



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj80.03.283>

RESEARCH ARTICLE

Альтернативне застосування деяких SSR ДНК маркерів у експериментальній мікології

Сергій М. БОЙКО 

Інститут еволюційної екології НАН України, вул. акад. Лебедева 37, Київ 03143, Україна

Адреса для листування: bsmbio@ukr.net

Реферат. Продемонстровано доцільність використання унікальних для *Schizophyllum commune* SSR ДНК маркерів у різних видів грибів для вирішення популяційно-генетичних питань. Для зразків *Auricularia auricula-judae* та *Irpex lacteus* спостерігали утворення гетерогенних ампліконів з довжиною переважно до 500 нп, що забезпечувало їхню високу роздільну здатність та полегшувало аналіз даних. Встановлені набори генетичних маркерів є ефективними для методу фінгерпринту ДНК видів *S. commune*, *I. lacteus*, *A. auricula-judae* і є перспективними для представників роду *Pleurotus*, але потребують подальшого розширення їхньої чисельності.

Ключові слова: генетичне профілювання, геномна ДНК, гетерогенність ампліконів, маркери ДНК, праймери, *Schizophyllum commune*

Вступ

Гриби трапляються в усіх екосистемах і демонструють велику різноманітність життєвих форм. Традиційно види грибів відокремлювали за морфологічними ознаками, однак значна мінливість таких ознак, в тому числі через субстратну приналежність та різноманітні умови зростання грибів, у багатьох випадках не дають однозначних результатів (Znidarsic, Pavko, 2001; Anusha et al., 2012). Наприклад, для *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. було виявлено вісім філогенетичних груп (Vilgalys, Sun, 1994), а для *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. — низку філогенетичних груп у Європі та Північній Америці (Johannesson, Stenlid, 2003). З розвитком молекулярних методів значно інтенсифікувався дослідницький процес у питаннях розуміння видового багатства, еколого-популяційного

різноманіття, з'явилась можливість з нових позицій оцінити стан генетичних ресурсів грибів та розробити шляхи їхнього збереження (Urbanelli et al., 2003; Klaassen, Osharov, 2007; Tra Bi et al., 2019; He et al., 2022).

Для вирішення більшості питань популяційної генетики використовуються генетичні маркери, які є вибірково нейтральними, відтворюваними, високоінформативними та недорогими. Ізоферменти, які мають достатню варіативність у локусах алозимів, були першими масово застосованими маркерами генотипування та залишаються потужним інструментарієм у вивченні різних аспектів біохімії та генетики грибів (Hamrick et al., 1986; Sharma et al., 1988; Huang et al., 1998; Lange, Schifino-Wittmann, 2000; Annesi et al., 2003; Boiko, 2018; Li et al., 2022). З розвитком ДНК технологій та збільшенням роздільної здатності сучасного обладнання

ARTICLE HISTORY. Submitted 21 January 2023. Revised 13 June 2023. Published 06 July 2023.

CITATION. Boiko S.M. 2023. An alternative application of some SSR DNA markers in experimental mycology. *Ukrainian Botanical Journal*, 80(3): 283–291. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj80.03.283>

This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ізоферментний аналіз поступився місцем різним модифікаціям ПЛР, які більш чутливі та пластичні у застосуванні. Молекулярні підходи, такі як AFLP (поліморфізм довжини ампліфікованого фрагмента), RAPD (поліморфізм випадкової ампліфікованої ДНК), ISSR (повтори між простими послідовностями ДНК), SSR (повтори простих послідовностей ДНК), SNP (поліморфізм одного нуклеотиду) та багато інших застосовують для розуміння структури популяцій грибів та їхнього генетичного різноманіття (Broders et al., 2011; Boiko, 2022; Lin et al., 2022; Liu et al., 2022; Singh et al., 2022). Але проблема полягає в тому, що для отримання дієвого результату та розробки відповідних генетичних маркерів майже завжди необхідна повна послідовність ДНК і, як мінімум, десятки зразків виду. Цей процес є складним, потребує чималих ресурсів, часу та кваліфікованого персоналу, що в підсумку формує "вузьке місце" у спробі реалізації наукових проєктів. Питання щодо застосування генетичних маркерів різних типів залишається відкритим, адже воно могло би значно зекономити час та здешевити дослідницький процес. Метод генетичного профілювання комерційно цінних об'єктів застосовується дуже часто як гарантія захисту інтелектуальних авторських прав. Несанкціоноване використання цінних організмів-продуцентів призводить до колосальних втрат та гальмування подальших розробок, тому пошук швидких і точних методів ідентифікації штаму/культури для гарантованого захисту прав правовласників є актуальним завданням (Foulongne-Oriol et al., 2011).

Саме тому метою нашої роботи було встановити придатність використання унікальних для гриба *S. commune* SSR ДНК маркерів для інших видів задля можливого їхнього застосування у вирішенні популяційно-генетичних питань експериментальної мікології.

Матеріали та методи

Об'єкти дослідження. Джерелом геномної ДНК були чисті культури грибів *Schizophyllum commune* Fr., *Irpex lacteus* (Fr.) Fr., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Pleurotus eryngii* (DC.) Qué., *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Qué., *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Daedalea quercina* (L.) Pers. (*Agaricomycetes*). Загалом було залучено 12 штамів, а саме:

Sc (*S. commune*), П-11, П-21, П-22 (*I. lacteus*), P-19 (*P. ostreatus*), Pe-1 (*P. eryngii*), A-7, A-8, A-9 (*A. auricula-judae*), Tv-13 (*T. versicolor*), Gl-2 (*G. lucidum*), та Dq-1 (*D. quercina*), що зберігаються в Інституті еволюційної екології НАН України.

Культивування грибів. Дослідні культури вирощували протягом 10 діб за температури 28 °С на рідкому глюкозо-пептоному середовищі такого складу (г × л⁻¹): глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; K₂HPO₄ — 0,4; MgSO₄ × 7H₂O — 0,5; ZnSO₄ × 7H₂O — 0,001; CaCl₂ — 0,05. Живильне середовище доводили до рН 5,0 та розливали по 25 мл у колби Ерленмейера ємністю 100 мл.

Виділення ДНК. Міцелій сепарували за допомогою вакуумної фільтрації. Виділення та очищення ДНК з міцелію або частини плодового тіла проводили за допомогою набору реагентів NeoPrep DNA (Неоген, Україна). Отримана ДНК зі свіжого біологічного матеріалу є високомолекулярною (до 40–50 тис. н.п.).

Проведення ПЛР. ПЛР проводили в об'ємі 50 мкл, що містив 25 мкл Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoFisher, США), 10 нг геномної ДНК, 0,2 мкМ кожного праймера. Ампліфікацію проводили у термоциклері SimpliAmp™ (ThermoFisher, США) за наступною програмою: первинна денатурація 3 хв за 95 °С, наступні 35 циклів денатурація 30 сек за 95 °С, гібридизація праймерів 30 сек за 56–59 °С, елонгація 1 хв за 72 °С (температуру гібридизації розраховували відповідно до рекомендації ThermoScientific DreamTaq GreenPCR Master Mix). Фінальна елонгація 5 хв за 72 °С. Розділення продуктів ампліфікації проводили в електрофоретичній камері з використанням 8% поліакриламідного гелю при 160 V протягом 60 хв у присутності 1% ТВЕ буферу. Гель-документування здійснювали за допомогою системи AlphaImager 2200 (Alpha Innotech, США). У роботі застосовано унікальний набір з 47 пар праймерів, що були розроблені для гриба *S. commune* (Boiko, 2022).

Обробка даних. Розміри фрагментів ДНК розраховували в програмному забезпеченні TotalLab TL 120 (Nonlinear Dynamics Ltd., Durham, USA) відповідно до стандартів довжини нуклеотидів, що були розділені разом із ампліконами. Для ієрархічної UPGMA кластеризації зразків використовували індекс подібності Дайса (також відомий як коефіцієнт Сьоренсена-Чекановського), який дозволяє аналізувати бінарні

Таблиця. 1. Утворення продуктів ПЛР з геномами різних видів грибів*
Table. 1. Formation of PCR products with genomes of different species of fungi*

Штам	mk4	mk33	mk88	mk90	mk93	mk168	mk197	mk239	mk383	mk488	mk506	mk543	mk566	mk625	mk736	mk832	mk965	mk978	mk1084	mk1102	mk1262	mk1330	mk1423	mk1445	mk1475	mk1637	mk1692
Dq-1	■			■	■																			■			
Gl-2	■			■	■															■					■		
A-8	■		■	■	■	■		■				■		■		■	■	■		■				■	■		
P-19	■	■		■	■	■	■	■				■		■		■				■	■		■	■	■		
Pe-1	■	■		■	■			■	■			■		■		■				■	■		■	■	■		
Il-11		■		■	■		■	■		■	■		■	■	■	■	■			■		■	■	■	■	■	■
Sc	■	■		■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Tv-13	■			■				■				■								■			■	■	■	■	■

продукт ПЛР спостерігається
 продукт ПЛР відсутній

* Позначення для штамів тут і на рис. 1–6. *Schizophyllum commune*: Sc; *Irpex lacteus*: Il-11, Il-21, Il-22; *Pleurotus ostreatus*: P-19; *P. eryngii*: Pe-1; *Auricularia auricula-judae*: A-7, A-8, A-9; *Trametes versicolor*: Tv-13; *Ganoderma lucidum*: Gl-2; *Daedalea quercina*: Dq-1.

дані (відсутність/наявність). Аналіз головних компонентів (PCA) використовували для візуалізації ступеня відмінності досліджуваних видів грибів за різноманітністю наявних продуктів ПЛР (Jackson, 1993; Ilin, Raiko, 2010).

Результати та обговорення

Застосування набору із 47 пар, специфічних для *S. commune* праймерів ДНК до групи дослідних культур, дозволило встановити суттєве розмаїття у здатності утворювати продукти ПЛР. Була виокремлена група з двадцяти семи маркерних локусів, до яких можна було спостерігати чітке утворення ампліконів. У табл. 1 наведено дані щодо наявності продукту реакції до кожного з маркерів (без урахування їхньої кількості) для досліджених видів грибів. Чисельність ампліконів та їхня довжина відіграють значну роль при порівнянні зразків у межах виду.

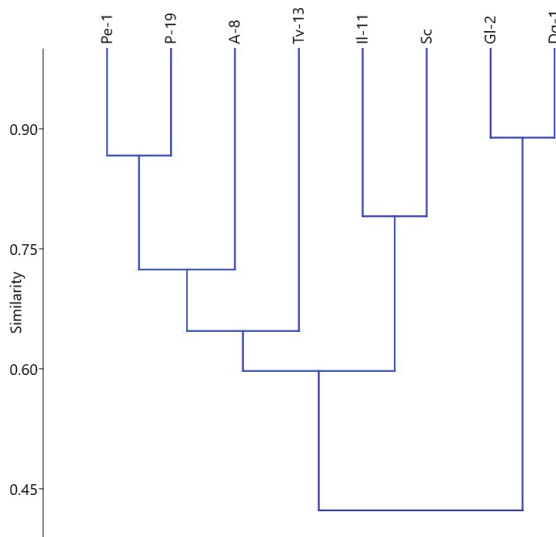
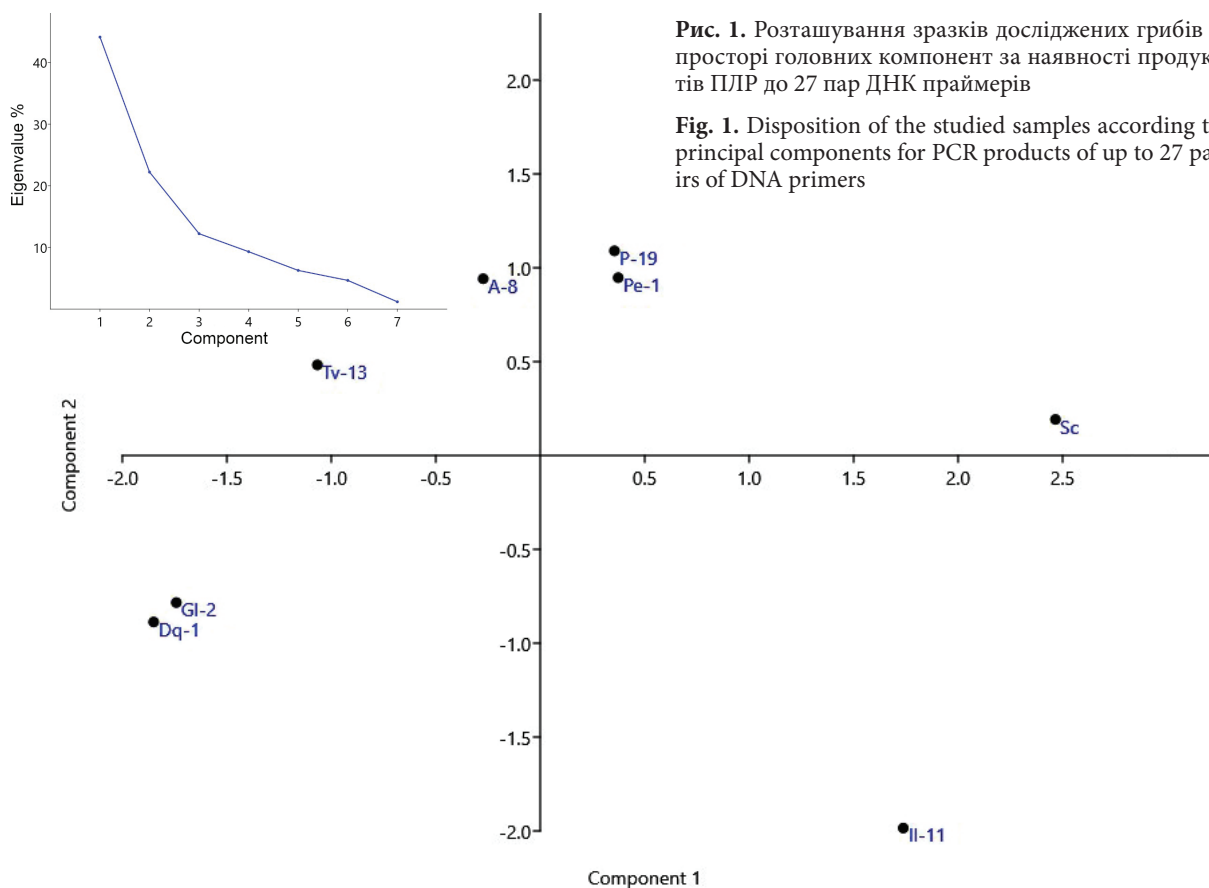
Бачимо, що різні види грибів по різному реагують на застосований набір праймерів, що є свідченням їхньої генетичної розмежованості. Так, найменшу кількість ДНК маркерів (4 та 5), що утворювали амплікони, виявлено для культур Dq-1 *D. quercina* та Gl-2 *G. lucidum* відповідно, а найбільшу (за виключенням *S. commune*, до якого саме маркери розроблялися) кількість (18) культура Il-1 *I. lacteus*.

Метод PCA дозволив нам розташувати у просторі головних компонент досліджені культури. Встановлено суттєвий внесок першої (44,1%) та чималий другої (22,2%) компонент у диференціацію грибів на основі продуктів ПЛР (рис. 1). Саме за першою компонентою спостерігається подібність між грибами *I. lacteus* і *S. commune* та їхня принципова віддаленість від групи *D. quercina*, *G. lucidum*. За другою компонентою суттєво різнилась від *I. lacteus* група зразків *P. ostreatus*, *P. eryngii* та *A. auricula-judae*.

Застосувавши ієрархічну кластеризацію, вдалося виділити два чіткі кластери. Перший формується культурами Sc *S. commune*, Il-11 *I. lacteus*, P-19 *P. ostreatus*, Pe-1 *P. eryngii*, A-8 *A. auricula-judae*, Tv-13 *T. versicolor*, другий – Gl-2 *G. lucidum* та Dq-1 *D. quercina* (рис. 2). У першому кластері спостерігаємо відокремлення культур Sc *S. commune* та Il-11 *I. lacteus*.

Слід зауважити, що амплікони, синтезовані до деяких генетичних локусів, для різних видів грибів мали однакову довжину (рис. 3, вказано стрілками), що може свідчити про їхню ідентичність та консервативність певних ділянок ДНК, принаймні в межах *Agaricomycetes*.

До таких маркерів належать mk4_Ru_X21_S81, mk90_Ru_X21_S81, mk93_USA14-25S64 та mk1445_USA_14-25S64, які у геномі гриба



S. commune кодують мікросателіти $(GA)_8$, $(CT)_5$, $(CTC)_5$ та $(CTC)_5$, відповідно.

Таким чином, застосований набір ДНК маркерів, розроблений для розмежування штамів у межах *S. commune*, показав свою придатність для розмежування культур грибів різних видів.

Залишається відкритим питання про ефективність використаних маркерів з метою розрізнення між собою зразків у межах одного виду. Для цього було розширено досліджені групи штамів у межах видів *A. auricula-judae* (A-7, A-8, A-9) та *I. lacteus* (Il-11, Il-21, Il-22). Застосовували лише ті ДНК маркери, що утворювали продукти ПЛР (табл. 1) та дозволяли фіксувати на електрофореграмах чіткі амплікони. На рис. 4 наведено приклади синтезованих ампліконів до локусів геному культур *A. auricula-judae*. Як і для зразків виду *I. lacteus* (рис. 5), основна частка гетерогенних ампліконів припадає на діапазон до 500 н.п. (позначені стрілками), що добре відбивається на їхній роздільній здатності та полегшує подальший аналіз даних.

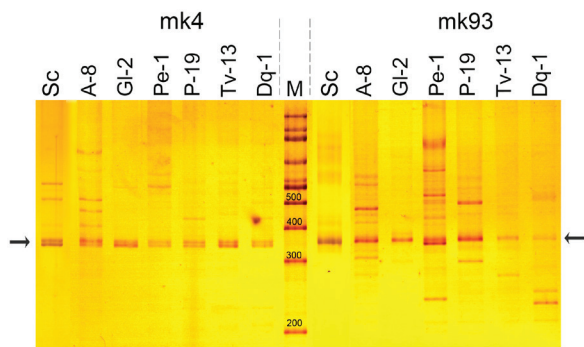


Рис. 3. Продукти ПЛР ДНК маркерів mk4_Ru_X21_S81 та mk93_USA14-25S64 до геномів досліджених грибів

Fig. 3. PCR products of DNA markers mk4_Ru_X21_S81 and mk93_USA14-25S64 to genomes of the studied fungi

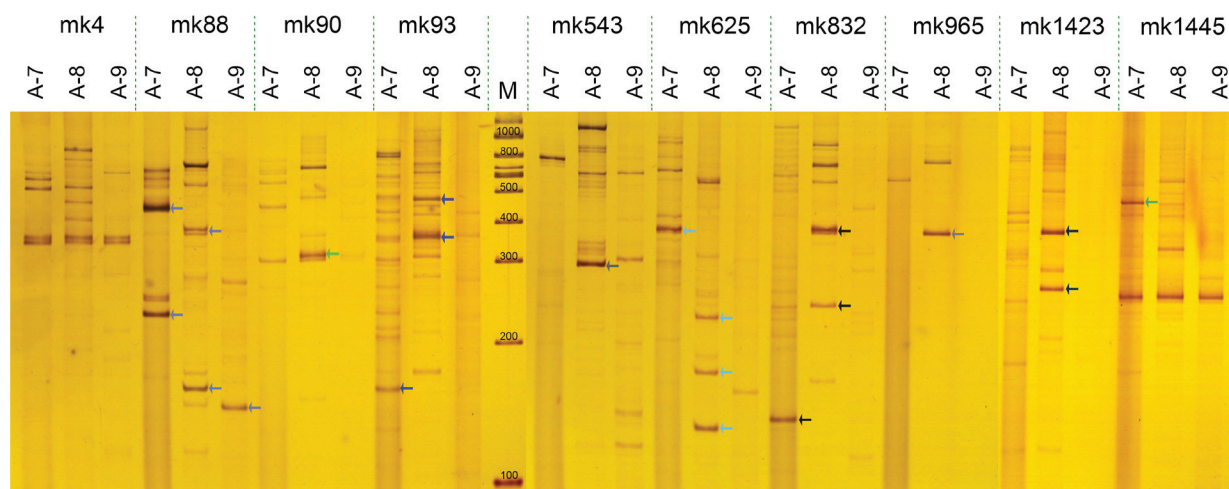


Рис. 4. Амплікони, утворені в результаті ПЛР з ДНК культур гриба *Auricularia auricula-judae* (стрілками позначено гетерогенні амплікони)

Fig. 4. Amplicons formed as a result of PCR of DNA of the strains of *Auricularia auricula-judae* (heterogeneous amplicons are indicated by arrows)

Загалом для *A. auricula-judae* було відзначено 11 генетичних локусів, що синтезували амплікони різної довжини (mk4_Ru_X21_S81, mk88_Ru_X21_S81, mk90_Ru_X21_S81, mk168_USA14-25S64, mk543_USA14-25S64, mk625_Ru_X21_S81, mk832_USA14-25S64, mk965_USA14-25S64, mk978_Ru_X21_S81, mk1423_USA14-25S64, mk1445_USA14-25S64). Для *I. lacteus* така кількість маркерів становила 16 (mk39_USA14-25S64, mk90_Ru_X21_S81, mk93_USA14-25S64, mk197_USA14-25S64, mk239_USA14-25S64, mk488_USA14-25S64, mk506_USA14-25S64, mk566_Ru_X21_S81, mk625_Ru_X21_S81, mk736_USA14-25S64, mk965_USA14-25S64, mk1084_Ru_X21_S81, mk1262_USA14-25S64, mk1330_USA14-25S64, mk1475_Ru_X21_S81, mk1692_USA14-25S64). Лише три ДНК

маркери були загальними для обох видів грибів (mk90_Ru_X21_S81, mk625_Ru_X21_S81, mk965_USA14-25S64), що в черговий раз вказує на їхню філогенетичну розмежованість.

Враховуючи отриману інформацію, було проведено генетичне профілювання активного продуцента целюлаз штаму *I. lacteus* П-11, який є біотехнологічно цінним об'єктом (Voiko, 2021; Voiko et al., 2023). Для цього використовували набір ДНК праймерів, які утворювали амплікони з геномною ДНК (табл. 1). Утворені амплікони мали довжину переважно від 118 до 462 н.п. (рис. 6).

До уваги брали тільки чіткі амплікони з високою концентрацією. Десять маркерів були мноморфними та шість утворювали по два амплікони. Характеристики праймерів та розмір

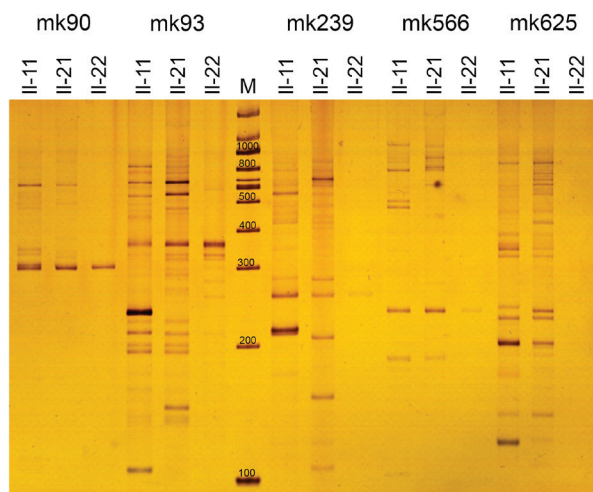


Рис. 5. Амплікони, утворені в результаті ПЛР з ДНК культур гриба *Irpex lacteus* (стрілками позначено гетерогенні амплікони)

Fig. 5. Amplicons formed as a result of PCR of DNA of the strains of *Irpex lacteus* (heterogeneous amplicons are indicated by arrows)

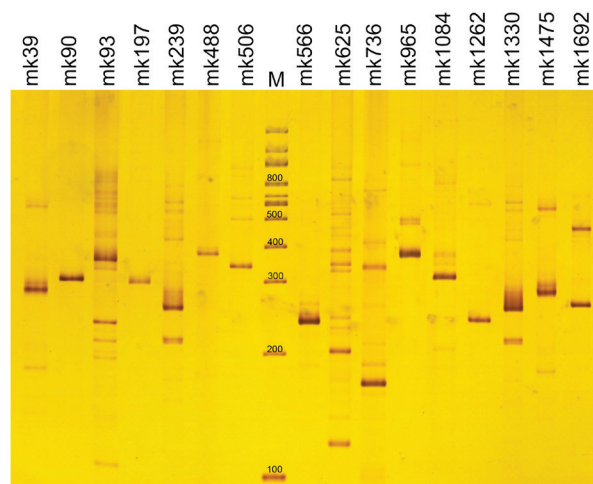


Рис. 6. Генетичне профілювання активного продуцента целюлази штаму Il-11 *Irpex lacteus*

Fig. 6. Genetic profiling of the cellulase-producing strain Il-11 of *Irpex lacteus*

синтезованих ампліконів представлені у табл. 2. Загалом для геному Il-11 *I. lacteus* вдалось виявити 22 ділянки ДНК, до яких було синтезовано відповідні амплікони, що є чіткими маркерними ознаками штаму. Отримані результати дозволили забезпечити ефективну ідентифікацію штаму

Il-11 *I. lacteus*, що є складовою паспорту біотехнологічно цінного об'єкту.

Незважаючи на те, що за основу дослідження було взято SSRs ДНК маркери для *S. commune*, отримані дані цілком підтверджують спроможність їхнього використання для інших видів. Звісно, стосовно зразків інших видів не може йти мова про їхню приналежність до мікросателітної ДНК. Можливо, більш доречно віднести їх до типу RAPD маркерів, але із суттєвими застереженнями. Адже класичний RAPD аналіз використовує короткі праймери, що складаються з випадкових послідовностей, зазвичай розміром 8–10 нуклеотидів (Williams et al., 1990; Welsh, McClelland, 1990), в результаті чого синтезується суміш складних патернів, що ускладнює їхню інтерпретацію та створює проблеми під час оцінки електрофоретичних зображень. Відмічаються суттєві труднощі з повторюванням результатів дослідів різними лабораторіями. Однак незважаючи на великі проблеми цього методу ПЛР, його продовжують широко застосовувати як для генетичної ідентифікації зразків (Wyss, 1996; Stefańska et al., 2022; Valencia-Ledezma et al., 2022), так і в популяційних дослідженнях (Czyżewska et al., 2018; García-Béjar et al., 2021; Wojciechowska-Koszko et al., 2022).

У нашому варіанті ПЛР залишаються всі позитивні сторони SSR маркерів та відсутні недоліки RAPD методу, а саме, застосовуються пари праймерів з довжиною 20 н.п. кожний, що в разі підвищує їхню специфічність та значно зменшує кількість утворених ампліконів. Крім того, не виникає жодних проблем з повторюваністю дослідів та набагато полегшується аналіз отриманих патернів. Єдине відкрите питання, як і у RAPD, — це розташування ампліфікованої послідовності у геномі певного виду гриба, але воно не є критичним у питаннях популяційного рівня. За потреби це вирішується повним секвенуванням геному необхідного зразка. Для вирішення популяційно-генетичних проблем виду необхідно у середньому п'ять ДНК маркерів для ідентифікації 50% генотипів, 14 маркерів для ідентифікації 90% генотипів і 25 маркерів для ідентифікації 99% генотипів (Fu et al., 2014). Враховуючи це, запропоновані набори генетичних маркерів лише частково задовольняють таким вимогам і потребують подальшого їхнього розширення для кожного виду. В той же час, в

Таблиця 2. Послідовності ПЛР-праймерів до унікальних локусів геному *Irpex lacteus* II-11 та розмір синтезованих ампліконівTable 2. Sequences of PCR primers to unique loci of II-11 *Irpex lacteus* genome and length of the synthesized amplicons

№	ID маркера	Послідовність лівого праймера	Послідовність правого праймера	Орієнтовний розмір ампліконів
1	mk39gen_USA_14-25_S64	TATAGCTGGTGCACGGACTG	CGAGATTGATAAGGGGCAAA	289
2	mk90spRU_Rus_X-21_S81	TCGTCCCCGACTATCATCTC	TAGGCCTGTTGTACGGCTTC	312
3	mk93spUS_USA_14-25_S64	CCTGACCACTCCATCATCCT	GAGACAGTTCGGCCGTCTAC	231
4	mk197spec_USA_14-25_S64	CATGTCTACCATGCCTGTGC	CGCATTCAGACTATCCGTCA	362
5	mk239spUS_USA_14-25_S64	CACAAGGACCAGGGCTACAT	GTTCACTGACTCGCCCTCTT	309
6	mk488gen_USA_14-25_S64	CTTCCTCTCCGTGATCGACT	CAAAACAGTCATCGGACACC	208
7	mk506spUS_USA_14-25_S64	GAGAACCACCGGAAGGTGT	TTCCTGACTCGCCCTCTTC	253
8	mk566spRU_Rus_X-21_S81	CTCCGCACCATAGGAGTGT	ACCGACGAGGAGATAGAGCA	376
9	mk625spRU_Rus_X-21_S81	CGCAATAGCTCACCTTCCTC	GCGCAGGTCGTAGTAGAAGC	347
10	mk736spUS_USA_14-25_S64	CGCGCTACATCGTCTACACC	ATCCTCCTGCACCTGCTCT	233
11	mk965spUS_USA_14-25_S64	CGTCTCCCAGAACTTTGAGC	TCATGTCCAACAAGGCCATA	118
12	mk1084spRU_Rus_X-21_S81	TGGACACATGTAGGCGTTGT	AAGCCACCTATGCGAGAAGA	194
13	mk1262gen_USA_14-25_S64	TTTCCCACGCTAATCCTCAC	ATACCCATGCGAATTCTTGG	156
14	mk1330spUS_USA_14-25_S64	GTTCCTGACTCGCCCTCTT	CACAAGGACCAGGGCTACAT	348
15	mk1475gen_Rus_X-21_S81	CGAGATTGATAAGGGGCAAA	TATAGCTGGTGCACGGACTG	376
16	mk1692gen_USA_14-25_S64	CGATACAATGCACACCCAAC	AGCGCTCTATCGCAAGGTTA	320
				236
				208
				255
				287
				262
				462

питаннях застосування технології фінгерпринту ДНК для цінних мікологічних зразків вони цілком достатні для видів *S. commune*, *I. lacteus* та *A. auricula-judae*. З огляду на отримані результати є перспектива їхнього застосування і до представників роду *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm.

Висновки

Отже, за результатами роботи доведено придатність використання генетичних маркерів, розроблених для *S. commune*, з метою розмежування культур грибів різних видів. Для *A. auricula-judae* визначено 11, а для *I. lacteus* — 16 ДНК локусів, до яких в результаті ПЛР утворюються чіткі амплікони різної довжини. Створені

набори генетичних маркерів частково відповідають вимогам до вирішення популяційно-генетичних питань і потребують подальшого розширення їхньої чисельності. Для активного продуцента целюлаз штаму *Irpex lacteus* II-11 було проведено генетичне профілювання, яке дозволило синтезувати 22 унікальні амплікони.

Дотримання етичних норм

Автор повідомляє про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

ORCID

С.М. Бойко:  <https://orcid.org/0000-0001-5321-6313>

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Annesi T., Coppola R., Motta E. 2003. Isozyme analysis on some wood decay fungi. *Journal of Plant Pathology*, 85(2): 87–90.
- Anusha N.C., Umikalsom M.S., Ling T.C., Ariff A.B. 2012. Relationship between fungal growth morphologies and ability to secrete lipase in solid state fermentation. *Asian Journal of Biotechnology*, 4: 15–29. <https://doi.org/10.3923/ajb-kr.2012.15.29>
- Boiko S.M. 2018. Pool of endoglucanase genes in *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. (*Basidiomycetes*) on the territory of Ukraine. *Acta Biologica Szegediensis*, 62(1): 53–59. <https://doi.org/10.14232/abs.2018.1.53-59>
- Boiko S. 2021. Optimization of the catalytic process and increase of the *Irpex lacteus* cellulases yield for saccharification. *Bioresource Technology Reports*, 15: 100780. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100780>
- Boiko S.M. 2022. Identification of novel SSR markers for predicting the geographic origin of fungus *Schizophyllum commune* Fr. *Fungal Biology*, 126(11–12): 764–774. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.09.005>
- Boiko S., Netsvetov M., Radchenko V. 2023. Cellulose biosaccharification by *Irpex lacteus* wood decay fungus. *Maderas-Ciencia y Tecnologia*, 25: 1–20. <https://revistas.ubiobio.cl/index.php/MCT/article/view/5912>
- Broders K.D., Woeste K.E., San Miguel P.J., Westerman R.P., Boland G.J. 2011. Discovery of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the uncharacterized genome of the ascomycete *Ophiognomonium clavignenti-juglandacearum* from 454 sequence data. *Molecular Ecology Resources*, 11(4): 693–702. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02998.x>
- Czyżewska U., Bartoszewicz M., Siemieniuk M., Tylicki A. 2018. Genetic relationships and population structure of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with otitis externa and healthy dogs. *Mycologia*, 110(4): 666–676. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1495981>
- Foulongne-Oriol M., Rodier A., Caumont P., Spataro C., Savoie J.M. 2011. *Agaricus bisporus* cultivars: Hidden diversity beyond apparent uniformity? In: *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. Vol. 2. Arcachon, France: INRA, pp. 9–16. Available at: <https://hal.inrae.fr/hal-02748163>
- Fu N., Wang P.Y., Liu X.D., Shen H.L. 2014. Use of EST-SSR markers for evaluating genetic diversity and fingerprinting celery (*Apium graveolens* L.) cultivars. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(2): 1939–1955. <https://doi.org/10.3390/molecules19021939>
- García-Béjar B., Árevalo-Villena M., Briones A. 2021. Characterization of yeast population from unstudied natural sources in La Mancha region. *Journal of Applied Microbiology*, 130(3): 650–664. <https://doi.org/10.1111/jam.14795>
- Hamrick J.L., Lichtwardt R.W., Lan C. 1986. Levels of isozyme variation within and among *Histoplasma capsulatum* localities. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 89(1–2): 49–56.
- He Y., Chen J., Tang C., Deng Q., Guo L., Cheng Y., Li Z., Wang T., Xu J., Gao C. 2022. Genetic diversity and population structure of *Fusarium commune* causing strawberry root rot in southcentral China. *Genes*, 13(5): 899. <https://doi.org/10.3390/genes13050899>
- Huang H., Dane F., Kubisiak T. 1998. Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the American chestnut (*Fagaceae*). *American Journal of Botany*, 85(7): 1013.
- Ilin A., Raiko T. 2010. Practical approaches to Principal Component Analysis in the presence of missing values. *Journal of Machine Learning Research*, 11: 1957–2000.
- Jackson D.A. 1993. Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology*, 74(8): 2204–2214. <https://doi.org/10.2307/1939574>
- Johannesson H., Stenlid J. 2003. Molecular markers reveal genetic isolation and phylogeography of the S and F intersterility groups of the wood-decay fungus *Heterobasidion annosum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(1): 94–101. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(03\)00087-3](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00087-3)
- Klaassen C.H.W., Osharov N. 2007. Aspergillus strain typing in the genomics era. *Studies in Mycology*, 59: 47–51. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.06>
- Lange O., Schifino-Wittmann M.T. 2000. Isozyme variation in wild and cultivated species of the genus *Trifolium* L. (*Leguminosae*). *Annals of Botany*, 86(2): 339–345. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1190>
- Li G., Wang Y., Zhu P., Zhao G., Liu C., Zhao H. 2022. Functional characterization of laccase isozyme (PoLcc1) from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* involved in lignin degradation in cotton straw. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21): 13545. <https://doi.org/10.3390/ijms232113545>
- Lin P., Yan Z.F., Kook M., Li C.T., Yi T.H. 2022. Genetic and chemical diversity of edible mushroom *Pleurotus* species. *BioMed Research International*, Article ID 6068185. <https://doi.org/10.1155/2022/6068185>
- Liu J.H., Ding F.H., Song H.Y., Chen M.H., Hu D.M. 2022. Analysis of genetic diversity among Chinese *Cyclocybe chaxingu* strains using ISSR and SRAP markers. *PeerJ*, 10: e14037. <https://doi.org/10.7717/peerj.14037>
- Sharma S., Sandhu D.K., Bagga P.S. 1988. Isozyme polymorphism of beta-glucosidase in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Genetics*, 26(5–6): 331–342.
- Singh K.N., Rawat S., Kumar K., Agarwal S.K., Goel S., Jagannath A., Agarwal M. 2022. Identification of significant marker-trait associations for *Fusarium* wilt resistance in a genetically diverse core collection of safflower using AFLP and SSR markers. *Journal of Applied Genetics*, 63(3): 447–462. <https://doi.org/10.1007/s13353-022-00694-z>

- Stefańska I., Kwiecień E., Górzynska M., Sałamaszyńska-Guz A., Rzewuska M. 2022. RAPD-PCR-based fingerprinting method as a tool for epidemiological analysis of *Trueperella pyogenes* infections. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(5): 562. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050562>
- Tra Bi C.Y., Amoikon T.L.S., Kouakou C.A., Noemie J., Lucas M., Grondin C., Legras J.L., N'guessan F.K., Djeni T.N., Djè M.K., Casaregola S. 2019. Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from traditional alcoholic beverages of Côte d'Ivoire. *International Journal of Food Microbiology*, 297: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.001>
- Urbanelli S., Della Rosa V., Fanelli C., Fabbri A.A., Reverberi M. 2003. Genetic diversity and population structure of the Italian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quèl and *P. ferulae* (DC.:Fr.) Quèl. *Heredity*, 90(3): 253–259. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800239>
- Valencia-Ledezma O.E., Castro-Fuentes C.A., Duarte-Escalante E., Frías-De-León M.G., Reyes-Montes M.D.R. 2022. Selection of polymorphic patterns obtained by RAPD-PCR through qualitative and quantitative analyses to differentiate *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(3): 296. <https://doi.org/10.3390/jof8030296>
- Vilgalys R., Sun B.L. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10): 4599–4603. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4599>
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24): 7213–7218. <https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Wojciechowska-Koszko I., Kwiatkowski P., Roszkowska P., Krasnodębska-Szponder B., Sławiński M., Gabrych A., Giedrys-Kalemba S., Dołęgowska B., Kowalczyk E., Sienkiewicz M. 2022. Genetic diversity of *Candida* spp. isolates colonizing twins and their family members. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(12): 1532. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121532>
- Wyss P. 1996. The use of RAPD for isolate identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 50: 199–207. <https://doi.org/10.1385/0-89603-323-6:199>
- Znidarsic P., Pavko A. 2001. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology*, 39(3): 237–252.

An alternative application of some SSR DNA markers in experimental mycology

S.M. BOIKO

Institute for Evolutionary Ecology National Academy of Sciences of Ukraine,
37 Lebedeva Str., Kyiv 03143, Ukraine

Abstract. The expediency of using unique SSR DNA-markers of *Schizophyllum commune* for population genetic assays in various fungal species has been demonstrated. In *Auricularia auricula-judae* and *Irpex lacteus*, we observed formation of heterogeneous amplicons mostly up to 500 bp in length that ensured their high resolution and facilitated data analysis. The established sets of molecular markers are efficient for DNA-fingerprinting of *S. commune*, *I. lacteus*, and *A. auricula-judae*, as well as are prospective for species of the genus *Pleurotus*, but need to be further enlarged.

Keywords: amplicons heterogeneity, DNA markers, genetic profiling, genomic DNA, primers, *Schizophyllum commune*