

На правах рукописи

ПОСТНОВА
Евгения Леонидовна

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИВИДОВОГО
ПОЛИМОРФИЗМА ШТАММОВ
Ganoderma lucidum
(W. Curtis:Fr.) P. Karst.

Специальность 03.00.24 – микология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2009

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель

кандидат биологических наук

Инсарова Ирина Давидовна

Официальные оппоненты

доктор биологических наук

Краснопольская Лариса Михайловна

доктор биологических наук

Терехова Вера Александровна

Ведущая организация

ФГОУ ВПО Пензенская государственная сельскохозяйственная академия

Защита диссертации состоится 15 мая 2009 года в 15:30 на заседании диссертационного совета

Д 501.001.46 при Биологическом факультете МГУ имени М.В.Ломоносова по адресу:

119992, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова,

Биологический факультет (аудитория М-1).

Т/факс: (495) 939-39-70

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан 15 апреля 2009 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



М.А. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Комплексный вид *Ganoderma lucidum* (W. Curtis:Fr.) P. Karst. объединяет внутривидовые группы, филогенетическая концепция которых до сих пор не разработана (Moncalvo, 2000; Wasser et al., 2006).

Значительные трудности при описании штаммов данного вида гриба по морфологии и культуральным свойствам вызваны их высокой степенью вариабельности в зависимости от условий культивирования (Seo, Kirk, 2000). Представители данной группы грибов являются объектом пристального внимания многих исследователей. Прежде всего это связано с поиском биологически активных веществ, нашедших широкое применение в медицине и фармакологии. *Ganoderma lucidum* – безусловный лидер среди целебных грибов Востока. В Китае уже в течение двух тысяч лет этот гриб эффективно используют для лечения различных заболеваний (Stamets, 1993; Chang, Miles, 2004; Wasser et al., 2006). В нашей стране также предпринимаются попытки создания биологически активных добавок на основе базидиом и мицелия, полученного методом погруженного культивирования (Краснопольская с соавт., 2003; Автономова, 2006).

Использование афиллофороидных базидиомицетов в масштабах промышленного культивирования подразумевает строгий биологический контроль материала. Однако многие авторы отмечают, что большой процент штаммов, применяемых в народной медицине стран Азии и Востока и описанных как *G. lucidum*, ошибочно относят к данному виду, а характеристика изолятов, ограниченная лишь описанием морфологии базидиом и вегетативной стадии, недостаточна и часто не может быть удовлетворительной (Hseu et al., 1996; Buchanan, 2001).

Высокая гетерогенность комплексного вида *G. lucidum* была подтверждена и современными молекулярными методами (Moncalvo et al., 1995; Hseu et al., 1996; Buchanan, 2001). Молекулярно-филогенетический анализ американских, азиатских и европейских коллекций *G. lucidum* с использованием маркеров рДНК позволил выделить несколько внутривидовых групп (Moncalvo, 2000). Однако отсутствие корреляции между филогенией по рДНК и разделением комплекса *G. lucidum* по морфологическим признакам вынуждает продолжать поиск молекулярных маркеров, способных стать исчерпывающим критерием при описании штаммов.

Цель работы.

Исследовать штаммы комплексного вида *Ganoderma lucidum* с использованием различных подходов и выявить признаки, значимые для характеристики внутривидовых групп.

Задачи.

1. Изучить морфологию вегетативной стадии штаммов *G. lucidum* (макро- и микроморфологию мицелия).
2. Исследовать способность штаммов *G. lucidum* к плодоношению в искусственных условиях.
3. Провести анализ вегетативной несовместимости и репродуктивной изоляции штаммов *G. lucidum*.
4. Изучить изоферментный и RAPD-полиморфизм штаммов *G. lucidum*.
5. Оценить значимость использованных методов для характеристики внутривидовых групп *G. lucidum*.

Научная новизна.

Впервые проведен детальный сравнительный анализ внутривидового разнообразия штаммов *G. lucidum* различного географического происхождения на основе морфологических, генетических, биохимических и молекулярных признаков.

Показано, что культурально-морфологические признаки штаммов *G. lucidum*, относящихся к различным интерстерильным группам, несмотря на репродуктивный барьер, четко не дифференцированы.

Использованный в RAPD-анализе набор праймеров подтвердил правомочность выделения интерстерильных групп внутри вида *G. lucidum*. С помощью RAPD-маркеров впервые был выявлен ДНК-фрагмент, специфичный для вида *G. lucidum*.

Показано, что модификация субстрата для культивирования *G. lucidum* путем добавления дрожжевого экстракта оказывает стимулирующее влияние на плодообразование.

Практическая значимость.

Полученные в настоящем исследовании результаты важны для понимания внутривидовой структуры комплексного вида *G. lucidum*.

Поскольку использованные в данной работе штаммы *G. lucidum* обладают противоопухолевой и антибактериальной активностью (Краснопольская с соавт., 2003; Автономова, 2006), выяснение внутривидового статуса данных штаммов *G. lucidum* не только обеспечит возможность сравнения с другими

известными штаммами, но и позволит описать новые источники биологически активных веществ.

При поверхностном культивировании на агаризованных средах обнаружена и исследована способность некоторых штаммов к образованию атипичных плодовых тел, формирующих жизнеспособные базидиоспоры. Поскольку культивирование базидиом данного ксилотрофного базидиомицета – длительный и трудоемкий процесс, получение генетического материала непосредственно на чашках Петри имеет немаловажное прикладное значение.

Предложен состав субстрата, позволяющий сократить сроки плодообразования, что важно для разработки методов культивирования базидиом штаммов *G. lucidum*.

Апробация работы.

Результаты исследований были доложены на конференциях: конференция, посвященная 85-летию кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В.Ломоносова (Москва, 2004); Юбилейная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения М.В. Горленко (Москва, 2008); «Современная микология в России» Второй съезд микологов России (Москва, 2008); на заседаниях кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В.Ломоносова.

Публикация результатов работы.

По теме диссертации опубликовано семь работ, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 111 страницах, содержит 19 таблиц и 32 рисунка. Список литературы включает 123 наименования, из них 87 зарубежные.

Благодарности автора

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к. б. н. Инсаровой И. Д. за внимание и общее руководство работой. Сотрудникам кафедры микологии и альгологии к. б. н. Сколотневой Е. С. за помощь, оказанную при проведении RAPD-анализа, н. с. Завьяловой Л. А. и д.б.н. Камзолкиной О. В. за помощь и советы в работе, Гололобовой М. А, Ворониной Е. Ю. Глубокая признательность всему коллективу кафедры микологии и альгологии за постоянную поддержку и внимание.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе приведены сведения об истории изучения и практической значимости вида *G. lucidum*, проанализированы данные о подходах, используемых в современной систематике видов рода *Ganoderma* (генетических, биохимических и молекулярных).

Глава 2. Материалы и методы

Объекты исследования.

Объектами исследования были 9 дикариотических природных изолятов *G. lucidum* различного географического происхождения; 3 дикариотических изолята, выделенных тканевым методом из полученных в ходе работы базидиом; 3 дикариотических изолята, полученных при проращивании хламидоспор; 12 монокариотических штаммов, полученных из споровых отпечатков тех же базидиом. В ряде опытов для сравнения исследовали 2 штамма *G. applanatum* (Pers.) Pat. (табл.1). Все штаммы находятся в коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В.Ломоносова.

Методы исследования

Выделение чистых культур. 1) Дикариотические мицелиальные культуры выделяли тканевым методом из базидиом, полученных интенсивным методом культивирования. 2) Одиночные хламидроспоры, изолированные микроманипулятором, проращивали на суло-агаре и получали моноспоровые дикариотические культуры. 3) Монокариотические культуры получали из споровых отпечатков путем последовательных разведений споровых суспензий с последующим рассевом на чашки Петри содержащие суло-агар.

Морфология. Морфологию колоний дикариотических и монокариотических штаммов изучали на культурах, выращенных при температуре 25°C на агаризованном сусле (4° по Баллингу). Описание колоний вели с использованием критериев Р. Сталперса (Stalpers, 1978).

Определение скорости роста. Изучение скорости роста штаммов проводили на чашках Петри диаметром 9 см на среде суло-агар 4° по Баллингу. Диаметр колонии измеряли один раз в сутки в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Для установления температурных максимумов и оптимумов, засеянные чашки Петри инкубировали при температуре 20°C, 25°C, 30°C, 40°C.

Таблица 1. Объекты исследования

Штамм	Способ выделения (ядерный статус)	Год выделения/год поступления в коллекцию	Место выделения
GL2	Культура ткани (n+n)	1998/1999	Кавказ
GL2re	Культура ткани (n+n)	2002	Москва
GL2chl	Моноспоровый изолят (n+n)	2002	Москва
GL3	Культура ткани (n+n)	1999/1999	Корея
GL4	Культура ткани (n+n)	---/2000	Франция
GL4re	Культура ткани (n+n)	2002	Москва
GL4chl	Моноспоровый изолят (n+n)	2002	Москва
GL4m1	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL4m2	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL4m6	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL4m7	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL5	Культура ткани (n+n)	---/2001	США
GL5re	Культура ткани (n+n)	2002	Москва
GL5chl	Моноспоровый изолят (n+n)	2002	Москва
GL6	Культура ткани (n+n)	2001/2001	Моск. обл.
GL7	Культура ткани (n+n)	1998/1998	Моск. обл.
GL8	Культура ткани (n+n)	2003/2004	Кавказ
GL8m1	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL8m3	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL8m5	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL8m9	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL9	Культура ткани (n+n)	2003/2004	Кавказ
GL9m1	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL9m2	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL9m4	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL9m7	Моноспоровый изолят (n)	2007	Москва
GL927	Культура ткани (n+n)	1961/2008	Австрия
G.APP926	Культура ткани (n+n)	1930/2008	Великобритания
G.APP632	Культура ткани (n+n)	1991/2008	Моск. обл.

Условные обозначения: GL- *G. lucidum*, GL2chl- моноспоровые изоляты, полученные при проращивании хламидоспор, GL2re- штаммы, изолированные из плодовых тел тканевым методом, GL4m1- моноспоровые монокариотические культуры. G.APP- *G. applanatum*, «---»- неизвестно

GL2 - природные
штаммы

Культивирование. Выгонку плодовых тел проводили согласно методике, разработанной непосредственно для *G. lucidum* (Stamets, 1993). В качестве субстрата использовали: дубовые опилки, лузгу, смесь дубовых опилок и лузги в соотношении 1:1. Кроме того, была опробована собственная модификация состава субстрата: к дубовым опилкам добавляли дрожжевой экстракт в количестве 0.5-1.0% от сухой массы субстрата.

Тесты на вегетативную несовместимость. Анализ вегетативной несовместимости природных изолятов *Ganoderma* spp. проводили на чашках Петри с сусло-агаром путем попарного сращивания дикариотических штаммов между собой во всех возможных комбинациях (Штаер, 2006)

Тесты на половую несовместимость. Принадлежность изолятов к интерстерильным группам и определение типов спаривания (факторов половой совместимости) проводили методами *мон-мон*- и *ди-мон*-скрещиваний (Egger, 1978).

Сканирующая электронная микроскопия. Мицелий на блоке с агаром фиксировали в парах осмия (Камзолкина, 1996). После высушивания образцы напыляли смесью платина/палладий (IB-3 Coater) и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) «Hittachi» S-405A.

Окраска ядерного аппарата. Окраску ядерного аппарата производили с использованием раствора ДАПИ по стандартной методике (Камзолкина, 1996).

RAPD-PCR анализ. ДНК выделяли из мицелия, полученного при культивировании на жидком 1,5% сусле на 10-е сутки роста по методике DiatomTM DNA Prep 100, Биоком. Реакцию амплификации геномной ДНК проводили на программируемом термоциклере марки «Терцик» 1-й модели. Для проведения реакций амплификации использовали готовые наборы для амплификации «PCR-core», Биоком. Для RAPD-PCR анализа образцов были использованы пять олигонуклеотидных праймеров, Синтол: R1 (5'-TGCCGAGCTG-3'), R2 (5'-AGTCAGCCAC-3'), R3 (5'-AATCGGGCTG-3'), R4 (5'-GAAACGGGTG-3'), R5 (5'-GCGATCCCCA-3') (Hseu et al., 1996).

Электрофорез. Применяли метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) для пяти изоферментов: полифенолоксидаза (КФ:1.10.3.2), малатдегидрогеназа (КФ:1.1.1.37), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ:1.1.1.49), кислая фосфатаза (КФ:3.1.3.2), неспецифическая эстераза (КФ:3.1.1.2).

Кластерный анализ. Для обработки данных, полученных при анализе изоферментного и RAPD-полиморфизма, использовали метод кластерного анализа с невзвешенным попарным средним (UPGMA). Для расчета генетических дистанций и анализа с последующей оценкой достоверности использовали программу TREECON for Windows (version 1,3b).

Глава 3. Экспериментальная часть

Исследование морфологии и условий роста вегетативной стадии дикариотических природных изолятов *G. lucidum* и особенностей, связанных с плодообразованием

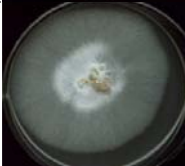
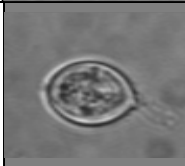
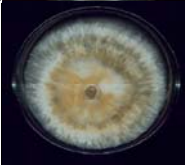
По макроморфологическим признакам, описанным с использованием критериев Р. Сталперса (Stalpers, 1978), установленным температурным оптимумам и максимумам, а также данным анализа скорости роста, исследованные штаммы относятся к трем морфологическим типам колоний (табл. 2).

1. Для первого типа (I) характерно: белая незональная колония в виде плотной пленки, поверхность колонии порошистая; инверзум белый, мицелий образует на стенках чашки Петри обильные тяжи. Температурный оптимум 30°C, максимум 35-37°C. Колонии быстрорастущие. К этому типу относятся штаммы: GL2 (Кавказ), GL4 (Франция), GL5 (США), GL8 (Кавказ), GL9 (Крым), GL927 (Австрия).

2. Для второго типа (II) характерно: белая зональная колония с желтовато-серым плотным центром; край прижатый, поверхность порошистая; инверзум в центре колонии светло-коричневый. Температурный оптимум 27-28°C, максимум 32-33°C. Колонии характеризуются средней скоростью роста. К данному типу принадлежит штамм GL3 (Корея).

3. Третий тип колоний (III) характеризовался твердой, плотной коркой, обычно темно-коричневой, иногда кремовой, с белыми секторами. Колонии медленно растущие, зональные, с концентрическими кругами разной структуры, поверхность колонии порошистая. Край колонии прижат, инверзум темно-коричневый. Температурный оптимум 25°C, максимум 31°C. К этому типу колоний принадлежат штаммы GL6 и GL7 из Московской области.

Таблица 2. Сравнительный анализ штаммов по морфологическим и культуральным признакам

Морфологический тип	Штамм	Внешний вид колоний	Скорость роста при 25°C	Наличие хламидоспор	Температурный максимум/ Температурный оптимум °C
I	GL2, GL4, GL5, GL8, GL9, GL927		Более 11 мм в сутки		34-37/30
II	GL3		9-11 мм в сутки		32-33/28
III	GL6, GL7		Менее 8 мм в сутки	нет	31/25

Общим микроморфологическим признаком для всех изученных штаммов было наличие воздушного кораллового мицелия с регулярно присутствующими пряжками (рис. 1а). У штаммов, относящихся к первому морфологическому типу (I), были обнаружены постоянно присутствующие многочисленные структуры на однородном мицелии в виде лимонovidных образований с толстыми стенками, сидящие на короткой ножке, в 1,5 – 2 раза превышающие по толщине мицелий (рис. 1б).

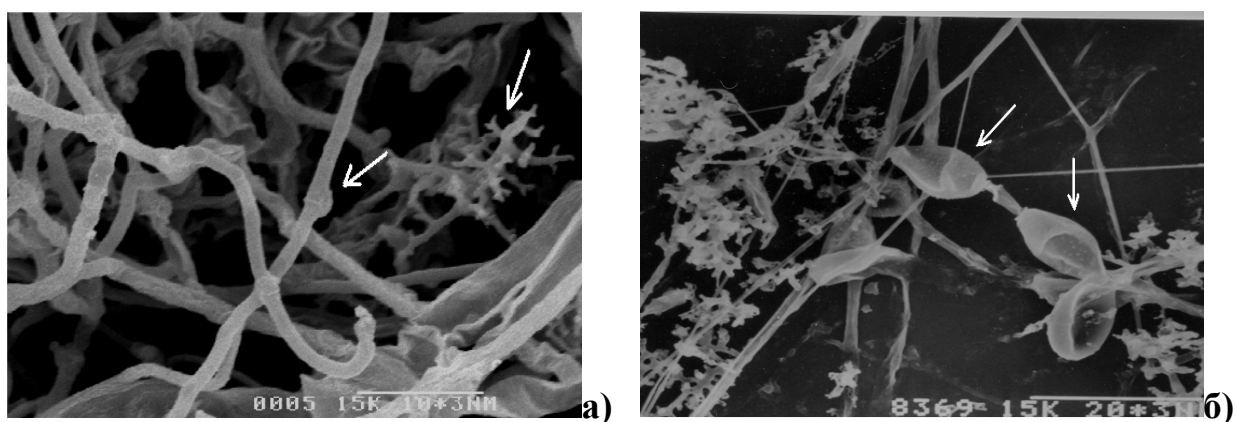


Рисунок 1. Микроморфология штаммов *G. lucidum*. Воздушный коралловидный мицелий с пряжками (а), хламидоспоры (б)

Эти структуры располагались как терминально, так и интеркалярно и полностью подходили под имеющееся в литературе описание хламидоспор афиллофороидных грибов (Решетников, 1991; Гарибова, 2000), в том числе, и непосредственно *G. lucidum*. Первое упоминание о наличии хламидоспор у *G. lucidum* приводится в работе Steygaert, 1967 (цитировано по Решетникову, 1991). У штамма из Кореи (GL3) такие структуры наблюдались единично, у штаммов из Московской области (GL6 и GL7) хламидоспоры не встречались (табл. 2).

С помощью микроманипулятора были изолированы одиночные хламидоспоры с мицелия трех штаммов (GL2chl, GL4chl, GL5chl). На сусло-агаре они прорастали на третьи сутки и давали типичный мицелий с пряжками.

Окраска ядерного аппарата хламидоспор раствором ДАПИ показала, что споры двуждерные.

При исследовании морфологии штаммов *G. lucidum* была выявлена способность чистых культур образовывать коралловидные плодовые тела на агаризованных средах (рис. 2а).



а)



б)

Рисунок 2. Коралловидные плодовые тела (а) и примордии (б)

Базидии и жизнеспособные базидиоспоры формировались в этом случае прямо на поверхности коралловидных плодовых тел (рис. 2а, 3а, б).

Аналогичные структуры отмечены в работе Сео и Шин (Seo, Shin, 1995) при исследовании штаммов *G. lucidum* из Кореи и Папуа Новой Гвинеи и были названы авторами атипичными плодовыми телами (АПТ). Анализ всей нашей коллекции показал, что базидии и базидиоспоры формировались прямо на поверхности АПТ штаммов из Кореи (GL3) и Крыма (GL9) (рис. 2а, 3а, 3б), а также на апикальных частях примордиев у штаммов с Кавказа (GL8) и из Франции (GL4) (рис. 2б).

Примордии штаммов GL2, GL5, и GL927 базидии и базидиоспоры не образовывали. Изученные штаммы *G. applanatum* атипичных плодовых тел не формировали.

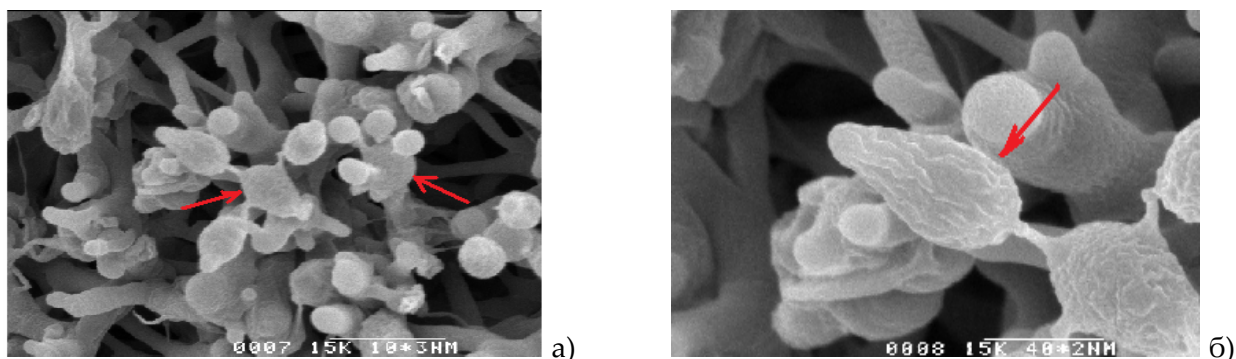


Рисунок 3. Базидии (а) и базидиоспоры (б), образованные АПТ штамма *G. lucidum* из Кореи (GL 3)

Исследование микроморфологии АПТ показало, что они сформированы вегетативными и скелетными гифами, а также кутикулярными клетками.

Установлено, что такие абиотические факторы, как освещенность, аэрация, pH и некоторые источники углеродного и азотного питания не влияют на способность к образованию АПТ, а, следовательно, данный признак может считаться штаммовым.

Наиболее надежным способом установления вида в культуре является идентификация нормально развитых типичных базидиом, образующихся при культивировании.

Плодовые тела получали по методике В. Стэйметса разработанной специально для *G. lucidum*. Были использованы четыре варианта субстрата: 1-лузга, 2- дубовые опилки, 3-смесь лузги и дубовых опилок в соотношении 1:1. Четвертый вариант представлял собой предложенную в данной работе модификацию, к дубовым опилкам был добавлен дрожжевой экстракт в количестве 0.5-1.0 % от сухой массы субстрата (табл. 3).

Для формирования плодовых тел наиболее благоприятным оказался четвертый вариант. Были не только получены базидиомы у штаммов, ранее не плодоносивших, но и сроки получения плодовых тел сократились на 5 - 10 суток. Следует отметить, что примордии были получены для всех штаммов.

**Таблица 7. Плодоношение на различных субстратах
(сутки)**

Штаммы	Опилки	Лузга	Опилки+лузга (1:1)	Опилки+дрож. экстракт
GL2	(35-38)	(40-45)	(40-45)	(29-34)
GL3	(37-40)	(45-50)	-	(32-36)
GL4	(35-40)	(37-49)	(35-40)	(30-33)
GL5	(34-45)	-	-	(30-35)
GL6	-	-	-	-
GL7	-	-	-	-
GL8	-	-	-	(30-35)
GL9	-	-	-	(30-35)
GL927	-	-	-	-

Типичные для вида лакированные веерообразные базидиомы получены у штаммов из Крыма (GL2), Кавказа (GL2, GL8) и США (GL5) (рис. 4а). Штамм из Франции (GL4) формировал консолевидные матовые базидиомы (рис. 4б). Штамм GL3 из Кореи образовывал базидиомы, именуемые в литературе «Оленьи рога» (Stamets, 1993) (рис. 4в).



Рисунок 4. Плодовые тела, полученные методом экстенсивного культивирования: а) лакированные базидиомы; б) матовые базидиомы; в) «оленьи рога»

Из полученных базидиом штаммов GL2, GL4, GL5 были реизолированы тканевым методом культуры и названы GL2re, GL4re, GL5re, морфология которых при дальнейшем изучении оказалась идентичной морфологии исходных штаммов.

Вегетативная несовместимость и репродуктивная изоляция штаммов

G. lucidum

Достоверное разграничение видов в современной микологии является сложнейшей проблемой, т. к. многие грибные популяции в природе представлены генетически сходными клонами, возникающими в результате бесполого размножения, причем клональную природу имеют и многие высшие базидиальные грибы, регулярно формирующие половые структуры (Шнырева с соавт., 2003).

Для установления генетических границ одной особи используют тест на вегетативную несовместимость, заключающийся в попарном сращивании дикариотических мицелиальных культур на агаризованных средах. Фенотипическим проявлением реакции вегетативной несовместимости считается мицелиальный валик или барраж, образующийся в зоне контакта культур.

Нами был проведен тест на вегетативную несовместимость дикариотических природных изолятов коллекции.

Наиболее сильный антагонистический ответ был отмечен при сращивании штаммов *G. lucidum* с двумя дикариотическими штаммами *G. applanatum* (рис. 5а). Менее сильная реакция вегетативной несовместимости отмечалась при сращивании штаммов *G. lucidum* между собой во всех возможных комбинациях (рис. 5б). И лишь в зоне контакта 2-х мицелиев, принадлежащих к одному штамму, активно образовывались анастомозы с последующим слиянием (рис. 5в).



Рисунок 5. Результаты теста на вегетативную несовместимость: антагонистические реакции - сильная (а), умеренная (б); совместимость (в)

Образование барража при сращивании внутри вида *G. lucidum* позволяет заключить, что исследуемые штаммы не являются клонами, а представляют собой генетически различные индивидуумы.

Показано, что генетическая эволюция многих грибов, приводящая к полной или частичной репродуктивной изоляции (интерстерильности), опережает морфологическую эволюцию, и зачастую некоторые морфологические виды представляют собой ассоциации видов-двойников (Дьяков, 1993). Чтобы внести ясность и избежать недоразумений при разделении видов базидиальных грибов, проводят анализ генетической (репродуктивной) изоляции между особями (Adaskaveg et al., 1986, Шнырева с соавт., 2003).

Вид *G. lucidum* обладает типичной тетраполярной, или двухфакторной, системой гомогенной несовместимости (Adaskaveg, Gilbertson, 1986). Для проведения фертильных (совместимых) скрещиваний необходимы различия по обоим факторам совместимости, т. е. гибридизация возможна только между монокарионами, гетероаллельными по каждому фактору.

Тетраполярный тип половой несовместимости позволяет выделить для каждой интерстерильной группы по четыре монокариотических штамма-тестера.

Для трех штаммов (GL4, GL8, GL9) было получено по 12-15 моноспоровых монокариотических культур. Были проведены *мон-мон* скрещивания и выделены три набора тестеров (по четыре монокариотические культуры с различными факторами спаривания).

Таблица 4. Выделение интерстерильных групп

		GL4				GL8				GL9			
		4m1	4m2	4m6	4m7	8m1	8m1	8m5	8m9	9m1	9m2	9m7	9m7
GL4	4m1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4m2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4m6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4m7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GL8	8m1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	8m3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
	8m5	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
	8m9	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
GL9	9m1	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
	9m2	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
	9m7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	9m7		-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-

Условные обозначения: «+»- образование пряжек, т. е. половая совместимость штаммов; «-»-отсутствие пряжек, репродуктивный барьер.

Скрещивания между тестерами показали, что штамм из Франции (GL4) относится к одной интерстерильной группе, а штаммы с Кавказа и из Крыма (GL8 и GL9, соответственно) к другой (табл. 4).

Уточнение принадлежности к выделенным интерстерильным группам остальных дикариотических штаммов провели с использованием *ди-мон*-скрещиваний (новый дикарион образуется за счет слияния гиф первичного монокариотического мицелия с гифами дикариотического мицелия) (табл. 5). Из полученных данных видно, что штамм из Австрии (GL927) вошел в интерстерильную группу, образованную штаммом из Франции (GL4), а штамм с Кавказа (GL2) – в интерстерильную группу штаммов южных регионов (GL8 -Кавказ и GL9 -Крым). Штаммы из Кореи (GL3), США (GL5) и Московской области (GL6 и GL7) не вошли ни в одну из выделенных интерстерильных групп, что позволяет предположить их репродуктивную изоляцию.

В то же время показано, что дикариотизация в *ди-мон* скрещиваниях может происходить нерегулярно. В литературе это объясняется либо частичной репродуктивной изоляцией, либо погрешностью метода (Шнырева с соавт., 2003).

Таблица 5. Установление принадлежности дикариотических природных изолятов к выделенным интерстерильным группам

	GL4				GL8				GL9			
	4m1	4m2	4m6	4m7	8m1	8m3	8m5	8m9	9m1	9m2	9m4	9m7
GL2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
GL3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GL4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GL5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GL7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GL8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
GL9	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
GL927	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Условные обозначения: «+»- образование пряжек, т. е. половая совместимость штаммов; «-»-отсутствие пряжек, репродуктивный барьер.

Сопоставление результатов анализа репродуктивной изоляции и данных, полученных при исследовании морфологических признаков, позволило заключить, что обе интерстерильные группы принадлежат к одному морфологическому типу.

Молекулярный и биохимический анализ штаммов *G. lucidum*

При недостатке морфологических характеристик для идентификации изолятов различных видов многие исследователи обращаются к белковым и молекулярным маркерам, способным обеспечить большим количеством значимых для оценки изменчивости признаков. С помощью молекулярных маркеров была показана высокая гетерогенность комплексного вида *G. lucidum* (Moncalvo, 1995; Hseu et al., 1996; Buchanan, 2001). Молекулярно-филогенетический анализ американских, азиатских и европейских коллекций *G. lucidum* с использованием маркеров рДНК позволил выделить несколько внутривидовых групп (*G. lucidum sensu stricto*, *G. resinaceum complex sensu lato*, *G. curtisii complex*, *G. tropicum complex sensu lato*) (Moncalvo, 2000). Однако отсутствие корреляции между филогенией по рДНК и морфологическим разделением комплекса *G. lucidum* стимулирует поиск новых молекулярных маркеров, способных стать исчерпывающим критерием при описании штаммов.

В нашей работе был использован метод **RAPD-PCR**, чувствительность которого отвечает требованиям исследований, касающихся изменчивости внутри вида *G. lucidum*. RAPD-полиморфизм данной выборки был исследован с использованием десятичленных олигонуклеотидных праймеров, уже продемонстрировавших свою эффективность на большой группе штаммов, относящихся к роду *Ganoderma* (Hseu et al., 1996). В ходе работы была обнаружена высокая степень молекулярного полиморфизма исследуемой выборки.

Наибольшее количество вариабельных полос было получено с праймерами R1, R3 и R5.

При сравнении молекулярных профилей (паттернов амплификации), полученных с помощью праймера R1, был обнаружен фрагмент размером 620 п.н. (пар нуклеотидов), проявляющийся только у штаммов *G. lucidum*. В составе RAPD-спектров штаммов *G. applanatum* данный фрагмент не присутствовал, что позволило предположить видоспецифичность полученного фрагмента (рис. 6).

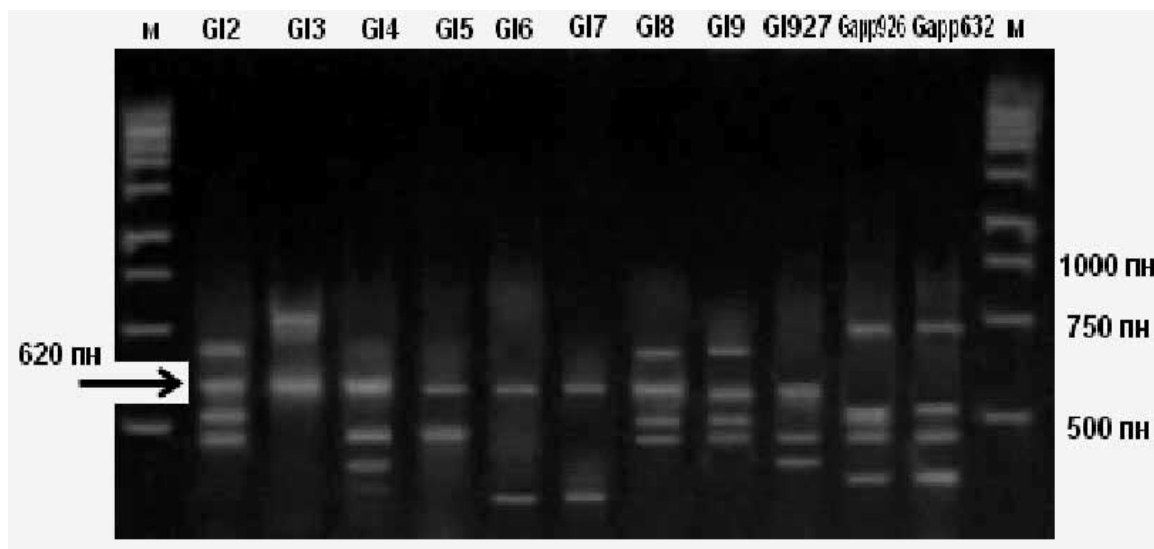


Рисунок 6. Электрофореграмма RAPD-полиморфизма штаммов *Ganoderma* spp., полученная при использовании праймера R1 (стрелкой обозначен фрагмент, видоспецифичный для штаммов *G. lucidum*; м - маркер GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas, размеры маркерных фрагментов (п.н.) указаны справа от фотографии). G1 - *G. lucidum* ; Gapp - *G. applanatum*

Полученные методом RAPD-PCR результаты были обработаны с помощью метода кластерного анализа. Все дендрограммы обладали сходной топологией, а наиболее устойчивой оказалась дендрограмма, построенная на основе анализа суммарной матрицы по всем паттернам амплификации (среднее значение индекса бутстрепа 82%) (рис.7).

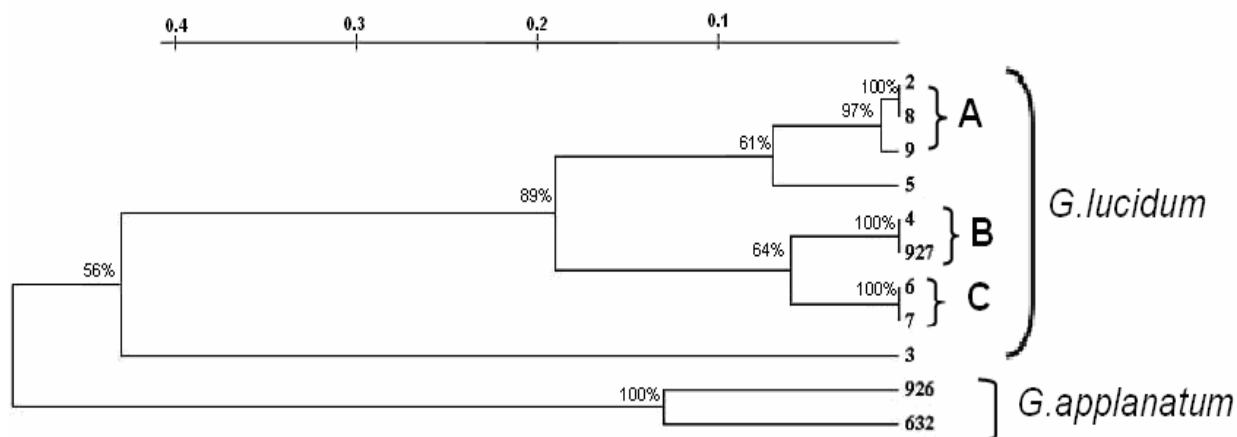


Рисунок 7. UPGMA-дендрограмма генетического сходства RAPD-профилей штаммов *Ganoderma* spp

Основной кластер дендрограммы включил все штаммы *G. lucidum*. Штаммы вида *G. applanatum* образовали отдельную внешнюю группу, монофилия которой поддерживалась высокими значениями индекса бутстрепа (до 100%). Данные кластерного RAPD-анализа подтвердили высокую гетерогенность вида *G. lucidum*, объединяя штаммы на протяжении широкого интервала условных единиц генетической дистанции (от 0,1 до 0,42) (рис. 7).

Внутри вида *G. lucidum* на полученной дендрограмме можно видеть три стабильные группы изолятов: «А» – штаммы с Кавказа (GL2, GL8) и из Крыма (GL9), «В» – штаммы из Франции и Австрии (GL4 и GL927, соответственно) и «С» – штаммы из Московской области (GL6 и GL7) (рис. 7).

Полученные группы штаммов характеризовались высокой степенью гомогенности RAPD-маркеров (индекс бутстрепа для групп «В» и «С» – до 100%, для группы «А» – до 97%). Представленные в данной выборке штаммы из Московской области (GL6 и GL7) (группа «С»), не являясь клонами по результатам тестов на вегетативную несовместимость, в то же время обладали идентичными молекулярными RAPD-профилями. Таким образом, RAPD-полиморфизм вида *G. lucidum* позволил выделить несколько внутривидовых групп.

Штамм из Кореи (GL3) продемонстрировал по всем RAPD-маркерам наибольшее отличие внутри кластера *G. lucidum*, занимая обособленную позицию на расстоянии 0,42 условных единиц генетической дистанции. Что касается штамма из США (GL5), то его степень объединения с группой из южных регионов была относительно невысока, до 61% индекса бутстрепа (рис. 7).

Еще одним методом исследования фенотипических проявлений генотипических различий штаммов является **белковый электрофорез**.

Было использовано пять изоферментных систем, из которых наиболее репрезентативной оказалась малатдегидрогеназа (МДГ).

На дендрограмме сравнения МДГ-спектров видно, что наибольшее отличие проявили штаммы *G. applanatum* и штамм *G. lucidum* из США (GL5), объединившись с остальными географическими изолятами *G. lucidum* только на уровне 1 единицы генетической дистанции (рис. 8).

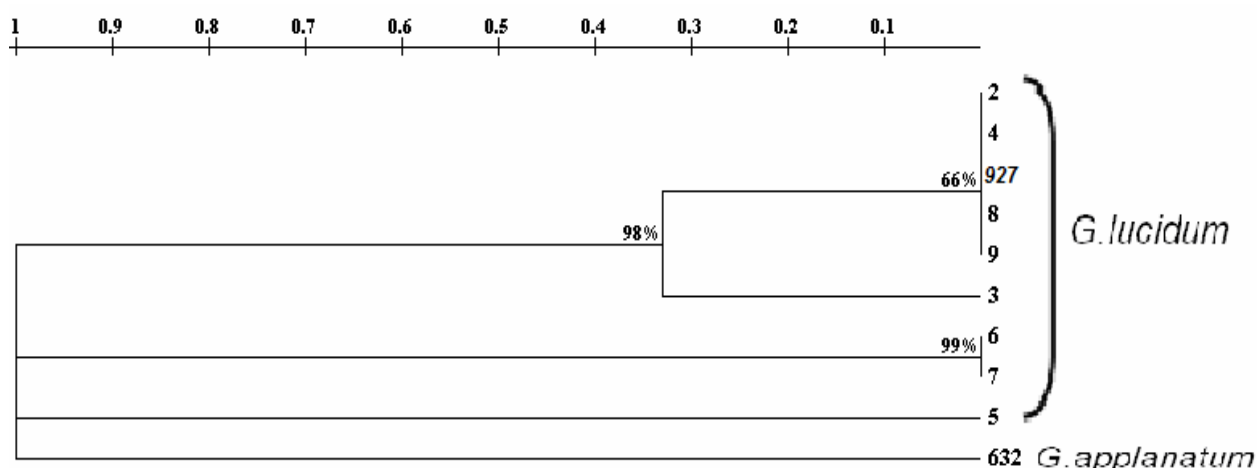


Рисунок 8. Дендрограмма сходства штаммов *G. lucidum* и *G. applanatum* по спектру изоферментов МДГ

Штаммы из Московской области (GL6 и GL7) объединились в одну группу, поддержанную значением индекса бутстрепа 99%. Остальные штаммы (GL2, GL4, GL8, GL9 и GL927) обнаружили 66% гомологии МДГ-спектров. Штамм из Кореи вновь занял обособленную позицию на уровне 0.34 условных единиц генетической дистанции (рис. 8).

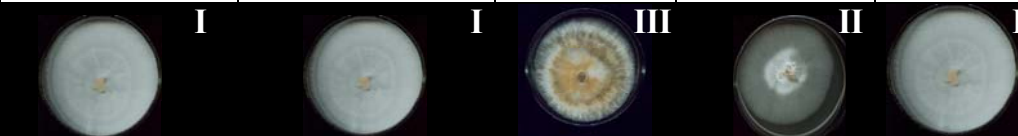
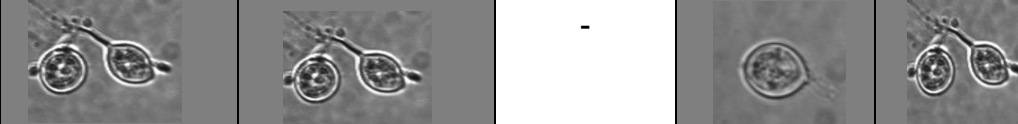
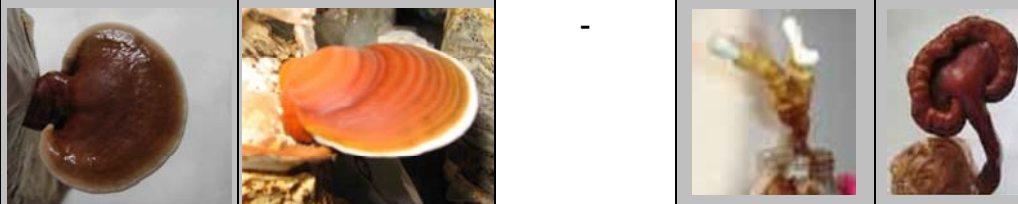
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование изменчивости штаммов *G. lucidum* с использованием различных подходов и методов позволило сопоставить результаты анализов (табл. 6). Была получена индивидуальная характеристика для каждой RAPD-группы, отличавшейся географическим происхождением и высокой степенью гомогенности по выбранным маркерам.

Так, штаммы GL2, GL8 и GL9 из южных регионов страны, объединившиеся по данным RAPD-анализа в группу «А», имели сходные спектры малатдегидрогеназы и составили интерстерильную группу I. Для них была показана способность к образованию в чистой культуре хламидоспор и получены веерообразные «лакированные» плодовые тела с ножкой (табл. 6).

Для европейских штаммов, объединившихся в RAPD-группу «В», было обнаружено: высокая степень гомогенности по изоферментам, принадлежность к интерстерильной группе II, наличие хламидоспор и консолевидные матовые плодовые тела.

Таблица 6. Сравнение результатов анализа полиморфизма штаммов *G. lucidum*

Критерии	Характеристика полученных групп штаммов <i>G. lucidum</i>				
Штамм (географ.про- исх.)	2, 8 (Кавказ), 9 (Крым)	4 (Франция), 927(Австрия)	6, 7 (Моск. обл.)	3 (Корея)	5 (США)
RAPD группа	А	В	С	-	-
Изо- ферменты	66%	66%	99%	-	-
Генетически й анализ	Интерстериль- ная группа 1	Интерстериль- ная группа 2 -	-	-	-
Морфологи- ческий тип					
Хламидо- споры					
Плодовые тела					

Что касается RAPD-группы «С» – штаммов из Московской области, – то для нее получена наибольшая степень сходства по МДГ-спектрам, показано отсутствие хламидоспор в чистой культуре и неспособность формировать типичные базидиомы в искусственных условиях.

ВЫВОДЫ

1. По морфолого-культуральным и микроморфологическим признакам показана гетерогенность изученных штаммов *G. lucidum* и выделены три морфологические группы.
2. Обнаружена способность некоторых штаммов *G. lucidum* образовывать базидии с жизнеспособными базидиоспорами в чистой культуре, минуя стадию формирования типичных базидиом.
3. Модифицирована методика получения базидиом путем добавления в субстрат дрожжевого экстракта, что стимулировало процесс плодообразования.
4. Получены группы тестеров и выявлены две интерстерильные группы штаммов *G. lucidum*.
5. С помощью RAPD-маркеров выявлен ДНК-фрагмент, специфичный для вида *G. lucidum*.
6. Применение генетических, биохимических и молекулярных методов, наряду с исследованием морфологии, позволило подтвердить правомочность выделения внутривидовых групп штаммов *G. lucidum*.
7. Исследование с использованием комплекса методов подтвердило сложную структуру вида *G. lucidum*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Чистякова Е. Л. Штаммовое разнообразие трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* // Тезисы конференции, посвященной 85-летию кафедры микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова. М. 2004 с. 149

Завьялова Л. А., Чистякова Е. Л., Инсарова И. Д., Антимонова А. В. Штаммовое разнообразие трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* // Микология и фитопатология. 2005. Т.39. № 1. с. 27-34.

Гарибова Л.В., Завьялова Л.А., Инсарова И.Д., **Чистякова Е.Л.** 2005. Анализ коллекции штаммов *Ganoderma lucidum* разного географического происхождения. // Материалы 6-ой Международной конференции «Проблемы лесной фитопатологии и микологии». М.-Петрозаводск, 2005, с. 69 – 72.

Постнова Е. Л. Антибиотическая активность и морфолого-культуральные признаки штаммов *Ganoderma lucidum* // Тезисы Юбилейной конференции, посвященной 100 - летию со дня рождения М.В. Горленко. М. 2008. с. 195

Постнова Е. Л. Макро - и микроморфология штаммов *Ganoderma lucidum* различного географического происхождения // «Современная микология в России». Второй съезд микологов России. Тезисы докладов. М., 2008. Т. 2. с.42

Постнова Е.Л., Завьялова Л.А., Инсарова И.Д.. Формирование атипичных плодовых тел и примордиев *in vitro* у *Ganoderma lucidum* и влияние на этот процесс абиотических факторов // Микология и фитопатология. 2009. Т.43. № 4 (в печати)

Постнова Е.Л., Сколотнева Е.С. Комплексный вид *Ganoderma lucidum*: внутривидовые группы штаммов с индивидуальной характеристикой // в печати