

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ШТАЕР Оксана Васильевна

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quel

Специальность: 03.00.24 – микология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2006

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Шнырева Алла Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Жуков Атэо Михайлович

кандидат биологических наук

Смирнов Алексей

Николаевич

Ведущая организация:

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Защита состоится 8 декабря 2006 года в 15 час. 30 мин. На заседании диссертационного совета Д 501.001.46 на Биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу:

119992, ГСП-2, г. Москва, Ленинские горы, дом. 1, к.12, ауд. М-1

тел/факс (045) 939 39 70

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

Автореферат разослан: 7 ноября 2006 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета:

кандидат биологических наук

М.А.

Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Вешенка легочная, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. - широко распространенный в средней полосе России ксилотрофный гриб. Вид принадлежит к группе агариикоидных базидиомицетов (кл. *Basidiomycetes*, пор. *Boletales*, сем. *Pleurotaceae*). Вешенка легочная представляет особый интерес ввиду того, что наряду с вешенкой устричной (*P. ostreatus*) является одним из наиболее популярных и доступных культивируемых в России грибов, причем вид *P. pulmonarius* широко используется не только в пищевой промышленности, но и как продуцент ряда биологически активных веществ. Однако, сведений о взаимоотношениях отдельных грибных индивидуумов, генотипическом разнообразии и уровне полиморфизма в локальных природных популяциях все еще недостаточно. Поэтому не вызывает сомнений необходимость более целенаправленного изучения и использования генетических ресурсов данного вида. Изучение популяционной структуры вешенки легочной и анализ происходящих в природных популяциях микроэволюционных процессов (генный дрейф, миграции, и т.д.) может в значительной степени расширить возможности использования природных генетических ресурсов вешенки легочной.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы было охарактеризовать природные популяции вида *P. pulmonarius* из разных географических зон средней полосы России.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать природные популяции *P. pulmonarius*, собранные на территории Московской, Тверской и Воронежской областей, по совокупности морфологических, физиологических и молекулярных признаков, и группам вегетативной несовместимости.
2. Оценить уровень природного полиморфизма и степень генетического разнообразия в природных популяциях вешенки легочной.
3. Оценить степень генетической дифференциации и инбридинга в популяциях *P. pulmonarius*.
4. Охарактеризовать половую совместимость природных изолятов вешенки и их принадлежность близкородственным видам *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*.

5. Исследовать ультраструктуру зоны контакта мицелиев при соматических взаимоотношениях между различными грибными индивидуумами *P. pulmonarius*.

Научная новизна

Впервые проведен детальный сравнительный анализ внутривидового разнообразия вида *P. pulmonarius* из разных регионов средней полосы России - Московской, Тверской и Воронежской областей - на основе морфологических, физиологических и молекулярных признаков.

Показано, что культурально-морфологические признаки двух близкородственных видов *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*, несмотря на существующий репродуктивный барьер, четко не дифференцированы.

Впервые исследована ультраструктура мицелия в зоне контакта генетически различных грибных индивидуумов и показаны этапы формирования барража в зоне антагонизма на границе взаимодействующих дикарионов.

Показано, что вегетативное размножение у вешенки в природе ограничено в пространстве отдельными субстратами и не оказывает существенного влияния на генотипическую структуру популяций.

Практическая и научная значимость

Полученные в настоящем исследовании данные представляют существенную ценность как для теоретического понимания внутривидовой структуры вида *P. pulmonarius* - типичного представителя ксилотрофных базидиомицетов, так и для последующей селективной работы и использования штаммов вешенки легочной в промышленном производстве. Впервые проведен сравнительный анализ природных популяций вешенки легочной, позволивший оценить генетическое разнообразие в географически удаленных природных популяциях. Впервые показана воспроизводимость типов антагонистических реакций в популяциях вешенки, что может в дальнейшем применяться как дополнительные специфические маркеры отдельных индивидуумов в популяционных исследованиях.

Благодарности автора

Автор выражает искреннюю благодарность д.б.н. А. В. Шныревой за внимание и общее руководство работой, сотрудникам Института общей генетики Ю.С. Белоконь и М.М. Белоконь за помощь, оказанную при проведении анализа белкового полиморфизма, д.б.н. О. В. Камзолкиной за

помощь и советы в работе с электронным микроскопом. Автор выражает также глубокую признательность всему коллективу кафедры микологии и альгологии за постоянную поддержку и внимание.

Апробация работы

Основные положения работы были доложены на конф. по биоразнообразию (Пенза, 2001), конф. посв. 250-летию МГУ им. М.В. Ломоносова и 90-летию ЗБС МГУ (Москва, 2001), I съезде микологов России (2002), Междунар. конф. посв. 85-летию каф. микологии и альгологии (Москва, 2004), Молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге (2004), на Международной конференции "Грибы в природных и антропогенных экосистемах" Россия (Санкт-Петербург, 2005), а также на заседаниях кафедры микологии и альгологии МГУ.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них 4 статьи, 6 тезисов, одна статья подана в печать.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения и трех глав, посвященных обзору литературы, материалам и методам исследований, а также главы с описанием результатов; приложений, выводов и списка использованной литературы. Диссертация изложена на 105 страницах, содержит 9 таблиц и 16 рисунков, а также два приложения, содержащих 25 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Сбор природного материала осуществляли маршрутным методом на территории Звенигородской биостанции МГУ (ЗБС) в июне-июле 2000 г., Лесного Тверского заповедника (Центральный Лесной Биосферный Государственный Тверской Заповедник) в июне-июле 2002 г. и в черте г. Воронежа в 2001 г. Было собрано 70 плодовых тел вешенки, в коллекцию природных штаммов также вошли дикорастущие штаммы, собранные в г. Москве осенью 2000 г. Из собранных плодовых тел были получены споровые отпечатки, а также из ткани трамы плодовых тел были выделены дикариотические мицелиальные культуры. Характеристика природных изолятов вешенки представлена в таблице 1.

Таблица 1. Природные изоляты вешенки в коллекции

Выборки		Время сбора	Кол-во штаммов	Штаммы*	Субстрат	Морфология
Московская область 2000г.	Звеногородская биостанция (ЗБС)	июнь-июль	27	O.1-1, O.1-2	береза	Плодовые тела с мягкой консистенцией от 5 до 12 см в диаметре. Форма плодового тела неправильно уховидная. Ножка 1-3 см в диаметре, от эксцентрической до почти центральной. У штамма O.10-1, выделенного с веточного опада, ножка отсутствовала. Цвет плодовых тел преимущественно светлый: от молочно белого и бежевого до палевого, светло- или серо-коричневого.
				O.2-1, O.2-2	осина	
				O.3-1, O.3-2, O.3-3	береза	
				O.4-1	береза	
				O.5-1	ива	
				O.6-1, O.6-2, O.6-3, O.6-4, O.6-5, O.6-6	береза	
				O.7-1, O.7-2	ель	
				O.8-1, O.8-2, O.8-3	береза	
				O.9-1, O.9-2, O.9-3, O.9-4	береза	
				O.10-1	осина	
				O.11-1, O.11-2	осина	
	г.Москва	сентябрь	11	O.13-1	осина	Темно-серые массивные плодовые тела до 15 см в диаметре, с мощной ножкой.
				M.2-2	береза	
				M.3-1, M.3-2, M.3-3, M.3-4	рябина	
				M.4-1, M.4-2, M.4-3	рябина	
				M.5-2, M.5-3	яблоня	
г. Воронеж 2001г	сентябрь-октябрь	12		B.1-1	липа	Массивные плодовые тела до 15-17 см в диаметре, преимущественно светло-серые.
				B.2-1	липа	
				B.3-1	береза	
				B.4-1	береза	
				B.5-1	береза	
				B.6-1	осина	
				B.7-1	осина	
				B.8-1	осина	
				B.11-1	осина	Темно-серые некрупные до 10 см в диаметре.
				B.12-1	липа	
				B.13-1	липа	
				B.14-1	липа	
Тверской Лесной заповедник (ЦЛБГТЗ) 2002 г.	июнь-июль	20		T.1-1, T.1-2, T.1-3, T.1-4, T.1-5	береза	Плодовые тела светлые: от белых до светло-серых и бежевых. Встречались в хорошо освещенных местах: просеки или опушки леса, на крупном валежнике.
				T.2-1, T.2-2, T.2-3	ель	
				T.3-1, T.3-2, T.3-3, T.3-4	осина	
				T.4-1, T.4-2, T.4-3	береза	
				T.5-1	береза	
				T.6-1, T.6-2, T.6-3, T.6-4	осина	

*Примечание:** На субстрате вешенка была представлена срезками плодовых тел. Из каждого среза брали по одному плодовому телу. Субстраты, на которых были обнаружены плодовые тела вешенки, были пронумерованы по мере обнаружения на них плодовых тел (первая цифра в индексе штамма), вторая цифра в индексе штамма указывает порядковый номер среза на каждом отдельном субстрате.

Выделение чистых культур. Дикариотические мицелиальные культуры выделяли из ткани трамы свежих плодовых тел на среде сусло-агар, с добавлением антибиотиков (5 мг/л фундазола и 1000000 ед./л ампициллина) для подавления роста посторонних грибов и бактерий. Монокариотические культуры получали из споровых отпечатков путем последовательных разведений споровых суспензий с последующим рассевом их на чашки Петри с сусло-агаром. Культивирование моно- и дикариотических изолятов вешенки проводили в термостате при 25°C. Мицелий для электронной микроскопии наращивали на чашках Петри на среде Чапека.

Определение скорости роста. Для определения скорости роста дикариотических штаммов в центр чашки Петри уколом высаживали мицелий, и каждые вторые сутки измеряли диаметр колонии гриба вплоть до полного зарастания чашки. Скорость роста рассчитывали по формуле Левинсона (Lewinson et al., 2000).

Выгонку плодовых тел проводили согласно методикам, разработанным для большого практикума по культивированию базидиальных грибов, проводимого на кафедре микологии и альгологии Биологического факультета МГУ (Л. В. Гарибова, 1983). В качестве основного лигно-целлюлозного субстрата использовали лузгу семян подсолнуха.

Видовую принадлежность изолятов и определение типов спаривания (факторов половой совместимости) проводили в *мон-мон*- и *ди-мон*-скрещиваниях по методике, разработанной Эггер (Egger, 1978).

Анализ вегетативной несовместимости природных изолятов проводили на чашках Петри с сусло-агаром, путем попарного срачивания дикариотических штаммов между собой во всех возможных комбинациях. По степени антагонистических ответов различали 3 типа реакций вегетативной: **N** (normal) – умеренная реакция, **S** (strong) – сильная реакция, **W** (weak) – слабо выраженный антагонизм. Частоты распределения природных штаммов в группы вегетативной несовместимости оценивали с помощью меры разнообразия по Шеннону (Lewontin, 1949).

Экстракцию водорастворимых белков проводили из свежего выращенного на чашках Петри 7-суточного мицелия в 50 мл 0.02 М трис-HCl буфера, pH 6.8. Разделение белковых фракций осуществляли в горизонтальном 13%-ном крахмальном геле в течение 5 часов в трех буферных системах (трис-цитратной, трис-ЭДТА-боратной и трис-цитрат-LiOH-боратной) по стандартным методикам Института Общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, описанным ранее (Дружинина и др., 1997). После проведения электрофореза

крахмальный блок разрезали на 5-6 горизонтальных пластин для последующего гистохимического окрашивания изоферментов. Окрашивание гелей проводили в растворе или с наслоением агарозы при 37°C и в 3-х разных буферных системах (по прописям института Общей генетики РАН). Результаты электрофореза белков обрабатывали с помощью пакета компьютерных программ (PopGene Version 1.32: Population Genetic Analysis) (Yet et. al. 1999) Дендрограмма генетического сходства между природными изолятами была построена на основе генетических расстояний Нея по 13 аллозимным локусам с использованием UPGMA алгоритма.

RAPD-анализ (Random Amplified Polymorphic DNA). ДНК экстрагировали из обезвоженного и растертого в жидком азоте 7–10 суточного мицелия по стандартным методикам (Lee et. al., 1988). ПЦР-амплификацию геномной ДНК проводили на программируемом термоциклере (Amplify 4L, Biokom). Использовали стандартные наборы для амплификации ДНК фирмы Sileks. Были использованы 3 олигомерных нуклеотидных праймера (Синтол) со следующими последовательностями: **A012:** 5'-TCCCGGTCTC-3', **A4:** 5'-AGTCAGCCAG-3', **Y07:** 5'-AGAGCCGTCA-3'. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли в 1,2% агарозном геле в трис-ацетатном буфере при 80–85 V. В качестве маркеров длин фрагментов ДНК использовали 1 kb-ladder, Fermentas и ДНК фага лямбда, гидролизованную с помощью ферментов рестрикции Hind III и Eco RI. Для визуализации гели окрашивали раствором бромистого этидия и фотографировали в УФ-свете цифровым фотоаппаратом Lumix. Результаты обрабатывали с помощью пакета компьютерных программ Treecon, version 1.1 (Van de Peer, University of Autwerp., 1995).

Электронная микроскопия. Для изучения зоны контакта вегетативных мицелиев использовали трансмиссионную микроскопию, основанную на анализе потока электронов, прошедших через срез препарата (*ТЭМ*), и сканирующую микроскопию (*СЭМ*).

Подготовка образца для ТЭМ: Фиксацию образцов проводили в 4%-ом растворе KMnO_4 (Камзолкина, 1996). После этого образцы обезвоживали и заливали в смолу Эпон (Fluka). Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-8800. Двойное окрашивание срезов проводили на коллоидной пленке и металлических сеточках по Рейнольдсу (Reynolds, 1963).

Подготовка образцов для сканирующей микроскопии (СЭМ). Фиксацию мицелия (вырезанного вместе с блоком агара) проводили в парах 1%-ного раствора OsO_4 , после чего мицелий высушивали на фильтровальной бумаге. Высушенные блоки наклеивали на металлический столик для напыления образцов смесью платины–палладия.

Результаты и обсуждение

1. Анализ морфологических признаков природных изолятов вешенки

Все собранные в летний период 2000 и 2002 гг. на территории Звенигородской биостанции и Тверского лесного заповедника природные изоляты вешенки обладали светлоокрашенными плодовыми телами и по типовому описанию вида, приведенного в региональных сводках (Бисько, Дудка, 1987, Барсукова, 1990, Гарибова, Сидорова и др. 1999) принадлежали вешенке легочной (вид *P. pulmonarius*).

Собранные в осенний период 2000 и 2001 гг. на территории г. Москвы и в черте г. Воронеж штаммы вешенки по совокупности морфологических признаков плодовых тел принадлежали вешенке устричной (вид *Pleurotus ostreatus*) - представителю близкого к вешенке легочной виду. Однако, определить видовую принадлежность некоторых природных изолятов, основываясь только на морфологических признаках плодовых тел, оказалось затруднительно в особенности для изолятов, собранных на территории г. Воронежа. Поэтому все природные штаммы вешенки были охарактеризованы по половой совместимости со штаммами-тестерами видов *P. pulmonarius* и *P. ostreatus* (см. далее).

Выделенные из плодовых тел мицелиальные дикариотические культуры были морфологически сходны и характеризовались почти одинаковой скоростью роста вегетативного мицелия.

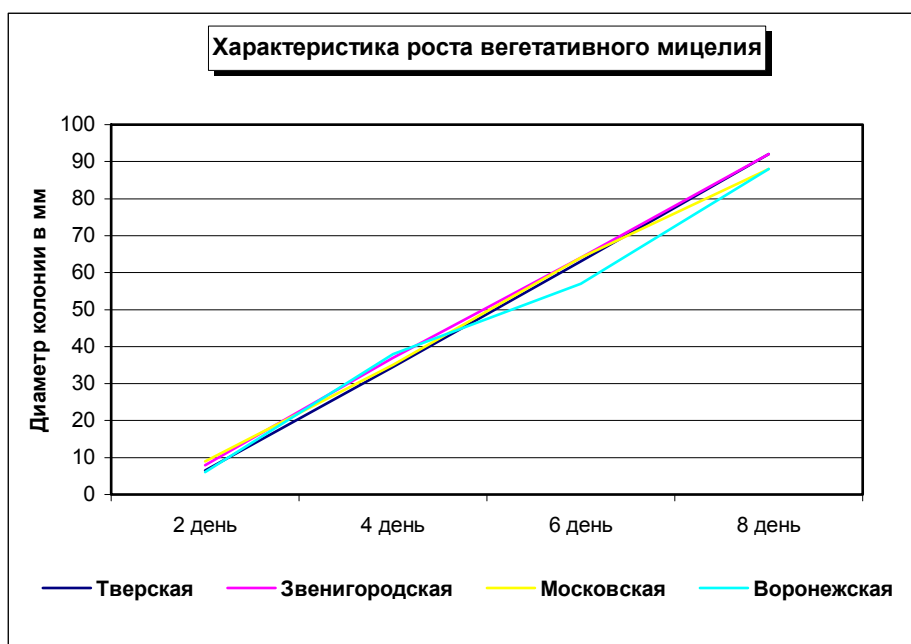


Рис. 1. Скорость роста дикариотических штаммов.

Скорость роста у всех природных изолятов колебалась в незначительном диапазоне - от 12 до 15 мм/сут. Существенных отклонений в скорости роста между отдельными изолятами как в пределах одной выборки, так и из разных выборок не обнаружено (рис. 1). В результате, отсутствие существенных различий в культурально-морфологических признаках и скорости роста вегетативного мицелия не позволили выделить дискретные фенотипические признаки, приемлемые для популяционного анализа.

2. Половая совместимость природных штаммов вешенки

Основным критерием при идентификации биологических видов у базидиальных грибов является половая совместимость монобазидиоспоровых штаммов со штаммами-тестерами, определяемая в *мон-мон*-скрещиваниях (монокарион×монокарион). Для восьми дикариотических природных изолятов, представляющих каждую из выборок, были выделены тестеры - по четыре моноспоровых штаммов, различающиеся аллелями локусов половой совместимости, и проведены *мон-мон*-скрещивания со штаммами-тестерами видов *P. pulmonarius* и *P. ostreatus* (табл.2).

Таблица 2. *Мон-мон*-скрещивания моноспоровых штаммов вешенки с гаплоидными штаммами-тестерами видов *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*

Штаммы	Монокариоти- ческие штаммы	Монокариотические тестеры типов спаривания								Вид (интерстерильная группа)
		<i>P. pulmonarius</i>				<i>P. ostreatus</i>				
		#14 м 1	#14 м 6	#14 м10	#14 м11	#38 м 1	#38 м 8	#38 м12	#38 м15	
O.6-1	m2; m3; m4; m18	++++	++++	++++	++++	----	----	----	----	<i>P.pulmonarius</i> I интерстерильная группа
O.6-4	m3; m8; m13; m17	++++	++++	++++	++++	----	----	----	----	
O.6-5	m1; m2; m4; m8	++++	++++	++++	++++	----	----	----	----	
O.6-6	m1; m3; m4; m17	++++	++++	++++	++++	----	----	----	----	
T.3-4	m4; m7; m9; m11	++++	++++	++++	++++	----	----	----	----	
B.1-5	m3; m4; m6; m12	++++	++++	++++	++++	----	----	----	----	
O.13-1	m2; m5; m8; m10	----	----	----	----	++++	++++	++++	++++	<i>P. ostreatus</i> II интерстерильная группа
M.4-2	m6; m9; m11; m12	----	----	----	----	++++	++++	++++	++++	
B.12	m1; m2; m3; m4	----	----	----	----	++++	++++	++++	++++	

Примечание: «+» - образование пружек, т.е. половая совместимость штаммов.

«-» - отсутствие пружек, репродуктивный барьер.

Уточнение видовой принадлежности всех остальных штаммов коллекции провели с помощью *ди-мон*-скрещиваний (дикарион×монокарион) (табл.3). В лабораторных условиях, по мимо слияния гиф двух монокариотических мицелиев (*мон-мон*-скрещивание), существует возможность образования нового дикариона путем слияния гиф первичного монокариотического мицелия с

гифами дикариотического мицелия (*ди-мон-скрещивание*), т.е. дикариотизация монокариотического партнера за счет миграции ядер дикариона, что можно определить по образованию пряжек на растущих кончиках гиф монокариотического тестера (Eger, 1982). Путем *ди-мон-скрещиваний* в лабораторных условиях можно относительно легко и быстро определить видовую принадлежность выделенного природного изолята гриба (Laroche et al., 1995).

Природные изоляты, выделенные на территории ЗБС, Тверского лесного заповедника и в черте г. Воронежа, и обладавшие светлоокрашенными плодовыми телами, продемонстрировали половую совместимость с тестерами, принадлежавшими виду *P. pulmonarius*. Все штаммы, собранные осенью на территории г. Москвы, и три штамма В.12-1, В.13-1 и В.14-1, собранные на территории г. Воронеж и обладающие темноокрашенными плодовыми телами, были совместимы со штаммами-тестерами вида *P. ostreatus*.

Таблица 3. *Ди-мон-скрещивания* природных изолятов вешенки

Выборки	Природные дикариотические изоляты	Кол-во штаммов	Монокариотические тестеры типов спаривания								Вид (интерстерильная группа)
			<i>P. pulmonarius</i> (штамм #14)				<i>P. ostreatus</i> (штамм #38)				
			14 m1	14m6	14m10	14m11	38m1	38m8	38m12	38m15	
Звенигородская	О.1-1,О.1-2,О.2-1, О.2-2,О.3-1,О.3-2, О.3-3,О.4-1,О.5-1, О.6-1,О.6-2,О.6-3, О.6-4,О.6-5,О.6-6, О.7-1,О.7-2,О.8-1, О.8-2,О.8-3,О.9-1, О.9-2,О.9-3,О.9-4, О.10-1,О.11-1, О.11-2	27	+	+	+	+	—	—	—	—	<i>P. pulmonarius</i> I интерстерильная группа
Тверская	Т.1-1, Т.1-2, Т.1-3, Т.1-4, Т.1-5, Т.2-1, Т.2-2, Т.2-3, Т.3-1, Т.3-2, Т.3-3, Т.3-4, Т.4-1, Т.4-2, Т.4-3, Т.5-1, Т.6-1, Т.6-2, Т.6-3, Т.6-4	20	+	+	+	+	—	—	—	—	
Воронежская	В.1-1, В.2-1, В.3-1, В.4-1, В.5-1, В.6-1, В.7-1, В.8-1, В.11-1	9	+	+	+	+	—	—	—	—	
	В.12-1, В.13-1, В.14-1	3	—	—	—	—	+	+	+	+	<i>P. ostreatus</i> II интерстерильная группа
Московская	О.13-1,М.2-2, М.3-1, М.3-2, М.3-3, М.3-4, М.4-1, М.4-2, М.4-3, М.5-2, М.5-3	11	—	—	—	—	+	+	+	+	

Примечание: «+» - образование пряжек на мицелии монокариотического тестера, т.е. половая совместимость штаммов; «—» - отсутствие пряжек на мицелии тестера, половая несовместимость.

3. Вегетативная несовместимость природных изолятов вешенки

В природных популяциях базидиомицетов *in situ* практически невозможно установить физические и генетические границы мицелия одной особи. Отчасти решению этой проблемы служит оценка реакции вегетативной, или гетерогенной несовместимости. Сращивания дикариотических штаммов на чашках Петри позволяют не только разграничить отдельные грибные индивидуумы, но и охарактеризовать степень антагонистических реакций между штаммами. Критерием в оценке служит зона барража в месте контакта сращиваемых мицелиев. Степень экспрессии реакции вегетативной несовместимости оценивали визуально.

Подавляющее большинство изолятов нашей коллекции при сращивании на агаризованной питательной среде формировали в зоне контакта мицелиальный валик (барраж), что является фенотипическим проявлением реакции вегетативной несовместимости. По характеру антагонистических ответов природные дикариотические штаммы были распределены в три группы (VC-группы): **S** (strong) – сильно выраженный антагонизм; **N** (normal) – реакция средней степени и **W** (weak) – слабое антагонистическое взаимодействие (рис.2: а, б, в).

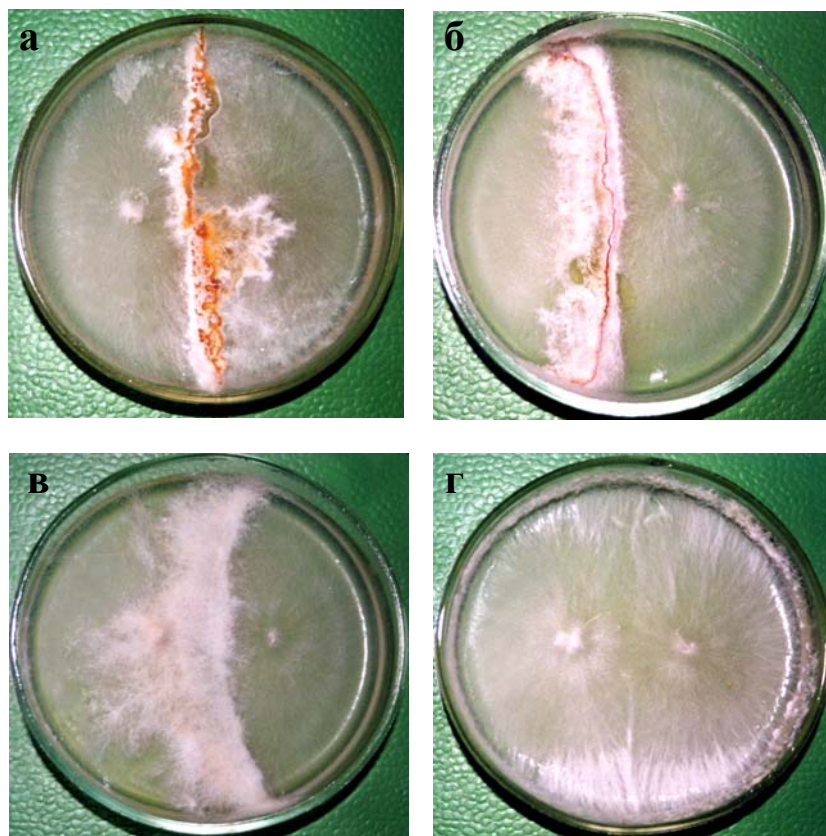


Рис. 2. Типы вегетативной несовместимости: а) сильная реакция (**S**); б) умеренная реакция (**N**); в) слабая реакция (**W**); г) совместимая реакция (**C**).

При контакте генетически идентичных штаммов зона контакта была не выражена, между гифами двух мицелиев активно образовывались анастомозы с последующим слиянием в единый мицелий; данную реакцию определили как реакцию совместимости С (compatibility) (рис.2, г).

Слабое антагонистическое взаимодействие (W-реакция) было отмечено только при внутривидовых срачиваниях природных изолятов вешенки. В зоне контакта мицелиев наблюдали встречный рост гиф партнёров без образования анастомозов между контактирующими мицелиями. При этом отдельные гифы покрывались слизистым чехлом с образованием тонких мицелиальных тяжей, представлявших собой несколько гиф, заключенных в общий слизистый чехол (рис. 3, а). В отдельных случаях несколько мицелиальных тяжей также могли объединяться под общим слизистым чехлом с образованием мелких «бляшек» (рис.3, б, в). Гифы контактирующих мицелиев плотно переплетались, образовывали довольно широкую, плотную зону контакта, в основном представленную множественными тонкими мицелиальными тяжами, не формирующими четкого мицелиального валика (рис.2, рис.3, г). Экссудат и пигментация в зоне контакта отсутствовали.

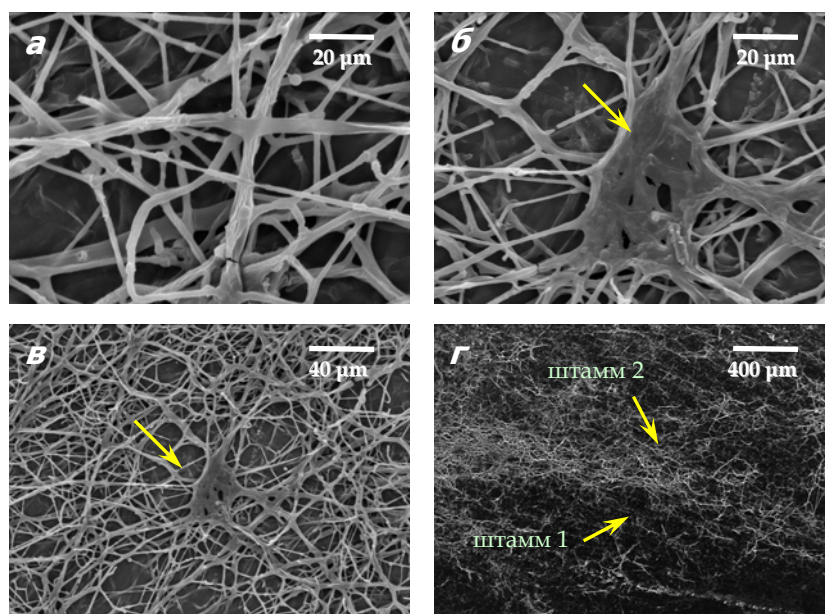


Рис.2. а) мицелиальные тяжи; б, в) «бляшки» объединенного слизью мицелия («бляшки» указаны стрелками) и мицелиальные тяжи; г) общий вид зоны контакта, стрелки указывают направление роста двух мицелиев.

В подавляющем большинстве случаев при срачиваниях дикариотических штаммов наблюдали четко выраженную реакцию вегетативной несовместимости: S (strong) - сильную реакцию и N (normal) – умеренную реакцию антагонизма. Оба типа реакции характеризовались высокой

секреторной активностью и выделением пигментированного экссудата уже на начальном этапе контакта двух мицелиев (рис.2, а, б).

При умеренном антагонизме (N-реакция) между контактирующими мицелиями формировался плотный, хорошо различимый пигментированный мицелиальный валик (барраж) 3-4 мм шириной (рис 2, б). В зоне контакта образовывались множественные мицелиальные тяжи, которые уже на начальном этапе контакта мицелиев нередко объединялись под общим слизистым чехлом в крупные «бляшки». Мицелиальные тяжи и «бляшки», сформированные гифами контактирующих мицелиев, снова покрывались воздушным мицелием, из которого образовывались новые мицелиальные тяжи (рис.4, в). Таким образом, процесс образования в зоне контакта мицелиальных тяжей и «бляшек» повторялся многократно. Фактически барраж формировался из переплетающихся мицелиальных тяжей, постепенно покрывающихся общим слизистым чехлом, сначала как крупные «бляшки», а далее как единый мицелиальный валик.

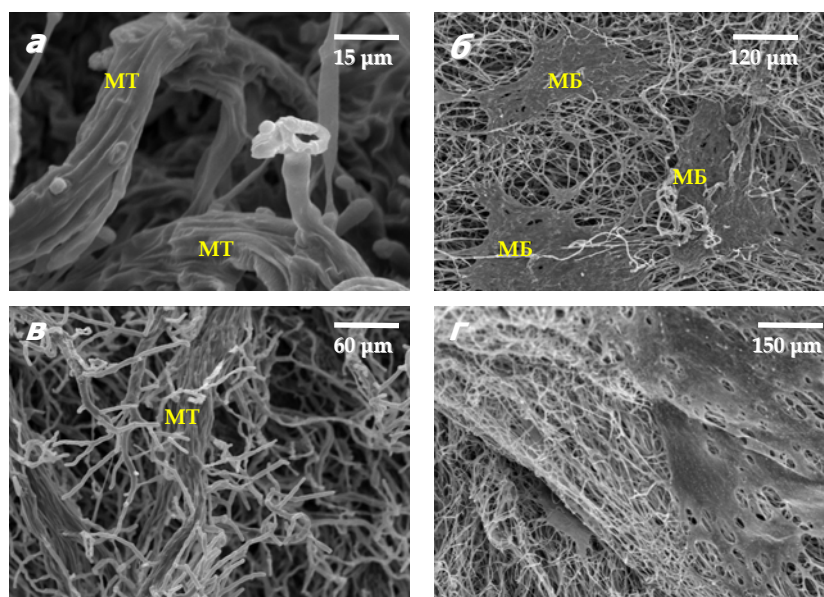


Рис.4 N-реакция вегетативной несовместимости. а) мощные мицелиальные тяжи (MT); б) мицелиальные бляшки (MB); в) воздушный мицелий на MT; г) формирование мицелиального валика (барража).

Сильно выраженный антагонизм (S-реакция) характеризовался образованием мощного, не редко гофрированного и пигментированного барража более 4-5 мм шириной, с каплями экссудата на поверхности (рис.2, а). В зоне контакта образовывались мощные мицелиальные тяжи, которые сливались в единый, покрытый общим слизистым чехлом мицелиальный мат, на котором вновь образовывался воздушный мицелий. Несмотря на отчетливо развитый барраж при сильной антагонистической реакции, на зрелом разросшемся мицелиальном валике можно было обнаружить идущую вдоль

всего барража хорошо различимую область прижатого мицелия в зоне непосредственного контакта мицелиев (рис.5). Однако, если при умеренном антагонизме после образования четкого плотного барража рост воздушного мицелия обоих партнеров в зоне контакта почти прекращался, то при сильной антагонистической реакции наблюдалось активное ветвление воздушного мицелия обоих партнеров, что, в свою очередь, стимулировало дальнейшее развитие барража.

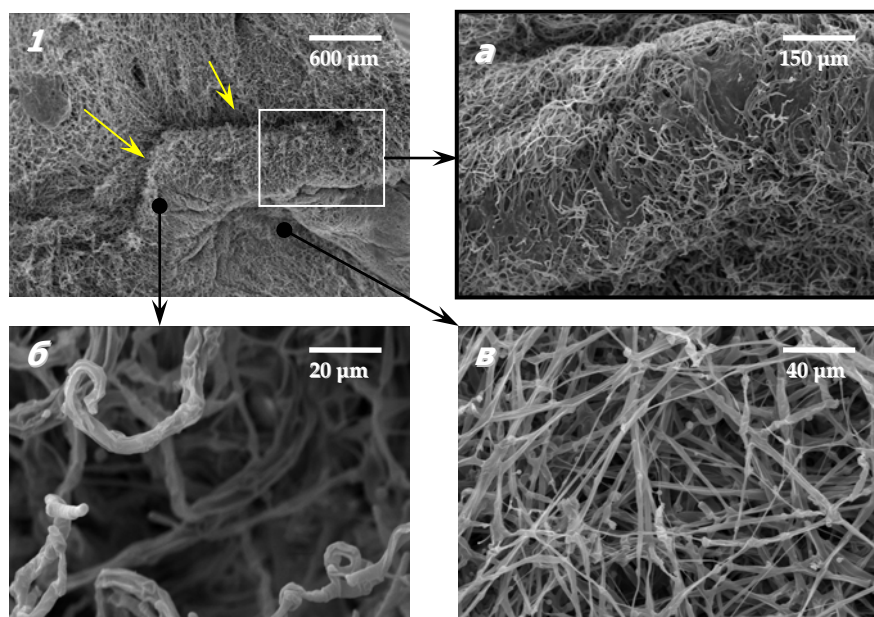


Рис.5 Сильная реакция антагонизма в зоне контакта двух дикарионов. 1 - зона прижатого мицелия: а) структура барража; б) гифы в зоне контакта; в) мицелий рядом с барражом.

Степень антагонизма не зависела от субстрата (породы дерева), а также от времени и места сбора изолятов. Была отмечена полная воспроизводимость типов антагонистических ответов при повторных сращиваниях одних и тех же партнеров, что, вероятно, свидетельствует о генетическом контроле вегетативной несовместимости у базидиомицетов.

4. Анализ частот встречаемости типов вегетативной несовместимости

Природные популяции были охарактеризованы по частотам встречаемости типов реакции вегетативной несовместимости. Сильная и умеренная степени вегетативной несовместимости преобладали как в отдельных выборках, так и во всей коллекции в целом, при этом степень антагонизма не зависела от расстояния между местами сбора изолятов (рис.6). Было отмечено, что в выборках, собранных на территориях природоохранных зон (например, ЗБС и Тверской лесной заповедник), доля S- и N-реакций достигала наибольших

значений, а доля **W**-реакций не превышала 5-6%. Так, в тверской выборке был отмечен самый высокий процент сильных антагонистических взаимодействий (64%) и наименьшая доля **W**-реакций (5%). В воронежской выборке, собранной в черте города, доля слабых взаимодействий оказалась равна 23%, что более чем в 4 раза больше, чем в тверской и звенигородской выборках; при этом вегетативно совместимых штаммов в воронежской выборке не было обнаружено (рис.6, а). В целом по всем выборкам подавляющее большинство природных штаммов, принадлежащих виду *P.pulmonarius*, были вегетативно несовместимы, и только 12% всех комбинаций показали соматическую совместимость (рис.6, б).

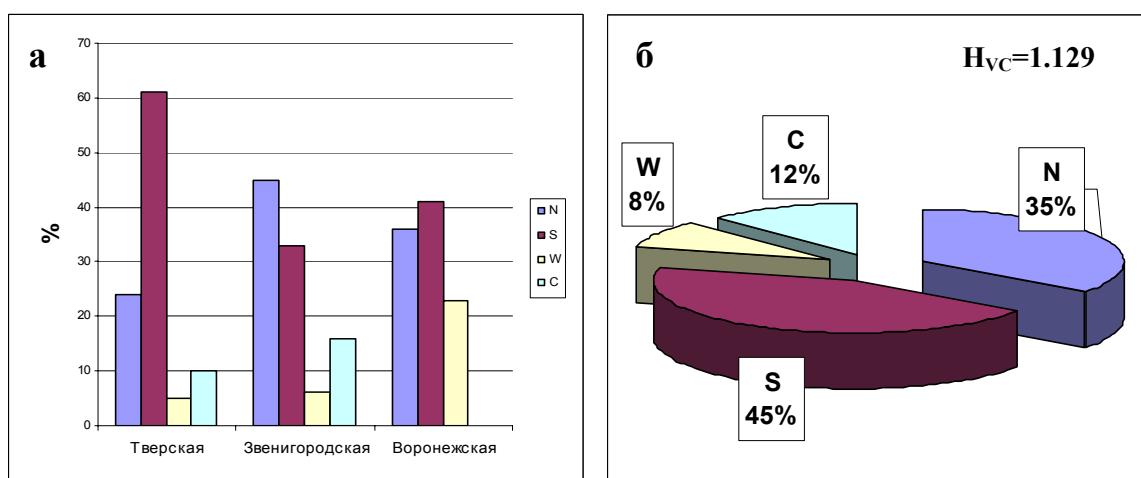


Рис. 6. Характер распределения частот встречаемости типов вегетативной несовместимости. а) В отдельных выборках, б) Суммарно во всей коллекции штаммов *P. pulmonarius*. **W** (weak) – слабая реакция; **S** (strong) – сильная реакция; **N** (normal) – умеренная реакция; **C** (compatibility) – реакция совместимости.

Генетическое разнообразие, оцененное с помощью меры разнообразия по Шеннону, и характер распределения штаммов вешенки в VC-группы были сходными во всех выборках (рис.6, а). Индекс разнообразия по Шеннону составил $H_{vc}=1,129$ с преобладанием S- и N-реакций. Вегетативно совместимые клоны были выделены из плодовых тел, расположенных в пределах одного субстрата (бревна) на расстоянии не более 0,5-1 м.

5. Полиморфизм и генное разнообразие популяций *P.pulmonarius* по совокупности аллозимных генов

Генетическое разнообразие природных выборок вешенки было охарактеризовано по 13 изоферментным локусам (*Acp*, *Adh*, *Fe*, *Lap-1*, *Lap2*, *Idh*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Pgm*, *Pgi*, *Sod*, *Est-1*, *Est-2*), что позволило выявить 40 аллелей. Частоты встречаемости аллелей аллозимных локусов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Частоты аллелей изоферментных локусов в выборках *P. pulmonarius*

Локусы	Аллели	Выборки			Суммарно по всем выборкам
		Звенигородская	Тверская	Воронежская	
Acp	<i>Acp-1</i> ¹²¹	0.046	-*	-	0.017
	<i>Acp-2</i> ¹⁰⁸	0.546	-	0.056	0.224
	<i>Acp-3</i> ¹⁰⁰	0.227	0.556	0.611	0.448
	<i>Acp-4</i> ⁸⁶	0.046	0.222	0.167	0.138
	<i>Acp-5</i> ⁷⁶	0.136	0.222	0.167	0.172
Adh	<i>Adh-1</i> ¹⁰⁰	1.000	-	1.000	1.000
Fe	<i>Fe-1</i> ¹⁰⁰	0.438	0.944	1.000	0.385
	<i>Fe-2</i> ⁹⁶	0.188	0.056	-	0.135
	<i>Fe-3</i> ⁸⁸	0.375	-	-	0.481
Lap1	<i>Lap1-1</i> ¹⁰⁰	0.909	0.889	0.667	0.828
	<i>Lap1-2</i> ⁸⁹	0.091	-	0.111	0.069
	<i>Lap1-0</i> ^{silent}	-	0.111	0.222	0.103
Lap2	<i>Lap2-2</i> ¹⁰⁵	0.046	0.167	0.056	0.086
	<i>Lap2-3</i> ¹⁰⁰	0.455	0.278	0.500	0.414
	<i>Lap2-3</i> ^{s 99}	0.182	0.111	0.167	0.155
	<i>Lap2-4</i> ⁹⁶	0.318	0.167	0.278	0.259
	<i>Lap2-5</i> ⁹³	-	0.167	-	0.052
	<i>Lap2-6</i> ⁸⁶	-	0.111	-	0.035
Idh	<i>Idh-1</i> ¹⁰⁶	0.091	0.167	0.500	0.179
	<i>Idh-2</i> ¹⁰⁰	0.909	0.833	0.313	0.500
	<i>Idh-3</i> ⁹²	-	-	0.188	0.321
<i>Mdh1</i>	<i>Mdh-1</i> ¹⁰⁰	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Mdh2</i>	<i>Mdh-2</i> ¹⁰⁰	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Pgm</i>	<i>Pgm-2</i> ¹⁰⁸	0.091	-	0.056	0.052
	<i>Pgm-3</i> ¹⁰⁰	0.909	0.889	0.944	0.914
	<i>Pgm-4</i> ⁹¹	-	0.111	-	0.035
<i>Pgi</i>	<i>Pgi-1</i> ¹¹⁶	0.455	-	0.222	0.241
	<i>Pgi-2</i> ¹⁰⁰	0.546	1.000	0.722	0.741
	<i>Pgi-3</i> ⁸³	-	-	0.056	0.017
<i>Sod</i>	<i>Sod-1</i> ¹⁰⁰	0.750	0.833	0.889	0.607
	<i>Sod-2</i> ⁸²	0.250	-	-	0.089
	<i>Sod-3</i> ⁷⁴	-	0.167	0.111	0.304
<i>Est1</i>	<i>Est1-1</i> ¹⁰³	0.182	-	0.333	0.172
	<i>Est1-2</i> ¹⁰⁰	0.455	0.667	0.444	0.517
	<i>Est1-3</i> ⁹⁵	0.182	0.111	0.222	0.172
	<i>Est1-4</i> ⁹⁰	0.182	0.222	-	0.138
<i>Est2</i>	<i>Est2-1</i> ¹¹²	0.091	0.056	-	0.052
	<i>Est2-2</i> ¹¹⁰	0.227	0.389	0.556	0.379
	<i>Est2-3</i> ¹⁰⁰	0.500	0.444	0.167	0.379
	<i>Est2-4</i> ⁹⁷	0.182	0.111	0.278	0.190

Примечание: *- аллель не присутствует в данной выборке. Курсивом отмечены редкие аллели с частотой встречаемости $p < 0.09$. Жирным шрифтом отмечены уникальные аллели, обнаруженные только в данной выборке и не встречающиеся в других.

Общая доля полиморфных локусов составила 92% для всей коллекции *P. pulmonarius* (табл.5). При этом два из 13 исследуемых локусов *Mdh-1* и *Mdh-2* оказались мономорфными во всех выборках. В звенигородской и воронежской выборках мономорфным оказался также локус алкогольдегидрогенезы *Adh*. Частоты встречаемости аллелей значительно варьировали в пределах разных популяций – от редко встречающихся с частотой менее 9% (например, аллель *Acp-1*¹²¹ с частотой 0.046 в звенигородской выборке) до доминирующих (например, *Fe-1*¹⁰⁰ в тверской выборке и *Sod-1*¹⁰⁰ в воронежской выборке с частотами встречаемости 0.944 и 0.889 соответственно).

Наиболее полиморфными оказались локусы *Acp*, *Lap-2*, *Est-1*, *Est-2*, представленные в каждой выборке как минимум тремя аллелями. Большинство аллелей полиморфных локусов были представлены во всех исследованных популяциях. Однако, в каждой выборке были обнаружены характерные, встречающиеся только в данной локальной популяции, названные уникальными, аллели. При этом частоты встречаемости уникальных аллелей превышали значение $p \leq 0.09$, т.е. они не являлись редкими (табл.4). Исключением оказался обнаруженный в звенигородской выборке аллель кислой фосфатазы *Acp-1*¹²¹ с частотой встречаемости менее 5% ($p = 0.046$). В звенигородской выборке были отмечены еще два характерных для данной локальной популяции уникальных аллеля: *Fe-3*⁸⁸ и *Sod-2*⁸² с частотами 0.250 и 0.375 соответственно. В тверской выборке было обнаружено три уникальных аллеля: *Lap2-5*⁹³ ($p=0.167$), *Lap2-6*⁸⁶ ($p=0.111$) и *Pgm-4*⁹¹ ($p=0.111$), которые также не являлись редкими. В воронежской популяции был отмечен только один не обнаруженный в других выборках аллель изоцитратдегидрогеназы *Idh-3*⁹² с частотой встречаемости 0.188. Подобное присутствие уникальных аллелей с относительно высокими частотами встречаемости у природных штаммов, собранных в пределах одной географической (и климатической) зоны, можно объяснить появлением и накоплением в локальных популяциях вешенки новых аллелей. Новые аллели могут возникать в результате случайных колебаний частот их встречаемости (генетического дрейфа) в изменяющихся условиях среды.

Одним из ключевых параметров в исследовании популяционно-генетических процессов является гетерозиготность на локус. Различные типы отбора, генный дрейф, неслучайное скрещивание, инбридинг и другие факторы, влияющие на формирование популяционной структуры вида, можно охарактеризовать через уровень гетерозиготности популяций. Во всех исследованных популяциях вешенки наблюдали преобладание доли ожидаемых гетерозигот над наблюдаемыми ($H_o=0.254 < H_e=0.453$), что свидетельствовало о некотором недостатке гетерозигот при условии случайных скрещиваний и,

следовательно, о некотором отклонении от панмиксии (равновесия Харди-Вайнберга) (табл. 5). Вероятно, подобное отклонение от панмиксии в природных популяциях вешенки в наших исследованиях можно объяснить ограниченной репрезентативностью выборок.

Во всех выборках наблюдали случайное распределение аллельных частот, что можно объяснить действием генного дрейфа, а также наличием незначительной миграции. Среднее значение потока генов между выборками из разных регионов оказалось равно $Nm=0.08$, т.е. в среднем одна миграция на поколение. При этом все выборки штаммов вешенки оказались полиморфными и характеризовались высоким уровнем генетического разнообразия. Значения индекса разнообразия I колебались от $I = 0.562$ в тверской выборке до $I = 0.619$ в воронежской и $I = 0.623$ в звенигородской выборках, и для всей коллекции штаммов в целом было $I = 0.794$ (табл.5).

Таблица 5. Генетическое разнообразие и полиморфизм в популяциях *P.pulmonarius*

Выборки	P, %	A	A_E	h_μ	Генотипическое разнообразие			Nm
					H_o	H_e	I	
Звенигородская	76.92	2.54	1.90	0.08	0.281	0.375	0.623	0.15
Тверская	69.23	2.42	1.88	0.05	0.260	0.332	0.562	0.18
Воронежская	75.00	2.50	1.83	0.10	0.255	0.378	0.619	0.13
По всем популяциям в (пределах вида)	92.31	3.15	2.17	0.25	0.254	0.453	0.794	0.08

Примечание: P- доля полиморфных локусов; A- среднее число аллелей на локус; A_E - эффективное число аллелей на локус; наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготности по Левену; I - индекс разнообразия по Шеннону; Nm – поток генов; h_μ – доля редких аллелей ($p \leq 0.09$)

Результаты оценки показателей F_{ST} (генетической дифференциации) и F_{IS} (коэффициента инбридинга) для каждой выборки штаммов по отдельности и суммарно для всей коллекции природных изолятов представлены в таблице 6. Генетическая дифференциация между выборками (F_{ST}), оцененная с помощью F-статистики Райта, оказалась значительной в отдельных выборках и составила 0.726, т.е. приблизительно 27% генетической изменчивости отмечено в пределах данных выборок, а остальные 73% - между изученными популяциями. Вероятно, географически удаленные популяции гриба приспосабливаются к местным условиям, в ходе чего происходит дальнейшее накопление генетических различий, которое в популяциях с ограниченной численностью

особей быстро приводит к значительной генетической дифференциации между ними (табл.6).

Тем не менее, в каждой выборке природных изолятов уровень инбридинга (F_{IS}) не превышал 25%, допустимый для панмиксных популяций базидиального гриба, обладающего тетраполярной системой половой совместимости (табл.6). Таким образом, все три исследованные выборки природных штаммов *P. pulmonarius*, собранные на территории географически удаленных регионов России, несмотря на некоторый недостаток гетерозигот, представляют собой панмиксные популяции.

Таблица 6. Суммарная F-статистика по Райту для всей коллекции природных штаммов вешенки легочной

Локусы	Выборки <i>P. pulmonarius</i>						Суммарно по всем выборкам	
	Звенигородская		Тверская		Воронежская			
	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{ST}</i>
<i>Acp</i>	-0.013	0.493	-0.200	0.400	0.022	0.511	0.113	0.557
<i>Adh</i>	—	0.000	1.000	0.000	—	1.000	1.000	1.000
<i>Fe</i>	0.407	0.831	-0.067	0.467	—	0.000	0.745	0.899
<i>Lap1</i>	-0.100	0.450	1.000	1.000	1.000	1.000	0.770	0.885
<i>Lap2</i>	0.170	0.585	0.086	0.543	-0.039	0.481	0.100	0.549
<i>Idh</i>	-0.100	0.450	-0.231	0.385	0.190	0.681	0.478	0.758
<i>Mdh1</i>	—	0.000	—	0.000	—	0.000	—	0.000
<i>Mdh2</i>	—	0.000	—	0.000	—	0.000	—	0.000
<i>Pgm</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	-0.059	0.471	0.790	0.893
<i>Pgi</i>	0.633	0.817	-	0.000	0.739	0.870	0.740	0.868
<i>Sod</i>	0.733	0.906	0.590	0.795	1.000	1.000	0.866	0.9389
<i>Est2</i>	-0.048	0.476	-0.312	0.344	0.308	0.654	0.051	0.526
<i>Est1</i>	-0.107	0.447	0.422	0.711	-0.137	0.432	0.130	0.565
среднее	0.215	0.626	0.253	0.582	0.232	0.655	0.444	0.726

Примечание: F_{IS} - суммарный коэффициент инбридинга, оценивающий снижение уровня гетерозиготности в силу неслучайных скрещиваний в популяции; F_{ST} - мера генетической дифференциации между популяциями.

На основании частот встречаемости изоферментных локусов были рассчитаны генетические расстояния по Нею и построена дендрограмма сходства/различий между природными изолятами вешенки (рис. 7).

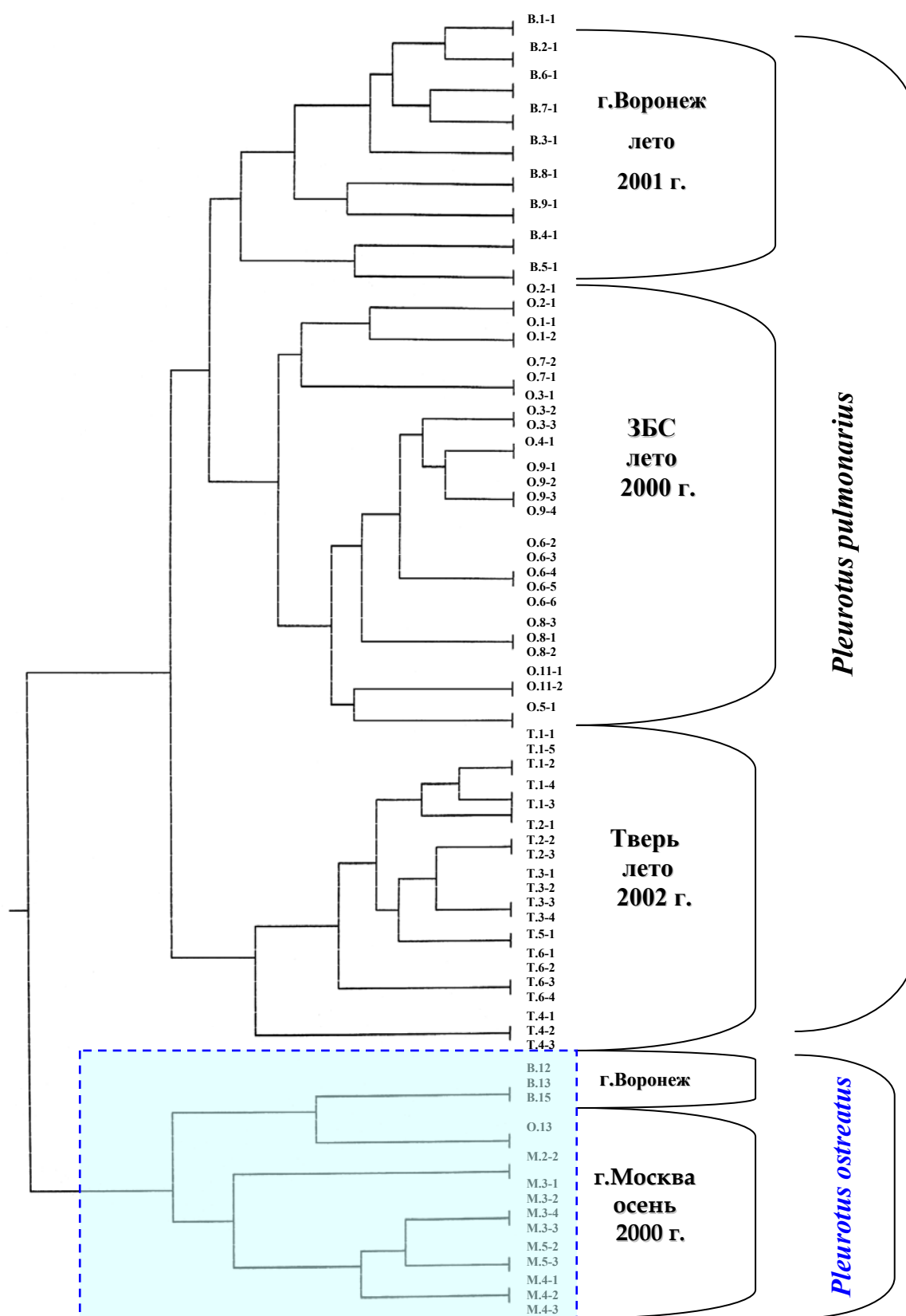


Рис.7. UPGMA-дендрограмма генетического сходства между природными штаммами вешенки, построенная на основе генетических расстояний Нея по 13 изоферментным локусам.

Все штаммы вешенки сформировали два четких обособленных кластера, соответствующих видам *P.pulmonarius* и *P.ostreatus* (I и II интерстерильные группы соответственно). Причем в пределах кластера, соответствующего виду *P. pulmonarius*, четко выделяются три подкластера, представляющие звенигородскую, тверскую и воронежскую выборки соответственно, т.е. присутствует четкая географическая дифференциация. Все вегетативно совместимые природные изоляты на дендрограмме представлены генетически идентичными клонами. Таким образом, дендрограмма отражает как видовую, так и географическую дифференциацию популяций вешенки.

6. ДНК полиморфизм в природных популяциях вешенки

Сходная по топологии дендрограмма генетического сходства и дифференциации между выборками вешенки была получена и с применением полиморфных ДНК признаков (RAPD-маркеров) (рис.7).

По результатам RAPD–ПЦР анализа все природные штаммы также были распределены в кластеры в зависимости от сезона сбора изолятов и их географического происхождения (рис.8). Фактически RAPD-маркеры, как и изоферментные локусы, позволили разделить репродуктивно изолированные близкородственные виды *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*. Но если при анализе изоферментных локусов кластер штаммов *P.ostreatus* находился обособленно на дендрограмме, то на дендрограмме по RAPD-признакам штаммы *P.ostreatus* объединились в кластер с другими изолятами вешенки легочной *P.pulmonarius*, собранными осенью. Иными словами, на дендрограмме по RAPD-признакам наряду с видовой дифференциацией четко выражена географическая и сезонная дифференциация между природными изолятами вешенки. Зависимости кластеризации штаммов от субстратной принадлежности даже в пределах одной локальной популяции отмечено не было.

RAPD-анализ ДНК подтвердил генетическую идентичность вегетативно совместимых штаммов, выделенных в пределах одного субстрата. Эти данные в совокупности с результатами, полученными при анализе 13 изоферментных систем и вегетативной несовместимости природных изолятов, также свидетельствуют в пользу того, что вклад вегетативного размножения в структуру природных популяций вешенки ограничен в пространстве отдельными субстратами и практически сведен к минимуму. Таким образом, кластерный анализ, проведенный по совокупности аллозимных локусов и RAPD-признаков, показал, что дивергенция между видами *P.pulmonarius* и *P.ostreatus* произошла сравнительно недавно и связана как с репродуктивной изоляцией, так и эколого-географическим фактором.

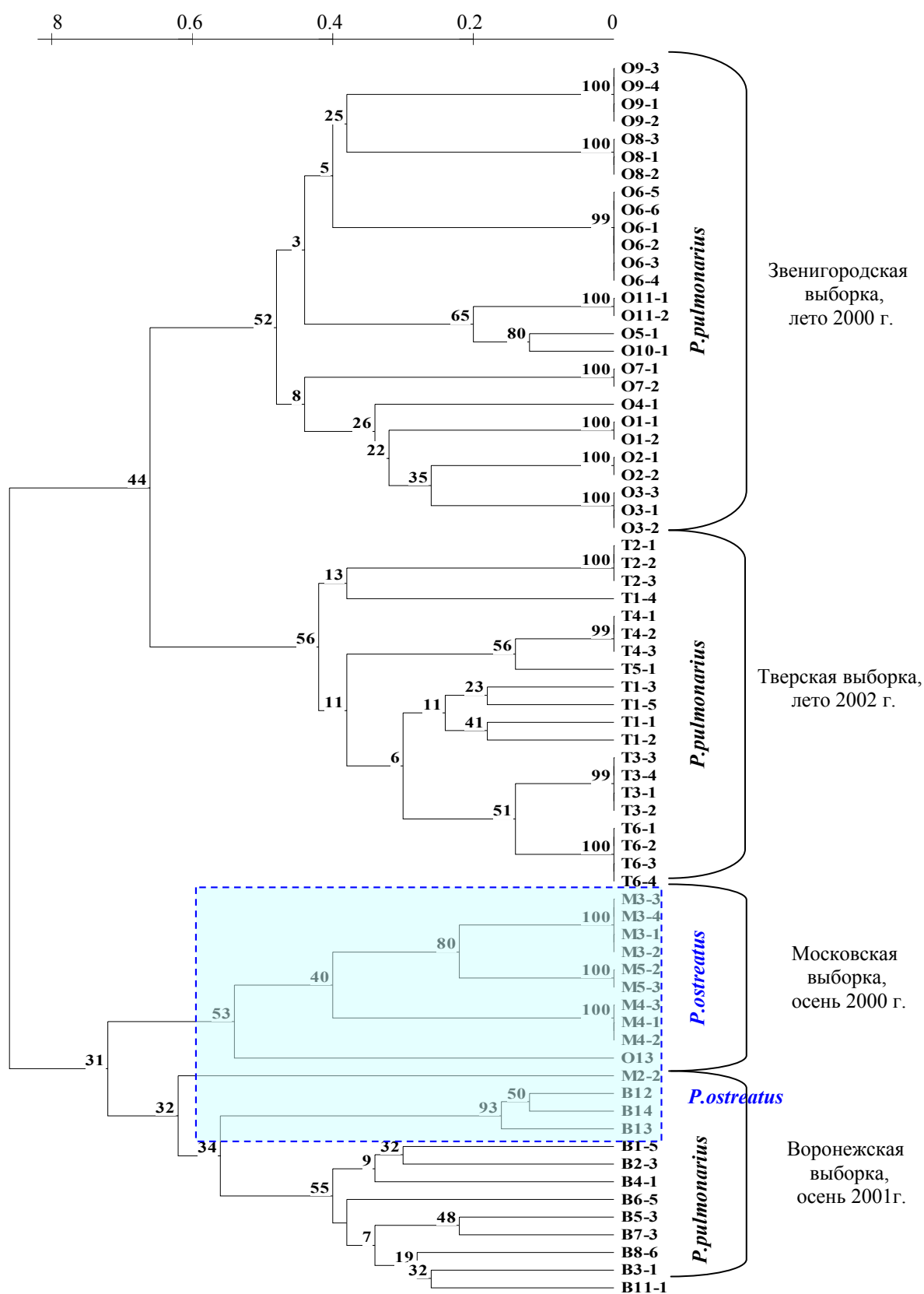


Рис.8. UPGMA-дендрограмма генетического сходства между природными изолятами вешенки, построенная на основе генетических расстояний Нея по RAPD-признакам.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведен детальный анализ внутривидового разнообразия вешенки легочной (*P. pulmonarius*) из разных регионов средней полосы России - Московской, Тверской и Воронежской областей - на основе морфологических, физиологических и молекулярных признаков.
2. Показан высокий уровень полиморфизма и значительное генотипическое разнообразие ($I = 0.794$, $H_{VC} = 1.129$) в природных популяциях вешенки *P. pulmonarius* из трех территориально удаленных регионов.
3. Основными факторами, влияющими на структуру популяций вешенки легочной, являются рекомбинации, обусловленные половым воспроизведением, генетический дрейф и поток генов (миграции).
4. Показана значительная дифференциация ($F_{ST} = 0.726$) между природными популяциями *P. pulmonarius* с уровнем инбридинга, не превышающем 25%, допустимых для грибов, обладающих тетраполярной системой половой совместимости.
5. В популяциях вешенки преобладают антагонистические взаимодействия между грибными индивидуумами сильной (с частотой встречаемости $S = 0.45$) и средней ($N = 0.35$) степени. Степень антагонизма не зависела от субстрата и места сбора изолятов.
6. Показано, что вегетативное размножение у вешенки в природе ограничено в пространстве отдельными субстратами и не оказывает существенного влияния на генотипическую структуру популяций.
7. Впервые исследована ультраструктура мицелия в зоне контакта генетически различных индивидуумов, и показаны этапы формирования барража в зоне антагонизма на границе взаимодействующих дикарионов.
8. Внутривидовая дивергенция на географически изолированные популяции в пределах вида *P. pulmonarius* впервые подтверждена комплексным кластерным анализом по совокупности аллозимных и RAPD-признаков. Близкородственные виды *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*, несмотря на отсутствие четко дифференцированных морфологических признаков, представляют собой репродуктивно изолированные виды, причем дивергенция между этими видами произошла сравнительно недавно.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Шнырева А.В., Штаер О.В., Дьяков Ю.Т. Редкий механизм обменов в природных популяциях вешенки (*Pleurotus ostreatus*) // В сб.: Популяция сообщество, эволюция. Тез. докл., Казань: Новое издание, 2001. С. 124-125
2. Шнырева А.В., Штаер О.В., Дьяков Ю.Т. Внутривидовая структура культивируемого базидиального гриба *Pleurotus ostreatus* // В сб.: Проблемы изучения и охраны биоразнообразия и природных ландшафтов Европы. Материалы конф. по биоразнообразию, 27-30 мая 2001, Пенза, 2001. С.155-157
3. Штаер О.В., Шнырева А.В. Молекулярно-генетический анализ популяций *Pleurotus ostreatus* на территории Звенигородской биостанции МГУ // Роль биостанций в сохранении биоразнообразия России. Материалы конф., посвящ. 250-летию МГУ им. М.В. Ломоносова и 90-летию ЗБС им. С.Н. Скадовского, Москва, 2001. С.189-191
4. Шнырева А.В., Штаер О.В. Типы половой рекомбинации в природных популяциях вешенки устричной, *Pleurotus ostreatus* // В сб.: Современная микология в России. Тез. докл. I съезда микологов России. М.: Национ. акад. микол., 2002. С.168-169
5. Штаер О.В., Шнырева А.В. Сравнительный анализ природных штаммов вида *Pleurotus ostreatus*, проведенный с использованием молекулярно-генетических признаков // В сб.: Микология и альгология – 2004, Тез. докл. Конф., посвящ. 85-летию кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова, 2004. С. 154-155
6. Штаер О.В., Белоконь Ю.С., Белоконь М.М., Шнырева А.В. Сравнительный анализ природных изолятов вида *Pleurotus ostreatus* // Микробиология, 2005, т.74, № 2. С. 231-238
7. Штаер О.В., Шнырева А.В. Вегетативная несовместимость в природных популяциях *Pleurotus pulmonarius* // В сб.: Грибы в природных и антропогенных экосистемах. Материалы конф., посвящ. 100-летию начала работы проф. А.С. Бондарцева в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 24-28 апреля, 2005. С. 323-327
8. Штаер О.В. Ультраструктура мицелия в зоне антагонизма генетически различных индивидуумов *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. // Материалы I (IX) конф. молодых ботаников, Санкт-Петербург, 21-26 мая, 2006. С. 304
9. Шнырева А.В., Штаер О.В. Дифференциация двух близкородственных видов *Pleurotus pulmonarius* и *Pleurotus ostreatus* с помощью скрещиваний и молекулярных маркеров // Генетика, 2006, т.42, № 5. С. 667-674
10. Штаер О.В., Шнырева А.В. Структура мицелия в зоне антагонизма генетически различных индивидуумов *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. // Микол. и фитопатол., 2006, подано в печать.