

**Московский государственный университет имени  
М.В.Ломоносова  
Биологический факультет**

---

На правах рукописи

**Шнырева Анастасия Андреевна**

**ГРИБЫ РОДА *PLEUROTUS*: ГЕНОТИПИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ  
ЛОКУСОВ ПОЛОВОЙ СОВМЕСТИМОСТИ**

**Специальность 03.02.12 – микология**

**ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:  
д.б.н., проф. Ю.Т. Дьяков**

**Москва  
2015**

## Содержание

|                                                                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Введение.....</b>                                                                                                              | <b>3</b>  |
| <b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>                                                                                            | <b>6</b>  |
| 1.1 Систематическое положение и характеристика видов рода <i>Pleurotus</i> .....                                                  | 6         |
| 1.2 Концепция вида у грибов.....                                                                                                  | 10        |
| 1.3 Половое размножение высших базидиальных грибов и структура генов, участвующих в<br>процессе половой совместимости.....        | 17        |
| <b>Глава 2. Материалы и методы.....</b>                                                                                           | <b>29</b> |
| 2.1 Объекты исследования.....                                                                                                     | 29        |
| 2.2 Культивирование штаммов вешенки.....                                                                                          | 33        |
| 2.3 Получение плодовых тел в лабораторных условиях.....                                                                           | 33        |
| 2.3.1 Получение плодовых тел и споровых отпечатков на чашках Петри.....                                                           | 33        |
| 2.3.2 Выгонка плодовых тел.....                                                                                                   | 33        |
| 2.4 Получение тестерных штаммов.....                                                                                              | 36        |
| 2.5 Выделение ДНК, амплификация и анализ ITS последовательностей.....                                                             | 37        |
| 2.5.1 Выделение геномной ДНК.....                                                                                                 | 37        |
| 2.5.2 Амплификация ITS последовательностей на матрице геномной ДНК.....                                                           | 38        |
| 2.5.3 Секвенирование нуклеотидных последовательностей и анализ данных.....                                                        | 38        |
| 2.5.4 Баркодинг на основе рестрикционного анализа ITS последовательностей.....                                                    | 39        |
| 2.6 Биоинформатический анализ структуры <i>matA</i> локусов половой совместимости у<br>представителей рода <i>Pleurotus</i> ..... | 40        |
| 2.7 Клонирование генов <i>matA</i> локуса.....                                                                                    | 40        |
| 2.7.1 Вектор для клонирования и штаммы использованных микроорганизмов.....                                                        | 40        |
| 2.7.2 Выделение ДНК.....                                                                                                          | 41        |
| 2.7.3 Приготовление компетентных клеток и трансформация.....                                                                      | 41        |
| 2.7.4 Амплификация и клонирование <i>hd</i> генов гомеодоменных белков.....                                                       | 42        |
| <b>Глава 3. Результаты и обсуждение.....</b>                                                                                      | <b>45</b> |
| 3.1 Культивирование видов рода <i>Pleurotus</i> в лабораторных условиях.....                                                      | 45        |
| 3.2 Филогенетический анализ видов рода <i>Pleurotus</i> .....                                                                     | 53        |
| 3.2.1 Оценка «надежности» ITS последовательностей видов рода <i>Pleurotus</i> в ГенБанке.....                                     | 53        |
| 3.2.2 Филогенетический анализ видов рода <i>Pleurotus</i> .....                                                                   | 54        |
| 3.2.3 Анализ эволюционных расстояний между видами рода <i>Pleurotus</i> .....                                                     | 61        |
| 3.3. Анализ половой совместимости в пределах комплексных видов рода <i>Pleurotus</i> . Мон-мон<br>скрещивания.....                | 62        |
| 3.3.1 Анализ половой совместимости между видами <i>P. cajor-caju</i> и <i>P. pulmonarius</i> .....                                | 63        |
| 3.3.2 Анализ половой совместимости между представителями вида <i>P. cornucopiae</i> .....                                         | 66        |

|                                                                                                          |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3.3 Анализ репродуктивной изоляции между коммерческими и природными штаммами <i>P. ostreatus</i> ..... | 68         |
| 3.3.4 Уточнение видового статуса и разрешение «спорных» видов рода <i>Pleurotus</i> .....                | 70         |
| 3.4 Баркодинг видов рода <i>Pleurotus</i> .....                                                          | 72         |
| 3.5 Анализ генов половой совместимости у представителей рода <i>Pleurotus</i> .....                      | 81         |
| 3.5.1 Структура <i>matA</i> локуса половой совместимости.....                                            | 81         |
| 3.5.2 Клонирование генов <i>matA</i> локуса <i>P. ostreatus</i> .....                                    | 90         |
| <b>Глава 4. Заключение.....</b>                                                                          | <b>99</b>  |
| <b>Выводы.....</b>                                                                                       | <b>103</b> |
| <b>Список литературы .....</b>                                                                           | <b>104</b> |
| <b>Благодарности .....</b>                                                                               | <b>119</b> |
| <b>Приложения.....</b>                                                                                   | <b>120</b> |

## Введение

**Актуальность исследования.** Представители базидиальных грибов рода *Pleurotus* (Fr.) Kumm., вешенка, хорошо известны и встречаются повсеместно. Виды рода *Pleurotus* широко распространены в лесных биоценозах средней полосы России, а также многие из них культивируются в пищевых целях. Видовой состав рода довольно разнообразен. Большинство видов рода съедобны или условно съедобны. Многие виды представляют биотехнологическую и медицинскую ценность, так как обладают пулом ферментов семейства пероксидаз (Bonatti *et al.*, 2004). Показано также, что спиртовые и водные экстракты полисахаридов многих представителей данного рода обладают антиопухолевой и антиоксидантной активностью (Lakshmi *et al.*, 2005; Sánchez, 2010). Данный род характеризуется сложной структурой видов. Зачастую точное определение видов в пределах рода *Pleurotus* затруднено в связи со схожестью морфологических характеристик, особенно если речь идет о комплексных видах, представленных интерстерильными группами. Морфология плодовых тел при культивировании вешенок также отличается вариабельностью признаков и, как показано, во многом зависит от условий выращивания (Sánchez, 2004; Avin *et al.*, 2012). Поэтому классическое определение грибов на основе культурально-морфологических характеристик целесообразно сопровождать молекулярно-генетическими методами анализа. В связи с этим поиск универсальных молекулярных маркеров и генотипирование видов является одной из основополагающих задач современной таксономии, а также необходимо для создания и систематизации коллекции грибов.

Половое размножение и образование фертильного дикариотического мицелия и плодовых тел у базидиальных грибов контролируется генами локусов половой совместимости *matA* и *matB*. Локус *matA* обладает вариабельной структурой и кодирует гомеодоменные белки (HD, homeodomain), гетеродимеры которых являются транскрипционными факторами, участвующими в регуляции процессов полового развития. Только гомеодоменные белки, синтезированные с разных аллелей *matA* локусов половых партнеров, могут сформировать активный гетеродимерный белок. Подобный механизм генетического контроля значительно уменьшает вероятность инбридинга и направлен на поддержание природного внутривидового полиморфизма. В связи с высокой вариабельностью последовательностей генов гомеодоменных белков (*hd*) и вариабельностью количества копий этих генов в пределах *matA* локуса, их изучение затруднено. Тем не менее, расшифровка структуры локусов и содержащихся в них последовательностей важна для понимания механизмов размножения и развития грибов, а также оптимизации процессов направленной селекции.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы было изучение генетического разнообразия видов рода *Pleurotus*, генотипирование и создание системного подхода к их молекулярной идентификации, анализ половой совместимости в пределах комплексных видов, а также молекулярно-генетический и структурный анализ *matA* локуса половой совместимости на примере вида *P. ostreatus*.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести генотипирование 37 штаммов, относящихся к 10 видам вешенки - *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae*, *P. citrinopileatus*, *P. calyptratus*, *P. cystidiosus*, *P. dryinus*;
2. Провести генотипирование 10 видов вешенки, относящихся к интерстерильным группам, которые не представлены в нашей коллекции – *P. abieticola*, *P. albidus*, *P. australis*, *P. euosmus*, *P. fuscoquamulosus*, *P. levis*, *P. populinus*, *P. purpureo-olivaceus*, *P. tuber-regium* - на основе последовательностей из ГенБанка;
3. Разработать метод молекулярной идентификации видов (баркодинг) на основе рестрикционного анализа вариабельной ITS последовательности кластера генов рДНК для видов вешенок;
4. Подтвердить таксономический статус спорных видов *P. sajor-caju* и *P. euosmus*;
5. Провести *in silico* структурный анализ *matA* локуса и закодированных в нем последовательностей генов гомеодоменных белков для вида *P. ostreatus* и некоторых представителей рода (*P. djamor* и *P. eryngii*);
6. Создать гибридные конструкции генов гомеодоменных белков *matA* локуса *P. ostreatus* на основе эукариотического вектора pYSK7 для трансформации в геном базидиального гриба *Coprinopsis cinerea*.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** В ходе настоящей работы был разработан быстрый и эффективный метод молекулярной идентификации (баркодинг) для видов рода *Pleurotus* на основе рестрикционного анализа ITS1-5.8S-ITS2 последовательности кластера рибосомальных генов. Был проведен детальный анализ видовой принадлежности штаммов в пределах комплексных видов *P. sajor-caju* – *P. pulmonarius* и *P. euosmus* – *P. cornucopiae* и разрешен вопрос о таксономическом статусе данных видов, что было предметом дискуссии среди микологов.

В ходе экспериментов был адаптирован метод получения плодовых тел в лабораторных условиях для большинства видов рода *Pleurotus*. Впервые были получены в лабораторных условиях полноценные плодовые тела для несъедобного вида *P. calyptratus*. Был также разработан метод получения гимения и стерильных споровых отпечатков непосредственно на чашках Петри.

Был проведен детальный анализ *in silico* структуры генов *matA* локуса, кодирующих гомеодоменные транскрипционные факторы, на основе двух совместимых по полу гаплоидных штаммов *P. ostreatus*. Были созданы рекомбинантные конструкции, содержащие гены гомеодоменных белков *P. ostreatus*, на основе вектора pYSK7 для трансформации в *S. cinerea* с целью последующей экспрессии этих генов и выяснения механизма функционального взаимодействия белков от гетерологичных хозяев.

Данная работа представляет ценность для исследователей в области микологии и филогенетики, внося вклад в изучение генетического разнообразия и ресурсов таких хозяйственно значимых объектов как грибы рода *Pleurotus*. Работа имеет практическую значимость для селекционеров и грибных производителей. Разработанная система молекулярных баркодов имеет несомненную практическую значимость для контроля чистоты мицелиальных культур в коллекциях промышленных микроорганизмов грибного происхождения. Работа также вносит вклад в фундаментальную науку и изучение таких основополагающих вопросов как генетика пола у грибов и регуляция половой совместимости между партнерами и дальнейшего развития организма.

**Апробация работы.** Результаты исследований были представлены на заседании кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ; на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 2012); Международном конгрессе «18th Congress of the International Society for Mushroom Science» (Пекин, Китай, 2012); 3-м Съезде микологов России (Санкт-Петербург, 2012); Международной конференции «7th International Medicinal Mushroom Conference» (Пекин, Китай, 2013); Международной конференции «12th European Conference on Fungal Genetics» (Севилья, Испания, 2014); 6-м Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2014); Международном конгрессе «10th International Mycological Congress» (Бангкок, Таиланд, 2014).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 3 – статьи в журналах из списка рекомендованных ВАК, 3 – статьи в сборниках, 9 – тезисы конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 129 страницах, иллюстрирована 19 рисунками и 12 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 165 источников, из них 148 на английском языке. Приложение содержит 10 рисунков.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Систематическое положение и характеристика видов рода *Pleurotus*

Отдел *Basidiomycota* R.T.Moore

Подотдел *Agaricomycotina* Dowell

Класс *Agaricomycetes* Dowell

Порядок *Agaricales* Underw.

Семейство *Pleurotaceae* Kühner

Род *Pleurotus* (Fr.) Kumm. ( согласно Index Fungorum)

Представители семейства *Pleurotaceae* (вешенковые) относятся преимущественно к ксилотрофам, обитающим на мертвой древесине, и встречаются повсеместно. Общие морфологические характеристики представителей семейства: плодовые тела, как правило, сидячие или с боковой эксцентрической ножкой, реже с центральной; шляпка веерообразная, почковидная, языковидная или уховидная; мякоть упругая, сухая и мясистая; споровый порошок белый, кремовый, розоватый или сиреневатый; пластинки гимения нисходящие или приросшие; у некоторых видов на ранних этапах развития присутствует кольцо от частного покрывала; плодовые тела часто растут группами или срастаются основаниями. Семейство включает более 30 видов (Гарибова, Сидорова, 1997). У большинства видов мицелий образует пряжки в местах формирования септ, которые обеспечивают миграцию ядер между клетками гифы.

Наиболее распространенные в средней полосе России виды – **вешенка устричная** *P. ostreatus* (Fr.) Kumm. и **вешенка легочная** *P. pulmonarius* (Fr.) Quel. В природе представители *P. ostreatus* обитают в лесах умеренной зоны, растут группами на пнях и стволах различных лиственных пород. Плодоношение у *P. ostreatus* происходит с мая по сентябрь во влажных условиях и при температуре около 20°C. Этот вид съедобен и широко культивируется по всему миру как на специально подготовленных субстратах, так и на различных сельскохозяйственных и промышленных отходах (солома, лузга семян подсолнуха, отходы обработки хлопчатника и целлюлозно-бумажной промышленности) (Гарибова, Сидорова, 1997).

Благодаря высокой пищевой ценности, большому количеству витаминов и микроэлементов, а также иммуномодулирующей активности, вешенка устричная занимает второе место в рейтинге промышленных объемов культивирования грибов по всему миру после шампиньона *Agaricus bisporus* (Baars *et al.*, 2000; Wasser, Weis, 1999; Sánchez, 2009). Л.В. Гарибова и И.И. Сидорова дают следующее морфологическое описание данного вида (Гарибова, Сидорова, 1997): шляпка 3-17 см в диаметре, округлая, выпуклая или широковоронковидная, зачастую эксцентрическая, неслизистая, гладкая, влажная, от

молочно-белой до темно-бурой окраски. Пластинки гимения нисходящие, широкие, редкие, белые, желтеющие, нередко анастомозирующие. Мякоть плотная, белая. Ножка 2-4 см высотой, до 3 см в диаметре, боковая, цилиндрическая, сплошная, белая, гладкая, иногда при основании слегка волосистая или войлочная, может отсутствовать. Согласно описанию, данному И.А. Дудкой и С.П. Вассером (Дудка, Вассер, 1987) гифальная система мономитическая, с регулярными пряжками; базидии 30-40 x 4-6 мкм, цилиндрические, вздутые на вершине, тонкостенные; базидиоспоры 7-12 x 3-4 мкм, цилиндрические, эллипсоидальные, широковеретеновидные или миндалевидные, гладкие, тонкостенные, неамилоидные, в массе кремовые, сероватые или розоватые.

Следующий распространенный вид в лесах средней полосы России - **вешенка легочная, *P. pulmonarius* (Fr.) Quel.** Вид также растет группами на отмершей древесине, находящейся на разных стадиях разложения. Обитает преимущественно на лиственных породах (липа, береза, осина, дуб, бук), реже на хвойных (ель, пихта). Образование плодовых тел зачастую также происходит во влажных, прохладных, затемненных участках леса, с июля по сентябрь. Гриб съедобен и обладает приятным вкусом и запахом. Также используется в промышленном культивировании для пищевых целей, но в меньшей степени, чем вешенка устричная (Гарибова, Сидорова, 1997). Л.В. Гарибова и И.И. Сидорова дают следующее морфологическое описание данного вида: шляпка 4-9 см в диаметре, языковидная, выпуклораспростертая, с тонким и часто надтреснутым краем, гладкая, белая, желтовато-бурая, иногда с сероватым или палевым оттенком. Мякоть тонкая, упругая, белая. Пластинки нисходящие, частые, средней ширины. Ножка боковая, 1-2 см длиной и около 1,5 см в диаметре, цилиндрическая, сплошная, белая, войлочноопушенная. Споры 6-11 x 2-4 мкм, цилиндрично-продолговатые, гиалиновые, тонкостенные (Lechner *et al.*, 2004). Стоит отметить, что плодовые тела *P. pulmonarius*, встречающиеся в природе, иногда морфологически похожи на плодовые тела *P. ostreatus*. Однако генетическими методами было показано, что это два разных близкородственных вида (Шнырева, Штаер, 2006). Морфологическим сходством с *P. pulmonarius* обладает еще один вид вешенок – ***P. sajor-caju* (Fr.) Singer.** Этот вид используется в промышленном производстве в связи с легкостью культивирования и высокой продуктивностью. Однако, видовой статус *P. sajor-caju* до сих пор точно не установлен. Некоторые авторы считают, что *P. sajor-caju* является разновидностью или термоустойчивым штаммом *P. pulmonarius* (Chiu *et al.*, 1998; Idowu, 2003), в то время как другие считают их близкородственными видами (Lakshmi *et al.*, 2005; Kashangura *et al.*, 2006).

**Вешенка степная *P. eryngii* (Fr.) Quel.** также съедобна и широко культивируется в азиатских странах. Гриб растет на корнях и в основании отмерших стеблей некоторых



зонтичных (*Eryngium*, *Ferula*), плодоносит в сентябре-октябре. Обнаруживается в степных зонах, например, в пустынно-степных предгорьях Средней Азии (Гарибова, Сидорова, 1997). Согласно морфологическому описанию Л.В. Гарибовой и И.И. Сидоровой, шляпка гриба 4-8 см в диаметре, очень мясистая, плоская, выпуклая, неправильная по форме, гладкая или слегка чешуйчатая, от бело-кремовой до коричневатой. Пластинки нисходящие, редкие, широкие, беловато-розоватые. Ножка до 6 см высотой, до 4 см в диаметре, плотная, немного эксцентрическая, к основанию суженная, беловатая.

**Розовая вешенка, *P. djamor*** (Rumph. ex Fr.) Boedijn., – один из наиболее ярких представителей рода. Этот экзотический вид встречается в субтропической климатической зоне. Плодовые тела по морфологическим параметрам похожи на вешенку устричную *P. ostreatus*, однако отличаются кораллово-красным цветом примордиев и розовым или бледно-розовым цветом взрослых плодовых тел. Шляпка 2-4 см в диаметре, гладкая. Пластинки гимения нисходящие, частые, гладкие. Ножка до 5 см высотой, до 3 см в диаметре, боковая, гладкая, иногда отсутствует (Lechner *et al.*, 2004). Плодовые тела растут большими группами на пораженной или разлагающейся древесине. Плодоношение происходит весной, при температуре около 30°C (Srivastava, 2001). Споровый порошок от кремового до розоватого цвета, размер спор составляет 6-10 x 2-5 мкм; споры гиалиновые, неамилоидные, тонкостенные (Corner, 1981; Stamets, 1993; Lechner *et al.*, 2004).

**Вешенка рожковидная, *P. cornucopiae*** (Paul.) Rolland – также съедобна и культивируема. Гриб распространен по всей территории России и плодоносит в июле-сентябре. Растет в группах по несколько плодовых тел на пнях и валежных стволах лиственных пород (Гарибова, Сидорова, 1997). Шляпка гриба составляет 3-12 см в диаметре, вогнутая или воронковидная, вытянутая наподобие рожка, беловатая или желто-охряная. Мякоть белая, мягкая с мучнисто-сладковатым запахом и вкусом. Пластинки далеко нисходящие, белые, узкие. Ножка 2-6 см длиной и 1,5-2 см в диаметре, эксцентрическая, сплошная, цилиндрическая или к основанию суженная, белая или желто-охряная. Споры 8-9,5 x 3,5-4 мкм, бледно-серые, розоватые, неамилоидные (Corner, 1981).

**Вешенка лимонношляпковая, *P. citrinopileatus*** Singer – вид, распространенный на восточной территории России, а также в северном Китае и Японии. Вид съедобен, распространен в промышленном культивировании. Является близкородственным виду *P. cornucopiae* (Petersen *et al.*, 2011). Плодовые тела вешенки золотой, или лимонношляпковой, растут группами на разлагающейся древесине лиственных пород (например, на вязах). Шляпка 2-7 см в диаметре, тонкая, от ярко-желтой до золотисто-коричневой окраски. Пластинки гимения белые, частые, нисходящие. Споры цилиндрические или эллипсоидные, гладкие, гиалиновые, амилоидные, 6-9 x 2-3,5 мкм (Ohira, 1990; Parmasto, 1987).

**Вешенка покрытая, *P. calyptratus*** (Lindblad ex Fr.) Sacc., в отличие от остальных вешенок практически не съедобна, так как имеет плотную, мясистую, кожистую и резиноподобную по консистенции шляпку. Плодоношение происходит с конца апреля по июль, особенно массово в мае. Гриб растет на сухостойной и упавшей древесине (осина), поодиночке или, реже, группами. Шляпка 3-8 см, сидячая, почко- или веерообразная, с загнутым вниз краем, гладкая, от коричнево-серого до светло серого цвета. Пластинки гимения широкие, довольно частые, прикрыты толстым светлым пленчатым покрывалом, которое со временем разрывается и остается по краю шляпки ([http://mycoweb.narod.ru/fungi/Pleurotus\\_calyptratus.html](http://mycoweb.narod.ru/fungi/Pleurotus_calyptratus.html)). Споры 9-15 x 3-5 мкм, неамилоидные (Corner, 1981).

***P. cystidiosus*** O.K. Mill. – значимый представитель рода *Pleurotus*, так как способен производить бесполое спороношение (анаморфную стадию) в виде коремий на дикариотическом мицелии. Вид является экзотическим для России и встречается в Аргентине, Южной Африке, на острове Тайвань и других местообитаниях. Съедобен. Шляпка крупная, 8-17 см в диаметре, мясистая, языковидная, влажная, от бледно-желтого до охряного цвета, иногда сероватая, гладкая, часто с надтреснутым краем. Пластинки нисходящие, целые, частые, средней ширины, анастомозирующие и истончающиеся к ножке, формируют псевдоретикулум. Ножка светлая, коричневая или сероватая, эксцентрическая, боковая, 2-5 см в длину, 1-3 см в диаметре, сужающаяся к основанию. Споры 11-18 x 4-6 мкм, гиалиновые, гладкие, тонкостенные, цилиндрические, продолговатые; споровый порошок белый, кремовый. Анаморфа представлена артроспорами, собранными в черные коремии. Коремии сами по себе выглядят как маленькие плодовые тела с черной, влажной шляпкой 0,4-0,9 мм в диаметре и белой ножкой 0,6-1,25 мм в длину и 0,1-0,2 мм в диаметре. Гифы, формирующие коремии, тонкостенные, соединенные в пучок. Артроконидии темные, цилиндрические, 5-6 x 14-17 мкм (Lechner *et al.*, 2004).

**Вешенка дубовая, *P. dryinus*** (Pers.) P. Kumm. – еще один представитель рода *Pleurotus*, формирующий анаморфную стадию. Гриб съедобен и распространен в лесах России со второй половины июля до сентября на валежнике широколиственных пород (дуб, вяз), характерен для северных температурных зон. Произрастает одиночно или небольшими группами. Шляпка 4-15 см в диаметре, крупная, мясистая, плосковыпуклая, белая, кремовая, желтоватая, коричневая, покрыта темными чешуйками, по краю нередко остается частное покрывало. Пластинки гимения нисходящие, частые или редкие, светлоокрашенные. Ножка 2—10 см длиной, 1-3 см в диаметре, цилиндрическая или немного утолщающаяся книзу, центральная, эксцентрическая или вовсе боковая, бархатистая, беловатая, с плёнчатым или хлопчатым кольцом, обычно исчезающим к старости гриба. Споры 9-12 x 3-6 мкм,

эллиптические, гладкие, неамилоидные; споровый порошок белый (Сержанина, 1984; William, 2003; [http://mycoweb.narod.ru/fungi/Pleurotus\\_dryinus.html](http://mycoweb.narod.ru/fungi/Pleurotus_dryinus.html)). При культивировании на чашках Петри дикариотический мицелий *P. dryinus* образует сухой, пылящий зеленовато-коричневатым налет, представляющий собой бесполое спороношение в виде цепочек коричневых артроспор (Petersen *et al.*, 2011).

## 1.2 Концепция вида у грибов

Видовая структура рода *Pleurotus* сложна и разнообразна. Род включает в себя более 30 видов, причем видовой статус большого количества представителей этого рода до сих пор обсуждается (Гарибова, Сидорова, 1997). В связи с этим важно разграничить три принципиальных подхода, или концепции, в определении вида у грибов.

Исторически традиционной считается **концепция морфологического вида**. Эта концепция основывается на фенотипических подходах систематики - сравниваются видимые морфологические, реже физиолого-биохимические признаки (Шнырева, 2011). Данный подход считается классическим и широко распространен. Однако, морфологические проявления признаков находятся под большим влиянием абиотических и биотических факторов среды и, таким образом, обладают высокой степенью вариабельности в зависимости от условий местообитания. Так, в некоторых условиях близкородственные виды проявляют сходную морфологию, в то время как штаммы одного вида из разных местообитаний могут иметь существенные морфологические и физиолого-биохимические различия.

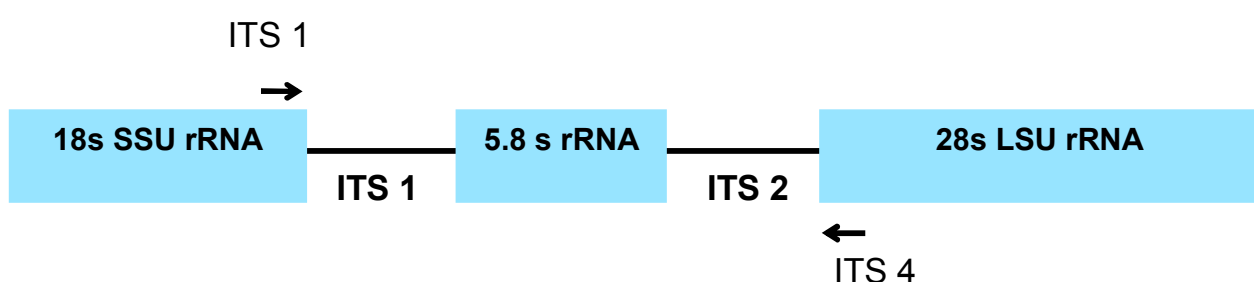
В связи с высокой вариабельностью морфологических характеристик у грибов в двадцатом веке большую популярность получила **концепция биологического вида**. Данная концепция основывается на классическом определении вида (Майр, 1971): вид – это группа свободно скрещивающихся организмов, дающих жизнеспособное потомство и репродуктивно изолированных от других таких же групп. Согласно концепции, две популяции организмов относятся к разным видам в том случае, если скрещивание между ними затруднено или не происходит вовсе. Таким образом, репродуктивная изоляция – это основной критерий разграничения близкородственных и зачастую схожих по морфологии видов (Шнырева, 2011). Однако, разграничение видов на основе репродуктивной изоляции не всегда возможно ввиду того, что половая стадия у многих грибов встречается редко или может отсутствовать вовсе (например, митоспоровые грибы). Кроме того, процесс образования новых видов идет также и за счет накопления генетической изменчивости, связанной с процессами миграции, генетического дрейфа, рекомбинации и отбора (Алтухов, 2003; Шнырева, 2007). Отбор – это процесс, когда различные генетически обусловленные

фенотипические варианты в пределах одного вида различаются по их вкладу в каждое последующее поколение (Endler, 1986). Таким образом, отбор является основным двигателем эволюции, а образование видов у грибов может быть связано, например, с их расхождением по различным экологическим нишам обитания (Дьяков, 1999; Шнырева, 2011). Также, особую роль в постоянном процессе образования видов может играть и искусственный отбор, или селекция по определенным производственно важным признакам. В частности, роль селекции в образовании и дивергенции видов важна для таких культивируемых объектов, как виды рода *Pleurotus*.

За последние годы было показано, что генетическая эволюция многих базидиальных грибов опережает морфологическую эволюцию, а многие морфологические виды представляют собой ассоциации видов-двойников (Радзиевская, 1987; Шнырева и др., 1998). Совокупность недавних исследований, сделанных в областях биохимической генетики популяций и сравнительной генетики вида, заставляет признать, что процесс образования новых видов, а тем более макроэволюция, далеко не всегда сводится к простой замене аллелей уже существующих генных локусов, и репродуктивная изоляция не есть побочный продукт длительного процесса дивергенции популяций. Напротив, репродуктивная изоляция - важнейшее первичное условие возникновения нового вида (Алтухов, 1997; Шнырева и др., 2012). По этой причине наиболее актуальным для разграничения видов базидиальных грибов является классический генетический метод скрещиваний монокариотических гаплоидных культур (метод *мон-мон* скрещиваний). На основании скрещиваемости можно разделить не только морфологически сходные виды, как это было показано в работе по разграничению *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* (Шнырева, Штаер, 2006), но и обнаружить внутривидовые вариации, разделенные неполными репродуктивными барьерами (Bresinsky *et al.*, 1987; Шнырева и др., 1996). Метод скрещиваний основан на получении монокариотических гаплоидных тестерных линий для исследуемого штамма гриба из колониального рассева базидиоспор. В основе реакций половой совместимости (репродуктивной изоляции) лежат гены *mat* локуса, которые участвуют как в самом процессе скрещивания, так и в последующем развитии вновь образованного дикариона (функционального диплоида). Так, ранее методом *мон-мон* скрещиваний между монокариотическими тестерными линиями различных видов вешенок было показано, что виды рода *Pleurotus* подразделяются на 16 интерстерильных групп или видовых комплексов, скрещивание между которыми затруднено (Vilgalys, Sun 1994; Zervakis *et al.*, 1994; Шнырева и др., 1998; Petersen *et al.*, 2011; Шнырева, Шнырева, 2014).

В связи с высокой трудоемкостью процесса получения монокариотических гаплоидных культур и проведения скрещиваний, а также с развитием молекулярно-генетических методов

анализа, в последние десятилетия особой популярностью пользуется новый, третий подход, основанный на **концепции молекулярного вида**. Базовым способом молекулярной идентификации видов по праву считается прочтение (секвенирование) нуклеотидных последовательностей определенных, в разной степени переменных участков генома, приемлемых для межвидового сравнения, с последующим сравнением полученных данных с электронной базой данных таких же геномных последовательностей - NCBI, EMBL-EBI или DDBJ - при помощи инструмента BLAST. Полученные последовательности используются для молекулярной систематики организмов, а именно в филогенетических исследованиях. Однако, далеко не каждая последовательность генома может быть использована в качестве филогенетического маркера. Так, для филогенетических исследований в царстве грибов в настоящее время предложено использовать шесть универсальных генных областей, консервативных и переменных в достаточной мере для межвидового разграничения: гены малой и большой субъединиц рибосомальных РНК и межгенные спейсерные участки (18S рРНК, 28S рРНК, 5.8S рРНК, IGS, ITS), фактор элонгации пептидов (EF1 $\alpha$ ) и два гена, кодирующих субъединицы РНК полимеразы II (RPB1 и RPB2) (James *et al.*, 2006). Наиболее часто используемыми в филогенетике областями для межвидовых и внутривидовых сравнений являются транскрибируемые спейсерные области кластера генов рибосомальных РНК - ITS1 и ITS2 (internal transcribed spacers), фланкированные генами 18S рРНК и 28S рРНК, и геном 5.8S рРНК, прерывающим ITS последовательность. Структура рибосомального кластера генов в области ITS показана на Рисунке 1. Именно по этим генным последовательностям накоплены большие информационные базы данных в ГенБанке ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



**Рисунок 1.** Схема области кластера генов рРНК с участком локализации ITS. Стрелками обозначены направления праймеров, наиболее часто используемых для молекулярной идентификации видов грибов, – прямой праймер ITS1 и обратный праймер ITS4.

Следует отметить, что в течение последних двадцати лет было проведено множество филогенетических исследований на видах рода *Pleurotus*. Сначала популярностью пользовался метод анализа белковых спектров изоферментов с подбором ферментов,

обладающих полиморфизмом и кодоминантностью наследования (Zervakis *et al.*, 1994; Шнырева и др., 2004). Данный подход был эффективен и позволял находить межвидовые различия, однако не всегда обладал достаточной разрешающей способностью и был трудоемким. С распространением молекулярных технологий, в частности метода рестрикционного анализа, популярность приобрел метод RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), позволявший с помощью набора эндонуклеаз рестрикции (ферменты, специфичные для определенных последовательностей ДНК) «разрезать» ДНК исследуемых штаммов/видов и получать видоспецифические (и даже штаммоспецифические) профили рестрикции, состоящие из набора фрагментов различной длины, которые можно было анализировать в агарозных и полиакриламидных гелях (Iraçabal *et al.*, 1995). Однако данный метод был трудоемким, требовал получения относительно чистых препаратов ДНК и соблюдения точных условий эксперимента для воспроизводимости результатов. С внедрением технологии ПЦР (Полимеразная Цепная Реакция) стали появляться модификации метода RFLP с добавлением шага амплификации. Так, в методе AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) использовали набор эндонуклеаз рестрикции, которые «разрезали» ДНК на фрагменты с выступающими «липкими концами», к которым посредством реакции лигирования можно было «пришить» специфичные адаптерные последовательности. Последующую амплификацию фрагментов рестрикции проводили с помощью праймеров, комплементарных адаптерным последовательностям. Подобный подход до сих пор считается одним из наиболее надежных методов для проведения филогенетического анализа, в том числе, и для видов рода *Pleurotus* (Pawlik *et al.*, 2012). Определенную популярность для видовых сравнений приобрел также другой метод, основанный на ПЦР, - RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), или метод «молекулярного фингерпринтинга», основанный на амплификации геномной ДНК исследуемого штамма со «случайными праймерами» (набор коротких олигонуклеотидных праймеров с известными последовательностями) (Chandra *et al.*, 2010). Однако данный подход отличался ограниченной воспроизводимостью результатов анализа. Также, до сих пор широкой популярностью пользуется метод SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms), базирующийся на анализе повторяющихся последовательностей генома. Повторяющиеся последовательности встречаются часто, они многообразны и характерны для геномов эукариот. Их условно можно подразделить на две группы: tandemные повторы (последовательности, сходные по структуре первичной последовательности и расположенные друг за другом в геноме) и диспергированные повторы (семейства сходных повторов, случайно разбросанных по геному). Такие повторы возникают путем многократной амплификации (размножения в ходе процессов рекомбинации, а также в

результате транспозиции мобильных генетических элементов) отдельных уникальных последовательностей, а также в результате дупликации геномов, например, при ошибках мейоза и рекомбинации. Особые классы tandemных повторов, отличающиеся от основной массы ядерной ДНК по нуклеотидным последовательностям, получили название сателлитных ДНК. Близкородственные виды и роды могут сильно отличаться друг от друга по набору и содержанию таких сателлитных ДНК. Для геносистематиков, изучающих таксономию на родовом и видовом уровне, огромный интерес представляют минисателлитные повторы – короткие нуклеотиды, диспергированные по всему геному (Karaoglu *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2008; Шнырева, 2011). Высокая скорость мутирования по этим повторам позволяет использовать их для разграничения близкородственных видов и видов-двойников (Шнырева, 2011).

В связи с наличием огромных баз данных по геномным последовательностям и простотой метода амплификации ДНК, в настоящее время для молекулярной идентификации видов широко применяется амплификация генных последовательностей в сочетании с секвенированием амплифицированных фрагментов, по которым в дальнейшем проводится сравнительный анализ на уровне таксонов различного ранга в зависимости от выбранных для анализа генных последовательностей. Подробно этот подход описан в обзорной статье А.В. Шныревой (2011). Наиболее популярным в таксономии грибов является относительно простой и доступный метод сравнения ITS последовательностей, который был предложен еще в середине 90-х годов (Vilgalys, Sun, 1994).

В связи с огромными объемами накопленной информации по ITS последовательностям для разных таксонов, было предложено создать единую базу данных по ITS, содержащую информацию о всех живых организмах. Одна из наиболее масштабных и известных программ подобного плана – «Баркодинг всего живого» (Barcode of Life). ДНК баркодинг – это таксономический метод, использующий короткие последовательности ДНК в качестве генетических маркеров для определения видовой принадлежности изучаемых организмов (Hebert *et al.*, 2003; Barcode of Life programme). ДНК баркодинг был также недавно предложен и для грибов. В качестве основного молекулярного маркера для грибов была предложена ITS последовательность из кластера рибосомальных генов (Bellemain *et al.*, 2010). Была создана целая база данных, посвященная грибному баркодингу - Fungal Barcoding Database ([www.fungalbarcoding.org](http://www.fungalbarcoding.org)). Процесс определения видов при помощи баркодинга заключается в сравнении внутри- и межвидовых отличий на уровне последовательности ДНК. Как правило, замена или делеция одной пары нуклеотидов в такой последовательности может служить маркером для разграничения близкородственных видов. На данный момент более 100 000 грибных ITS последовательностей депонировано в

различные электронные базы данных (Nilsson *et al.*, 2009). И эта цифра неуклонно растет в связи с повышающейся доступностью техники секвенирования по всему миру. Однако, пока еще не существует эффективных мер контроля депонирования такого огромного количества данных. В базах данных встречается множество неотредактированных последовательностей, включающих всевозможные ошибки секвенирования, особенно по 5'- и 3'-концам последовательностей. Также некоторые последовательности бывают неправильно определены, например, на видовом уровне, или находятся под устаревшими или уже не используемыми названиями (Harris, 2003; Nilsson *et al.*, 2006). Поэтому для проведения различных филогенетических исследований с особой осторожностью должен проводиться подбор референсных последовательностей из электронных баз данных (Bellemain *et al.*, 2010).

Границы биологического вида и молекулярно-генетического вида не всегда совпадают в силу применяемых подходов и методов оценки. Однако, для видов рода *Pleurotus* известно, что разделение на интерстерильные группы при проведении генетических скрещиваний фактически соответствует разделению рода *Pleurotus* на филогенетически поддерживаемые клады, соответствующие установленным видам (Vilgalys, Sun, 1994; Zervakis *et al.*, 1994; Шнырева и др., 1998; Petersen *et al.*, 2011). Как правило, концепция биологического вида позволяет достоверно разграничить виды и поддерживается при этом молекулярными данными, как например это было в случае с *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* (Шнырева, Штаер, 2006; Шнырева, 2011). Иногда бывает так, что данные биологической концепции дополняют данные, полученные с помощью молекулярных методов, особенно если молекулярный метод оказывается недостаточной разрешающей способности для разграничения комплексных видов.

Используя накопленные данные по половой несовместимости и морфологии среди представителей рода *Pleurotus*, американские исследователи Vilgalys и Sun (1994) разделили все виды внутри рода на 16 интерстерильных групп. В своей работе Petersen с соавторами (2011) подробно описал основных представителей интерстерильных групп. Так, к I интерстерильной группе авторы отнесли вид *P. ostreatus* (Fr.) Kumm., включая вариации *P. ostreatus* var. *columbinus* (Quél.) Pilát и *P. ostreatus* var. *florida* Cetto, которые отличаются по цвету шляпки базидиом. Однако, Gonzalez и Labarère (2000) выделили *P. ostreatus* var. *columbinus* в отдельный вид *P. columbinus* Quél. на базе исследований консервативных митохондриальных маркеров и отнесли данный вид ко II интерстерильной группе. Ко II интерстерильной группе согласно Petersen (2011) относятся виды *P. pulmonarius* (Fr.) Quél, *P. sapidus* Sacc. и *P. sajor-caju* (Fr.) Singer, последний из которых, согласно автору, является культивируемой разновидностью *P. pulmonarius*. К III интерстерильной группе относится



вид *P. populinus* O. Hilber & O.K. Mill., который проявил репродуктивную изоляцию с видами *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* (Hilber, 1989; Vilgalys *et al.*, 1993). К IV интерстерильной группе относятся близкородственные виды *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland, *P. citrinopileatus* Singer и *P. euosmus* (Berk.) Sacc. Грибы этой интерстерильной группы обладают димитической гифальной системой, что отличает их от морфологически сходного вида *P. pulmonarius* (Petersen *et al.*, 2011). Вид *P. citrinopileatus* является спорным, и в данный момент многие ученые относят его к *P. cornucopiae*, так как между видами не было выявлено репродуктивных барьеров (Petersen *et al.*, 2011). К V интерстерильной группе принадлежит тропический вид *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, а также вид *P. salmoneo-stramineus* Lj.N. Vassiljeva, который сейчас относят к *P. djamor* (Petersen *et al.*, 2011). К VI группе относят виды *P. eryngii* (DC.) Quél., *P. fossulatus* Cooke, *P. nebrodensis* (Inzenga) Quél. (Vilgalys, Sun, 1994; Rodriguez Estrada *et al.*, 2010). VII группа включает виды с анаморфной стадией в виде коремий - *P. cystidiosus* O.K. Mill., *P. smithii* Guzmán, *P. fuscusquamulosus* D.A. Reid & Eicker, *P. abalonus* Y.H. Han, K.M. Chen & S. Cheng. Было показано, что *P. abalonus* не имеет репродуктивных барьеров с представителями вида *P. cystidiosus* (Zervakis, 1998). В связи с этим многие исследователи относят данных представителей к подвиду *P. cystidiosus* var. *abalonus* (Y.H. Han, K.M. Chen & S. Cheng) O. Hilber. Также, были обнаружены репродуктивные барьеры между видами *P. cystidiosus* и *P. smithii* (Petersen *et al.*, 2011; Zervakis, 1998), и было предложено выделить вид *P. smithii* в отдельную интерстерильную группу (Zervakis, 1998). Следующая интерстерильная группа VIII включает редкий и малоизученный вид *P. levis* (Berk. & M.A. Curtis) Singer. Согласно Index Fungorum этот вид на данный момент относят к *Lentinus levis* (Berk. & M.A. Curtis) Murrill. Представители данного вида морфологически трудно отличимы от *P. dryinus* (Pers.) P. Kumm., однако, для этих видов в ходе скрещиваний были выявлены репродуктивные барьеры (Petersen *et al.*, 2011). К IX интерстерильной группе относят еще один вид, имеющий анаморфную конидиальную стадию - *P. dryinus* (Pers.) P. Kumm. В отличие от вида *P. dryinus*, *P. levis* не формирует анаморфной конидиальной стадии на культивируемом мицелии (Petersen *et al.*, 2011). К X интерстерильной группе относится вид *P. tuber-regium* (Fr.) Singer. Согласно Index Fungorum, вид на данный момент относят к *Lentinus tuber-regium* (Fr.) Fr. Особенностью данного вида является способность формировать базидиомы на склероциях. При скрещивании с тестерами других видов *P. tuber-regium* проявил репродуктивную изоляцию, в связи с чем его выделили в отдельную интерстерильную группу (Petersen *et al.*, 2011). Редкий вид *P. opuntiae* (Durieu & Lév.) Sacc. относят к XI интерстерильной группе (Petersen, Krisai-Greilhuber, 1999). Для точной таксономической идентификации данного малоизученного вида требуется выделить эпителип (Petersen *et al.*, 2011). К XII

интерстерильной группе относят недавно открытый вид *P. abieticola* R.H. Petersen & K.W. Hughes. Данный вид имеет мономитическую гифальную систему. При построении филогенетического дерева на основе ITS последовательностей мономитические представители *P. abieticola* оказались с доверительной вероятностью отделены от видов *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. populinus* и *P. eryngii* (Petersen, Hughes, 1997). К XIII группе относится вид *P. albidus* (Berk.) Pegler. По ITS последовательности и наличию мономитической гифальной системы данный вид является близкородственным *P. ostreatus* (Vilgalys, Sun, 1994; Alberto *et al.*, 2002). Однако его относят к отдельной интерстерильной группе (Petersen *et al.*, 2011). К XIV группе относят вид *P. australis* Sacc., который показал репродуктивную изоляцию ото всех остальных изученных видов (Petersen *et al.*, 2011). XV интерстерильная группа включает виды *P. purpureo-olivaceus* (G. Stev.) Segedin и *P. rattenburyi* Segedin, которые в дальнейшем были объединены в один вид *P. purpureo-olivaceus* (Segedin *et al.*, 1995). Этот вид также имеет анаморфную артроконидиальную стадию (Petersen *et al.*, 2011). К последней, XVI интерстерильной группе относится вид *P. calypttratus* (Lindblad ex Fr.) Sacc. Димитическая гифальная система и особенности морфологии приближают этот вид к *P. djamor*. Кроме того, данные виды показали частичную совместимость, однако, «гибридный» дикариотический мицелий не формировал плодовых тел (Zervakis, 1998; Petersen *et al.*, 2011). Также, согласно Petersen (2011) некоторые более редкие и недавно описанные виды требуют дополнительных таксономических исследований: *P. agaves* Dennis; *P. bajocalifornicus* Esteve-Rav., G. Moreno & N. Ayala; *P. eugrammus* (Mont.) Dennis; *P. fossulatus* Cooke; *P. mexicanus* Guzmán; *P. parsoniae* G. Stev.; *P. velatus* Segedin, P.K. Buchanan & J.P. Wilkie.

### 1.3 Половое размножение высших базидиальных грибов и структура генов, участвующих в процессе половой совместимости

Для большинства высших базидиальных грибов характерно преобладание полового воспроизведения в природе. Половое размножение имеет очевидное преимущество перед бесполом и вегетативным размножением, так как сопровождается рекомбинацией генетического материала от двух половых партнеров в ходе мейоза. Для многих гомобазидиальных грибов, включая вешенку, характерен гаплоидно-дикариотический жизненный цикл, который представлен двумя чередующимися фазами – гаплоидной (монокариотической) и дикариотической (функционально диплоидной). Фертильное, то есть способное к размножению плодовое тело гриба (базидиома) может образовываться исключительно на дикариотическом мицелии. В результате мейоза, или редукционного деления, на концах базидий экзогенно образуются по четыре гаплоидные базидиоспоры,

которые служат для распространения гриба в природе. Далее, оказавшись на субстрате, гаплоидные базидиоспоры прорастают гаплоидным монокариотическим мицелием. Монокариотический мицелий не способен образовывать фертильных плодовых тел. Для образования фертильного дикариотического мицелия и базидиом должно произойти слияние двух совместимых по полу гаплоидных мицелиев. Так как *Pleurotus* обладает тетраполярной системой гомогенной совместимости, то для формирования дикариона необходимо слияние моноспоровых гаплоидных изолятов, различающихся (гетероаллельных) по двум *A*- и *B*-факторам (локусам) половой совместимости с множественными аллелями ( $AxVx$ ,  $AyVy$ ) (биполярный гетероталлизм) (Vilgalys, Sun, 1994; Zervakis, Balis, 1996; Шнырева и др., 2012). Наличие регулярных, хорошо заметных пряжек в районе клеточных септ является надежным критерием, подтверждающим миграцию ядер между скрещиваемыми гоокариотическими мицелиями с последующим формированием дикариона. Появление пряжек на мицелии фактически указывает на фертильность (половую совместимость) партнеров и их принадлежность к одному и тому же виду (Vilgalys, Sun, 1994; Шнырева и др., 2012).

Критерий скрещиваемости, или половая совместимость, тестируемая в *мон-мон* скрещиваниях, широко применяется в систематике базидиомицетов, основным способом репродукции которых является половое размножение базидиоспорами мейотического происхождения (Vilgalys, Sun, 1994; Zervakis, Balis, 1996). В случае полной половой совместимости между гаплоидными штаммами происходит формирование фертильного дикариотического мицелия (дикариона) с последующим образованием плодовых тел. Отсутствие дикариотизации при скрещивании монобазидиоспоровых (гаплоидных) штаммов, полученных из базидиоспор (споровых отпечатков), свидетельствует о том, что данные штаммы либо являются генетически идентичными клонами, имеющими идентичные аллели локусов половой совместимости, либо принадлежат различным интерстерильным группам (репродуктивно изолированным биологическим видам). Многочисленные тесты на половую совместимость показали, что барьеры интерстерильности у большинства видов презиготические и почти всегда непреодолимые, хотя известны примеры частичной интерстерильности или гибридизации у базидиомицетов (Шнырева и др., 1998; Vilgalys, Sun, 1994). Именно критерий нескрещиваемости, или репродуктивной изоляции является основным в концепции биологического вида.

Тетраполярная система контроля половой совместимости была хорошо изучена на классическом модельном генетическом объекте – *Coprinopsis cinerea* (Kües *et al.*, 2002). Тетраполярная система основывается на двух несцепленных локусах (*A* и *B*), которые контролируют дальнейшие шаги развития фертильного дикариона (Kües, 2000). Каждый локус представлен множественными аллелями; так, в природе для *C. cinerea* было

обнаружено 160 *A* и 81 *B* аллелей (Day, 1963; Kües *et al.*, 2002). Также как и у *C. cinerea*, для представителей рода *Pleurotus* характерна тетраполярная система, контролируемая двумя несцепленными локусами *A* и *B* со множественными аллелями. Так, для *P. ostreatus* было найдено 23 *matA* и 15 *matB* аллелей (Whitehouse, 1949); для вида *P. populinus*, который является близкородственным видам *P. ostreatus* и *P. pulmonarius*, было подсчитано 126 *matA* и 354 *matB* аллеля, для вида *P. pulmonarius* – 30 *matA* и 90 *matB* аллелей, для *P. djamor* – 58 *matA* и 231 *matB* (Anderson *et al.*, 1991; James *et al.*, 2004). Подсчет аллелей локусов половой совместимости – трудоемкий процесс, основанный на получении гаплоидных тестерных линий от каждого штамма с последующими мон-мон (монокарион-монокарион) скрещиваниями между линиями тестируемых штаммов. Во время проведения подобных скрещиваний для *P. pulmonarius* было показано, что новые аллели локусов половой совместимости могут появляться в результате процесса мейотической рекомбинации (Eugenio, Anderson, 1968). Этот факт доказывает, что *mat* локусы довольно протяженные и включают несколько независимо активных генов, обладающих одинаковыми регуляторными функциями (Casselton, Olesnicky, 1998). Однако, для видов рода *Pleurotus*, включая *P. ostreatus*, внутрилокусная рекомбинация в пределах *matA* локуса не была обнаружена (Takemaru, 1961; Larraya *et al.*, 1999; Liou, 2000).

Локусы *matA* и *matB* отличаются по структуре и обладают разными регуляторными функциями. Так, в момент слияния двух взаимосовместимых монокариотических мицелиев гены локуса *matB* регулируют процесс миграции ядер из одного партнера в другой. Когда два гаплоидных ядра, гетероаллельных по обоим *mat* локусам, оказываются в апикальной клетке гифы, свою роль начинает выполнять *matA* локус, контролируя дальнейшее поведение двух ядер – синхронность деления ядер с последующей миграцией одного из них в дочернюю клетку мицелия для восстановления дикариона. Миграция одного из ядер происходит через специальные формирования в районе клеточных септ – пряжки. В формировании пряжек участвуют как *matA*, так и *matB* локусы (Larraya *et al.*, 2001; Kües *et al.*, 2002).

Из исследований, проведенных на модельных объектах, известно, что локус *matA* кодирует два типа гомеодоменных транскрипционных факторов (HD1 и HD2), а локус *matB* кодирует гены феромонов и рецепторов феромонов (Kües *et al.*, 2011). Наиболее хорошо изученным является *matB* локус в силу того, что закодированные в нем гены обладают более консервативной структурой. Так, на примере модельного объекта *C. cinerea* была показана структура *matB* локуса, характерная для большинства базидиальных грибов, формирующих плодовые тела (Casselton, Kues, 2007). Локус *matB* у базидиальных грибов, как правило, состоит из нескольких сублокусов (кассет), включающих гены феромонов и рецепторов

феромонов. Половая совместимость (слияние) двух гаплоидных монокариотических клеток возможна только в том случае, если гаплоидные партнеры имеют разные аллели хотя бы в одной из кассет. Локус *matB* у *C. cinerea* состоит из трех сублокусов (кассет), каждый из которых включает один ген, кодирующий рецептор феромона, и два гена, кодирующих непосредственно феромоны. На примере *C. cinerea* было показано, что феромоны могут активировать только рецептор гаплоидного партнера в пределах одной и той же кассеты, при этом взаимодействие происходит по принципу «ключ-замок» (Fowler *et al.*, 2001; Casselton, Kues, 2007). Функциональная целостность кассет поддерживается за счет уникальных межгенных фланкирующих последовательностей в пределах *matB* локуса. Такие последовательности индивидуальны для каждого аллеля. Низкая гомология фланкирующих межгенных областей снижает вероятность рекомбинационных процессов между сублокусами, тем самым поддерживая их целостность и относительный консерватизм. Высокая степень консервативности наблюдается в свою очередь в последовательностях генов, кодирующих рецепторы феромонов. В виду наличия протяженных областей гомологии у генов рецепторов феромонов и редких внутригенных рекомбинаций значительно облегчается задача исследования структуры *matB* локуса, а также его генного окружения. Многие ученые находят параллели в структуре и функционировании *matB* локуса базидиальных грибов со структурной организацией половых хромосом животных (Devier *et al.*, 2008). Локус, кодирующий феромоны и их рецепторы, был впервые обнаружен у фитопатогенного гриба *Ustilago maydis* с тетраполярной системой половой совместимости (Bolker *et al.*, 1992). В случае этого организма локус обладал упрощенной организацией, связанной с облигатно паразитическим образом жизни гриба. Локус *matB* у *U. maydis* был обозначен как *a*, и было обнаружено всего два аллеля данного локуса – *a1* и *a2*, в каждом из которых были найдены гены феромонов (*mfa1* и *mfa2*, mating feromone *a* locus) и гены рецепторов феромонов (*pra1* и *pra2*, pheromone receptor *a* locus) (Bolker *et al.*, 1992; Raudaskoski, Kothe, 2010). Позже локус *matB* был изучен у базидиомицета *Schizophyllum commune*, который является модельным объектом генетики наряду с *C. cinerea*. У данного представителя локус *matB* обладает более сложной структурной организацией, сходной с таковой у *C. cinerea*: локус разделен на два сублокуса (кассеты) *Bα* и *Bβ*, каждый из которых включает гены феромонов и один ген, кодирующий рецептор (Raudaskoski, Kothe, 2010). Количество генов феромонов в кассетах может варьировать; наиболее сложной структурой из исследованных на данный момент обладает *Bβ2* аллель, состоящий из одного гена, кодирующего рецептор, и восьми генов, кодирующих феромоны. Более того, несколько дополнительных копий генов феромонов были обнаружены в других участках генома (Fowler *et al.*, 2001; Raudaskoski, Kothe, 2010). Интересно, что мутации, искусственно

индуцированные в аллеле *Bβ2*, показали возможность перехода от тетраполярной системы половой совместимости к биполярной за счет индукции развития по *B*-пути без прохождения скрещиваний. Так, было выделено три группы мутаций: первичные – мутации в генах рецепторов; вторичные – точковые мутации (делеции) в генах феромонов, которые приводили к изменению или потере функции генов, а также к возможности активировать рецепторы феромонами собственного аллеля; а также мутации, приводящие к конститутивной активности рецепторов без связывания с феромонами (Kothe, 1999). Было показано, что точковые замены как в генах феромонов, так и рецепторов феромонов, могут изменить функции взаимного распознавания рецепторов и лигандов (Kothe, 1999). Также, в экспериментах на *S. commune* было показано возрастание уровня экспрессии генов феромонов и их рецепторов на ранних этапах скрещивания монокарионов, что свидетельствует об основополагающей функции этих генов в процессе дикариотизации (Erdmann *et al.*, 2012).

Феромоны представляют собой короткие липопротеиды (9-14 а.к.), возникающие в результате посттрансляционного процессинга предшественников протяженностью в 40-100 а.к. и последующей модификации белковых молекул по специфичным мотивам на N- и C-концах (Fowler *et al.*, 2001; Raudaskoski, Kothe, 2010). Последовательность феромона включает СААХ мотив (С - цистеин, А – алифатическое основание, Х – любая из аминокислот) на С-конце, который, как полагают, метилирован и фарнезилирован по цистеину, что придает большую гидрофобность молекуле феромона (Casselton, Olesnicku, 1998; Kües *et al.*, 2011). Рецепторы феромонов относятся к обширному классу семиспиральных трансмембранных рецепторов (серпентинов), имеющих семь трансмембранных доменов, расположенных в цитоплазматической мембране. Активация рецепторов данного класса сопряжена с G-белком, поэтому их также обозначают как GPCR (G-protein-coupled receptor) (Casselton, Kues, 2007). Данные рецепторы участвуют в распознавании сигналов из окружающей среды и передаче их внутрь клетки. Грибы используют рецепторы феромонов для распознавания коротких липопротеидных лигандов - феромонов от аллельных партнеров (Casselton, Kues, 2007). Первой предложенной моделью структурной организации и взаимодействия феромона и его рецептора по праву считают модель взаимодействия феромона MFa (α-фактор) и его рецептора STE3 у аскомицетных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с биполярной системой половой совместимости (Raudaskoski, Kothe, 2010). В виду высокой консервативности последовательностей рецепторов среди представителей царства грибов, рецепторы феромонов грибов относят к подклассу STE3-подобных рецепторов. В экспериментах по изучению экспрессии разных генов и участков генов феромонов и рецепторов в мутантном по *matB* локусу штамме *S.*

*commune* (штамм *B<sub>null</sub>* с полностью делетированным локусом *matB*) было выявлено, что N-конец рецептора обращен наружу клетки и образует три петлевые структуры, которые, возможно, участвуют в связывании совместимых феромонов. С-конец в свою очередь обращен внутрь клетки и связан с гетеромерным сигнальным G-белком (Fowler *et al.*, 2001; Gola, Kothe, 2003). На штамме *S. commune* было также показано, что GPCR рецепторы присутствуют в большом количестве на псевдопряжковых образованиях, а также локализуются на долипоровых септах на всем протяжении мембран (Erdmann *et al.*, 2012). При связывании феромона происходит активация рецептора с последующим фосфорилированием  $\alpha$ -субъединицы связанного с ГДФ G-белка, что приводит к диссоциации G-белка и освобождению его  $G\alpha$ -субъединицы, которая, в свою очередь, взаимодействует с MAP-киназным каскадом передачи сигналов фосфорилирования белков, таким образом регулируя экспрессию многих генов (Raudaskoski, Kothe, 2010).

В случае *S. cerevisiae* и *U. maydis* (грибов с упрощенным морфогенезом) основная функция феромонов и рецепторов феромонов состоит в активации экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в конъюгации (слиянии) совместимых по полу гаплоидных мицелиев. Также, эти белки контролируют образование вирулентного дикариона у фитопатогена *U. maydis*. У представителей класса Agaricomycetes, например, *S. commune* и *C. cinerea*, слияние гиф и анастомозирование происходит между вегетативными гифами вне контроля со стороны локусов половой совместимости. Для данных представителей феромоны и рецепторы феромонов, в первую очередь, регулируют процессы, происходящие после слияния мицелиев и образования дикариона и которые связаны с реципрокным обменом ядрами и миграцией ядер в образовавшемся дикарионе (Raudaskoski, 1998; Raudaskoski, Kothe, 2010). Для *S. cerevisiae* известны основные игроки процесса слияния гаплоидных клеток – гены *Fus1*, *Fus2*, *Fig1*, *Fig2* (Glass *et al.*, 2004). Продукты этих генов концентрируются в зоне сращивания конъюгирующих клеток, и их экспрессия контролируется сигналами феромонного пути (Raudaskoski, Kothe, 2010). Интересно, что при анализе полной геномной последовательности мицелиального аскомицета *Neurospora crassa* ортологов генов *Fus* и *Fig* обнаружено не было (Glass *et al.*, 2004). Однако был обнаружен ортолог *Prm1* гена *S. cerevisiae*, который также является мишенью феромонного сигнального пути. Экспериментально было показано, что этот ген играет основную роль в процессе слияния клеток-партнеров у *N. crassa* (Heiman, Walter, 2000; Glass *et al.*, 2004). Делетирование *prm1*-подобного гена (pheromone-regulated multispanning membrane protein) у *N. crassa* приводило к снижению конъюгации вегетативных гиф на 50%, а впоследствии - к полному отсутствию слияния клеток и остановке скрещивания. В связи с этим было высказано предположение, что данный ген играет одну из главных ролей в процессах как

вегетативного, так и полового слияния мицелиев (Fleissner *et al.*, 2009). При анализе полной геномной последовательности базидиомицета *S. commune* также не было обнаружено ортологов генов *Fus1*, *Fus2*, *Fig1* и *Fig2*. Однако был обнаружен ортолог гена *Prm1*, что говорит о схожей схеме регуляции слияния клеток у аскомицета *N. crassa* и базидиомицета *S. commune* (Raudaskoski, Kothe, 2010). Одновременно на штаммах *N. crassa*, мутантных по генам, кодирующим G-белок, было показано, что данные мутации в феромонном сигнальном пути не оказывают влияния на вегетативное слияние мицелиев, однако полностью блокируют репродуктивный процесс (Fleissner *et al.*, 2008). Таким образом, можно говорить о двух путях контроля слияния мицелиев: о независимом от функций гетеромерного G-белка пути контроля вегетативного слияния и анастомозирования мицелиев, а также о пути слияния мицелиев, который опосредован активацией феромонами соответствующих рецепторов и передачей сигналов через G-белок (Raudaskoski, Kothe, 2010).

Структура локуса *matB* была детально изучена у представителя рода *Pleurotus* – вешенки розовой *P. djamor* (James *et al.*, 2004). Были обнаружены три последовательности, соответствующие STE3-классу рецепторов: *PDSTE3.1*, *PDSTE3.2* и *PDSTE3.3*. При этом было показано, что последовательности *PDSTE3.1* и *PDSTE3.2* располагаются на расстоянии 3-4 тыс.п.н. друг от друга, а последовательность *PDSTE3.3* сцеплена с консервативным геном *CLA4*, который кодирует киназу (Cdc42p-activated signal transducing kinase). В экспериментах по наследованию генов рецепторов феромонов была показана рекомбинация между парами генов *PDSTE3.1-PDSTE3.2*, и *PDSTE3.3-CLA4* по образованию неродительских комбинаций этих генов. В результате было сделано заключение о том, что у исследованного штамма *P. djamor* locus *matB* состоит как минимум из трех кассет (сублокусов). По аналогии с другими изученными объектами, каждая кассета *matB* локуса *P. djamor* должна включать по одному гену, кодирующему рецептор феромона, а также по 2-8 генов феромонов (Fowler *et al.*, 2004; Halsall *et al.*, 2000). Однако обнаружение *in silico* рамок считывания генов феромонов в данном эксперименте было затруднено в связи с низкой консервативностью последовательностей этих генов (James *et al.*, 2004).

Гораздо реже у базидиальных грибов встречается биполярная (однофакторная, или однолокусная) система половой совместимости. Биполярная система, как полагают, произошла от тетраполярной (двуфакторной) системы посредством слияния *matA* и *matB* локусов в единую область с запретом рекомбинационных процессов (Hibbett, Donoghue, 2001; Kues *et al.*, 2011). В результате протяженная хромосомная область наследуется как единый *mat* locus (Bakkeren, Kronstad, 1993; Bakkeren, Kronstad, 1996; Kues *et al.*, 2011). Подобные эволюционные события можно наблюдать, например, у патогенных грибов человека *Cryptococcus neoformans* и злаков *Ustilago hordei*, в геномах которых произошло



слияние *matA* и *matB* локусов в единый кластер с частичной делецией некоторых участков локусов, что привело к относительному упрощению их структурной организации (Casselton, Kues, 2007). Объединение двух *mat* локусов в единую область происходило неоднократно в процессе эволюции в разных группах грибов (Bakkeren *et al.*, 2006; Kues *et al.*, 2011). Однако некоторые авторы придерживаются гипотезы о том, что первоначально возникла биполярная система половой совместимости (Coelho *et al.*, 2010). По мнению авторов, общий предшественник базидиальных грибов характеризовался биполярной системой половой совместимости, в геноме которого два *mat* локуса располагались на одной хромосоме; однако, пока не ясно, были ли локусы сцеплены. В качестве возможной структурной организации *mat* локусов общего предшественника авторы предлагают структуру локусов у псевдобиполярного базидиомицета *Sporidiobolus salmonicolor*, короткий относится к наиболее эволюционно ранней группе базидиомицетов – подотделу Pucciniomycotina (класс Microbotryomycetes). Согласно Coelho с соавторами (2010), представители пукциниевых грибов Pucciniomycotina отделились от двух других подотделов базидиальных грибов – Ustilaginomycotina и Agaricomycotina – еще до возникновения и закрепления в ходе эволюции тетраполярной системы половой совместимости. Локусы *matA* и *matB* у гриба *S. salmonicolor* находятся на одной хромосоме на большом расстоянии друг от друга и частично сцеплены; рекомбинация на участке между ними частично супрессирована (Coelho *et al.*, 2010). Общий предок подотделов Ustilaginomycotina и Agaricomycotina получил классическую тетраполярную систему половой совместимости за счет хромосомной аберрации (транслокации), в результате которой два *mat* локуса оказались на разных хромосомах. У видов же *U. hordei* и *C. neoformans* произошла вторичная транслокация одного из *mat* локусов, что привело к возвращению к биполярности (Bakkeren, Kronstad, 1994; Hsueh *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2010). У некоторых изученных представителей Pucciniomycotina (*S. salmonicolor*, *Microbotryum violaceum*) оба *mat* локуса располагаются на одной хромосоме на расстоянии более  $10^6$  п.н., при этом рекомбинация между локусами супрессирована (подавлена) (Coelho *et al.*, 2010).

Известно, что гены локуса *matA*, в отличие от *matB*, очень вариабельны по нуклеотидным последовательностям, вследствие чего их изучение затруднено. Гомологии прослеживаются исключительно на уровне аминокислотных последовательностей. Как правило, локус *matA* состоит из двух сцепленных сублокусов, или кассет, - *Aα* и *Aβ* (Raudaskoski, Kothe, 2010). Локус *matA* был наиболее детально изучен на модельном объекте *Coprinopsis cinerea*. У данного представителя базидиальных грибов *matA* локус состоит из трех пар генов – *a* (кассета *Aα*), *b* и *d* (кассета *Aβ*); каждая пара генов (кассета) кодирует два типа гомеодоменных транскрипционных факторов (HD1 и HD2) (Raudaskoski, Kothe, 2010).

Однако среди изученных грибов пока еще не был обнаружен аллель *matA* локуса с полным набором всех трех пар генов. Как правило, внутри кассет часто встречаются делеции одного из генов - *hd1* или *hd2*. Как полагают, за счет подобной высокой структурной вариабельности достигается большее разнообразие аллелей *matA* локуса в природе (Raudaskoski, Kothe, 2010). Белки HD1 и HD2 гомологичны гомеодоменным белкам *Mata2* и *Mata1*, являющимися основными регуляторными единицами однолокусной системы полового размножения у дрожжей *S. cerevisiae* (Casselton, Olesnick, 1998). Белки этих двух типов отличаются по структуре и последовательностям ДНК-связывающего домена. Так, HD2 тип обладает высокой ДНК-связывающей активностью, в то время как HD1 обладает более слабой активностью, однако HD1 тип белков обладает сигналами ядерной локализации и активизационным доменом (Raudaskoski, Kothe, 2010). Оба класса гомеодоменных белков содержат три области с  $\alpha$ -спиральной структурой, третья из которых включает ДНК-связывающий мотив **WFXNXXR**. Последовательность ДНК-связывающего мотива в HD1 белке менее консервативна, а сама аминокислотная последовательность гомеодоменного белка характеризуется нестандартной для этого класса длиной и имеет дополнительные аминокислоты между первой и второй  $\alpha$ -спиралями. Вероятно, поэтому белки этого типа обладают более слабой ДНК-связывающей активностью. Подобные нетипичные по структуре домены известны также под названием TALE гомеодоменов. В свою очередь, белки HD2 класса имеют типичную для гомеодоменов протяженность ДНК-связывающего домена в 60 аминокислот (Kües *et al.*, 2011).

Особо значимыми в структуре гомеодоменных белков HD1 и HD2 являются N-концы белковых последовательностей, так как они выполняют роль димеризационных доменов между совместимыми HD1 и HD2 белками. Только HD1-HD2 гетеродимер способен в дальнейшем работать в качестве транскрипционного фактора и регулировать экспрессию генов морфогенеза при развитии фертильного дикариона и последующего образования плодовых тел. Важно отметить, что процесс димеризации может происходить исключительно между двумя белками-партнерами, транскрибируемыми на разных аллелях *matA* локуса, то есть происходящих из разных ядер при скрещивании совместимых по полу гаплоидных штаммов. N-конец гомеодоменных белков играет главную роль в димеризации и отличается высокой степенью вариабельности по аминокислотным последовательностям между разными аллелями локуса, что и обеспечивает множественные аллельные комбинации (Kües *et al.*, 2011).

Для базидиомицета *Schizophyllum commune* в природе было обнаружено девять аллельных вариантов кассеты *A $\alpha$*  и 32 варианта (аллеля) кассеты *A $\beta$*  (Raper, 1966). Гомеодоменные продукты генов кассеты *A $\alpha$*  были обозначены как Y и Z, а в кассете *A $\beta$*  был

обнаружен белок, названный V (Stankis *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1996; Raudaskoski, Kothe, 2010). Образование активного гетеродимера происходит между белками Y и Z с разных аллелей, при этом белок Y относится к HD2 типу и несет сигнал ядерной локализации (Shen *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 2002). Сравнительный анализ последовательностей HD белков у разных изученных представителей базидиальных грибов показал, что белок Z *S. commune* относится к HD1 типу (Bakkeren *et al.*, 2008; Raudaskoski, Kothe, 2010).

У облигатного патогена кукурузы *Ustilago maydis* локус *matA* был исторически обозначен как *b*. В этом локусе закодированы два гомеодоменных белка – bE (b-East) и bW (b-West). Они образуют активный гетеродимер-транскрипционный фактор в случае экспрессии с разных аллелей (Kahmann *et al.*, 1995; Kahmann, Schirawski, 2007; Raudaskoski, Kothe, 2010). С развитием программы по секвенированию геномов у многих базидиальных грибов, геномы которых подвергли «прочтению» (секвенированию), также удалось обнаружить гомологи гомеодоменных последовательностей HD1 и HD2 по консервативным мотивам с исследованными гомеодоменными последовательностями *C. cinerea*. Так, у эктомикоризообразующего гриба *Laccaria bicolor* были обнаружены последовательности *Lba1* и *Lba2*, кодирующие белки типа HD1 и HD2 соответственно (Niculita-Hirzel *et al.*, 2008).

Известно, что *matA* локус фланкирован консервативным геном *mip* (mitochondrial intermediate peptidase) и зачастую геном  $\beta$ -fg (beta-flanking gene) (James *et al.*, 2004). Для видов, геномы которых еще полностью не прочтены, исследование окружения *mip* последовательности является единственной возможностью «вытащить» гены *matA* локуса. Так, для вида *P. djamor* методом позиционного клонирования и скрининга геномной космидной библиотеки с праймерами к консервативному участку *mip* гена были обнаружены несколько перекрывающихся космид (James *et al.*, 2004). Полученный участок генома (75.3 тыс.п.н.) был прочтен, в результате чего были обнаружены два гена, кодирующих гомеодоменные транскрипционные факторы, - *PDa1* и *PDa2*. Таким образом, у исследованного штамма *P. djamor* локус *matA* представлен только одной парой генов - *PDa1* и *PDa2*, кодирующих белки HD1 и HD2 типа соответственно. Согласно предложенной авторами генетической карте отсеквенированного участка, последовательности генов *PDa1* и *PDa2* транскрибируются с общей промоторной области, но в противоположных направлениях. Такой тип транскрипции, как полагают, характерен для генов *matA* локуса (James *et al.*, 2004).

Гомологи гомеодоменных белков были обнаружены также и у биполярных видов базидиомицетов. Так, у культивируемого съедобного гриба *Pholiota nameko* была обнаружена всего лишь одна пара гомеодоменных последовательностей в *A*-локусе спаривания (Yi *et al.*, 2008). У биполярного вида *Coprinellus disseminatus* были обнаружены

две мультиаллельные кассеты *matA* локуса - *Aα* и *Aβ*, каждая из которых состоит из пары генов, кодирующих HD1 и HD2 типы белков (James *et al.*, 2006). Опасный патоген человека, вызывающий глубокие микозы, *Cryptococcus neoformans* обладает биполярной системой половой совместимости. У этого вида присутствует всего один протяженный (до 100 т.п.н.) локус половой совместимости с двумя аллельными состояниями – *MATα* и *MATβ* (Kües *et al.*, 2011). В аллеле *MATα* присутствует ген *SXI1α*, продуктом экспрессии которого является белок типа HD1. Аллель *MATβ* содержит ген *SXI2α*, который кодирует белок типа HD2 (Raudaskoski, Kothe, 2010; Kües *et al.*, 2011). Соответственно белки Sxi1 и Sxi2 формируют активный гетеродимерный комплекс при скрещивании монокарионов и способствуют развитию дикариона (Kües *et al.*, 2011). Таким образом, у данного патогенного базидиомицета происходит упрощение организации локусов половой совместимости до наличия только одного *mat* локуса с двумя аллелями в отличие от множественных аллелей, характерных для большинства базидиомицетов. При этом мишени (регуляторные промоторные области) Sxi1 и Sxi2 до сих пор не обнаружены. Известно лишь то, что активация экспрессии генов *mat* локуса происходит уже после слияния совместимых по полу клеток в отличие от аскомицетных дрожжей, у которых слияние гаплоидных клеток противоположного пола находится непосредственно под контролем *mat* локуса (Kües *et al.*, 2011).

На данный момент еще мало накоплено сведений о генах, экспрессия которых регулируется генами *mat* локусов. Некоторые целевые гены, регулируемые генопродуктами локусов половой совместимости, были обнаружены у мутантных штаммов. Так, у *C. cinerea* был выделен мутант *num1*, у которого изменен процесс миграции ядер (Makino, Kamada, 2004). Эта мутация приводила к одностороннему скрещиванию, то есть мутантный штамм функционировал как донор ядра. Было показано, что ген *num1* кодирует белок, состоящий из 217 а.к., у которого на N- и C- концах присутствует мотив «лейциновая застёжка-молния» и домен «coiled-coil» на C-конце, характерные для ДНК-связывающих факторов транскрипции (Makino, Kamada, 2004; Raudaskoski, Kothe, 2010). Экспрессия данного гена регулируется по *matB* пути, то есть феромон-рецепторными взаимодействиями. Основываясь на структуре белка Num1, авторы полагают, что, скорее всего этот белок входит в состав белкового комплекса, функционирующего как транскрипционный фактор (Makino, Kamada, 2004; Raudaskoski, Kothe, 2010). У гриба *S. commune* были обнаружены гены *brt1* и *mat1* (Lengeler, Kothe, 1999a; Lengeler, Kothe, 1999b). Ген *brt1* кодирует ингибитор инициации трансляции и находится под негативным контролем *matB* пути развития, то есть подавляется (репрессируется) при активации феромонового пути (Lengeler, Kothe, 1999a). Ген *mat1* кодирует белок, имеющий структурную организацию, сходную с транспортными белками, и

его экспрессия активируется при встрече совместимых по полу монокарионов (Lengeler, Kothe, 1999b). Ортологи этих генов были также обнаружены в геномах других представителей класса Agaricomycetes, однако их участие в процессе формирования дикариона пока еще не доказано (Raudaskoski, Kothe, 2010).

У гриба *C. cinerea* были обнаружены гены *pcc1* (pseudoclamp connection) и *clp1* (clampless), участвующие в процессе образования пряжек на дикариотическом мицелии (Murata *et al.*, 1998; Inada *et al.*, 2001). Ортологи гена *pcc1* были обнаружены и у других грибов, а также в геномах других эукариотических организмов, в то время как ортологи гена *clp1* были обнаружены только у базидиальных грибов. Ген *pcc1* кодирует белок, содержащий HMG мотив (High Mobility Group box), характерный для транскрипционных факторов. Как полагают, продукт гена *pcc1* подавляет экспрессию генов *matA* пути развития у монокарионов, то есть в отсутствие полового партнера. В то же время при развитии по *matA* пути активируется экспрессия гена *clp1* в образующемся дикарионе. Продукт гена *clp1* негативно регулирует (репрессирует) экспрессию гена *pcc1* в дикарионе, что приводит к активации экспрессии генов, необходимых для формирования пряжек и, соответственно, для образования фертильного дикариона (Kamada, 2002; Scherer *et al.*, 2006; Raudaskoski, Kothe, 2010).

Таким образом, половое развитие у базидиальных грибов – это сложный регулируемый процесс, который находится под генетическим контролем со стороны не только специфических *mat* локусов половой совместимости, но и других генетических элементов, чьи функции еще предстоит изучить.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Объекты исследования

В работе по генотипированию были использованы 37 штаммов десяти различных видов рода *Pleurotus*. Штаммы принадлежали пяти коллекциям микроорганизмов и были собраны в разных местообитаниях, как указано в Таблице 1. В исследовании использовали как дикорастущие изоляты, так и производственные штаммы вешенки. Для большинства штаммов были секвенированы ITS последовательности кластера генов рРНК; полученные последовательности были депонированы в ГенБанк, где им были присвоены идентификационные номера (id) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). В анализе *matA* локуса половой совместимости использовали два монокариотических штамма *P. ostreatus* – PC9 и PC15, – которые были получены методом дедикариотизации из производственного штамма N001 в лаборатории проф. Л. Ларрая (Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain) (Larraza *et al.*, 2001). Геномы этих двух штаммов полностью секвенированы и опубликованы на сайте Института JGI (Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA; <http://genome.jgi.doe.gov/>).

В Таблице 2 указаны референсные последовательности видов из базы данных NCBI, которые были использованы в филогенетическом анализе и при составлении системы баркодов ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Эти последовательности рекомендованы к использованию в дальнейших филогенетических исследованиях.

**Таблица 1.** Список штаммов, использованных в работе

| Вид                   | Штамм           | Происхождение                                                                                  | Коллекция* | Номер ITS в<br>ГенБанке |
|-----------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------|
| <i>P. sajor-caju</i>  | CS-32           | Производств. штамм, Northwest<br>Mycological Consultants, США                                  | МГУ        | JQ814757                |
|                       | H-1             | Производств. штамм, Amycel 3011                                                                | WUR        | JQ837470                |
|                       | H-2             | Производственный штамм, Le<br>Champion 29, Франция                                             | WUR        | JQ837471                |
| <i>P. pulmonarius</i> | 06-1            | Дикорастущий изолят, ЗБС МГУ,<br>Московская обл.                                               | МГУ        | JQ837472                |
|                       | ZBS2012         | Дикорастущий изолят, ЗБС МГУ,<br>Московская обл.                                               | МГУ        | KF932728                |
|                       | 14d             | Дикорастущий изолят, ЗБС МГУ,<br>Московская обл.                                               | МГУ        | JQ837473                |
| <i>P. ostreatus</i>   | M-9             | Дикорастущий изолят, г. Москва                                                                 | МГУ        | JQ837474                |
|                       | M-8             | Дикорастущий изолят, г. Москва                                                                 | МГУ        | JQ837476                |
|                       | 38d             | Дикорастущий изолят, ЗБС МГУ,<br>Московская обл.                                               | МГУ        | JQ837475                |
|                       | H-5             | Изолят из экстремал. местообитания<br>32GH, Венгрия                                            | WUR        | KF932726                |
|                       | H-8**           | Монокарион PC15, полученный из<br>производственного штамма N001                                | WUR        | JQ837478                |
|                       | H-9             | Монокарион EP57, полученный из<br>производственного штамма                                     | WUR        | JQ837479                |
|                       | #54             | Дикорастущий изолят, г. Москва                                                                 | МГУ        | -                       |
|                       | #55             | Дикорастущий изолят, г. Москва                                                                 | МГУ        | -                       |
|                       | L/4             | Производственный штамм, г. Львов,<br>Украина                                                   | МГУ        | KF932729                |
|                       | Sommer<br>PC9** | Производственный штамм, Германия<br>Монокарион, полученный из<br>производственного штамма N001 | МГУ<br>GöU | -                       |
|                       | N001            | Производственный штамм, г.<br>Памплона, Испания                                                | GöU        |                         |

|                           |              |                                                      |       |          |
|---------------------------|--------------|------------------------------------------------------|-------|----------|
| <i>P. djamor</i>          | H-10         | Производственный штамм, Россия                       | МГУ   | JQ837488 |
|                           | Z1           | Производственный штамм, Россия                       | МГУ   | JQ837487 |
|                           | 1526         | Дикорастущий изолят                                  | ИБиХ  | KF932719 |
| <i>P. eryngii</i>         | H-6          | Производственный штамм, Le Lion PE, Франция          | WUR   | JQ837481 |
|                           | H-7          | Производственный штамм Somysel 3065, Sylvan, Франция | WUR   | KF932727 |
|                           | 1504         | Дикорастущий изолят                                  | ИБиХ  | KF932718 |
| <i>P. cornucopiae</i>     | H-14         | Производственный штамм, Россия                       | МГУ   | JQ837484 |
|                           | 82           | Дикорастущий изолят                                  | ИБиХ  | KF932716 |
|                           | 88           | Дикорастущий изолят                                  | ИБиХ  | KF932717 |
|                           | AG I/463     | -                                                    | CCBAS | KF932721 |
|                           | AG IV/675    | -                                                    | CCBAS | -        |
|                           | AG III/465   | -                                                    | CCBAS | -        |
|                           | AG II/464    | -                                                    | CCBAS | -        |
| <i>P. calyptratus</i>     | C-1          | Дикорастущий изолят, г. Москва                       | МГУ   | JQ837485 |
|                           | 1935         | Дикорастущий изолят                                  | ИБиХ  | KF932720 |
|                           | 2933         | Дикорастущий изолят                                  | GöU   | KF932730 |
| <i>P. citrinopileatus</i> | AG 30015/691 | -                                                    | CCBAS | KF932725 |
|                           |              |                                                      |       |          |
| <i>P. cystidiosus</i>     | AG 55/466    | -                                                    | CCBAS | FJ608592 |
| <i>P. dryinus</i>         | AG I/467     | -                                                    | CCBAS | KF932722 |
|                           | AG II/468    | -                                                    | CCBAS | KF932723 |
|                           | AG III/470   | -                                                    | CCBAS | KF932724 |

Примечание: \*Коллекции: МГУ – Кафедра микологии и альгологии, МГУ имени М.В. Ломоносова; WUR - Plant Research International, University of Wageningen, Нидерланды; ИБиХ - Институт ботаники им. М.Г.Холодного, г. Киев, Украина; CCBAS - Culture Collection of Basidiomycetes, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Чехия; GöU - Georg-August-University Göttingen, Германия.

\*\*Штаммы, геномы которых полностью отсековированы:  
[http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15\\_1/PleosPC15\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15_1/PleosPC15_1.home.html)  
[http://genome.jgi-psf.org/PleosPC9\\_1/PleosPC9\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/PleosPC9_1/PleosPC9_1.home.html).



**Таблица 2.** Референсные ITS последовательности исследуемых видов *Pleurotus*, взятые в анализ из базы данных ГенБанка (NCBI)

| Вид                       | Штамм      | Происхождение                     | Коллекция* | Номер ITS в<br>ГенБанке |
|---------------------------|------------|-----------------------------------|------------|-------------------------|
| <i>P. pulmonarius</i>     | 4203       | Дикорастущий изолят,<br>Швеция    | TENN       | AY450349                |
| <i>P. ostreatus</i>       | 6689       | Дикорастущий изолят,<br>Австрия   | TENN       | AY450345                |
| <i>P. djamor</i>          | CBS100134  | -                                 | CBS        | AY265821                |
| <i>P. eryngii</i>         | C1         | Дикорастущий изолят,<br>Иран      | IK         | FJ514549                |
| <i>P. cornucopiae</i>     | 8763       | Дикорастущий изолят,<br>Австрия   | TENN       | AY450341                |
| <i>P. euosmus</i>         | CBS 307.29 | -                                 | CBS        | EU424298                |
| <i>P. calyptratus</i>     | 9065       | Дикорастущий изолят,<br>Австрия   | TENN       | AY450338                |
| <i>P. citrinopileatus</i> | ACCC51261  | -                                 | CAAS       | EU424285                |
| <i>P. cystidiosus</i>     | CBS 297.35 | Дикорастущий изолят,<br>США       | CBS        | AY315766                |
| <i>P. dryinus</i>         | 7947       | Дикорастущий изолят,<br>Дания     | TENN       | AY450343                |
| <i>P. abieticola</i>      | 10625      | Дикорастущий изолят,<br>Россия    | TENN       | AF345656                |
| <i>P. albidus</i>         | 6504       | Дикорастущий изолят,<br>Бразилия  | TENN       | AF345658                |
| <i>P. australis</i>       | VT1953     | Дикорастущий изолят,<br>Австралия | DUKE       | AY315758                |
| <i>P. fuscoquamus</i>     | LGAMP50    | Дикорастущий изолят,<br>Греция    | DUKE       | AY315789                |
| <i>P. levis</i>           | CP-30      | Дикорастущий изолят,<br>Мексика   | DUKE       | GU722279                |

|                                   |           |                                        |      |          |
|-----------------------------------|-----------|----------------------------------------|------|----------|
| <i>P. populinus</i>               | 9936      | Дикорастущий изолят,<br>США            | TENN | AY450346 |
| <i>P. purpureo-<br/>olivaceus</i> | PDD:91632 | Дикорастущий изолят,<br>Новая Зеландия | StU  | GQ411523 |
| <i>P. tuber-regium</i>            | PtWat     | -                                      | DUKE | AF109988 |

Примечание: \*Коллекции: TENN – University of Tennessee Herbarium, США; CBS - CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Голландия; IK - Institute of Kalamata, National Agricultural Research Foundation, Греция; CAAS - Chinese Academy of Agricultural Sciences, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Китай; DUKE - Department of Biology, Duke University, США; StU - Department of Biology, Stanford University, США.

## 2.2 Культивирование штаммов вешенки

Культивирование штаммов проводили в чашках Петри на сусло-агаре (МЕА, 150 мл пивного сусла, 850 мл воды, 20 г агара; или на 1 л воды: 20 г ячменного экстракта, 20 г агара) при 25°C.

Для получения мицелиальной биомассы штаммы культивировали в жидкой питательной среде, содержащей глюкозу, дрожжевой и ячменный экстракты (YMG, на 1 л воды: 4 г глюкозы, 4 г дрожжевого экстракта, 10 г ячменного экстракта) в стерильных условиях при 25°C в темноте.

## 2.3 Получение плодовых тел в лабораторных условиях

### 2.3.1 Получение плодовых тел и споровых отпечатков на чашках Петри

Для проведения генетического анализа половой совместимости была отработана методика получения стерильных споровых отпечатков непосредственно на чашках Петри с сусло-агаром. Для получения фертильного гимения мицелий инокулировали в центре чашки Петри и инкубировали в темноте при 25°C до полного зарастания мицелием поверхности чашки Петри (приблизительно 7-12 суток в зависимости от изучаемого вида). После этого чашки продолжали инкубировать перевернутыми «вверх дном» при комнатной температуре (22-24°C) и естественном освещении со сменой «день-ночь». В среднем на 10-14 сутки отмечали появление на поверхности хорошо выраженного гимения и споровых отпечатков базидиоспор на крышке чашки Петри.

### 2.3.2 Выгонка плодовых тел

На первом этапе готовили стерильный мицелиальный инокулюм. Для этого 50 г сухого зерна сорго с кожурой или без или 50 г сухого пшеничного зерна помещали в конические стеклянные колбы (объемом 250 мл) и заливали 70 мл воды. Колбы закрывали ватными

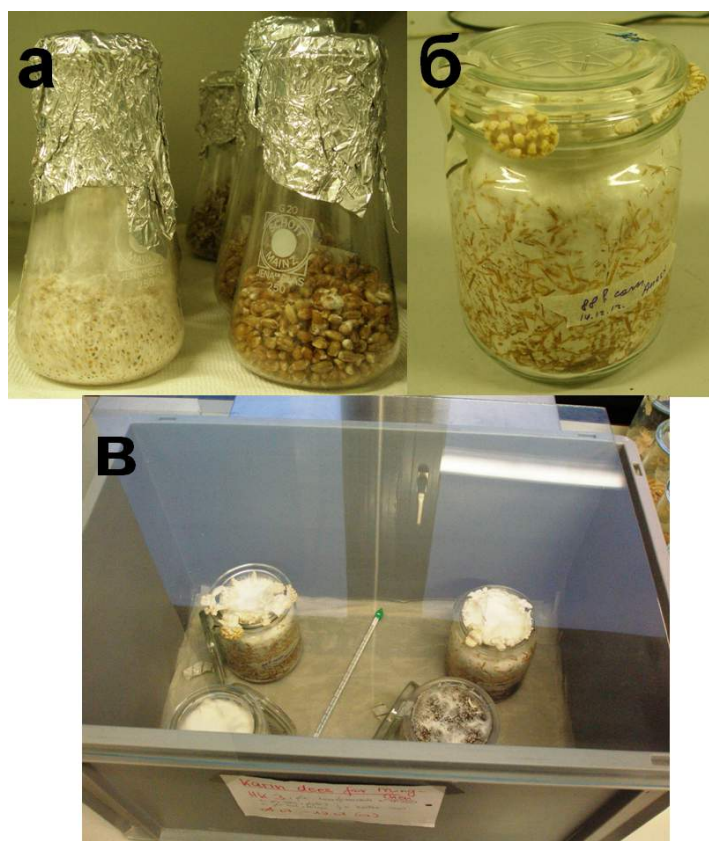
пробками и автоклавировали (при 1 атм в течение 30 мин). В результате автоклавирования стерильное зерно, впитав влагу, становилось пригодным субстратом для инокуляции грибным мицелием. Для инокуляции использовали молодые мицелиальные культуры. Каждую колбу инокулировали тремя блочками агаризованной среды с мицелием. Затем колбы инкубировали в темноте при 25°C около двух недель или до полного зарастания зернового субстрата мицелием гриба (Рисунок 2а).

На следующем этапе мицелиально-зерновой инокулюм переносили в стеклянные банки (объемом 1 л) со стеклянными крышками. Предварительно в банки помещали пшеничную солому в количестве 75 г (каждая банка была заполнена сухой соломой почти до горлышка) и заливали 500 мл воды. После автоклавирования банок (при 1 атм в течение 30 мин) стерильная солома становилась мягкой и пригодной для заселения грибным инокулюмом. Остатки воды в банках после автоклавирования удаляли. Далее в стерильные банки с соломой помещали полученный ранее на зерне стерильный инокулюм, после чего инокулированные банки инкубировали в темном термостате при 25°C до полного обрастания субстрата мицелием (20 – 30 суток, Рисунок 2б). Далее одну серию банок с культурами помещали на 2 дня в инкубатор с температурой 13°C и 9-часовым периодом освещения (условия стимуляции плодоношения холодом, или «холодовый шок»), после чего культуры переносили в пластиковые контейнеры (коробки размером 36 см x 56 см x 30 см) для дальнейшего культивирования в естественных условиях светового дня (Рисунок 2в). Вторую серию банок с культурами сразу помещали в пластиковые контейнеры (без стимуляции холодом) и инкубировали в течение 2 сут в темноте при 25°C.

Для поддержания высокого уровня влажности дно контейнеров покрывали двумя слоями влажной фильтровальной бумаги, которую периодически смачивали водой для поддержания постоянной влажности. Коробки сверху накрывали стеклянными пластинами, оставляя щель в 1-2 см для аэрации. Стекло позволяло поддерживать естественные условия светового дня. Пластиковые контейнеры с банками помещали на лабораторный стол, расположенный у окна для обеспечения естественного светового дня. В течение всей инкубации проводили измерение температуры внутри коробок. Так, во время первой серии экспериментов (декабрь-февраль) температура варьировала между 19 и 22°C при 9 ч световом дне, а во второй серии экспериментов (февраль-апрель) температура была выше (23 – 25°C) при 11 ч световом дне. Продолжительность светового дня оценивали с помощью интернет-ресурса <http://dateandtime.info/> для широты г. Гёттинген, Германия, где проводили эксперимент.

Помимо выращивания грибов в банках, для некоторых видов вешенок параллельно проводили культивирование в специализированных пластиковых мешках. Для этого в

каждый мешок помещали 300 г соломы и заполняли 700 мл воды. Далее мешки герметично закрывали и автоклавировали. После стерилизации из мешков с уже мягкой и пригодной для культивирования стерильной соломой, соблюдая стерильность, удаляли излишки воды, а субстрат инокулировали исследуемыми культурами вешенки. Далее мешки инкубировали в темном термостате при 25°C до полного обрастания субстрата мицелием, после чего мешки надрезали скальпелем в четырех местах по краю одной из сторон и помещали, как и банки, в подготовленные камеры (пластиковые контейнеры) для дальнейшего культивирования. Продуктивность штаммов вешенок оценивали по двум волнам плодоношения. При этом зрелые плодовые тела срезали, взвешивали и проводили измерения параметров плодовых тел. Урожайность штаммов оценивали в процентах выхода плодовых тел от веса субстрата. Из зрелых плодовых тел получали также споровые отпечатки на чашках Петри для дальнейшего генетического анализа.



**Рис. 2.** Выгонка плодовых тел видов рода *Pleurotus* в лабораторных условиях.

- (а) Получение мицелиального инокулюма на зерновом субстрате из пшеницы или сорго.
- (б) Заращение основного субстрата (пшеничной соломы) мицелием и появление примордиев.
- (в) Получение зрелых плодовых тел вешенок в банках, помещенных в пластиковые культивационные контейнеры.

## 2.4 Получение тестерных штаммов

Получение гаплоидных тестеров половой совместимости (типов спаривания) и определение аллелей факторов половой совместимости осуществляли согласно стандартной методике (Eger, 1978). В типе у базидиомицетов продуктами мейоза являются четыре гаплоидные базидиоспоры, созревающие в массе на базидиях в гимениальном слое плодовых тел. Грибы рода *Pleurotus* обладают тетраполярной системой половой (гомогенной) совместимости, поэтому для формирования фертильного дикариона необходимо слияние монобазидиоспоровых гаплоидных (гомокариотических) изолятов, различающихся аллелями локусов половой совместимости ( $AxBx$ ,  $AyBy$ ), или гетероаллельных по  $A$ - и  $B$ -факторам типов спаривания (биполярный гетероталлизм), причем каждый из локусов половой совместимости имеет множественные аллели (Pegler, 1983). Фертильный дикарион (диплоид) как результат миграции ядер между совместимыми по полу гомокариотическими мицелиями легко идентифицировать по наличию регулярных, хорошо заметных пряжек в районе клеточных септ. Появление пряжек на мицелии в результате скрещивания гомокарионов (так называемые, *мон-мон* скрещивания) фактически указывает на фертильность (половую совместимость) партнеров и их принадлежность к одному и тому же виду (Pegler, 1983; Шнырева, 2003). Отсутствие дикариотизации между скрещиваемыми гомокарионами указывает на то, что данные монобазидиоспоровые гаплоидные изоляты имеют одинаковые аллели локусов половой совместимости или на то, что данные изоляты принадлежат репродуктивно изолированным интерстерильным группам (биологическим видам) (Шнырева, 2003).

Выделение монобазидиоспоровых гаплоидных тестеров, гетероаллельных по  $A$ - и  $B$ -факторам, проводили следующим образом: 10 - 16 моноспоровых культур, полученных из спорового отпечатка, скрещивали во всех возможных комбинациях на агаризованной питательной среде. Каждую пару монобазидиоспоровых изолятов помещали на расстоянии 1,5-2 см друг от друга на чашке Петри. Результаты фиксировали спустя 10-14 дней после начала инкубации, когда происходила миграция ядер и формировалась четко выраженная зона контакта противоположных мицелиев. В полностью совместимых комбинациях ( $A\#B\#$ ) зона контакта была не дифференцирована, так же как и при несовместимых комбинациях ( $A=B=$ ), но в последнем случае пряжки не формировались. Моноспоровые культуры, совместимые только по фактору  $A$  ( $A\#B=$ ), формировали четкую зону контакта в виде «барража» без пряжек, а совместимые только по фактору  $B$  ( $A=B\#$ ) – зону «прижатого» (flat) неконтактирующего мицелия между взаимодействующими монокарионами. Таким образом, в результате проведенных внутриштаммовых скрещиваний выделяли четыре группы моноспоровых (гомокариотических) гаплоидных штаммов, гетероаллельных по локусам

половой совместимости, которые и служили в дальнейшем гаплоидными тестерами половой совместимости ( $AxVx$ ,  $AyVy$ ,  $AxVy$ ,  $AyVx$ ). Тестерным штаммом мог быть любой штамм из каждой из четырех групп (Шнырева и др., 1998; 2012).

## **2.5 Выделение ДНК, амплификация и анализ ITS последовательностей**

### **2.5.1 Выделение геномной ДНК**

Выделение геномной ДНК из мицелия проводили по стандартной методике с использованием жидкого азота (Lee *et al.*, 1988). Молодой мицелий снимали с поверхности сусло-агара с помощью шпателя с последующим растиранием в ступке в жидком азоте до гомогенной мицелильной пудры. Полученную пудру переносили в 2-мл пробирки Eppendorf. Далее в пробирки добавляли по 750 мкл лизирующего буфера (Состав: 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-меркаптоэтанол; pH 8.0 - 8.3), встряхивали на вортексе и инкубировали в течение 1 ч при 65°C. На следующем этапе проводили очищение препаратов от белков посредством добавления 700 мкл смеси фенол/хлороформ (1:1). Пробирки интенсивно встряхивали на вортексе и проводили центрифугирование при 12000 об/мин в течение 10 мин. Шаг депротеинизации повторяли дважды. Очищенную от клеточных структур и белков водную фазу (супернатант) аккуратно отбирали и переносили в новую пробирку; в пробирку к супернатанту добавляли 20 мкл 3М ацетата натрия, аккуратно перемешивали и затем добавляли 1 мл изопропанола. Смесь аккуратно перемешивали и инкубировали при +4°C, 30 мин. Осадки ДНК собирали центрифугированием в течение 5 мин при 10000 об/мин. Полученную ДНК очищали от примесей полисахаридов переосаждением 96%-ным этанолом. Далее осадок ДНК растворяли в 300-500 мкл стерильной деионизированной воды и использовали в дальнейшем в качестве матрицы для амплификации.

Экстракцию ДНК проводили также с помощью экспресс-метода с обработкой микроволнами (Izumitsu *et al.*, 2012). Так, молодой мицелий или небольшой кусочек плодового тела гриба помещали в 1.5 мл пробирку Eppendorf и ресуспендировали в TE буфере. Полученную смесь обрабатывали в микроволновой печи (при мощности 600 В) в течение 1 мин, затем смесь охлаждали в течение 30 с при комнатной температуре и повторяли микроволновую обработку в течение 1 мин. Далее полученную суспензию осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 5 мин и водную фазу, содержащую ДНК, использовали непосредственно для постановки амплификации. Данный протокол является быстрым и простым методом экстрагирования ДНК и позволяет амплифицировать участки генома размером до 2000 п.н. с высокой эффективностью.

### 2.5.2 Амплификация ITS последовательностей на матрице геномной ДНК

Амплификацию проводили на термоциклере Amply4 (Biokom) с использованием *Taq* полимеразы и пары стандартных праймеров: прямого ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и обратного ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Реакцию проводили в общем объеме реакционной смеси 25 мкл со следующим составом реагентов: 10 нг геномной ДНК, 2.5 мкл 10x ПЦР буфера с 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific, Вильнюс, Литва), 0.2 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата (dNTP), 0.4 мкМ каждого праймера и 1 единица активности *Taq* полимеразы на реакцию. Амплификацию проводили при следующих условиях: 2 мин начальной денатурации при 94°C, далее 35 циклов, состоящих из денатурации ДНК-матрицы в течение 30 с при 94°C, отжига праймеров в течение 30 с при 55°C и шага элонгации цепи в течение 30 с при 72°C, а также окончательного шага элонгации в течение 10 мин при 72°C. Полученные ПЦР продукты анализировали в 1%-ном агарозном геле согласно стандартной методике.

### 2.5.3 Секвенирование нуклеотидных последовательностей и анализ данных

Секвенирование ПЦР продуктов проводили с двух концов с каждым из двух праймеров: ITS1 или ITS4 (White *et al.*, 1990). Для реакции секвенирования были взяты по 100 нг ПЦР продукта и очищены переосаждением 96%-ным этанолом (по стандартной методике) с последующим концентрированием в 10 мкл очищенной MQ воды. Далее по 40 нг каждого очищенного ПЦР-продукта были смешаны с реакционной смесью для секвенирования BigDye Terminator v3.1, которая содержала меченые флюоресцентными красителями дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты (ddNTP) (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) с добавлением 0.2 мкМ одного из праймеров. Далее реакционная смесь была очищена переосаждением с помощью 0.3M ацетата натрия и 96%-ного этанола. Часть реакций секвенирования проводили на базе ЦПК «Геном» ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Последовательности некоторых штаммов были отсеквенированы в Bűsgen-Institute (Georg-August-University Gűttingen, Германия).

Анализ полученных последовательностей проводили с помощью программ Chromas (Technelysium Pty Ltd.; <http://technelysium.com.au>) и Mega 5 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2011). Множественные выравнивания по алгоритму ClustalW, построение филогенетического дерева по алгоритму Maximum Likelihood (с использованием модели Jukes-Cantor) проводили в программе Mega 5.

Эволюционные дистанции между видами рода *Pleurotus* рассчитывали согласно модели Maximum Composite Likelihood в программе Mega 5, учитывая основные замены нуклеотидов по каждой позиции в секвенированных ITS последовательностях для каждого вида/штамма.

Полученные секвенированные ITS последовательности штаммов вешенки были сопоставлены с электронной базой данных NCBI при помощи алгоритма Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Также, полученные последовательности были депонированы в базы данных нуклеотидных последовательностей ГенБанка (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами, указанными в Таблице 1.

#### 2.5.4 Баркодинг на основе рестрикционного анализа ITS последовательностей

На первом этапе был проведен рестрикционный анализ *in silico* на основе ITS последовательностей для каждого вида *Pleurotus*. Рестрикционный анализ проводили с использованием программ WatCut (University of Waterloo, Ontario, Canada; <http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template>) и CLC Sequence Viewer ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)). На основе консенсусных последовательностей в программе WatCut для каждого вида были построены рестрикционные карты. Три эндонуклеазы рестрикции *AluI*, *BsuRI* и *HinfI* (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), а также пары ферментов *AluI* + *EcoRI* и *BsuRI* + *EcoRI* были использованы для рестрикционного анализа амплифицированных ITS последовательностей в эксперименте. Рестрикционный анализ с последующим анализом полученных фрагментов в агарозном гель-электрофорезе проводили по стандартной методике (Sambrook, Russell, 2001). В зависимости от эндонуклеазы были использованы разные рестрикционные буферы согласно рекомендациям фирмы-производителя (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Так, для *AluI* использовали 1-кратный (1x) буфер Tango, для *HinfI* и *BsuRI* – (1x) буфер Red, для двойной рестрикции *BsuRI* + *EcoRI* использовали (2x) буфер Tango. В случае двойной рестрикции эндонуклеазами *AluI* + *EcoRI* было трудно подобрать универсальный буфер, так как для активности этих ферментов характерны разные солевые концентрации. Поэтому использовали процедуру рестрикции в 2 шага: сначала проводили реакцию с эндонуклеазой *AluI* в (1x) буфере Tango (с низкой концентрацией солей) в течение 1,5 ч, затем добавляли фермент *EcoRI* и буфер Tango доводили до 2-кратной концентрации; инкубирование продолжали в течение 1,5 ч. Реакцию рестрикции для всех проб проводили в общем объеме реакционной смеси 15 мкл в течение 1 – 1,5 ч или в течение ночи при 37°C.



## 2.6 Биоинформатический анализ структуры *matA* локусов половой совместимости у представителей рода *Pleurotus*

Для проведения структурного анализа *matA* локуса были взяты следующие последовательности локуса из электронных баз: последовательности монокариотических штаммов PC9 и PC15 *P. ostreatus* (отсеквенированы Joint Genome Institute, <http://jgi.doe.gov/>); последовательности монокариотических штаммов RV95/134.104 и RV95/957.30 *P. djamor* (номера в ГенБанке AY462112, AY462111; James *et al.*, 2004); последовательности монокариотических штаммов CCMSSC00488 и CCMSSC00489 *P. eryngii* (номера в ГенБанке HQ595186, HQ595187). Множественные выравнивания последовательностей генов *matA* локуса проводили в программе Dialign 2.2.1 (BiBiServ, <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/welcome.html>; Morgenstern, 2004). Для предсказания наличия сигнальных последовательностей использовали программу SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen *et al.*, 2011). Для предсказания сайтов локализации аминокислотных последовательностей гомеодоменных белков использовали программу PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) и WoLF PSORT (<http://wolfsort.org/>). Для предсказания структуры белка (глобулярная или трансмембранная, наличие трансмембранных доменов, поверхностных петель), основанной на гидрофильности/гидрофобности аминокислотных последовательностей, использовали программу Kyte Doolittle Hydropathy Plot (<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>, Kyte, Doolittle, 1982).

Для предсказания структурной организации белковой молекулы (вторичная структура) использовали программу SWISS-MODEL Secondary Structure Prediction and Domain Assignment ([http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools\\_sequencescan1](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_sequencescan1); Arnold *et al.*, 2006).

## 2.7 Клонирование генов *matA* локуса

### 2.7.1 Вектор для клонирования и штаммы микроорганизмов

Рекомбинантный кольцевой вектор pYSK7, использованный для клонирования и экспрессии генов *matA* локуса, был получен из дрожжевого shuttle-вектора pRS426 в лаборатории профессора U.Kues (Georg-August-University Göttingen, Germany). Этот вектор имеет маркер *URA3* для селекции ауксотрофных по урацилу клонов в штаммах дрожжей, 2  $\mu$ m дрожжевой ориджин репликации *ori*, маркер *Amp<sup>r</sup>* устойчивости к ампициллину для селекции в клетках *Escherichia coli*, бактериальный ориджин репликации *ColE1* (Sikorski, Hieter, 1989), а также добавленный участок генов *pab1* (p-amino benzoic acid synthase) и *lcc1* (laccase) гриба *C. cinerea*, которые ориентированы в одном направлении. Лакказный ген *lcc1*

в векторе pYSK7 находится под контролем конститутивного промотора *gpdII* из *Agaricus bisporus* (П) и собственного терминатора транскрипции (Т) (см. далее в разделе 3.5.2 Рисунок 17) (Kilaru, 2006).

Для проведения гомологичной рекомбинации использовали ауксотрофный по урацилу штамм *Saccharomyces cerevisiae* RH1385 (*MATa*, *ura3Δ*). Для амплификации (наработки) полученных конструкций использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Waldbronn, Germany).

Полученные рекомбинантные конструкции планируется экспрессировать в двух монокариотических гаплоидных ауксотрофных по триптофану штаммах *C. cinerea*: у штамма FA2222 отсутствует *hd1* ген в *matA* локусе, имеются маркеры *acu-1* (потеря функции ацетил-СоА синтетазы) и *trp-1.1*, *1.6* (ауксотрофность по триптофану) и аллели *A5*, *B6 mat* локусов; у штамма AT8 отсутствуют *a2* и *d2* гены в *matA* локусе, имеются маркеры ауксотрофности по триптофану *trp-3* и аденину *ade-8* и аллели *A43*, *B43 mat* локусов (May, Matzke, 1995; Kertesz-Chaloupková *et al.*, 1998).

### 2.7.2 Выделение ДНК

Выделение геномной ДНК из мицелия гаплоидных штаммов PC9 и PC15 *P. ostreatus* проводили по стандартной методике с использованием жидкого азота (Lee *et al.*, 1988).

Для выделения плазмидной ДНК из клеток *S. cerevisiae* и *E. coli* также использовали стандартные методики. Плазмидную ДНК из бактериальных клеток выделяли щелочным методом с использованием 0.2 М раствора NaOH с 1% SDS ( $C_{12}H_{25}SO_4Na$ ) в качестве лизирующего агента и 0.9 М раствора ацетата натрия с 0.5 М NaCl в качестве ренатурирующего агента (Birnboim, Doly, 1979). Выделение плазмидной ДНК из дрожжевых клеток с целью трансформации в *E. coli* проводили с использованием лизирующего буфера (2% Тритон X-100, 1% SDS, 100 мМ NaCl, 100 мМ Трис pH 8.0, 1 мМ EDTA) и стеклянных бусин, с шагом очищения от белков смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт по методике, описанной в методическом пособии «Short Protocols in Molecular Biology» (Ausubel *et al.*, 2002).

### 2.7.3 Приготовление компетентных клеток и трансформация

Приготовление компетентных клеток *E. coli* проводили по стандартной методике с индукцией компетентности раствором 100 мМ  $CaCl_2$  на холоде (Mandel, Higa, 1970). Трансформацию подготовленных компетентных бактериальных клеток проводили методом «heat shock» (Dagert, Ehrlich, 1979). Полученные трансформанты отбирали на среде LB (Luria Broth; 10 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, 10 г агара на 1 л воды) с

добавлением антибиотика ампициллина (Amp, 0.1 мг/мл) по соответствующему селективному маркеру устойчивости к ампициллину.

Клетки *S. cerevisiae* обладают компетентностью и не требуют специальной подготовки. Для рутинного выращивания клеток дрожжей использовали среду YPDA (20 г глюкозы, 10 г дрожжевого экстракта, 20 г пептона, 30 мг аденинсульфата, 20 г агара на 1 л воды). Процедуру трансформации *S. cerevisiae* проводили с использованием 1 М ацетата лития и одноцепочечной ДНК (ss DNA) согласно методике Gietz, Schiestl (2007). Селекцию трансформантов дрожжей проводили на специализированной среде SD (Yeast Synthetic Dropout; 20 г глюкозы, 1.7 г дрожжевого экстракта, 5 г сульфата аммония, 5 г аминокислот казеина, 20 мг аденина, 20 мг триптофана, 20 г агара) по маркеру ауксотрофности *ura*.

#### 2.7.4 Амплификация и клонирование *hd* генов гомеодоменных белков

Амплификацию *hd* генов, кодирующих гомеодоменные белки *matA* локуса, для интеграции в плазмиду pYSK7 проводили в два шага. Для этого были сконструированы химерные праймеры таким образом, чтобы увеличить на 40-50 п.н. область гомологии с вектором pYSK7, что впоследствии обеспечило бы эффективную интеграцию последовательностей *hd* генов в вектор (Oldenburg *et al.*, 1997; Raymond *et al.*, 1999). Пары праймеров для первого шага ПЦР были созданы на основе последовательностей генов *matA* локуса *P. ostreatus*, опубликованных на сайте JGI (<http://genome.jgi.doe.gov>). В свою очередь, поиск самих генов, кодирующих гомеодоменные белки *P. ostreatus*, проводили при помощи инструмента поиска tblastn по полным геномным последовательностям гаплоидных монокарионов PC9 и PC15 *P. ostreatus* на сайте JGI, используя хорошо изученные аминокислотные последовательности b1-1 (X62336) и b2-1 (X79687) гомеодоменных белков *C. cinerea*. Клонирование *hd* генов в pYSK7 плазмиду проводили с замещением лакказного гена *lccI* плазмиды посредством гомологичной рекомбинации.

Для обеспечения экспрессии клонированных *hd* генов с правильной рамки считывания области гомологии праймеров с исследуемыми генами начинались непосредственно с 5'-конца гена, т.е. с последовательности ATG (Таблица 3). Нуклеотидные последовательности химерных праймеров (11 пар) представлены в Таблице 3. В виду того, что все праймеры отличались большой длиной, они были проверены на вероятность гомо- и гетеродимеризации, а также образование шпилек с использованием программы OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies; <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>; Owczarzy *et al.*, 2008).

Первый шаг амплификации исследуемых генов проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл следующего состава: 10 нг геномной ДНК, 2.5 мкл 10x ПЦР буфера (с

концентрациями компонентов: 10 мМ Трис pH 8.8, 50 мМ KCl, 0.1% Triton X-100, 10.5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 0.2 мМ dNTP, по 0.4 мкМ каждого из пары праймеров, 1 ед. активности *Taq* полимеразы (Thermo Scientific, Вильнюс, Литва). Условия ПЦР: денатурация 5 мин при 94°C, далее 35 циклов по 30 с при 94°C, 30 с при 63°C и 3 мин при 72°C, и конечный шаг элонгации цепи 10 мин при 72°C. Для второго шага амплификации использовали 1-2 мкл ПЦР-продукта, полученного в первом шаге (≈60 нг ДНК); амплификацию проводили в общем объеме реакционной смеси 25 мкл (2.5 мкл 10x ПЦР буфера, 0.2 мМ dNTP, по 0.4 мкМ каждого из пары праймеров и 1 ед. активности *Taq* полимеразы). Условия амплификации были следующими: начальная денатурация ДНК-матрицы в течение 5 мин при 94°C, далее 35 циклов по 30 с при 94°C, 30 с при 58°C и 3 мин при 72°C, и конечный шаг 10 мин при 72°C.

**Таблица 3.** Список праймеров для клонирования генов гомеодоменных белков *matA* локуса

| Шаг ПЦР | Праймер          | Нуклеотидная последовательность праймера <sup>a</sup>                      |
|---------|------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1       | f_HD1.1_PC15_op  | 5'gaggaaagatgccagaagaaGCTGTAGCTAGACGAGAGCGG3'                              |
|         | f_HD1.1_PC15_gpd | 5'ctcccatctacacacaacaagcttatcgccATGCTCGACATTCTGCTTCAAGCAGAGG3'             |
|         | r_HD1.1_PC15     | 5'ctatagcagcctcctaccactggccctctggtcaactataatattatCTAGGCGATCGCTAGCTCTGC3'   |
|         | f_HD1.2_PC15_op  | 5'gaggaaagatgccagaagaaCCTCTGCTTGAAGCAGAATGTGCG3'                           |
|         | f_HD1.2_PC15_gpd | 5'ctcccatctacacacaacaagcttatcgccATGGCTGTTGACGTCCGCTC3'                     |
|         | r_HD1.2_PC15     | 5'ctatagcagcctcctaccactggccctctggtcaactataatattatCTACGCAAATGCCAGCTCTGC3'   |
|         | f_HD2_PC15_op    | 5'gaggaaagatgccagaagaaGCGACTAGCTCTTGCTTGGC3'                               |
|         | f_HD2_PC15_gpd   | 5'ctcccatctacacacaacaagcttatcgccATGGTCGTCTCGAACACCAACAC TGAAG3'            |
|         | r_HD2_PC15       | 5'ctatagcagcctcctaccactggccctctggtcaactataatattatCTATGATCTTGCCTGCACAATCG3' |
|         | f_HD1_PC9_op     | 5'gaggaaagatgccagaagaaGGTGTCTAAAATGCGTTGAACGG3'                            |
|         | f_HD1_PC9_gpd    | 5'ctcccatctacacacaacaagcttatcgccATGACTGTGTCGTCGAGATCCG3'                   |
|         | r_HD1_PC9        | 5'ctatagcagcctcctaccactggccctctggtcaactataatattatCTATACGAACGCCAACTCTTCC3'  |
| 2       | f_HD2_PC9_op     | 5'gaggaaagatgccagaagaaGTGTAAAAGTCGGTTGCG3'                                 |
|         | f_HD2_PC9_gpd    | 5'ctcccatctacacacaacaagcttatcgccATGGATATCTTGGCCGTTCAACG C3'                |
|         | r_HD2_PC9        | 5'ctatagcagcctcctaccactggccctctggtcaactataatattatCTATGATCTTGCCTGCACAATCG3' |
| 2       | f_pYSK7_op       | 5'CAGGGATTGGGAAAAGGTCTTCGTCTGGAGGAAAGATGCCA GAAG3'                         |
|         | r_pYSK7          | 5'CTTCCCTCTGTGACCAACTTTGACTATAGCAGCCTCCTACCA CTGGCCCTCTGGTCAAC3'           |

Примечание. <sup>a</sup> Заглавными буквами показана последовательность праймера, гомологичная 5'-концу генов гомеодоменных белков; прописными буквами обозначена последовательность, гомологичная участку pYSK7 вектора в месте интеграции генов при клонировании.

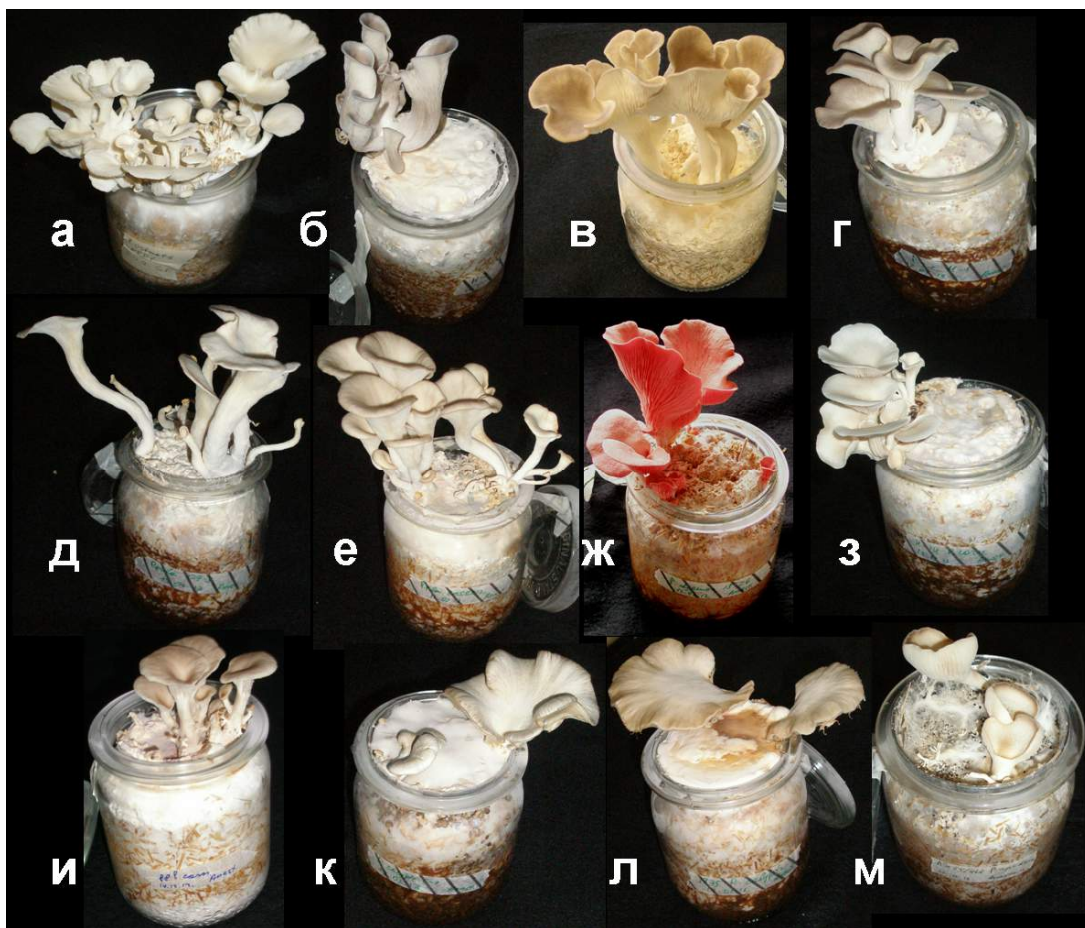
Клонирование амплифицированных последовательностей генов гомеодоменных белков (*hd*) проводили с помощью метода гомологичной рекомбинации в дрожжах. Для этого 0.5 мкг полученного ПЦР-продукта, включающего исследуемый ген и длинные гомологичные вектору концы для интеграции, смешивали с 0.5 мкг вектора pYSK7, линейаризованного по уникальным сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hpa*I (в течение 8 ч при 37°C). Данные сайты рестрикции располагались внутри *lcc1* гена плазмиды, по которым и происходила интеграция амплифицированных *hd* последовательностей.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1 Культивирование видов рода *Pleurotus* в лабораторных условиях

Одной из задач работы было получение гаплоидных тестерных линий для некоторых штаммов вешенки из базидиоспор (споровых отпечатков). Для этого проводили выгонку плодовых тел в лабораторных условиях.

Многие съедобные грибы рода *Pleurotus* широко культивируют в искусственных условиях по всему миру. Как правило, культивируемые штаммы разных видов требуют разных условий. Экзотические (субтропические) виды чаще выращивают в условиях повышенных температур (25-30°C) и повышенной длины светового дня. Относительная влажность воздуха, которая необходима для выращивания большинства культивируемых видов, примерно одинакова и колеблется в районе 90% (Stamets, 1993). При выращивании плодовых тел вешенок важным условием является концентрация углекислого газа CO<sub>2</sub> в культивационной камере. Так, при повышенных концентрациях углекислоты плодовые тела вырастают мелкими и видоизмененными. Было также показано, что температура при выращивании оказывает влияние на цвет шляпки: чем выше температура, тем светлее пигментация шляпки плодового тела (Sivolarova *et al.*, 2012). Существует два основных способа лабораторного культивирования съедобных грибов – в специализированных пластиковых (полипропиленовых) мешках и в стеклянных банках. Как правило, культивирование производят в специализированных комнатах с автоматизированным режимом освещения, аэрации воздуха и поддержанием постоянной влажности. Однако, как было показано в ходе данной работы, плодовые тела для многих видов рода *Pleurotus*, включая некоторые непродуцирующие виды и дикорастущие изоляты, можно получать по упрощенной схеме непосредственно на лабораторном столе. При этом для многих видов не наблюдали сильных отклонений в морфологии плодовых тел от таковых, наблюдаемых в природных условиях (Рисунок 3). Для некоторых видов, также как и при выращивании в промышленных условиях в теплицах, получали две волны плодоношения. Данные по культивированию исследуемых видов рода *Pleurotus* в условиях, предложенных в данной работе, а именно, в стеклянных банках с соломой в качестве субстрата, представлены в Таблице 4.



**Рисунок 3.** Морфология плодовых тел представителей рода *Pleurotus* при выращивании в лабораторных условиях: *P. ostreatus* N001 (а), *P. ostreatus* Н-5 (б), *P. sajor-caju* CS-32 (в), *P. sajor-caju* Н-1 (г), *P. pulmonarius* О9-3 (д), *P. pulmonarius* ZBS2012 (е), *P. djamor* 1526 (ж), *P. cornucopiae* Н-14 (з), *P. cornucopiae* 88 (и), *P. calyptratus* C-1 (к), *P. calyptratus* 1935 (л), *P. cystidiosus* AG 55/466 (м).

**Таблица 4.** Плодоношение видов рода *Pleurotus* в лабораторных условиях

| Вид                   | Штамм    | Эксперимен-<br>тальная<br>серия* | Период<br>зарастания<br>субстрата<br>(сут) | Период формирования<br>плодовых тел (сут) |            |
|-----------------------|----------|----------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|------------|
|                       |          |                                  |                                            | 1-ая волна                                | 2-ая волна |
| <i>P. ostreatus</i>   | N001     | 1                                | 24 ±2                                      | 8 ±1                                      | 18±2       |
|                       | H-5      | 2                                | 17±1                                       | 5±1                                       | 8±1        |
| <i>P. sajor-caju</i>  | CS-32    | 1                                | 23±2                                       | 7±1                                       | 11±2       |
|                       | H-1      | 1                                | 25±1                                       | 7±1                                       | 11±1       |
| <i>P. pulmonarius</i> | O9-3     | 2                                | 24±1                                       | 7±2                                       | 8±2        |
|                       | ZBS2012  | 1,2                              | 23±1                                       | 10±1                                      | 9±1        |
| <i>P. djamor</i>      | 1526     | 2                                | 28±1                                       | 22±2                                      | 23±3       |
| <i>P. cornucopiae</i> | H-14     | 2                                | 20±1                                       | 10±1                                      | 14±1       |
|                       | 88       | 2                                | 23±1                                       | 7±1                                       | 12±1       |
| <i>P. calyptratus</i> | C-1      | 2                                | 19±1                                       | 9±3                                       | - **       |
|                       | 1935     | 2                                | 19±1                                       | 8±2                                       | -          |
| <i>P. cystidiosus</i> | AG       | 2                                | 17±2                                       | 5±1                                       | 30±2       |
|                       | 55/466   |                                  |                                            |                                           |            |
| <i>P. eryngii</i>     | H-7      | 1,2                              | 26±2                                       | -                                         | -          |
| <i>P. dryinus</i>     | AG I/457 | 1,2                              | 26±2                                       | -                                         | -          |

Примечание. \*проводили две серии экспериментов: 1-ая серия – культивирование в декабре-феврале при 20°C и 9- часовом световом дне; 2-ая серия – культивирование в феврале-апреле при 23°C и 11 ч световом дне.

\*\* - данные не получены.

Примордии и зрелые плодовые тела в лабораторных условиях были получены для следующих видов: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. djamor*, *P. cornucopiae*, *P. calyptratus* и *P. cystidiosus* (Таблица 4). Для всех исследуемых видов было отмечено интенсивное заращение мицелием субстрата из пшеничной соломы. Самая быстрая колонизация субстрата происходила у представителей видов *P. ostreatus* и *P. cystidiosus* – в среднем на 17-е сутки культивирования при 23°C и 11-часовом периоде освещения. В эксперименте использовали два штамма вешенки устричной, *P. ostreatus* - культивируемый штамм N001 и природный изолят H-5. Культивируемый штамм N001 выращивали в первой серии экспериментов (декабрь-февраль; 20°C, 9 ч световой день), в то время как дикий природный изолят H-5 культивировали во второй серии экспериментов в феврале-апреле при



более высокой температуре (23°C) и 11-часовом световом дне. Вероятно, поэтому природный штамм Н-5 быстрее начал формировать плодовые тела как в первой, так и во второй волне плодоношения (на 5-е и 8-е сутки соответственно) по сравнению с культивируемым производственным штаммом N001 (Таблица 4). Однако, несмотря на различия в темпах созревания, урожайность (процент выхода плодовых тел от общей массы субстрата) у обоих штаммов *P. ostreatus* была сходной и составила 87% для штамма N001 и 84% для штамма Н-5 (Таблица 5).

Штаммы *P. sajor-caju* также успешно плодоносили в лабораторных условиях. В эксперимент были взяты два производственных штамма – североамериканский CS-32 и европейский Н-1 (Таблица 4). Оба штамма культивировали в первой серии экспериментов при температуре около 20°C и 9-часовом световом дне. Максимальная биомасса плодовых тел была сформирована в первую волну плодоношения (71-74% от массы субстрата), в то время как во вторую волну плодовые тела были мелкими, и их урожайность не превысила 5% (Таблица 5).

Два природных изолята вешенки легочной, *P. pulmonarius* - О9-3 и ZBS2012 - успешно плодоносили в обеих сериях экспериментов: как при 23°C и 11-часовом световом дне, так и при «зимних» условиях (20°C, 9 ч световой день) (Таблица 4). На формирование примордиев у обоих штаммов ушло около 30 суток вне зависимости от температуры и длины светового дня. В отличие от культивируемых штаммов близкородственного вида *P. sajor-caju*, природные изоляты *P. pulmonarius* формировали плодовые тела необычной формы: небольшие шляпки воронковидной формы на длинных и относительно тонких ножках (Рисунок 3). Таким образом, можно заключить, что внешние условия культивирования оказывают значительное влияние на морфологию плодовых тел, но не являются универсальными для всех изученных видов *Pleurotus*. В экспериментах природный штамм О9-3 *P. pulmonarius* показал большую суммарную урожайность по сравнению со штаммом этого же вида ZBS2012 (Таблица 5). Однако, при культивировании в первой серии экспериментов средняя урожайность для штамма ZBS2012 за две волны плодоношения составила 33%, что в 1,7 раз ниже, чем во второй серии экспериментов при 11-часовом световом дне. Таким образом, температура и продолжительность светового дня оказывали существенное влияние на общую продуктивность штаммов *P. pulmonarius* - вида, широко распространенного в природных экотопах средней полосы России.

Приуроченный к тропическому климату и экзотический для умеренных широт вид *P. djamor* (вешенка розовая) культивировали во второй серии экспериментов, с середины февраля по апрель. Начало плодоношения природного штамма 1526 данного вида было отмечено значительно позже по сравнению с другими анализируемыми видами, а именно, на

25-е сутки с момента колонизации субстрата мицелием (Таблица 4). Плодовые тела характерной розовой окраски появились лишь в апреле, когда продолжительность светового дня достигла 13 ч, а температура в лабораторной камере для культивирования повысилась до 25°C. При этом урожайность природного штамма 1526 вешенки розовой была высокой и составила за две волны плодоношения 84% по отношению к субстрату, что сопоставимо с продуктивностью культивируемых штаммов *P. ostreatus* и *P. sajor-caju* (Таблица 5).

Еще один съедобный вид, успешно формировавший плодовые тела в лабораторных условиях, – вешенка воронковидная, *P. cornucopiae*. В исследовании были использованы два штамма – производственный Н-14 и природный изолят 88 (Таблица 4). Оба штамма культивировали во второй серии экспериментов (23°C, 11 ч световой день). Средняя урожайность штаммов была несколько ниже, чем у других культивируемых видов и достигала в среднем 60% от массы субстрата. При этом урожайность производственного штамма Н-14 была несколько выше (73%) по сравнению с природным изолятом 88 (49%) (Таблица 5).

Вид *P. calypttratus* относят к некультивируемым и несъедобным вешенкам. В эксперименте участвовали два природных изолята, взятых из разных коллекций, – московский изолят С-1 и киевский 1935. Штаммы культивировали как в первой, так и во второй серии экспериментов, однако, полноценные плодовые тела из примордиев были сформированы только во второй серии экспериментов (23°C, 11 ч световой день). Как и в природных условиях, гимений у формирующихся плодовых тел был покрыт частным покрывалом, которое со временем раскрывалось, оставляя бахрому по краю шляпки (Рисунок 3). Представители данного вида давали только одну волну плодоношения в среднем на 28-е сутки после инокуляции субстрата.

Вид *P. cystidiosus*, в типе образующий анаморфную коремидальную стадию, был способен продуцировать зрелые плодовые тела в лабораторных условиях (Таблица 4). Культивирование штамма AG 55/466 *P. cystidiosus* проводили во второй серии экспериментов. Интересно, что данный штамм показал наилучшие результаты как по продуктивности (урожайность составила 97% от массы субстрата), так и по срокам плодоношения первой волны (Таблица 5). В литературе встречается информация о промышленном культивировании вида *P. cystidiosus*, однако в России вид не пользуется популярностью для культивирования в пищевых целях (Kong, 2004).

Однако следует отметить, что не для всех видов вешенок предложенные нами «лабораторные» условия культивирования оказались оптимальными. Так, определенная трудность возникла с получением плодовых тел у представителя вида *P. eryngii*. Согласно рекомендациям по промышленному культивированию, данный вид требует пониженных

температур (10-15°C) для формирования примордиев и температуры не выше 18°C для дальнейшего плодоношения (Kong, 2004). Однако мы не смогли получить плодовые тела для *P. eryngii* ни в случае применения холодового шока (инкубирование при 13°C), ни при культивировании грибов при более высоких температурах 19-20°C и выше. Возможно, получение плодовых тел в данном случае было затруднено из-за неспецифичности используемого субстрата (соломы), так как обычно вид *P. eryngii* культивируют на комплексных субстратах, включающих дубовые опилки, подсолнечную или хлопковую лузгу, пшеничную солому с добавлением соломы зонтичных растений (Kong, 2004). Не удалось получить плодовых тел у штамма AG I/457 *P. dryinus*. Данный вид не является культивируемым и не употребляется в пищу. Вид приурочен к северным широтам и, вероятно, требует особых условий для инициации плодоношения в лабораторных условиях.

**Таблица 5.** Урожайность штаммов видов *Pleurotus*

| Вид                   | Штамм   | 1-ая волна плодоношения |                            |                   | 2-ая волна плодоношения |                            |                   |
|-----------------------|---------|-------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|
|                       |         | диаметр<br>шляпки, см   | длина/диаметр<br>ножки, см | Урожайность,<br>% | диаметр<br>шляпки, см   | длина/диаметр<br>ножки, см | Урожайность,<br>% |
| <i>P. ostreatus</i>   | N001    | 4.0±1.5                 | 3.0±0.5/1.0±0.5            | 72                | 8.5±0.0                 | 4.5±0.0/1.5±0.0            | 15                |
|                       | H-5     | 5.0±2.0                 | 5.5±1.5/1.0±0.5            | 51                | 4.5±2.0                 | 2.5±0.5/0.75±0.2           | 33                |
| <i>P. sajor-caju</i>  | CS-32   | 7.5±1.5                 | 4.0±1.0/1.0±0.5            | 74                | 2.7±1.3                 | 2.0±0.5/0.7±0.3            | 5                 |
|                       | H-1     | 7.0±2.0                 | 4.5±0.5/1.0±0.5            | 71                | 3.5±1.0                 | 2.0±0.5/1.0±0.2            | 5                 |
| <i>P. pulmonarius</i> | O9-3    | 5.0±2.5                 | 6.0±3.0/1.0±0.5            | 61                | 4.0±2.0                 | 6.0±2.0/1.0±0.5            | 24                |
|                       | ZBS2012 | 2.7±1.3                 | 4.2±0.8/0.5±0.2            | 21                | 5.0±2.0                 | 5.0±1.5/1.0±0.5            | 34                |
| <i>P. djamor</i>      | 1526    | 6.5±3.5                 | 1.4±0.6/0.5±0.1            | 71                | 4.5±2.5                 | 1.7±0.8/0.4±0.1            | 13                |
| <i>P. cornucopiae</i> | H-14    | 4.0±2.0                 | 2.5±1.0/0.9±0.6            | 54                | 5.0±2.0                 | 3.5±1.5/0.5±0.2            | 19                |
|                       | 88      | 3.0±1.0                 | 3.0±1.0/0.7±0.3            | 44                | 2.0±1.0                 | 3.0±1.0/0.5±0.2            | 5                 |
| <i>P. calyptratus</i> | C-1     | 5.5±0.5                 | -                          | 44                | -                       | -                          | -                 |
|                       | 1935    | 8.0±2.0                 | -                          | 53                | -                       | -                          | -                 |
| <i>P. cystidiosus</i> | AG      | 7.0±0.0                 | 6.5±0.0/0.7±0.0            | 38                | 7.0±1.5                 | 3.5±0.5/1.2±0.3            | 59                |
|                       | 55/466  |                         |                            |                   |                         |                            |                   |

Помимо выгонки плодовых тел в банках было проведено культивирование некоторых видов вешенок в пластиковых мешках объемом 4000 см<sup>3</sup>. Условия эксперимента были такими же, как и при культивировании в банках. Эксперименты по культивированию в банках и мешках проводили параллельно. В качестве субстрата была использована стерильная пшеничная солома. Биомасса субстрата в банках составляла около 75 г, а в мешках – около 300 г. В анализ были взяты штаммы четырех наиболее широко культивируемых видов - *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. cornucopiae* и *P. sajor-caju*. Сравнительные данные по урожайности штаммов при культивировании в банках и мешках представлена в Таблице 6. Интересно, что показатели урожайности при увеличении биомассы субстрата снижались у всех штаммов. Наилучшие результаты по урожайности как в банках, так и в мешках показал производственный штамм N001 *P. ostreatus* - 87% и 52% соответственно. Также близкие по урожайности показатели продемонстрировал производственный штамм CS-32 *P. sajor-caju*: 78% по отношению к массе субстрата при культивировании в банках и 50% - при культивировании в мешках (Таблица 6). Продуктивность штамма 88 *P. cornucopiae* была сходной при культивировании в банках и мешках - 49% и 35% соответственно. Природный изолят ZBS2012 *P. pulmonarius* показал относительно хорошую урожайность при культивировании в банках и низкую урожайность при выращивании в мешках (55% и 6% соответственно) (Таблица 6). Поэтому для представителей вида *P. pulmonarius* мы рекомендуем проводить культивирование в стеклянных банках, поскольку эффективность культивирования грибов в мешках, как было показано, значительно ниже. Для всех остальных исследованных видов вешенок культивирование можно проводить двумя предложенными и апробированными способами (как в мешках, так и в банках), однако, по относительной урожайности метод культивирования в банках более продуктивен.

**Таблица 6.** Урожайность некоторых видов рода *Pleurotus* при культивировании в стеклянных банках и пластиковых мешках

| Вид, штамм                    | Урожайность при<br>культивировании в банках,<br>% |            | Урожайность при<br>культивировании в мешках,<br>% |            |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------|------------|
|                               | 1-ая волна                                        | 2-ая волна | 1-ая волна                                        | 2-ая волна |
| <i>P. ostreatus</i> N001      | 72                                                | 15         | 28                                                | 24         |
| <i>P. sajor-caju</i> CS-32    | 74                                                | 4          | 39                                                | 11         |
| <i>P. pulmonarius</i> ZBS2012 | 21                                                | 34         | 2                                                 | 4          |
| <i>P. cornucopiae</i> 88      | 44                                                | 5          | 20                                                | 15         |

Снижение уровня урожайности при повышении общей биомассы субстрата при культивировании грибов в мешках, вероятно, можно объяснить тем, что, несмотря на повышение массы субстрата, относительная площадь поверхности субстрата остается недостаточной для эффективного формирования большого количества примордиев. Также, из-за большого объема субстрата в мешках ухудшается его аэрация и снижается эффективность проникновения влаги внутрь субстрата.

Следует особо отметить, что в данной работе впервые были получены плодовые тела для в общепризнанном понимании «некультивируемых» видов *P. calypttratus* и *P. cystidiosus*, причем плодоношение этих видов происходило при стандартных условиях лабораторного культивирования. Таким образом, предложенный и апробированный в данной работе метод выгонки плодовых тел может быть эффективно использован в лабораторных условиях для многих видов вешенок. В данной же работе зрелые плодовые тела получали с целью дальнейшего анализа базидиоспорового потомства, полученного из споровых отпечатков. Из зрелых плодовых тел получали споровые отпечатки, рассевы которых использовали в последующем для получения монобазидиоспоровых гаплоидных тестерных линий и проведения генетического анализа локусов половой совместимости.

### **3.2 Филогенетический анализ видов рода *Pleurotus***

#### **3.2.1 Оценка «надежности» ITS последовательностей видов рода *Pleurotus* в ГенБанке**

Одной из основных целей работы было проведение генотипирования видов в пределах рода *Pleurotus*. Для реализации данной цели на первом этапе было проведено секвенирование ITS последовательностей для имеющихся в коллекции штаммов вешенок с последующим использованием их для представления филогенетической картины рода *Pleurotus*.

Отсеквенированные ITS последовательности 31 штамма, принадлежащих десяти видам рода *Pleurotus* (Таблица 1), были сперва выравнены с последовательностями в электронной базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В результате выравниваний наряду с ожидаемыми видами с высоким коэффициентом сходства (99-100%) в Генбанке были обнаружены также последовательности штаммов с неопределенным или некорректно определенным видовым статусом. Данные результаты говорят о том, что в связи с популярностью и доступностью метода анализа ITS последовательностей грибов за последние годы в ГенБанке накопилось огромное количество неаннотированных и неправильно определенных последовательностей. Этот факт, несомненно, вносит путаницу в электронные базы данных и в некоторой степени снижает надежность полученных результатов выравнивания. Это также часто препятствует точному определению видовой

принадлежности штаммов грибов на основе данных секвенирования. Поэтому при постановке задачи определения видов грибов на основе определенных ДНК последовательностей (например, ITS) следует проводить филогенетический анализ с использованием тщательно выбранных референсных последовательностей *типовых* штаммов анализируемых видов (так называемых, ex-type culture) из известных коллекций, которые имеются в электронных базах (Ко Ко *et al.*, 2011). Иными словами, без тщательного и критического анализа источников депонирования ДНК-последовательностей грибов в Генбанке, анализа качества и «надежности» депонированных последовательностей невозможно судить о точной видовой принадлежности анализируемых штаммов и филогенетических отношениях в пределах группы анализируемых грибов.

Проводя молекулярные исследования, не стоит также забывать о классических методах анализа видов грибов. Для многих базидиальных грибов одним из критериев видовой принадлежности является половая совместимость с монокариотическими тестерами вида (Vilgalys, Sun, 1994; Шнырева и др. 1998). Так, ранее было показано, что виды рода *Pleurotus* подразделяются на 16 интерстерильных (репродуктивно изолированных) групп, скрещивания между которыми затруднены (Vilgalys, Sun, 1994; Vilgalys *et al.*, 1996; Zervakis *et al.*, 2004; Gonzalez, Labarère, 2000; Petersen *et al.*, 2011).

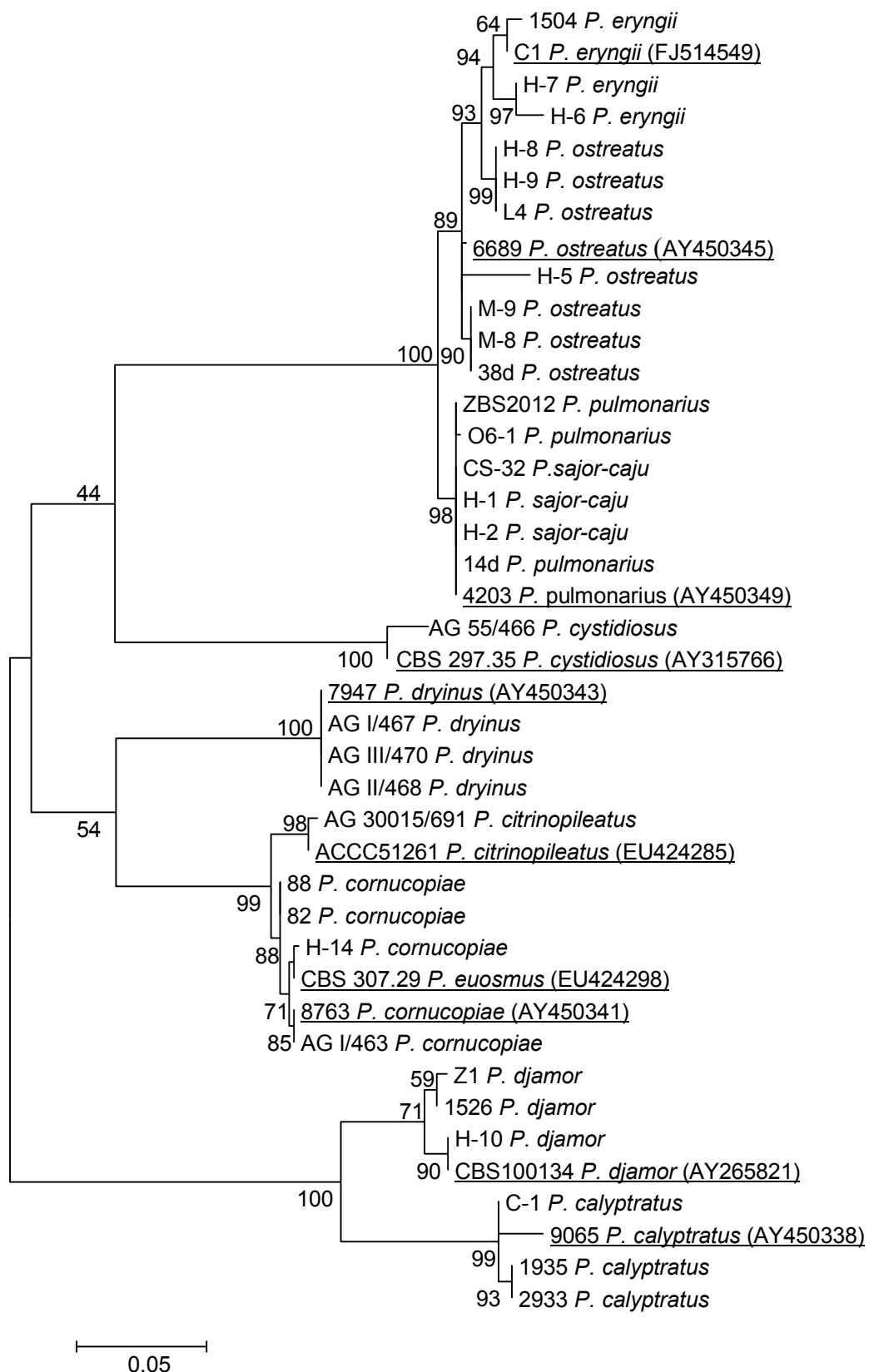
В нашем анализе были задействованы виды, относящиеся к восьми общепризнанным интерстерильным группам (Petersen *et al.*, 2011). Так, были проанализированы штаммы *P. ostreatus*, относящиеся к I интерстерильной группе. Ко II интерстерильной группе относятся виды *P. pulmonarius* и близкородственный ему *P. sajor-caju*, который, согласно мнению некоторых авторов, теперь помещен в род *Lentinus* (Grand *et al.*, 2011). Из IV интерстерильной группы были взяты в анализ виды *P. cornucopiae* и *P. citrinopileatus*, известные в сфере производственного культивирования. Из V интерстерильной группы в анализ был взят *P. djamor*, а из VI группы – штаммы *P. eryngii*. Из VII интерстерильной группы был взят в анализ штамм *P. cystidiosus*, а из IX – *P. dryinus*. Также в анализе присутствовали представители XVI группы – штаммы вида *P. calypttratus*.

### 3.2.2 Филогенетический анализ видов рода *Pleurotus*

Для полноты картины филогенетических взаимоотношений видов в пределах рода *Pleurotus* помимо штаммов из нашей коллекции были взяты референсные ITS последовательности из ГенБанка, представленные в Таблице 2. На основе отсекументированных ITS последовательностей 31 штамма вешенок из нашей коллекции и 10 референсных ITS последовательностей из ГенБанка было построено филогенетическое дерево родства/сходства между видами рода *Pleurotus* (Рисунок 4). Разделение на кластеры

поддержано доверительными критериями на основе 1000 реплик – бутстреп анализом (bootstrap, Bs.). Соответственно, виды, объединенные в пределах одного кластера на филограмме, представляют собой близкородственные виды. Филогенетическое дерево четко структурировано и подразделено на шесть основных кластеров, которые соответствуют видовой принадлежности изученных штаммов вешенок. Так, в первый наиболее обширный кластер попали штаммы *P. eryngii* и *P. ostreatus* с незначительным подразделением на подкластеры, соответствующие данным видам. Эти результаты соответствуют мнению авторов (Vilgalys *et al.*, 1996) о существовании комплекса видов *P. ostreatus*, объединяющего близкородственные виды *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* и *P. eryngii*. Однако, несмотря на незначительную дивергенцию ITS последовательностей между данными видами, эти три вида, как показано, имеют четкие репродуктивные барьеры и не скрещиваются между собой (Шнырева и др. 1998, 2004; Шнырева, Штаер, 2006; Zervakis *et al.*, 1994). В нашем исследовании интересным является факт неоднородности кластера *P. ostreatus*, который подразделяется на два подкластера. В первый подкластер попали более близкие виду *P. eryngii* культивируемые штаммы *P. ostreatus* (штаммы Н-8, Н-9 и L4), в то время как во втором подкластере, более удаленном от вида *P. eryngii*, объединились природные изоляты вешенки устричной (штаммы М-9, М-8, 38d и изолят из экстремального местообитания Н-5) (Рисунок 4). Данный результат может косвенно свидетельствовать в пользу предположения о том, что промышленное культивирование вешенок и связанный с ним селекционный процесс оказывает значительное влияние не только на общее биоразнообразие внедренных в культивирование штаммов, но и на генетическое расхождение и внутривидовую дивергенцию культивируемых штаммов. Еще один близкий виду *P. ostreatus* подкластер штаммов включает представителей видов *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju*, чьи ITS последовательности оказались максимально сходными (с заменой нуклеотида только по одной позиции) (Рисунок 5). Однако, несмотря на почти полное сходство ITS последовательностей, нами было показано, что виды *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju* несовместимы по полу, и, следовательно, репродуктивно изолированы (результаты анализа половой совместимости с использованием гаплоидных штаммов-тестеров представлены далее в Главе 3.3.1). В связи с этим можно говорить о недостаточной разрешающей способности метода анализа ITS последовательностей. В подобных случаях целесообразно использовать другие (или дополнительные) генные последовательности в филогенетическом анализе (James *et al.*, 2006).





**Рисунок 4.** Филогенетическое дерево сходства между штаммами видов *Pleurotus*, построенное на основе ITS последовательностей, с использованием алгоритма максимального правдоподобия Maximum Likelihood (MEGA 5). Референсные ITS последовательности, взятые из ГенБанка, подчеркнуты. Цифры на ветвях указывают значения бутстрепа (в %). Длина ветвей соответствует количеству накопленных нуклеотидных замен в анализируемых ДНК последовательностях.

|                |     |                                                               |     |
|----------------|-----|---------------------------------------------------------------|-----|
| <i>P. s-c</i>  | 12  | GTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTA-GTCTTTCAACCACCTGTGAAC  | 70  |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 1   | GTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGGTCTTTCAACCACCTGTGAAC  | 60  |
| <i>P. s-c</i>  | 71  | TTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGCTGGGATTTAAA  | 130 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 61  | TTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGCTGGGATTTAAA  | 120 |
| <i>P. s-c</i>  | 131 | CGTCTCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACTTAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAAT  | 190 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 121 | CGTCTCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACTTAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAAT  | 180 |
| <i>P. s-c</i>  | 191 | GTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTG | 250 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 181 | GTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTG | 240 |
| <i>P. s-c</i>  | 251 | GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA  | 310 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 241 | GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA  | 300 |
| <i>P. s-c</i>  | 311 | GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCGAGGGGCATGCCTG    | 370 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 301 | GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCGAGGGGCATGCCTG    | 360 |
| <i>P. s-c</i>  | 371 | TTTGAGTGTCAATTAATTCTCAAACCTCACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTGGGGGT  | 430 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 361 | TTTGAGTGTCAATTAATTCTCAAACCTCACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTGGGGGT  | 420 |
| <i>P. s-c</i>  | 431 | TGCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTG  | 490 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 421 | TGCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTG  | 480 |
| <i>P. s-c</i>  | 491 | CGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAA  | 550 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 481 | CGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAA  | 540 |
| <i>P. s-c</i>  | 551 | TCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACT  | 610 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 541 | TCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACT  | 600 |
| <i>P. s-c</i>  | 611 | TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA                                      | 634 |
|                |     |                                                               |     |
| <i>P. pulm</i> | 601 | TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA                                      | 624 |

Идентичность: 99% (622/624 п.н.)

**Рисунок 5.** Выравнивание отсеквенированных ITS-последовательностей *P. sajor-caju*, штамм Н-1 (JQ837470), и *P. pulmonarius*, штамм О6-1 (JQ837472); анализ проведен с использованием инструмента blast в ГенБанке.

В значительной степени близкородственными оказались виды *P. citrinopileatus* и *P. cornucopiae* (Рисунок 4). Несмотря на поддерживаемые отличия в ITS последовательностях (бутстреп, Bs. 99%), данные виды были отнесены Р. Петерсеном с соавторами к одной интерстерильной группе IV (Petersen *et al.*, 2011). В экспериментах по скрещиваниям данные виды показали отсутствие репродуктивного барьера и оказались совместимыми по полу. Еще ранее этими же авторами было предложено лишить *P. citrinopileatus* видового статуса и определить его как *P. cornucopiae* var. *citrinopileatus* (Petersen, Krisai-Greilhuber, 1999). Однако, в виду того, что отличия между этими видами выявляются не только на молекулярном уровне, но и на морфологическом, в дальнейшем требуется провести дополнительные скрещивания между представителями этих видов, чтобы окончательно подтвердить или опровергнуть наличие межвидового репродуктивного барьера между видами *P. citrinopileatus* и *P. cornucopiae*.

Некоторое сомнение вызвал видовой статус коммерческого штамма Н-14 *P. cornucopiae* из нашей коллекции, который на филограмме попал в подкластер *P. cornucopiae*. Однако при сравнении с пулом ITS последовательностей в ГенБанке ITS последовательность штамма Н-14 показала 99% сходства с последовательностью EU424298 *Pleurotus euosmus* (штамм CBS 307.29) (Рисунок 6). Проанализировав наличие последовательностей последнего вида в ГенБанке, оказалось, что вид *P. euosmus* представлен только одним штаммом в голландской коллекции типовых культур CBS. Причем этот вид был описан в Великобритании еще в 1893 году в сборнике «British Fungus-Flora» под именем *Agaricus (Pleurotus) euosmus* (Masse, 1893). Так как точное происхождение культивируемого штамма Н-14 в нашей коллекции не установлено, вполне логично было предположить, что этот штамм на самом деле, возможно, является представителем вида *P. euosmus*. В виду того, что клада *P. cornucopiae* в целом является довольно разнородной (Рисунок 4) нами были проведены скрещивания между тестерами половой совместимости разных штаммов *P. cornucopiae* (как коммерческих, так и дикорастущих) с целью выявления возможных репродуктивных барьеров между ними. Результаты анализа половой совместимости представлены далее в Главе 3.3.2.

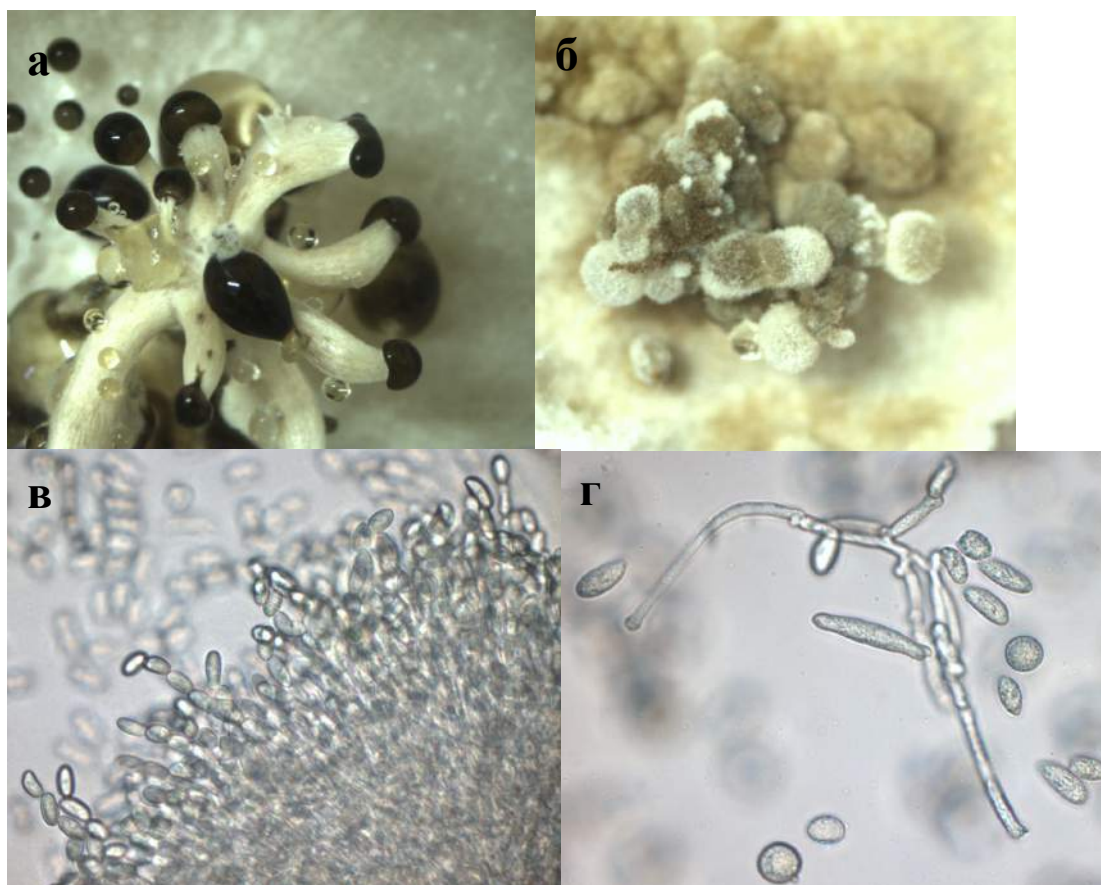
|                |     |                                                                |     |
|----------------|-----|----------------------------------------------------------------|-----|
| <i>P. corn</i> | 1   | AGCTGAA-GCTGGCCTCTAGGGGCATGGTGCACGCTTCATTAGTCCCCTTTCACACCCCT   | 59  |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 47  | AGCTGAATGCTGGCCTCTAGGGGCAT-GTGCACGCTTCATTAGTCCCCTTTCACACCCCT   | 105 |
| <i>P. corn</i> | 60  | GTGCACCTTTGATAGATTTCGCTGGAGAGACGGTCGCCTTCACGGTGGCTTGAACCTTCGGT | 119 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 106 | GTGCACCTTTGATAGATTTCGCTGGAGAGACGGTCGCCTTCACGGTGGCTTGAACCTTCGGT | 165 |
| <i>P. corn</i> | 120 | GGGTCTATACCATTACACACACAAACGTATGTCTATGAATGTCATTTACATGGGCCATGC   | 179 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 166 | GGGTCTATACCATTACACACACAAACGTATGTCTATGAATGTCATTTACATGGGCCATGC   | 225 |
| <i>P. corn</i> | 180 | TGCCTATAAAACCTAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA   | 239 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 226 | TGCCTATAAAACCTAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA   | 285 |
| <i>P. corn</i> | 240 | GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT   | 299 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 286 | GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT   | 345 |
| <i>P. corn</i> | 300 | TGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGCATTAAAT     | 359 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 346 | TGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGCATTAAAT     | 405 |
| <i>P. corn</i> | 360 | TCTCAAACCTACCTTTTGCTTTGCTGTGAATCGTAGTGTGGATCGTTGGGGGTGCTG      | 419 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 406 | TCTCAAACCTACCTTTTGCTTTGCTGTGAATCGTAGTGTGGATCGTTGGGGGTGCTG      | 465 |
| <i>P. corn</i> | 420 | GCTTGTACCGAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCGGGACTTTGTTGTTGCCTCTACC    | 479 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 466 | GCTTGTACCGAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCGGGACTTTGTTGTTGCCTCTACC    | 525 |
| <i>P. corn</i> | 480 | ACATGGTGTGATAATTATCTACGCCAGACCGTATGCAATGATACTTATGGAGTCCAGCT    | 539 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 526 | ACATGGTGTGATAATTATCTACGCCAGACCGTATGCAATGATACTTATGGAGTCCAGCT    | 585 |
| <i>P. corn</i> | 540 | CTCTAATTGTCTTCGGACAGCTTTTGACCATTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGC    | 599 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 586 | CTCTAATTGTCTTCGGACAGCTTTTGACCATTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGC    | 645 |
| <i>P. corn</i> | 600 | TGAACTTAAGCATATCAATAA                                          | 620 |
|                |     |                                                                |     |
| <i>P. euos</i> | 646 | TGAACTTAAGCATATCAATAA                                          | 666 |

Идентичность: 99% (619/621п.н.)

**Рисунок 6.** Выравнивание отсеквенированной ITS-последовательности *P. cornicopiae*, штамм Н-14 (JQ837484), и взятой из ГенБанка последовательности *P. euosmus* CBS 307.29 (EU424298).

Представители следующего четко выраженного кластера на филограмме подразделяются на два подкластера, соответствующих видам *P. djamor* и *P. calyptratus*. Представители этих видов обладают отличающейся от других видов вешенок морфологией плодовых тел (цвет, размеры, форма плодовых тел). Между собой эти виды отличаются также по местообитанию: вид *P. djamor* приурочен к теплему тропическому климату, в то время как *P. calyptratus* встречается в нашем климатическом поясе. Статус съедобности данных видов также различен. Представители вида *P. djamor* культивируются, обладают плодовыми телами мягкой и нежной текстуры, тонким грибным вкусом, в то время как плодовые тела *P. calyptratus* жесткие и не употребляются в пищу. Более того, в виду близкого расположения на филогенетическом дереве и частичной половой совместимости в экспериментах по скрещиваниям было предложено рассматривать вид *P. calyptratus* в качестве вариации в пределах вида *P. djamor* (Alberto *et al.*, 2002). Однако мы не поддерживаем эту точку зрения.

В данной работе были проанализированы также два вида вешенок - *P. cystidiosus* и *P. dryinus*, - которые обладают бесполом размножением и способны образовывать анаморфные структуры. Эти виды сформировали четко обособленные кластеры на филограмме с максимальным доверительным интервалом (Bs.100%). Греческий миколог G.Zervakis (1998) поместил вид *P. cystidiosus* в подрод *Coremiopleurotus* Hilber. Вид *P. cystidiosus* преобладает в теплых климатических зонах и отличается от других видов рода *Pleurotus* наличием специфической анаморфной стадии, которая представлена артроконидиями на конидиеносцах, объединенных в макроструктуры – коремии. Коремии обычно хорошо заметны на мицелии в виде небольших «плодовых тел» с темными влажными «шляпками», содержащими гиалиновые конидии, и светлыми «ножками», образованными конидиеносцами (Рисунок 7 а, в). Анаморфная стадия другого вида – *P. dryinus* – представлена артроспорами. Артроспоры образуются на дикариотическом мицелии и выглядят как коричневый или темно-зеленый сухой пылящий налет, который зачастую можно принять за контаминацию культур плесневыми грибами (Рисунок 7 б, г). Филогенетическое родство между двумя видами с анаморфными стадиями - *P. cystidiosus* и *P. dryinus* -, отраженное на филограмме, незначительно. Поэтому можно предположить, что виды *P. cystidiosus* и *P. dryinus* приобрели способность бесполого размножения конидиями независимо друг от друга в ходе эволюционного процесса как возможный эффективный механизм распространения этих видов в природе.



**Рисунок 7.** Мицелиальные культуры видов *P. cystidiosus* (а, в) и *P. dryinus* (б, г) с анаморфными стадиями на чашках Петри. (а) Коремии *P. cystidiosus* (увеличение, 10х); (б) Анаморфное спороношение *P. dryinus* в виде налета на поверхности мицелия (увеличение, 10х); (в) Коремии *P. cystidiosus* с цепочками артроконидий на конидиеносцах (увеличение, 40х); (г) Фрагмент мицелия *P. dryinus* с отдельными артроспорами (увеличение, 40х).

### 3.2.3 Анализ эволюционных расстояний между видами рода *Pleurotus*

Параллельно с построением филогенетического дерева была проведена оценка относительных эволюционных расстояний между представителями каждого вида (Таблица 7). Низкие значения эволюционных дистанций указывают на высокое родство между видами по ITS последовательностям, как, например, в случае близкородственных видов *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju*, эволюционное расстояние между которыми равно 0.000. Наиболее высокие значения эволюционных дистанций наблюдали между образующим коремии видом *P. cystidiosus* и другими видами, в особенности группами *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju* (дистанции от 0.304 до 0.319). Общий коэффициент генетического разнообразия внутри рода *Pleurotus*, составил 0.196 при величине стандартного отклонения 0.033 (Таблица 7).

**Таблица 7.** Эволюционные дистанции между видами рода *Pleurotus*

|               | <i>P.eryn</i> * | <i>P.ostr</i> | <i>P.pulm</i> | <i>P.s-c</i> | <i>P.cyst</i> | <i>P.dry</i> | <i>P.citr</i> | <i>P.corn</i> | <i>P.dj</i> | <i>P.caly</i> |
|---------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-------------|---------------|
| <i>P.eryn</i> |                 | 0.007         | 0.010         | 0.010        | 0.056         | 0.036        | 0.039         | 0.040         | 0.053       | 0.049         |
| <i>P.ostr</i> | 0.024**         |               | 0.006         | 0.006        | 0.058         | 0.035        | 0.039         | 0.039         | 0.054       | 0.050         |
| <i>P.pulm</i> | 0.038           | 0.021         |               | 0.000        | 0.057         | 0.034        | 0.039         | 0.039         | 0.053       | 0.046         |
| <i>P.s-c</i>  | 0.038           | 0.021         | 0.000         |              | 0.056         | 0.034        | 0.038         | 0.039         | 0.053       | 0.046         |
| <i>P.cyst</i> | 0.306           | 0.319         | 0.306         | 0.304        |               | 0.030        | 0.043         | 0.041         | 0.049       | 0.048         |
| <i>P.dry</i>  | 0.198           | 0.197         | 0.186         | 0.184        | 0.155         |              | 0.027         | 0.026         | 0.037       | 0.039         |
| <i>P.citr</i> | 0.221           | 0.219         | 0.214         | 0.212        | 0.235         | 0.139        |               | 0.007         | 0.039       | 0.037         |
| <i>P.corn</i> | 0.221           | 0.220         | 0.214         | 0.211        | 0.228         | 0.134        | 0.025         |               | 0.037       | 0.037         |
| <i>P.dj</i>   | 0.292           | 0.296         | 0.288         | 0.285        | 0.269         | 0.201        | 0.216         | 0.208         |             | 0.014         |
| <i>P.caly</i> | 0.264           | 0.267         | 0.247         | 0.244        | 0.260         | 0.213        | 0.204         | 0.201         | 0.068       |               |

Примечание. \*сокращенные названия штаммов, использованных в анализе: *P.eryn* – изолят 1504 *P. eryngii*, *P.ostr* – изолят М-9 *P. ostreatus*, *P.pulm* – изолят О6-1 *P. pulmonarius*, *P.s-c* – штамм CS-32 *P. sajor-caju*, *P.cyst* – изолят AG 55/466 *P. cystidiosus*, *P.citr* – изолят AG 30015/691 *P. citrinopileatus*, *P.corn* – штамм Н-14 *P. cornucopiae*, *P.dj* – изолят 1526 *P. djamor*, *P.caly* – изолят С-1 *P. calyptratus*.

\*\*Значения эволюционных дистанций указаны под диагональю; значения стандартных отклонений приведены над диагональю. Эволюционные расстояния рассчитаны согласно модели Maximum Composite Likelihood (программа Mega 5), учитывая замены нуклеотидов по каждой позиции между последовательностями для каждого вида.

### 3.3. Анализ половой совместимости в пределах комплексных видов рода

#### *Pleurotus*. Мон-мон скрещивания

Анализ половой совместимости между штаммами или «спорными» видами базидиальных грибов с хорошо выраженным половым воспроизведением фактически основывается на анализе аллелей локусов половой совместимости путем *мон-мон* (монокарион-монокарион) скрещиваний между монобазидиоспоровыми гаплоидными тестерами. В свою очередь, гаплоидные штаммы-тестеры половой совместимости получают в *мон-мон* скрещиваниях монобазидиоспорового потомства, полученного из споровых отпечатков плодовых тел. Для базидиальных грибов, обладающих тетраполярной системой половой совместимости и гапло-диплоидным жизненным циклом, получать гаплоидные штаммы-тестеры половой совместимости путем базидиоспоровых рассеивов и дальнейших внутриштаммовых скрещиваний не составляет особого труда. Гапло-дикариотический жизненный цикл, характерный для многих гомобазидиальных шляпочных грибов, в том числе и грибов из рода *Pleurotus*, основан на чередовании двух фаз: *дикариотической*

(функционально *диплоидной*) – представленной мицелием с формирующимися на нем плодовыми телами, и *гаплоидной* – представленной гаплоидными базидиоспорами, образующимися на гимении плодовых тел в результате мейоза (Rajaratnam, Bano, 1987). Гаплоидные базидиоспоры прорастают в гаплоидный монокариотический мицелий, который способен сливаться (анастомозировать) с другим таким же монокариотическим мицелием при условии, если гаплоидные ядра отличаются аллелями локусов половой совместимости. В результате слияния гаплоидных мицелиев формируется фертильный дикарион, способный производить плодовые тела. Генетический контроль половой совместимости, как уже было сказано выше, осуществляется двумя несцепленными локусами *A* и *B* с множественными аллелями (Шнырева и др., 1998; Zervakis, Balis, 1996).

### 3.3.1 Анализ половой совместимости между видами *P. cajor-caju* и *P. pulmonarius*

Для трех штаммов *P. sajor-caju* CS-32, Н-1 и Н-2 с помощью монобазидиоспорового посева (из спорового отпечатка от одного родителя) были получены по 12 сестринских монокариотических гаплоидов, которые были скрещены друг с другом во всех возможных комбинациях, в результате чего для каждого штамма были получены четыре группы гаплоидных тестеров, гетероаллельных по локусам половой совместимости (Таблица 8). При внутриштаммовых скрещиваниях сестринских гаплоидов из монобазидиоспорового посева наблюдали три типа взаимодействия контактирующих мицелиев, как это было описано ранее в работе Эгер (Eger, 1978): сращивание мицелиев без видимой границы между ними (совместимость по полу в случае различных аллелей локусов половой совместимости или полная несовместимость в случае общих аллелей); образование небольшого мицелиального валика – барража – в зоне контакта мицелиев (в случае одинаковых аллелей по локусу *B* половой совместимости); flat-реакция – менее плотный мицелий в зоне контакта (в случае одинаковых аллелей по локусу *A*). Таким образом, наблюдая различные фенотипы в зоне контакта скрещиваемых сестринских монокарионов, нам удалось определить аллели локусов половой совместимости тестерных штаммов (Таблица 8).



**Таблица 8.** Получение монокариотических гаплоидных тестеров для штаммов *P. sajor-caju*

| Дикариотический родительский штамм |       | Гаплоидные тестеры | Аллели локусов половой совместимости | Половая совместимость с гаплоидными тестерами с различными аллелями |      |      |      |
|------------------------------------|-------|--------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------|------|------|
|                                    | CS-32 |                    |                                      | m2                                                                  | m8   | m12  | m14  |
|                                    |       |                    |                                      | A1B1                                                                | A1B2 | A2B1 | A2B2 |
|                                    |       | m2                 | A1B1                                 | —                                                                   | —    | —    | +    |
|                                    |       | m8                 | A1B2                                 | —                                                                   | —    | +    | —    |
|                                    |       | m12                | A2B1                                 | —                                                                   | +    | —    | —    |
|                                    |       | m14                | A2B2                                 | +                                                                   | —    | —    | —    |
|                                    | H-1   |                    |                                      | m5                                                                  | m7   | m8   | m10  |
|                                    |       |                    |                                      | A3B3                                                                | A3B4 | A4B3 | A4B4 |
|                                    |       | m5                 | A3B3                                 | —                                                                   | —    | —    | +    |
|                                    |       | m7                 | A3B4                                 | —                                                                   | —    | +    | —    |
|                                    |       | m8                 | A4B3                                 | —                                                                   | +    | —    | —    |
|                                    |       | m10                | A4B4                                 | +                                                                   | —    | —    | —    |
|                                    | H-2   |                    |                                      | m6                                                                  | m7   | m9   | m11  |
|                                    |       | A5B5               | A5B6                                 | A6B5                                                                | A6B6 |      |      |
| m6                                 |       | A5B5               | —                                    | —                                                                   | —    | +    |      |
| m7                                 |       | A5B6               | —                                    | —                                                                   | +    | —    |      |
| m9                                 |       | A6B5               | —                                    | +                                                                   | —    | —    |      |
| m11                                |       | A6B6               | +                                    | —                                                                   | —    | —    |      |

Примечание. «+» - половая совместимость и образование пражек;

«-» - половая несовместимость и отсутствие пражек.

Далее полученные тестеры штаммов *P. sajor-caju* были скрещены с имеющимися в нашей коллекции гаплоидными тестерами вида *P. pulmonarius*. Результаты мон-мон скрещиваний между гаплоидными тестерами *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* представлены в Таблице 9. Во всех 16-ти комбинациях при скрещивании четырех гаплоидных тестеров штамма CS-32 *P. sajor-caju* с четырьмя тестерами *P. pulmonarius* (штамм О6-1) не наблюдали формирования фертильного дикариотического мицелия с пражками, что свидетельствует о том, что между данными видами – *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* – существует репродуктивная изоляция. Аналогичные результаты были получены в скрещиваниях гаплоидных тестеров штаммов Н-1 и Н-2 с тестерами *P. pulmonarius*. Однако, во всех мон-мон скрещиваниях между штаммами CS-32, Н-1 и Н-2, принадлежащими виду *P. sajor-caju*, всегда происходило образование фертильного дикариотического мицелия с пражками. Значит, исследуемые штаммы CS-32, Н-1 и Н-2 принадлежат самостоятельному виду *P. sajor-caju*, который демонстрирует репродуктивную изоляцию (половую несовместимость, или нескрещиваемость) со сходным по морфологии близкородственным видом *P. pulmonarius*.

**Таблица 9.** Мон-мон скрещивания между гаплоидными тестерами видов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius*

| Гомокариотические<br>тестерные штаммы |       |     |      | CS-32 |      |      |      | H-1  |      |      |      | H-2  |      |      |      |
|---------------------------------------|-------|-----|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                       |       |     |      | m2    | m8   | m12  | m14  | m5   | m7   | m8   | m10  | m6   | m7   | m9   | m11  |
|                                       |       |     |      | A1B1  | A1B2 | A2B1 | A2B2 | A3B3 | A3B4 | A4B3 | A4B4 | A5B5 | A5B6 | A6B5 | A6B6 |
| <i>P. sajor-caju</i>                  | CS-32 | m2  | A1B1 | –     | –    | –    | +    |      |      |      |      |      |      |      |      |
|                                       |       | m8  | A1B2 | –     | –    | +    | –    |      |      |      |      |      |      |      |      |
|                                       |       | m12 | A2B1 | –     | +    | –    | –    |      |      |      |      |      |      |      |      |
|                                       |       | m14 | A2B2 | +     | –    | –    | –    |      |      |      |      |      |      |      |      |
|                                       | H-1   | m5  | A3B3 | +     | +    | +    | +    | –    | –    | –    | +    |      |      |      |      |
|                                       |       | m7  | A3B4 | +     | +    | +    | +    | –    | –    | +    | –    |      |      |      |      |
|                                       |       | m8  | A4B3 | +     | +    | +    | +    | –    | +    | –    | –    |      |      |      |      |
|                                       |       | m10 | A4B4 | +     | +    | +    | +    | +    | –    | –    | –    |      |      |      |      |
|                                       | H-2   | m6  | A5B5 | +     | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | –    | –    | –    | +    |
|                                       |       | m7  | A5B6 | +     | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | –    | –    | +    | –    |
|                                       |       | m9  | A6B5 | +     | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | –    | +    | –    | –    |
|                                       |       | m11 | A6B6 | +     | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | –    | –    | –    |
| <i>P. pulmonarius</i>                 | O6-1  | m1  | AxBx | –     | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
|                                       |       | m6  | AyBy | –     | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
|                                       |       | m8  | AyBx | –     | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
|                                       |       | m11 | AyBy | –     | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | –    |

Примечание. «+» - половая совместимость и образование пряжек;

«-» - половая несовместимость.

Следует заметить, что при секвенировании наиболее вариабельных спейсерных участков в кластере рибосомальных генов – ITS1 и ITS2 последовательностей – нам не удалось получить однозначный ответ о видовой принадлежности корейского штамма CS-32 *P. sajor-caju*, а также двух голландских штаммов H-1 и H-2 (Рисунок 4). Прояснить ситуацию о видовом статусе этих штаммов мы смогли только после проведения классических скрещиваний гаплоидных тестеров, которые позволили продемонстрировать наличие репродуктивного барьера (изоляции) с видом *P. pulmonarius*. Поэтому можно сделать заключение об ограничениях применения исключительно молекулярных методов в диагностике и верификации видов. Необходимо применять комплексный подход, сочетающий в себе молекулярные критерии и генетический критерий половой совместимости.

В нашем исследовании оба анализируемых вида вешенки, *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius*, по данным секвенирования ITS последовательностей продемонстрировали максимальное сходство (практически полную идентичность). Было отмечено также сходство между двумя видами по макроморфологическим признакам плодовых тел, что собственно и внесло некую путаницу в трактовку видовой идентичности культивируемых штаммов *P.*

*sajor-caju*. Однако, несмотря на сходство морфологии и спейсерных последовательностей рДНК, *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius*, как было показано в скрещиваниях, являются разными видами. Вероятно, репродуктивная изоляция, сопровождаемая установлением генетических барьеров, препятствующих скрещиваниям, происходит быстрее видимой морфологической дифференциации между близкородственными видами. Подобная ситуация для грибов рода *Pleurotus* уже была отмечена ранее (Vilgalys, Sun, 1994). В более ранней работе нашей лаборатории при сравнении двух сходных по морфологии видов вешенки *P. pulmonarius* и *P. ostreatus* также было показано существование полной репродуктивной изоляции (Шнырева, Штаер, 2006). Поэтому у ряда гомобазидиомицетов морфологическую дифференциацию (если таковая наблюдается) можно рассматривать как второй шаг в дивергенции (расхождении) видов, который следует за генетической изоляцией.

Таким образом, анализ половой совместимости с помощью метода *мон-мон* скрещиваний показал, что виды *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju*, несмотря на сходную морфологию базидиом, являются разными видами.

### 3.3.2 Анализ половой совместимости между представителями вида *P. cornucopiae*

Как было отмечено выше, особый интерес вызвал коммерческий культивируемый штамм Н-14 *P. cornucopiae*, максимально сходный по ITS последовательности (99%) со штаммом *P. euosmus* CBS 307.29 (Рисунок 4, 6). Поэтому было высказано предположение о возможной принадлежности штамма Н-14 виду *P. euosmus*. Для того чтобы внести ясность в данный вопрос, был проведен генетический анализ половой совместимости между штаммом Н-14 и штаммами *P. cornucopiae* коллекции с целью выявления возможных репродуктивных барьеров между ними. Для этого были получены монокариотические гаплоидные тестеры половой совместимости для всех штаммов вида *P. cornucopiae*. Для каждого из пяти штаммов *P. cornucopiae* (штаммы 82, AG IV/675, AG I/463, AG III/465, AG II/464), как и для штамма Н-14, в *мон-мон* скрещиваниях было получено по четыре гаплоидных тестера, гетероаллельных по локусам *A* и *B* половой совместимости. Далее полученные тестеры штаммов *P. cornucopiae* были скрещены с гаплоидными тестерами штамма Н-14 (Таблица 10). Все комбинации в скрещиваниях гаплоидных тестеров разных штаммов *P. cornucopiae* оказались фертильными и сопровождались формированием дикариотического мицелия с пряжками, что показало полную половую совместимость между анализируемыми штаммами, и, следовательно, отсутствие репродуктивных барьеров (нескрещиваемости) между ними.

**Таблица 10.** Результаты *мон-мон* скрещиваний между гаплоидными тестерами штаммов вида *P. cornicopiae*

| Гаплоидные тестеры половой совместимости анализируемых штаммов |                  |     |               | Гаплоидные тестеры штамма Н-14 <i>P. cornicopiae</i> ( <i>P. euosmus</i> ) |             |             |             |
|----------------------------------------------------------------|------------------|-----|---------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                                                |                  |     |               | m5                                                                         | m7          | m11         | m12         |
|                                                                |                  |     |               | <i>A1B1</i> *                                                              | <i>A1B2</i> | <i>A2B1</i> | <i>A2B2</i> |
| <i>P. cornicopiae</i>                                          | Штамм 88         | m2  | <i>A3B3</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m14 | <i>A3B4</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m17 | <i>A4B3</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m19 | <i>A4B4</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                | Штамм AG IV/675  | m1  | <i>A5B5</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m12 | <i>A5B6</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m14 | <i>A6B5</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m15 | <i>A6B6</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                | Штамм AG I/463   | m5  | <i>A7B7</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m7  | <i>A7B8</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m10 | <i>A8B7</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m12 | <i>A8B8</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                | Штамм AG III/465 | m1  | <i>A9B9</i>   | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m6  | <i>A9B10</i>  | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m9  | <i>A10B9</i>  | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m11 | <i>A10B10</i> | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                | Штамм AG II/464  | m3  | <i>A11B11</i> | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m6  | <i>A11B12</i> | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m10 | <i>A12B11</i> | +                                                                          | +           | +           | +           |
|                                                                |                  | m13 | <i>A12B12</i> | +                                                                          | +           | +           | +           |

Примечание. «+» - половая совместимость и образование пряжек;

\**AxBy* – аллели локусов половой совместимости.

Таким образом, все исследованные штаммы *P. cornucopeiae*, в том числе и штамм Н-14 принадлежат одному и тому же виду, или интерстерильной группе. Поэтому, на наш взгляд, не целесообразно выделять *P. euosmus* в отдельный вид, а с появлением современных молекулярно-генетических методов идентификации микроорганизмов следует проверять и пересматривать систематические положение штаммов со спорной видовой принадлежностью даже в известных коллекциях микроорганизмов.

### 3.3.3 Анализ репродуктивной изоляции между коммерческими и природными штаммами *P. ostreatus*

Продemonстрированная ранее неоднородная внутривидовая генетическая структура комплексного вида *P. ostreatus* (Шнырева и др., 1996), четкое подразделение на отдельные подкластеры природных изолятов и производственных штаммов *P. ostreatus* на филогенетическом дереве (Рисунок 4), а также полученные ранее результаты по репродуктивной изоляции между сходными по морфологии и молекулярным признакам близкородственными видами *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* (Шнырева и др., 2012) натолкнули нас на предположение о том, что генетическое расхождение (дивергенция) между видами в результате длительного селекционного процесса может приводить к репродуктивной изоляции и образованию новых близкородственных видов. Для проверки этой гипотезы были проведены *мон-мон* скрещивания между тестерами половой совместимости природных изолятов и производственных штаммов/сортов вида *P. ostreatus*. Монокариотические гаплоидные тестеры, гетероаллельные по локусам половой совместимости, были получены для двух коммерческих штаммов L/4 и Sommer и природного изолята Н-5. Для природных изолятов # 54 и # 55 гаплоидные тестеры были получены ранее в нашей лаборатории. Сперва были проведены скрещивания между тестерами двух коммерческих сортов L/4 и Sommer, которые показали присутствие общего аллеля локуса *B* половой совместимости (75% совместимых по полу комбинаций в скрещиваниях) (Таблица 11). Наличие общего аллеля у одного из двух несцепленных локусов половой совместимости свидетельствует том, что сорта европейской селекции L/4 и Sommer имеют общее происхождение. Далее были проведены скрещивания между гаплоидными тестерами коммерческих производственных штаммов (L/4 и Sommer) и гаплоидными тестерами природных изолятов Н-5, # 54 и # 55 (Таблица 12). Все комбинации в скрещиваниях оказались фертильными и, следовательно, не было подтверждено предположение о наличии частичной репродуктивной изоляции между коммерческими культивируемыми сортами и дикорастущими природными изолятами *P. ostreatus*.

**Таблица 11.** Мон-мон скрещивания между гаплоидными тестерами коммерческих штаммов (сортов) *P. ostreatus*

| Гаплоидные<br>тестеры половой<br>совместимости<br>штаммов (сортов) |     |             | L/4         |             |             |             | Sommer      |             |             |             |
|--------------------------------------------------------------------|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                                                                    |     |             | m1          | m12         | m14         | m11         | m1          | m4          | m5          | m2          |
|                                                                    |     |             | <i>A1B1</i> | <i>A1B2</i> | <i>A2B1</i> | <i>A2B2</i> | <i>A3B3</i> | <i>A3B1</i> | <i>A4B3</i> | <i>A4B1</i> |
| L/4                                                                | m1  | <i>A1B1</i> | –           | –           | –           | +           | +           | –           | +           | –           |
|                                                                    | m12 | <i>A1B2</i> | –           | –           | +           | –           | +           | +           | +           | +           |
|                                                                    | m14 | <i>A2B1</i> | –           | +           | –           | –           | +           | –           | +           | –           |
|                                                                    | m11 | <i>A2B2</i> | +           | –           | –           | –           | +           | +           | +           | +           |
| Sommer                                                             | m1  | <i>A3B3</i> | +           | +           | +           | +           | –           | –           | –           | +           |
|                                                                    | m4  | <i>A3B1</i> | –           | +           | –           | +           | –           | –           | +           | –           |
|                                                                    | m5  | <i>A4B3</i> | +           | +           | +           | +           | –           | +           | –           | –           |
|                                                                    | m2  | <i>A4B1</i> | –           | +           | –           | +           | +           | –           | –           | –           |

Примечания. «+» - половая совместимость; «-» - половая несовместимость;

25 % совместимых комбинаций в скрещиваниях тестеров (4 тестера х 4 тестера = 16 комбинаций) свидетельствуют об общих аллелях по обоим локусам половой совместимости; 75% (12 из 16 возможных) совместимых по полу комбинаций свидетельствуют о наличии общего аллеля *matB* локуса.

**Таблица 12.** Мон-мон скрещивания между гаплоидными тестерами коммерческих культивируемых штаммов и дикорастущих изолятов вида *P. ostreatus*

| Гаплоидные<br>тестеры половой<br>совместимости<br>штаммов |        |     | Дикорастущие изоляты |    |    |     |            |    |    |     |           |    |    |    |
|-----------------------------------------------------------|--------|-----|----------------------|----|----|-----|------------|----|----|-----|-----------|----|----|----|
|                                                           |        |     | Штамм # 54           |    |    |     | Штамм # 55 |    |    |     | Штамм Н-5 |    |    |    |
|                                                           |        |     | m4                   | m5 | m6 | m10 | m1         | m5 | m6 | m11 | m2        | m4 | m5 | m8 |
| Коммерческие штаммы (сорта)                               | Н-9 m  |     | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |
|                                                           | Sommer | m1  | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |
|                                                           |        | m2  | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |
|                                                           |        | m4  | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |
|                                                           |        | m5  | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |
|                                                           | L/4    | m1  | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |
|                                                           |        | m11 | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |
|                                                           |        | m12 | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |
|                                                           |        | m14 | +                    | +  | +  | +   | +          | +  | +  | +   | +         | +  | +  |    |

Примечание. «+» - половая совместимость; «-» - половая несовместимость.

### 3.3.4 Уточнение видового статуса и разрешение «спорных» видов рода *Pleurotus*

В нашем исследовании были проанализированы дикорастущие и культивируемые штаммы вешенок, относящиеся к восьми интерстерильным группам, или видовым комплексам (Petersen *et al.*, 2011). Основными критериями при анализе комплексных видов и для разрешения спорных вопросов о видовом статусе некоторых коллекционных штаммов служили молекулярный анализ сходства ITS-последовательностей и генетический анализ половой совместимости между «спорными» видами.

Было подтверждено близкое родство между видами *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju*; причем последний вид, согласно мнению некоторых авторов, недавно был помещен в род *Lentinus* (Grand *et al.*, 2011). Вид *P. sajor-caju* впервые был описан в 1821 году Fries в «Systema Mycologicum» под именем *Agaricus sajor-caju* Fr. В 1949 году этот вид был переименован в *P. sajor-caju* (Fr.) Singer (Singer, 1949). Однако, в настоящее время некоторые исследователи относят этот вид к совершенно другому роду *Lentinus sajor-caju* (Fr.) Fr. (NCBI). Тем не менее, американские микологи Grand, Hughes и Petersen (2011) показали, что штаммы в их коллекции, которые обозначены как *P. sajor-caju*, не имеют репродуктивных барьеров со штаммами *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. В то же время корейские микологи Li и Yao (2005) показали, что штаммы *P. sajor-caju* из их коллекции проявляют репродуктивную видовую изоляцию при скрещивании с тестерами вида *P. pulmonarius*. Согласно нашим исследованиям, основанным на схожести морфологии и филогенетическом родстве, вид *P. sajor-caju* все-таки следует относить к роду *Pleurotus* (а не *Lentinus*) в качестве полноценного вида. Во всяком случае, данный вывод правомерен для трех коммерческих штаммов этого вида, которые были использованы в нашей работе.

В проведенном филогенетическом анализе было также подтверждено близкое родство культивируемых видов *P. cornucopiae* и *P. citrinopileatus*; причем, несмотря на то, что штаммы вешенки воронковидной, *P. cornucopiae* были взяты из разных источников (коллекций), все они продемонстрировали высокую степень сходства как по молекулярным признакам, так и в генетическом анализе половой совместимости, включая возможного представителя *P. euosmus*. Вид *P. euosmus* был описан в Великобритании в 1893 году в сборнике «British Fungus-Flora» под именем *Agaricus (Pleurotus) euosmus* Berk. (Masse, 1893), и на данный момент носит название *Pleurotus euosmus* (Berk.) Sacc. В ГенБанке присутствует три ITS последовательности данного вида, сделанные в трех разных лабораториях (Франция, Китай, Южная Корея); причем все три последовательности отсекушены для одного и того же коллекционного штамма CBS 307.29. Так как нам неизвестно точное происхождение производственного штамма Н-14 *P. cornucopiae*, а его ITS последовательность максимально сходна с таковой штамма CBS 307.29 *Pleurotus euosmus*,

вполне правомерно можно сделать предположение об их родстве. Тем не менее, для штамма Н-14 не было показано репродуктивной изоляции с остальными представителями вида *P. cornucopiae* (Таблица 10). Следовательно, нет никакого основания выделять штамм Н-14, принадлежащий виду *P. cornucopiae* в отдельный вид.

В данном анализе присутствовали как съедобные виды, включая *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae*, *P. citrinopileatus*, так и несъедобные виды *P. cystidiosus*, *P. dryinus* и встречающийся осенью вид с частичным покрывалом на гимении *P. calyptratus* (Рисунок 3).

Согласно проведенному филогенетическому анализу, виды рода *Pleurotus* обладают монофилетическим происхождением и в эволюционном плане располагаются довольно близко друг от друга, за исключением вида *P. cystidiosus*, который помещен в подрод *Coremiopleurotus* (Zervakis *et al.*, 2004). Можно предположить, что немаловажную роль в расхождении видов вешенки на данный момент играет селекционный процесс производственных штаммов, что в итоге может привести к формированию новых репродуктивно изолированных биологических видов в пределах рода *Pleurotus*. Проведенный филогенетический анализ в целом подтверждает результаты ранее опубликованных работ о видовом разнообразии грибов рода *Pleurotus* с использованием других методов и подходов в филогенетике (Vilgalys, Sun, 1994; Zervakis *et al.*, 1994; Iraçabal, 1995; Gonzalez, Labarere, 2000).

Следует особо отметить, что анализ родства на молекулярном уровне не всегда позволяет получить однозначный ответ о видовом статусе изучаемых грибов. Это связано с тем, что, помимо огромного разнообразия морфологических форм и чрезвычайной пластичности, грибы демонстрируют разнообразие форм размножения, разнообразие жизненных циклов и ядерных статусов: грибы могут существовать в гаплоидной, диплоидной, дикариотической фазах (Шнырева, 2011; Дьяков, 1999). В виду всего этого разнообразия и возникли концепции морфологического, биологического и молекулярного видов. Концепция морфологического вида основывается на традиционных фенетических подходах, а именно, на сравнении видимых морфологических, реже физиолого-биохимических признаков. В основе концепции биологического вида лежит критерий репродуктивной изоляции. Согласно этой концепции, вид – это группа свободно скрещивающихся организмов, дающих жизнеспособное потомство, и репродуктивно изолированных от других таких же групп (Майр, 1971; Алтухов, 1997). Молекулярные виды дифференцируют на основе молекулярных признаков, и на филограммах молекулярные виды группируются в отдельные кластеры. В царстве грибов в виду вышеупомянутых особенностей совпадение этих трех концепций не всегда достижимо. Данное исследование

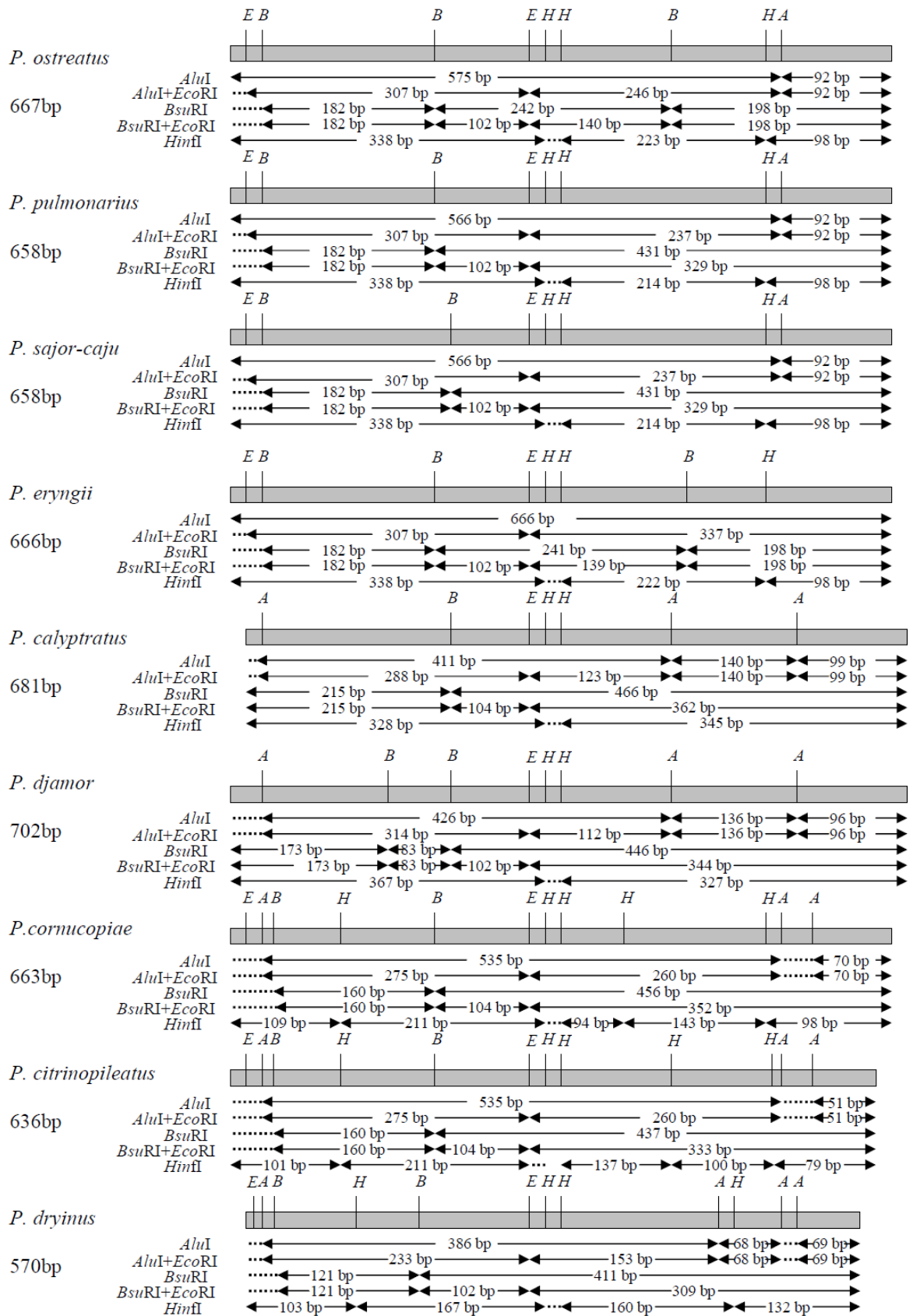


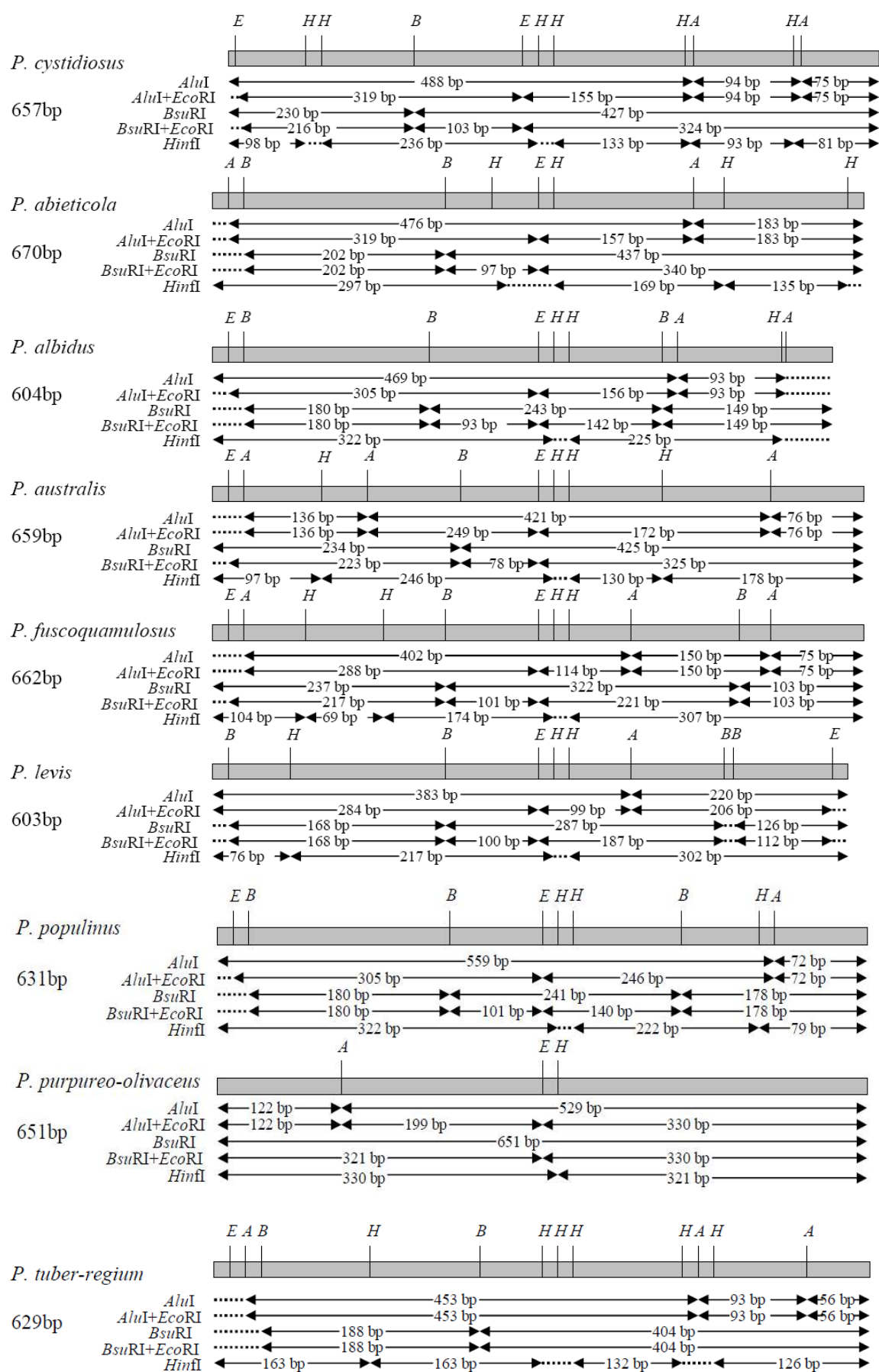
подтвердило мнение о том, что концепция биологического вида является наиболее приемлемой для базидиальных грибов, основным способом размножения которых является половое воспроизведение (Anderson, Kohn, 1998; Шнырева, 2007).

### 3.4 Баркодинг видов рода *Pleurotus*

Баркодинг является одним из современных молекулярных подходов, предложенных для генотипирования и идентификации видов живых организмов, в том числе и грибов (Bellemain *et al.*, 2010). В царстве грибов большинство анализов сделано на основе вариабельной спейсерной ITS последовательности кластера генов рПНК.

В данном исследовании для генотипирования штаммов вешенок спрева был проведен поиск молекулярных маркеров *in silico* на основе ITS1-5.8S-ITS2 отсеквенированных последовательностей видов из коллекции, а также последовательностей видов из других интерстерильных групп, отсутствующих в нашей коллекции. Для построения рестрикционных карт на основе ITS последовательностей 35 наиболее известных эндонуклеаз рестрикции были проанализированы в программе WatCut. Из 35-ти ферментов только четыре (*AluI*, *BsuI*, *HinfI*, и *EcoRI*) подходили для наших целей: ITS последовательности, обработанные ферментами рестрикции (эндонуклеазами), образовывали специфические и индивидуальные для каждого вида паттерны фрагментов рестрикции. Таким образом, полученные паттерны позволяли достоверно определить видовую принадлежность штамма по профилю фрагментов рестрикции (Рисунок 8). Также, при подборе эндонуклеаз рестрикции учитывали их относительную стоимость и доступность для исследователя.

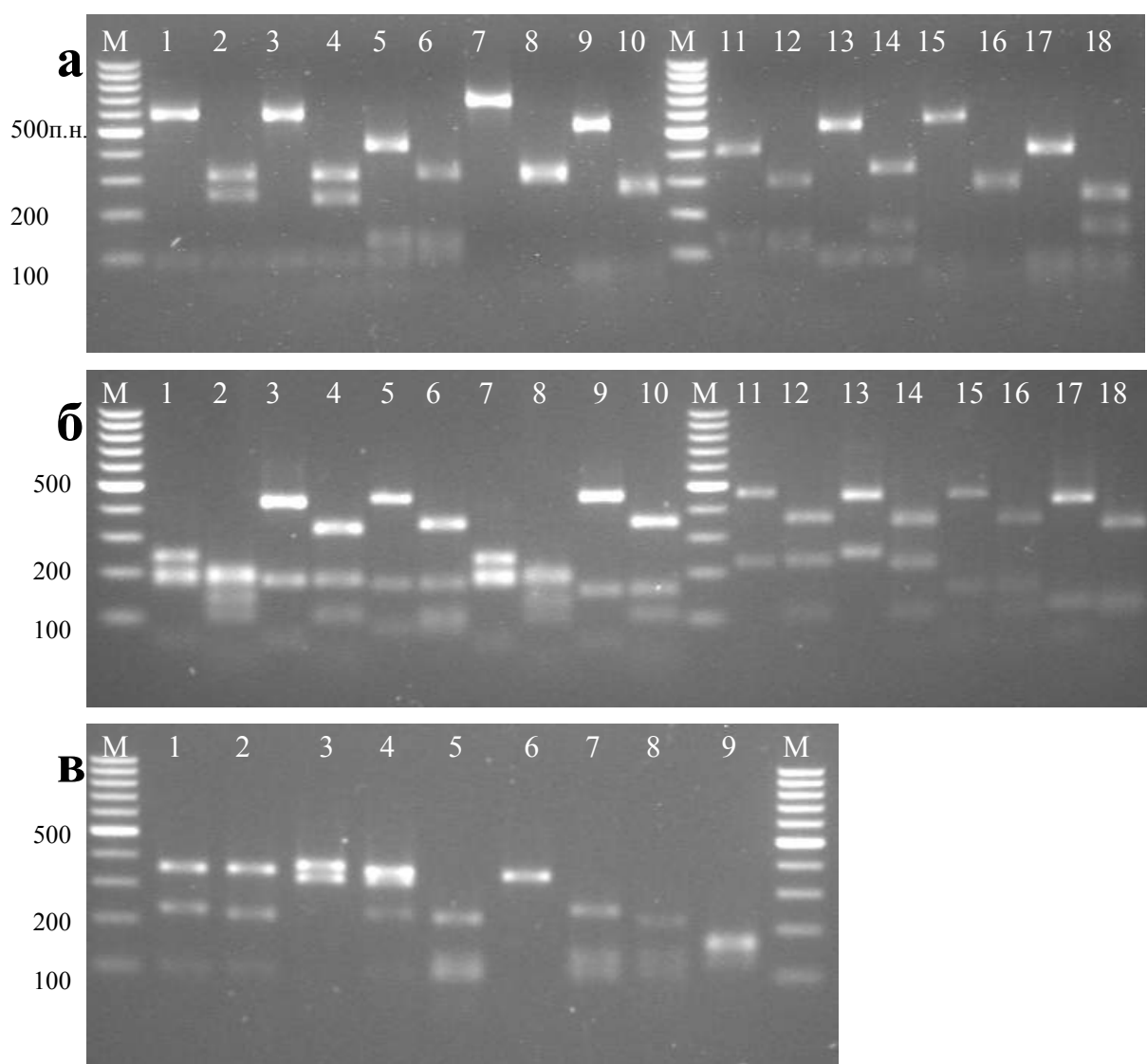




**Рисунок 8.** Рестрикционные карты видов рода *Pleurotus*, построенные на основе ITS последовательностей.

Любой уникальный сайт рестрикции в исследованной ITS последовательности, который характерен для каждого отдельного вида, может быть использован в качестве баркода или индивидуального маркера для видовой идентификации (Froslev *et al*, 2007). В нашем исследовании сначала биоинформатическими методами были построены рестрикционные карты для каждого вида *Pleurotus*. Впоследствии, предсказанные сайты были проверены в лабораторных экспериментах. В виду того, что ITS последовательность рибосомального кластера генов включает консервативный кодирующий участок 5.8S рРНК, который фланкирован двумя вариабельными спейсерными (межгенными) последовательностями – ITS1 и ITS2 (Gerbi, 1986), основные отличия в полученных рестрикционных картах видов относились к вариабельным концевым последовательностям ITS участка рибосомального кластера.

Эксперимент по рестрикционному анализу был спланирован следующим образом. На первом этапе использовали эндонуклеазу *AluI* в комбинации с *EcoRI* для идентификации видов *P. eryngii*, *P. cystidiosus*, *P. dryinus* и трех видовых комплексов *P. sajor-caju* – *P. pulmonarius*, *P. djamor* - *P. calyptratus* и *P. cornucopiae* - *P. citrinopileatus*. Фермент *EcoRI* использовали в качестве вспомогательного для получения более мелких фрагментов. Эндонуклеаза *AluI* в сочетании с эндонуклеазой *EcoRI* (совместная рестрикция *AluI/EcoRI*) позволила получить уникальные рестрикционные паттерны (фрагменты ДНК уникальной длины) для перечисленных видов (Рисунок 8, 9а). В ITS последовательности вида *P. eryngii* отсутствовал сайт рестрикции *AluI*, поэтому после переваривания этой эндонуклеазой на гель-электрофореze наблюдали только один фрагмент, равный длине ПЦР продукта – 660 п.н.. После двойной рестрикции *AluI/EcoRI* последовательность *P. eryngii* образовывала два видимых фрагмента по 307 и 337 п.н. и короткий, не визуализируемый на электрофореграмме фрагмент в 22 п.н., что соответствовало сайтам *EcoRI* в ITS последовательности. ITS последовательность *P. cystidiosus* имела два сайта *AluI* и образовывала три фрагмента по 488, 94 и 75 п.н., а при двойной рестрикции – фрагменты длиной 319, 155, 94 и 75 п.н., а также короткий и не видимый на агарозном геле фрагмент в 14 п.н.. ITS последовательность вида *P. dryinus* при действии фермента *AluI* образовывала фрагменты 386, 68 и 69 п.н. и не видимые на агарозном геле фрагменты в 28 и 19 п.н. При двойной рестрикции *AluI/EcoRI* получали фрагменты длиной 233, 153, 68 и 69 п.н. и не визуализируемые на геле фрагменты 19 и 14 п.н..



**Рисунок 9.** Электрофореграмма разделения фрагментов ITS последовательности после обработки эндонуклеазами рестрикции для исследуемых видов рода *Pleurotus*.

(а) Эндонуклеаза *AluI*. Дорожки: М – маркер длин фрагментов GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), 1 – *P. ostreatus* M-9, 2 – *P. ostreatus* M-9 (*AluI*+*EcoRI*), 3 – *P. sajor-caju* CS-32, 4 – *P. sajor-caju* CS-32 (*AluI*+*EcoRI*), 5 – *P. djamor* 1526, 6 – *P. djamor* 1526 (*AluI*+*EcoRI*), 7 – *P. eryngii* H-6, 8 – *P. eryngii* H-6 (*AluI*+*EcoRI*), 9 – *P. cornucopiae* 88, 10 – *P. cornucopiae* 88 (*AluI*+*EcoRI*), 11 – *P. calyptratus* 1935, 12 – *P. calyptratus* 1935 (*AluI*+*EcoRI*), 13 – *P. cystidiosus* AG 55/466, 14 – *P. cystidiosus* AG 55/466 (*AluI*+*EcoRI*), 15 – *P. citrinopileatus* AG 30015/691, 16 – *P. citrinopileatus* AG 30015/691 (*AluI*+*EcoRI*), 17 – *P. dryinus* AG III/470, 18 – *P. dryinus* AG III/470 (*AluI*+*EcoRI*).

(б) Эндонуклеаза *BsuRI*. Дорожки: М – 100 bp DNA Ladder, 1 – *P. ostreatus* M-9, 2 – *P. ostreatus* M-9 (*BsuRI*+*EcoRI*), 3 – *P. sajor-caju* CS-32, 4 – *P. sajor-caju* CS-32 (*BsuRI*+*EcoRI*), 5 – *P. djamor* 1526, 6 – *P. djamor* 1526 (*BsuRI*+*EcoRI*), 7 – *P. eryngii* H-6, 8 – *P. eryngii* H-6 (*BsuRI*+*EcoRI*), 9 – *P. cornucopiae* 88, 10 – *P. cornucopiae* 88 (*BsuRI*+*EcoRI*), 11 – *P. calyptratus* 1935, 12 – *P. calyptratus* 1935 (*BsuRI*+*EcoRI*), 13 – *P. cystidiosus* AG 55/466, 14 – *P. cystidiosus* AG 55/466 (*BsuRI*+*EcoRI*), 15 – *P. citrinopileatus* AG 30015/691, 16 – *P. citrinopileatus* AG 30015/691 (*BsuRI*+*EcoRI*), 17 – *P. dryinus* AG III/470, 18 – *P. dryinus* AG III/470 (*BsuRI*+*EcoRI*).

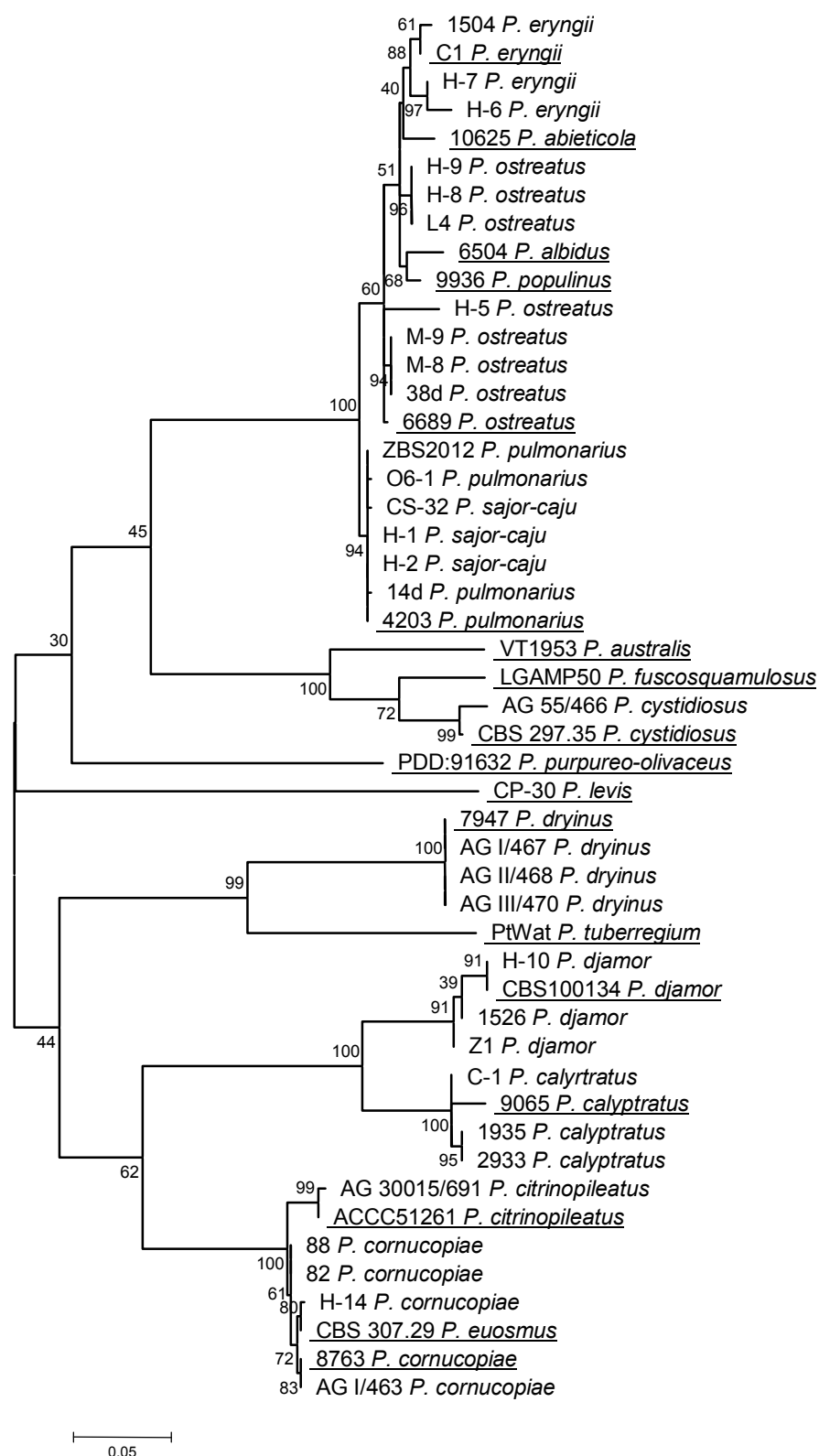
(в) Эндонуклеаза *HinfI*. Дорожки: М – 100 bp DNA Ladder, 1 – *P. ostreatus* M-9, 2 – *P. sajor-caju* CS-32, 3 – *P. djamor* 1526, 4 – *P. eryngii* H-6, 5 – *P. cornucopiae* 88, 6 – *P. calyptratus* 1935, 7 – *P. cystidiosus* AG 55/466, 8 – *P. citrinopileatus* AG 30015/691, 9 – *P. dryinus* AG III/470.

Для комплекса близкородственных видов *P. ostreatus* - *P. sajor-caju* – *P. pulmonarius* паттерны ДНК-фрагментов после обработки эндонуклеазами *AluI* в сочетании с *EcoRI* были одинаковыми. Так, при воздействии *AluI* эти виды образовывали два фрагмента - 566(575) и 92 п.н. При двойной рестрикции *AluI/EcoRI* получали фрагменты длиной 307, 237(246), 92 и 22 п.н. Стоит отметить, что ДНК фрагменты, разница в длине которых менее 20 п.н., трудно различимы на агарозном геле. Фермент *AluI* также оказался неэффективным для разграничения комплекса близкородственных видов *P. djamor* - *P. calyptratus*, так как образовывал сходные по длине фрагменты 426(411), 136(140), 96(99) и 44(31) п.н., соответственно. При двойной рестрикции различия в длинах фрагментов оказались также недостаточными: фрагменты длиной 314(288), 136(140), 112(123), 96(99) и 44(31) п.н. Близкородственные виды *P. cornucopiae* и *P. citrinopileatus* также не были дифференцированы ни при рестрикции ферментом *AluI* (сходные длины ДНК фрагментов 535, 70(51), 36(28) и 22 п.н.), ни при двойной рестрикции *AluI/EcoRI* (длины фрагментов 275, 260, 70(51), 22 и 14 п.н.).

Для лучшей разрешающей способности метода на втором этапе было предложено использовать эндонуклеазу рестрикции *BsuRI* в сочетании с *EcoRI* для дифференциации видов в пределах комплексов близкородственных видов (так называемых, комплексных видов). Этот фермент позволил разграничить виды *P. ostreatus* и комплекс *P. sajor-caju* - *P. pulmonarius*, а также виды *P. djamor* и *P. calyptratus* (Рисунок 8, 9б). Стоит отметить, что ITS последовательности видов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* схожи на 99% и отличаются только одной нуклеотидной заменой, поэтому для их дифференциации следует использовать либо другие вариабельные участки генома, которые предложено использовать в филогенетическом анализе грибов, например LSU, SSU или RBP1 (James *et al.*, 2006; Schoch *et al.*, 2012), либо проводить анализ половой совместимости, как это было показано в предыдущей главе. Для остальных обозначенных близкородственных видов рестрикционный анализ с использованием фермента *BsuRI* позволил произвести точную видовую идентификацию. Так, представители вида *P. ostreatus* при воздействии эндонуклеазы *BsuRI* образовывали фрагменты длиной 242, 198, 182 и 45 п.н., а при двойной рестрикции *BsuRI/EcoRI* образовывали фрагменты 198, 182, 140, 102, 23 и 22 п.н. ITS последовательность комплекса *P. sajor-caju* - *P. pulmonarius* при обработке рестриктазой *BsuRI* давала фрагменты в 431, 182 и 45 п.н., а при двойной рестрикции *BsuRI/EcoRI* – фрагменты в 329, 182, 102, 23 и 22 п.н. Вид *P. djamor* образовывал при таких же условиях фрагменты 446, 173, 83 п.н. и 344, 173, 102, 83 п.н., соответственно. Представители *P. calyptratus* образовывали соответственно фрагменты 466, 215 п.н. (*BsuRI*) и 362, 215, 104 п.н. (*BsuRI/EcoRI*).

Чтобы разграничить близкородственные виды *P. cornucopiae* и *P. citrinopileatus* использовали эндонуклеазу *Hinf*I. Эта эндонуклеаза позволила разделить виды по профилям рестрикции: фрагменты 211, 143, 109, 98, 94 и 8 п.н. для *P. cornucopiae*; и фрагменты 211, 137, 101, 100, 79 и 8 п.н. для *P. citrinopileatus* (Рисунок 8, 9в). Рестрикционные карты на основе ITS последовательностей десяти видов рода *Pleurotus* представлены для консенсусных последовательностей, полученных в результате сопоставления отсеквенированных последовательностей штаммов из нашей коллекции и референсных последовательностей типовых штаммов, взятых из ГенБанка (Таблица 1, 2; Рисунок 8). Дополнительно для восьми более редких видов рода *Pleurotus*, представители которых не присутствуют в нашей коллекции, были построены рестрикционные карты на основе референсных последовательностей, взятых из ГенБанка. Это виды *P. abieticola*, *P. albidus*, *P. australis*, *P. fuscoquamulosus*, *P. levis*, *P. populinus*, *P. purpureo-olivaceus* и *P. tuber-regium* (Рисунок 8). При этом мы рекомендуем с особой тщательностью подходить к выбору референсных последовательностей из ГенБанка и для некоторых депонированных последовательностей уточнять видовой статус объекта.

Таким образом, для большинства видов рода *Pleurotus* были подобраны специфичные эндонуклеазы рестрикции, позволяющие проводить быструю видовую идентификацию. Паттерны рестрикции можно считать молекулярными маркерами, или баркодами. Более того,, как показано, протяженность ITS1-5.8S-ITS2 последовательностей для разных видов вешенки отличается и поэтому ее длина может быть предложена для использования в качестве баркода для дифференциации некоторых видов *Pleurotus* (Рисунок 8). Комбинируя несколько эндонуклеаз рестрикции (*Alu*I, *Bsu*RI, *Hinf*I), можно разделить и идентифицировать практически все известные виды рода *Pleurotus*. Однако оказалось невозможным найти один уникальный фермент, позволяющий дифференцировать все виды рода *Pleurotus*. Таким образом, основываясь на полученных рестрикционных картах, было выявлено семнадцать генотипов, соответствующих восемнадцати видам. Генотипы близкородственных видов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* оказались идентичными при генотипировании с использованием паттернов рестрикции ITS в качестве молекулярных баркодов. Экспериментальные данные по генотипированию были подтверждены филогенетическим анализом на основе отсеквенированных ITS последовательностей 31 штамма вешенок из нашей коллекции и 18 референсных ITS последовательностей из ГенБанка, включая представителей из других интестерильных групп (Petersen *et al.*, 2011); было построено филогенетическое дерево родства между видами (Рисунок 10). Полученные данные по подразделению видов на клады, а также эволюционные дистанции между ними



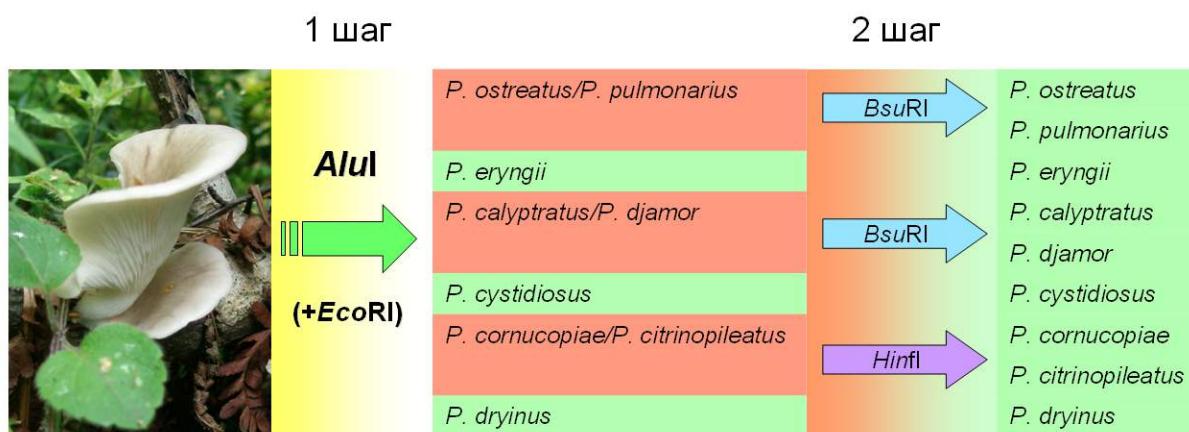
**Рисунок 10.** Филогенетическое дерево сходства между штаммами видов *Pleurotus*, относящихся к разным интерстерильным группам, построенное на основе ITS последовательностей, с использованием алгоритма максимального правдоподобия Maximum Likelihood (MEGA 5). Референсные ITS последовательности, взятые из ГенБанка, подчеркнуты. Цифры на ветвях указывают значения бутстрепа (в %). Длина ветвей соответствует количеству накопленных нуклеотидных замен в анализируемых ДНК последовательностях.



показали полное соответствие результатам, полученным при создании системы ITS-баркодинга для видов рода *Pleurotus*.

Таким образом, на практике была показана эффективность видовой идентификации представителей рода *Pleurotus* методом рестрикционного анализа ITS последовательностей. Кроме того, метод обладает относительной дешевизной, так как позволяет обойтись без трудоемкой процедуры секвенирования. При использовании метода быстрой экстракции ДНК (Izumitsu *et al.*, 2012) с последующей амплификацией и рестрикционным анализом ПЦР-продуктов можно практически вдвое (до двух дней) сократить время, затраченное на молекулярную идентификацию выделенных природных изолятов грибов. Кроме того, подобный метод позволяет проводить эффективный скрининг одновременно большого числа образцов. Данный подход на основе молекулярных баркодов может быть применим для любой группы базидиальных грибов при условии подбора и составления индивидуальных рестрикционных карт (Nauman *et al.*, 2007).

Для эффективного определения видовой принадлежности представителей рода *Pleurotus* мы предлагаем использовать следующую схему эксперимента (Рисунок 11). На первом этапе при помощи фермента *AluI* в комбинации с *EcoRI* предлагаем достоверно идентифицировать виды *P. eryngii*, *P. cystidiosus* и *P. dryinus*, а также определить комплексы близкородственных видов *P. ostreatus*-*P. pulmonarius*-*P. sajor-caju*, *P. calyptratus*-*P. djamor* и *P. cornucopiae*-*P. citrinopileatus*. На следующем этапе с использованием эндонуклеазы рестрикции *BsuRI* в комбинации с *EcoRI* предлагаем дифференцировать виды внутри комплексов *P. ostreatus*-*P. pulmonarius*-*P. sajor-caju* и *P. calyptratus*-*P. djamor*. И на конечном этапе для разграничения видов внутри комплекса *P. cornucopiae*-*P. citrinopileatus* предлагаем применять фермент *HinfI*. Данный метод применим не только для быстрого определения изолятов, собранных в природных местообитаниях, но также эффективен для быстрого скрининга коллекций микроорганизмов с целью выявления случаев ошибочной идентификации или загрязнения/заражения депонированных в коллекции чистых культур. Так, эффективность метода была показана нами на практике. Были обнаружены случаи ошибочного типирования некоторых культур *P. djamor* и *P. eryngii* в коллекции, которые были обозначены как виды *P. ostreatus* и *P. sajor-caju* (*P. pulmonarius*). Подобные ошибки иногда встречаются в коллекциях микроорганизмов и, как правило, происходят при массовых пересевах большого количества культур (так называемые «ошибки экспериментатора»).



**Рисунок 11.** Схема эксперимента по проведению видовой идентификации видов рода *Pleurotus* при помощи разработанной методики баркодинга.

Разрешающая способность метода баркодинга в значительной степени зависит от выбранной последовательности - «филогенетического» маркера, который позволит надежно определить родовую и видовую принадлежность объектов исследования. Однако, для внутривидовой идентификации, включая паспортизацию сортов, баркодинг на основе ITS не подходит, так как последовательность недостаточно вариабельна. В случае внутривидовой идентификации обычно применяют так называемые SNP маркеры (Single Nucleotide Polymorphisms) - точковые замены в последовательностях, обуславливающие полиморфизм.

Таким образом, мы разработали систему баркодов на основе ITS1-5.8S-ITS2 последовательности и набора сайтов рестрикции для разделения и идентификации большинства видов рода *Pleurotus*, включая широко культивируемые виды. Система баркодинга составлена для 17 генотипов, соответствующих 18 видам *Pleurotus*, включая виды, представленные в нашей коллекции, и редкие виды, последовательности которых были взяты из ГенБанка. Результаты филогенетического анализа видов рода *Pleurotus* полностью соответствуют результатам, основанным на рестрикционных картах ITS последовательностей (Рисунки 4, 8, 10).

### 3.5 Анализ генов половой совместимости у представителей рода *Pleurotus*

#### 3.5.1 Структура *matA* локуса половой совместимости

Одной из основных задач исследования было проведение молекулярно-структурного анализа *in silico* локуса *matA* на примере вида *P. ostreatus*. В процессе дикариотизации и образования плодовых тел у базидиальных грибов участвуют два локуса половой совместимости: локус *matA*, который кодирует два типа белков - гомеодоменных транскрипционных факторов HD1 и HD2 -, и локус *matB*, который кодирует гены феромонов и рецепторов феромонов (Kües *et al.*, 2011). В отличие от довольно консервативных генов

*matB* локуса, нуклеотидные последовательности гомеодоменных *hd* генов *matA* локуса очень вариабельны, что обусловлено их функцией. Из-за высокой степени вариабельности работа по клонированию и секвенированию данных генов затруднительна. Секвенирование *hd* последовательностей возможно только при условии секвенирования *matA* локуса целиком. Такое секвенирование возможно за счет наличия более консервативных последовательностей, фланкирующих локус, к которым можно подобрать праймеры. Однако сама структура и длина *matA* локуса может варьировать, так как для этого локуса характерны дубликации и делеции генов или участков генов в пределах локуса. В результате длина локуса может достигать 20-25 тыс.п.н., и, следовательно, секвенирование такой длинной последовательности требует особого подхода с применением дорогостоящих реактивов, таких как LongRange PCR набора и высокоточной Hi-Fi ДНК-полимеразы (High-Fidelity, обычно смесь *Taq* и *Pfu* полимераз). В виду того, что для трех видов рода *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. eryngii* и *P. djamor*) в базах данных имеются последовательности частично или полностью отсеквенированных геномов, мы решили провести структурный анализ *matA* локуса *in silico*. В анализе использовали следующие последовательности *matA* локусов: последовательности монокариотических штаммов PC9 и PC15 *P. ostreatus* (<http://jgi.doe.gov/>); последовательности монокариотических штаммов RV95/134.104 и RV95/957.30 *P. djamor* (номера в ГенБанке AY462112, AY462111; James *et al.*, 2004); последовательности монокариотических штаммов CCMSSC00488 и CCMSSC00489 *P. eryngii* (номера в ГенБанке HQ595186, HQ595187).

На нуклеотидном уровне участков гомологии между последовательностями *hd* генов выявлено не было, что в очередной раз свидетельствует о высокой степени вариабельности данных последовательностей. Для этих последовательностей гомологии прослеживали исключительно на аминокислотном уровне, как показано на Рисунке 12, который представляет множественные выравнивания аминокислотных последовательностей *hd* генов. Два класса HD транскрипционных факторов отличались как по длине, так и по аминокислотным последовательностям. Последовательности класса HD1 в целом на 40-50 аминокислотных остатков (а.к.) длиннее, чем последовательности HD2. Особо вариабельные участки у классов HD1 и HD2 белков наблюдали за счет вставок и делеций. Такие вариабельные участки, предположительно, относятся к петлевым пространственным структурам белка. У обоих классов гомеодоменных последовательностей присутствовал консервативный домен **WFXNXXR** в районе 120-190 а.к. у HD1 белка и в районе 140-195 а.к. у HD2 белка. Этот консервативный мотив **WFXNXXR**, как полагают, участвует в связывании регуляторного димерного белка HD1/HD2 с ДНК (DNA binding motif). Согласно литературе, ДНК-связывающий домен состоит из трех  $\alpha$ -спиралей, разделенных небольшими линейными



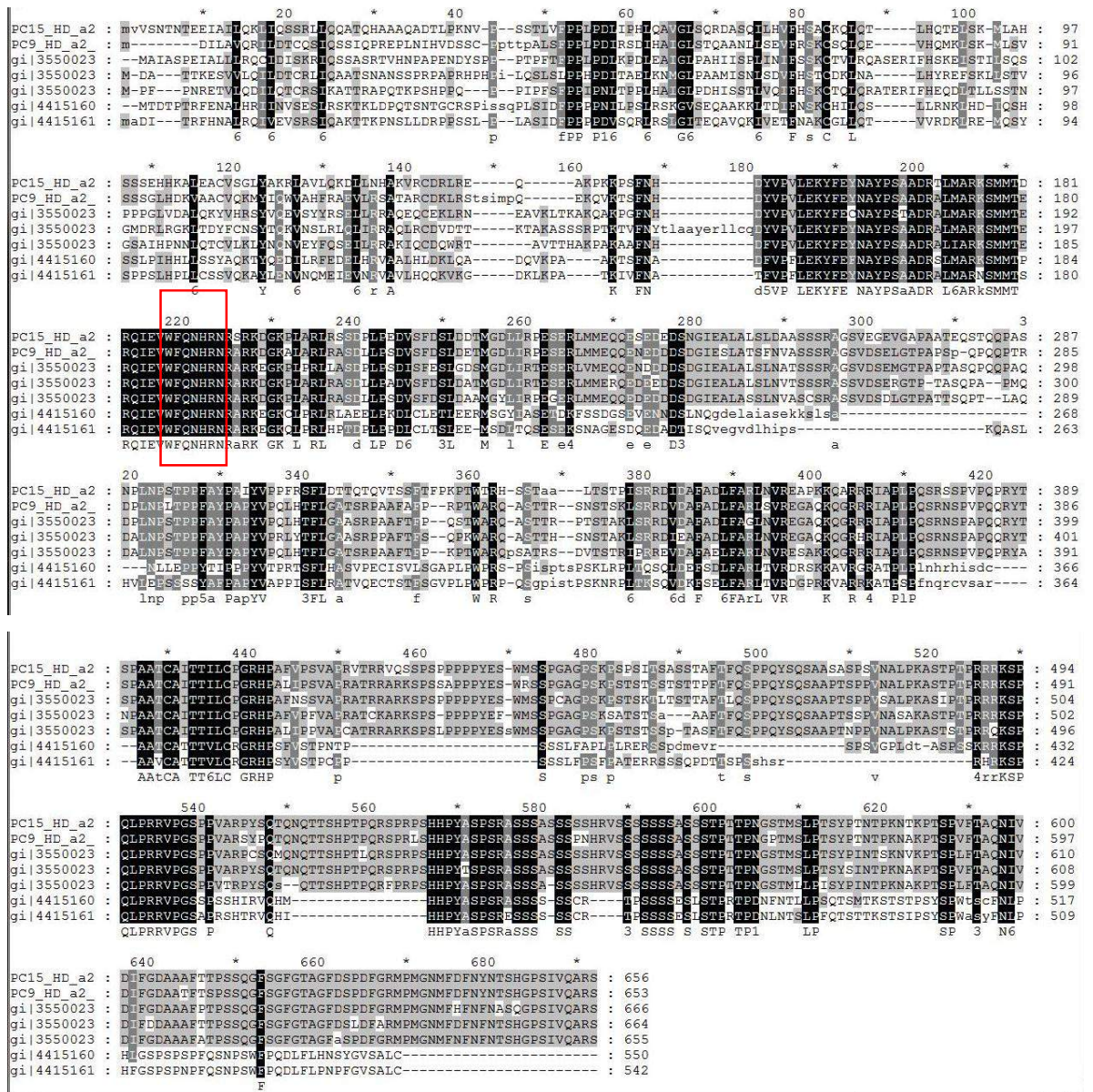
участками в несколько аминокислотных остатков, и собственно консервативный мотив WFXNXXR относится к третьей  $\alpha$ -спирали ДНК-связывающего домена белка (Kües *et al.*, 2011).

a)

|            |                    |                  |               |                     |                                          |                   |                           |
|------------|--------------------|------------------|---------------|---------------------|------------------------------------------|-------------------|---------------------------|
| PC15_HD_a1 | 1                  | 20               | 40            | 60                  | 80                                       | 100               |                           |
| PC15_HD_a1 | MAVDVRSRIATABEDF   | EGTYALEDRDWSVIT  | QVNVACSVIid   | ASIPARATVSEVAVIASSL | IEYDAEATAIKDS                            | IVSDHFSQITla      | DLTDT---                  |
| PC9_HD_a1  | mtvVEIRNRILHABEDL  | EGVPALDRKDSWSD   | ILDIKQELIED   | SALAHPTASAEVIA      | AFKVEESNFSQSS                            | ILDDGFAQY         | SSSHRA---                 |
| gi 3550023 | MTVDIRASIHABEDL    | IGGNLDELAPASWS   | ILDDITITQELI  | PEIRALAYATAAEV      | ITISFEIHTHADATIS                         | GMSDDGFKRE        | SSDHADvas                 |
| gi 3550023 | MS-DTIRNRILHABEDL  | IGGNLDELAPASWS   | ILDDITITQELI  | PEIRALAYATAAEV      | ITISFEIHTHADATIS                         | GMSDDGFKRE        | SSDHADvas                 |
| gi 3550023 | MAVDIRNRILHABEDL   | IGGNLDELAPASWS   | ILDDITITQELI  | PEIRALAYATAAEV      | ITISFEIHTHADATIS                         | GMSDDGFKRE        | SSDHADvas                 |
| gi 4415160 | MVA-----           | LVDAEFTIQAM---   | TNGSIDVGCQWNI | ILALINSHLIDAM       | ATLAHVTAHHH                              | LAHFFKLYDEEAAARS  | IAIDDESFDQ                |
| gi 4415161 | MSV-----           | LVDAEFTIKSIL---  | EGSSSLABERWNV | VVATIKKFLIDAM       | ATLAHVTAHHH                              | LAHFFKLYDEEAAARS  | IAIDDESFDQ                |
|            | M                  | 6 AE 6           | 6 F W         | 6 6d t 6A           | Ta r                                     | 6A                | D                         |
| PC15_HD_a1 | 120                | 140              | 160           | 180                 | 200                                      |                   |                           |
| PC15_HD_a1 | PVNSSSPVstlhappilk | qvqasyq--P       | -----         | TYIEPAYWLLKNVH      | PYPSEKTEKLLSR                            | RTATSQNI          | AWFLNARRIGWT              |
| PC9_HD_a1  | PQAR-PPDPSS        | -----            | PP            | -----               | TYIEPAYWLLKNVH                           | PYPSEKTEKLLSR     | RTATSQNI                  |
| gi 3550023 | SPSEAPPLEPTst      | -----            | SS            | -----               | PHIAPAYWLLKNVH                           | PYPSEKTEKLLSR     | RTATSQNI                  |
| gi 3550023 | PPPR-PAQNhtpssg    | -----            | ST            | -----               | PHIAPAYWLLKNVH                           | PYPSEKTEKLLSR     | RTATSQNI                  |
| gi 3550023 | SKSL-PKRSMP        | -----            | LSLSS         | -----               | SPHAPAYWLLKNVH                           | PYPSEKTEKLLSR     | RTATSQNI                  |
| gi 3550023 | EPSSR-EPstgalepqs  | nrntcsafpp       | -----         | PHIAPAYWLLKNVH      | PYPSEKTEKLLSR                            | RTATSQNI          | AWFLNARRIGWT              |
| gi 4415160 | SPAL-TASeee        | -----            | SLGH          | -----               | SPHAPAYWLLKNVH                           | PYPSEKTEKLLSR     | RTATSQNI                  |
| gi 4415161 | PPRR-PRSSAS        | -----            | EEVavc        | -----               | PHIAPAYWLLKNVH                           | PYPSEKTEKLLSR     | RTATSQNI                  |
|            |                    |                  |               |                     | p yIApAYKWLl N6 nPYP3RetK 16SR 3 TS qnId | AWFLN             | RRRIGWT IsKk55 GS4 Dt6AAA |
| PC15_HD_a1 | 220                | 240              | 260           | 280                 | 300                                      | 3                 |                           |
| PC15_HD_a1 | RAISDI-PKLYANA     | AESEEDHTPL       | ENICMAFVEMED  | AAELISORFES         | SLASRLICMLK                              | DNT               | -----                     |
| PC9_HD_a1  | RAISDI-PKlpi       | -----            | SNEERRPL      | ENICMAFVEMED        | AAELISORFES                              | SLASRLICMLK       | DNT                       |
| gi 3550023 | RAISDI-PKlpi       | -----            | SNEERRPL      | ENICMAFVEMED        | AAELISORFES                              | SLASRLICMLK       | DNT                       |
| gi 3550023 | RAISDI-PKlpi       | -----            | SNEERRPL      | ENICMAFVEMED        | AAELISORFES                              | SLASRLICMLK       | DNT                       |
| gi 3550023 | RAISDI-PKlpi       | -----            | SNEERRPL      | ENICMAFVEMED        | AAELISORFES                              | SLASRLICMLK       | DNT                       |
| gi 4415160 | RAISDI-PKlpi       | -----            | SNEERRPL      | ENICMAFVEMED        | AAELISORFES                              | SLASRLICMLK       | DNT                       |
| gi 4415161 | RAISDI-PKlpi       | -----            | SNEERRPL      | ENICMAFVEMED        | AAELISORFES                              | SLASRLICMLK       | DNT                       |
|            | RAl d              | Plp 1I MaF62M2   | A LY          | K5 kS               | Lag                                      | Ld 664DNTd        | d4 4 Ka e A rrw           |
| PC15_HD_a1 | 340                | 360              | 380           | 400                 | 420                                      |                   |                           |
| PC15_HD_a1 | FAEAYPSPSE         | EDILKRFETPS      | SDGDEEDTTP    | TPVAGKRKASSE        | EDEREVPNER                               | AKRRIRISSSS       | SSCSVDSI                  |
| PC9_HD_a1  | FAEAYPSPSE         | EDILKRFETPS      | SDGDEEDTTP    | TPVAGKRKASSE        | EDEREVPNER                               | AKRRIRISSSS       | SSCSVDSI                  |
| gi 3550023 | FAEAYPSPSE         | EDILKRFETPS      | SDGDEEDTTP    | TPVAGKRKASSE        | EDEREVPNER                               | AKRRIRISSSS       | SSCSVDSI                  |
| gi 3550023 | FAEAYPSPSE         | EDILKRFETPS      | SDGDEEDTTP    | TPVAGKRKASSE        | EDEREVPNER                               | AKRRIRISSSS       | SSCSVDSI                  |
| gi 3550023 | FAEAYPSPSE         | EDILKRFETPS      | SDGDEEDTTP    | TPVAGKRKASSE        | EDEREVPNER                               | AKRRIRISSSS       | SSCSVDSI                  |
| gi 4415160 | FAEAYPSPSE         | EDILKRFETPS      | SDGDEEDTTP    | TPVAGKRKASSE        | EDEREVPNER                               | AKRRIRISSSS       | SSCSVDSI                  |
| gi 4415161 | FAEAYPSPSE         | EDILKRFETPS      | SDGDEEDTTP    | TPVAGKRKASSE        | EDEREVPNER                               | AKRRIRISSSS       | SSCSVDSI                  |
|            | e                  | yppsp p p s      | r e p v       | p agrRR             | d 1                                      | rp KRr6LSS sScsS6 | s sr s p spS3 cSTP        |
| PC15_HD_a1 | 440                | 460              | 480           | 500                 | 520                                      |                   |                           |
| PC15_HD_a1 | PPSTPSEDSP         | SLQNTATPKR       | MRRLSDADA     | EPKPRKRM            | ILVRPLQVSD                               | PLPKSSVSS         | SSIS                      |
| PC9_HD_a1  | PPSTPSEDSP         | SLQNTATPKR       | MRRLSDADA     | EPKPRKRM            | ILVRPLQVSD                               | PLPKSSVSS         | SSIS                      |
| gi 3550023 | PPSTPSEDSP         | SLQNTATPKR       | MRRLSDADA     | EPKPRKRM            | ILVRPLQVSD                               | PLPKSSVSS         | SSIS                      |
| gi 3550023 | PPSTPSEDSP         | SLQNTATPKR       | MRRLSDADA     | EPKPRKRM            | ILVRPLQVSD                               | PLPKSSVSS         | SSIS                      |
| gi 3550023 | PPSTPSEDSP         | SLQNTATPKR       | MRRLSDADA     | EPKPRKRM            | ILVRPLQVSD                               | PLPKSSVSS         | SSIS                      |
| gi 4415160 | PPSTPSEDSP         | SLQNTATPKR       | MRRLSDADA     | EPKPRKRM            | ILVRPLQVSD                               | PLPKSSVSS         | SSIS                      |
| gi 4415161 | PPSTPSEDSP         | SLQNTATPKR       | MRRLSDADA     | EPKPRKRM            | ILVRPLQVSD                               | PLPKSSVSS         | SSIS                      |
|            | ppstP              | slp a kr rr d e  | pkrr          | lvrr4lq6vSDPlpks    | 3 s                                      | s                 | sqff Av e6                |
| PC15_HD_a1 | 540                | 560              | 580           | 600                 | 620                                      |                   |                           |
| PC15_HD_a1 | ETCGPIEFNM         | FDSCHADV         | ASNNKTS       | GDADNE              | -----                                    | TGSEHLKqgsf       | PLSLSSSAHHP               |
| PC9_HD_a1  | ETCGPIEFNM         | FDSCHADV         | ASNNKTS       | GDADNE              | -----                                    | TGSEHLKqgsf       | PLSLSSSAHHP               |
| gi 3550023 | ETCGPIEFNM         | FDSCHADV         | ASNNKTS       | GDADNE              | -----                                    | TGSEHLKqgsf       | PLSLSSSAHHP               |
| gi 3550023 | ETCGPIEFNM         | FDSCHADV         | ASNNKTS       | GDADNE              | -----                                    | TGSEHLKqgsf       | PLSLSSSAHHP               |
| gi 3550023 | ETCGPIEFNM         | FDSCHADV         | ASNNKTS       | GDADNE              | -----                                    | TGSEHLKqgsf       | PLSLSSSAHHP               |
| gi 4415160 | ETCGPIEFNM         | FDSCHADV         | ASNNKTS       | GDADNE              | -----                                    | TGSEHLKqgsf       | PLSLSSSAHHP               |
| gi 4415161 | ETCGPIEFNM         | FDSCHADV         | ASNNKTS       | GDADNE              | -----                                    | TGSEHLKqgsf       | PLSLSSSAHHP               |
|            | d qp               | 6dys2FA y s      | ts g dwe      | p                   | ld                                       | s p i p           | d dl p p f l cat W s      |
| PC15_HD_a1 | 640                | 660              | 680           | 700                 | 720                                      | 740               |                           |
| PC15_HD_a1 | i-----             | SSVRINLDGL       | SSIVSLPTNS    | QGFSledia           | RT-DEIT                                  | GSLESIDW          | SSIIPT                    |
| PC9_HD_a1  | i-----             | SSVRINLDGL       | SSIVSLPTNS    | QGFSledia           | RT-DEIT                                  | GSLESIDW          | SSIIPT                    |
| gi 3550023 | i-----             | SSVRINLDGL       | SSIVSLPTNS    | QGFSledia           | RT-DEIT                                  | GSLESIDW          | SSIIPT                    |
| gi 3550023 | i-----             | SSVRINLDGL       | SSIVSLPTNS    | QGFSledia           | RT-DEIT                                  | GSLESIDW          | SSIIPT                    |
| gi 3550023 | i-----             | SSVRINLDGL       | SSIVSLPTNS    | QGFSledia           | RT-DEIT                                  | GSLESIDW          | SSIIPT                    |
| gi 4415160 | i-----             | SSVRINLDGL       | SSIVSLPTNS    | QGFSledia           | RT-DEIT                                  | GSLESIDW          | SSIIPT                    |
| gi 4415161 | i-----             | SSVRINLDGL       | SSIVSLPTNS    | QGFSledia           | RT-DEIT                                  | GSLESIDW          | SSIIPT                    |
|            | 1                  | e Ln LdglSSL 3LP | ss            | f                   | IDW S6iP 36PPT                           | p                 | a g esRaeKlr              |
| PC15_HD_a1 | 760                |                  |               |                     |                                          |                   |                           |
| PC15_HD_a1 | KYQCHICQV          | KRLQELAI         | A             |                     |                                          |                   |                           |
| PC9_HD_a1  | KYQCHICQV          | KRLQELAI         | A             |                     |                                          |                   |                           |
| gi 3550023 | KYQCHICQV          | KRLQELAI         | A             |                     |                                          |                   |                           |
| gi 3550023 | KYQCHICQV          | KRLQELAI         | A             |                     |                                          |                   |                           |
| gi 3550023 | KYQCHICQV          | KRLQELAI         | A             |                     |                                          |                   |                           |
| gi 4415160 | KYQCHICQV          | KRLQELAI         | A             |                     |                                          |                   |                           |
| gi 4415161 | KYQCHICQV          | KRLQELAI         | A             |                     |                                          |                   |                           |



6)



**Рисунок 12.** Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей белков класса HD1 (a) и HD2 (б) для штаммов PC15 *P. ostreatus*, PC9 *P. ostreatus*, CCMSSC00488 *P. eryngii*, CCMSSC00489 *P. eryngii*, RV95/134.104 *P. djamor*, RV95/957.30 *P. djamor*. Программа Dialign 2.2.1; прямоугольниками выделен консервативный мотив **WFXNXR**.

Показав *in silico* наличие и общность строения гомеодоменных белков двух классов (HD1 и HD2) у некоторых представителей рода *Pleurotus*, дальнейший структурный анализ проводили на гомеодоменных последовательностях гаплоидных штаммов PC15 и PC9 *P. ostreatus*, которые произошли от одного и того же дикариотического родителя. С использованием программы PSORT и WoLF PSORT (<http://psort.hgc.jp/>, <http://wolffpsort.org/>) *in silico* была предсказана ядерная локализация обоих классов гомеодоменных белков. Так, выравнивая гомеодоменные последовательности с использованием баз данных по белковым сигнальным мотивам в программе PSORT (алгоритм *k*-Nearest Neighbors Classifier; Horton,

Nakai, 1997), была оценена вероятностная локализация исследуемых белков класса HD1 в клетке: для белка HD1.1 (штамм PC15) - 73.9 % ядерная локализация, 17.4 % цитоскелетная, 4.3 % везикулы секреторной системы, 4.3 % мембранная; для белка HD1.2 (штамм PC15) - 52.2 % ядерная, 26.1 % цитоплазматическая, 17.4 % цитоскелетная, 4.3 % везикулы секреторной системы; для белка HD1 (штамм PC9) - 73.9 % ядерная, 17.4 % цитоплазматическая, 8.7 % цитоскелетная локализация. Для белков класса HD2 были предсказаны следующие вероятные места локализации в клетке: для белка HD2 (штамм PC15) - 65.2 % ядерная локализация, 26.1 % цитоплазматическая, 8.7 % цитоскелетная; для белка HD2 (штамм PC9) - 82.6 % ядерная, 8.7 % цитоскелетная, 4.3 % цитоплазматическая, 4.3 % везикулы секреторной системы. Таким образом, для исследуемых гомеодоменных белков двух классов была предсказана ядерная локализация. Поиск сигнальных последовательностей ядерной локализации программа проводила по участкам, богатым аргинином (R) и лизином (K) или пролином (P) и гистидином (H), которые являются маркерами ядерных сигнальных последовательностей. Также, у представителей класса HD2 белков были обнаружены мотивы ДНК-связывающего гомеобокс-домена («homeobox»): MARKSMMTDRQIEVWFQNHRNRSR у HD2 белка штамма PC15 начиная с 179 а.к. и MARKSMMTERQIEVWFQNHRNRAR у HD2 белка штамма PC9 начиная с 177 а.к. Так как у последовательностей HD1 белков мотивы гомеобокс-домена не были обнаружены, то можно предположить, что у HD2 класса белков ДНК-связывающий домен более консервативен. Полученные результаты соответствуют информации о том, что HD белки выполняют функцию факторов транскрипции, и, следовательно, должны иметь ядерную локализацию и ДНК-связывающие мотивы.

Дальнейшее определение структурной организации гомеодоменных белков проводили в программе Kyte Doolittle Hydropathy Plot (<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>; Kyte, Doolittle, 1982). С помощью данной программы можно предсказать, является ли белок глобулярным или трансмембранным, основываясь на гидрофильности/гидрофобности составляющих его аминокислот. Программа работает по следующему принципу. Сначала каждой аминокислоте в зависимости от ее радикала присваивается число от 4.6 до -4.6, соответствующее ее гидрофобности. Число 4.6 соответствует наибольшей гидрофобности, а число -4.6 - наибольшей гидрофильности (<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/aminoacidscores.htm>). Параметр «размер окна» (window size) в программе – это количество аминокислот, по которым считается средняя гидрофобность или гидрофильность участка. Программа просчитывает среднюю гидрофобность каждого окна, при этом каждое последующее окно представляет собой предыдущее окно, сдвинутое на 1 а.к. Средняя гидрофобность оценивается программой в

виде графика, у которого по оси абсцисс обозначены координаты аминокислотной последовательности, а по оси ординат – средние значения гидрофильности/гидрофобности (Приложение 1). Если при выборе размера окна 18-21 значения графика оказываются выше красной линии ( $x=0 \rightarrow \infty$ ;  $y=1.6$ ), то анализируемые участки аминокислотной последовательности относятся к трансмембранным. При выборе размера окна 5-9, отрицательные пики графика предсказывают возможное положение гидрофильных участков последовательности, которые предположительно соответствуют поверхностным петлям вторичной структуры белковых молекул (Приложение 1). Так, при размере окна 19 было показано, что у гомеодоменных белков HD1 и HD2 класса отсутствуют трансмембранные гидрофобные участки, и, следовательно, белки имеют глобулярную структуру, что характерно для транскрипционных факторов. При размере окна 9 для белков класса HD1 было предсказано несколько гидрофильных участков, соответствующих отрицательным пикам. Наиболее выраженный отрицательный пик наблюдали между 250-300 а.к., где, с большой долей вероятности, находится наружная петля белковой молекулы (Приложение 1). Кроме того, согласно Рисунку 12, этот участок включает более-менее консервативные домены, и, следовательно, петля может участвовать в процессах связывания ДНК и активации транскрипции. При размере окна 9 последовательности класса HD2 белков формировали несколько отрицательных пиков, соответствующих гидрофильности, часть из которых также находилась между 200 и 300 а.к. (Приложение 1). Согласно Рисунку 12, в этом участке HD2 последовательности обладают низкой консервативностью.

Анализ аминокислотных последовательностей, проведенный в программе SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen *et al.*, 2011), также показал отсутствие сигнальных последовательностей трансмембранной локализации и сайтов их разрезания, что еще раз подтверждает предположение о том, что белок является глобулярным.

При помощи программы SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006) была предсказана вторичная структурная организация белков класса HD1 и HD2 (Приложение 2). Согласно предсказанной модели, гомеодоменные белки двух классов состоят в основном из  $\alpha$ -спиральных структур (H), основное количество которых локализуется на N-конце, а также линейных структур, предположительно, соединительных поверхностных петель (C). Для белков класса HD1 были обнаружены протяженные области гомологии с соответствующими гомеодоменными белками (mating-type protein Family) базидиального гриба *Coprinopsis cinerea*. Так, у штамма PC15 аминокислотная последовательность HD1.1 оказалась гомологичной соответствующей последовательности *C. cinerea* в области консервативного ДНК-связывающего домена (125-190 а.к.), представляющего собой  $\alpha$ -спиральный участок (H), а также на участке линейной области 190-290 а.к. (C), которая, вероятно, также

участвует в ДНК-связывании и активации транскрипции (Приложение 2 а). Аминокислотная последовательность HD1.2 штамма PC15 по всей протяженности имеет гомологии с семейством гомеодоменных белков *C. cinerea* и содержит  $\alpha$ -спирали с линейными областями (Приложение 2 б). Последовательность HD1 штамма PC9 также имеет протяженную область гомологии с семейством гомеодоменных белков *C. cinerea* на участке 45–443 а.к. (Приложение 2 в). У белков класса HD2 (штаммов PC15 и PC9) не было обнаружено гомологий с семейством гомеодоменных белков, участвующих в регуляции полового процесса у *C. cinerea* (Приложение 2 г, д). Более того, в области, где должна располагаться  $\alpha$ -спираль с ДНК-связывающим мотивом (140-190 а.к.), не было предсказано каких-либо структур, кроме линейных. Однако были обнаружены гомологии с классическими доменами гомеобокс и гомеодомен-подобных белков (ответственных за связывание регуляторных белков с ДНК) в области 120-190 а.к. у класса HD1 белков и в области 140-195 а.к. у класса HD2 белков (Приложение 2). Именно эти области содержат консервативный ДНК-связывающий мотив **WFXNXXR**.

Согласно литературным данным, гомеодоменные (гомеобокс) белки представляют собой транскрипционные факторы, обладающие схожим ДНК-связывающим доменом (Mannervik, 1999). Домен связывает ДНК при помощи структуры спираль-поворот-спираль (НТН, helix-turn-helix). НТН мотив состоит из двух  $\alpha$ -спиралей, которые соединены небольшой петлей. Вторая спираль присоединяется к ДНК посредством водородных связей и гидрофобного взаимодействия. Первая спираль стабилизирует образующийся комплекс (Рисунок 14). ДНК-связывающий (гомеодоменный) мотив достаточно консервативен как по последовательности, так и по пространственной структуре, и присутствует во многих семействах ДНК-связывающих белков.

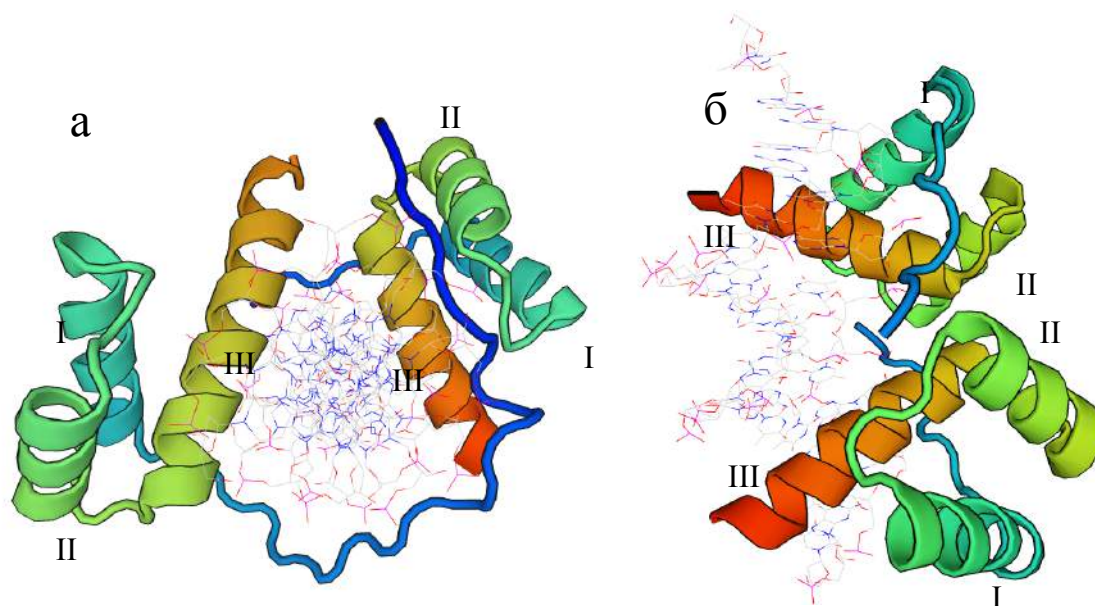
С помощью программы SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006) была предложена трехмерная пространственная организация белковой молекулы в области связывания с ДНК. Модель трехмерной структурной организации в данной программе основывается на поиске гомологичных аминокислотных последовательностей белков с известной пространственной структурой в электронной базе данных EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>). Так, для последовательности HD1.1 штамма PC15 было обнаружено незначительное сходство (38.6%) ДНК-связывающего мотива с таковым у мономера гомеобокс белка TGIF2LX человека, с уже охарактеризованной пространственной структурой. Была предсказана трехмерная структура ДНК-связывающего домена HD 1.1 штамма PC15 (Рисунок 13 (а)). В модели ДНК-связывающего домена HD1.1 белка присутствуют три  $\alpha$ -спирали со следующими координатами: I спираль на участке 125-137 а.к., II спираль - 146-156 а.к., III спираль - 160-173 а.к. Спираль III во всех ДНК-связывающих доменах содержит мотив



**WFXNXR** и непосредственно участвует в ДНК-связывании. Для ДНК-связывающего домена HD1.2 белка штамма PC15 было обнаружено сходство (41.46%) с гомеобокс-белком Meis2 человека (Рисунок 13 б). В модели ДНК-связывающего домена HD1.2 белка также были обнаружены I, II и III  $\alpha$ -спирали на участках 120-123 а.к., 132-142 а.к. и 146-160 а.к. соответственно. Для HD1 белка другого гаплоидного штамма PC9, который имеет сходство (41.46%) с белком Meis2 человека, предложена пространственная модель со следующим положением трех  $\alpha$ -спиралей: 126-129 а.к. (частично), 138-148 а.к., 152-166 а.к. (Рисунок 13 в). Для ДНК-связывающего домена белка второго класса HD2 штамма PC15 было обнаружено сходство (44.26%) с белком ARX (Homeodomain-containing protein Aristaless) человека и предложена модель со следующими координатами  $\alpha$ -спиральных структур: на участках 149-161 а.к., 167-175 а.к. и 181-197 а.к. (Рисунок 13 г). Для ДНК-связывающего домена второго класса HD2 штамма PC9 было найдено сходство (32.86%) с гомеодоменным белком семейства Pax *Drosophila melanogaster* и предложена модель с координатами  $\alpha$ -спиралей на участках 148-160 а.к., 166-176 а.к. и 180-195 а.к. (Рисунок 13 д).

Ранее было показано, что N-концевые последовательности в структуре гомеодоменных белков HD1 и HD2 выполняют роль димеризационных доменов между совместимыми HD1 и HD2 белками-партнерами (Kües *et al.*, 2011). Только HD1-HD2 гетеродимер способен в дальнейшем работать в качестве транскрипционного фактора и регулировать экспрессию генов, участвующих в морфогенезе фертильного дикариона с последующим образованием плодовых тел. Причем димеризация может происходить исключительно между белками-партнерами HD1 и HD2, которые транскрибируются на разных аллелях *mata* локуса в дикарионе, сформированном между совместимыми по полу гомакариотическими штаммами. Благодаря такой функции, N-конец отличается высокой степенью вариабельности аминокислотных последовательностей между разными аллелями локуса (Kües *et al.*, 2011). Возможные варианты связывания белка-гетеродимера с ДНК представлены на Рисунке 14. В частности, на Рисунке 14 а изображен гетеродимер, сформированный гомеодоменными белками – транскрипционными факторами Aristaless и Clawless человека, участвующими в регуляции экспрессии генов во время развития нервной системы (Miyazono *et al.*, 2010). Можно предположить, что подобная модель связывания с ДНК будет работать и для белка HD2 штамма PC15, так как именно с белком Aristaless HD2 последовательность продемонстрировала больше всего сходства. Для последовательности HD2 штамма PC9, возможно, более приемлемой является модель гетеродимеризации белков семейства Pax *D. melanogaster* в виду большего сходства между этими белками (Рисунок 14 б) (Wilson *et al.*, 1995).





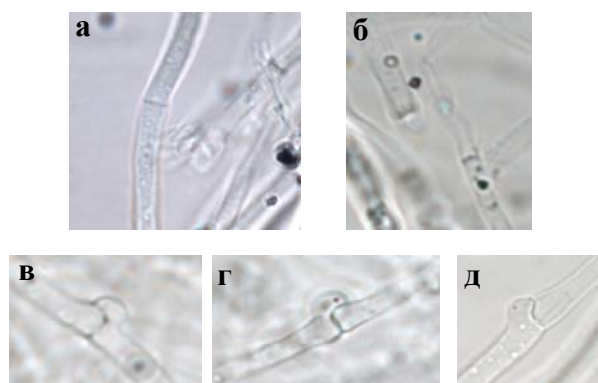
**Рисунок 14.** Возможные модели гетеродимеризации гомеодоменных белков (их ДНК-связывающих доменов): (а) гетеродимер, сформированный гомеодоменными белками – транскрипционными факторами *Aristaless* и *Clawless* человека (Miyazono *et al.*, 2010); (б) гетеродимер, сформированный белками семейства *Pax D. melanogaster* (Wilson *et al.*, 1995).

Именно для белков класса HD2 программой были предложены модели гетеродимеризации. Видимо, это связано с большей консервативностью ДНК-связывающего домена и более канонической структурой белков данного класса.

### 3.5.2 Клонирование генов *mata* локуса *P. ostreatus*

У представителей рода *Pleurotus*, как и у большинства базидиальных грибов, образование плодовых тел в норме происходит на дикариотическом мицелии. Дикариотический мицелий можно отличить по наличию пряжек в области межклеточных септ. В нашем исследовании для клонирования генов *mata* локуса и анализа межallelных взаимодействий были взяты хорошо известные и полностью отсекариотированные монокариотические гаплоидные штаммы PC9 и PC15 *P. ostreatus*, которые были получены из дикариотического диплоидного штамма N001 методом дедикариотизации (Larraza *et al.*, 2001). При микроскопировании монокариотические штаммы PC9 и PC15 образовывали простые септы, характерные для монокарионов (Рисунок 15 а, б), в то время как дикариотический мицелий родительского штамма N001 в местах образования септ имел типичные для базидиомицетов пряжки (Рисунок 15 в, г, д). Поэтому пряжки могут быть использованы в качестве селективного признака при отборе трансформантов в процедуре клонирования генов *mata* в подходящий (совместимый по полу) монокарион (Kües *et al.*, 1992). В виду того, что при скрещивании монокариотических штаммов PC15 и PC9

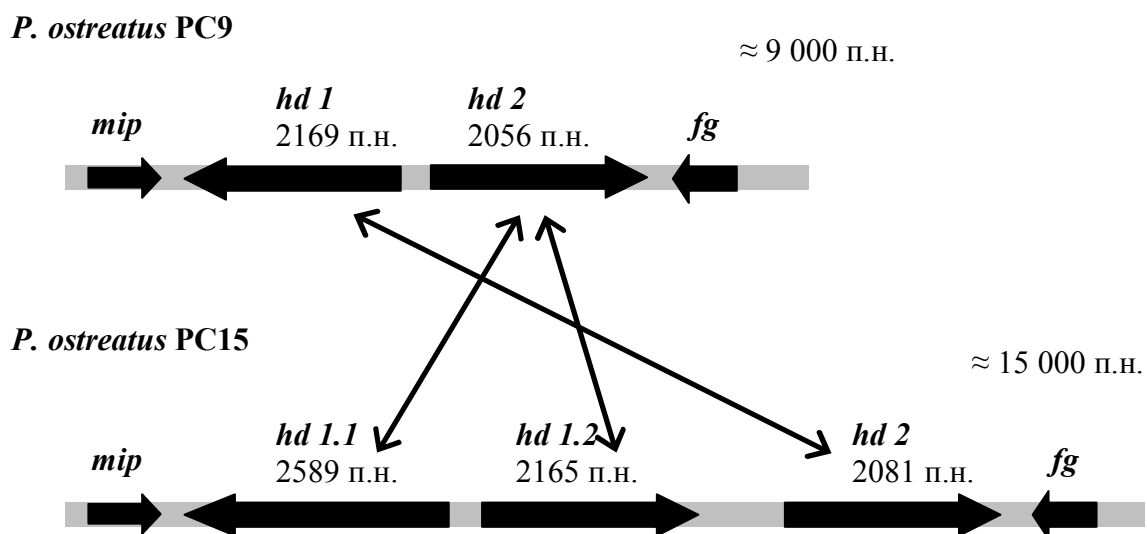
формируется фертильный дикарион, *matA* и *matB* локусы этих штаммов представлены разными аллелями. Таким образом, клонирование *matA* генов этих монокариотических штаммов может давать как совместимые, так и несовместимые (отрицательный контроль) комбинации. На данный момент предложено несколько методик клонирования рекомбинантных генетических конструкций в монокариотических клетках *P. ostreatus* (Amore *et al.*, 2012; Salame *et al.*, 2013); однако, эти протоколы работают с низкой эффективностью. В связи с этим было принято решение провести клонирование генов *matA* локуса *P. ostreatus* в монокариотических клетках *Coprinopsis cinerea*, для которого разработаны адаптированные методики эффективной трансформации. Кроме того, клонирование генов *matA* локуса *P. ostreatus* в гетерологичном хозяине *C. cinerea* может пролить свет на вопрос о степени взаимодействия различных гомеодоменных белков при формировании активных гетеродимеров (в том числе и в случае гетерологичной гетеродимеризации), а также глубже понять механизмы половой совместимости на уровне регуляции транскрипции у разных групп грибов.



**Рисунок 15.** Особенности строения гиф в области септ (световая микроскопия, x40). а). Септы у гаплоидного монокариотического штамма PC9; б). Септы у гаплоидного штамма PC15; в, г, д). Образование пряжек в районе септ на дикариотическом мицелии штамма N001.

Согласно данным, основанным на геномных последовательностях штаммов PC9 и PC15 (DOE JGI, Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA; <http://genome.jgi.doe.gov/>), *matA* локус у этих штаммов имеет следующую структуру. Монокариотический штамм PC9 характеризуется стандартной структурой *matA* локуса, то есть содержит пару генов (*hd1* и *hd2*), кодирующих HD1 и HD2 белки, регуляция транскрипции которых происходит с общей межгенной промоторной области (Рисунок 16). Монокариотический штамм PC15 отличается наличием дополнительной (второй) копии гена, кодирующего белок HD1 класса; таким образом, в *matA* локусе имеется три копии *hd* генов – *hd1.1*, *hd1.2* и *hd2* (Рисунок 16). Какая из копий генов, кодирующих HD1 класс белков, у штамма PC15 является активной,

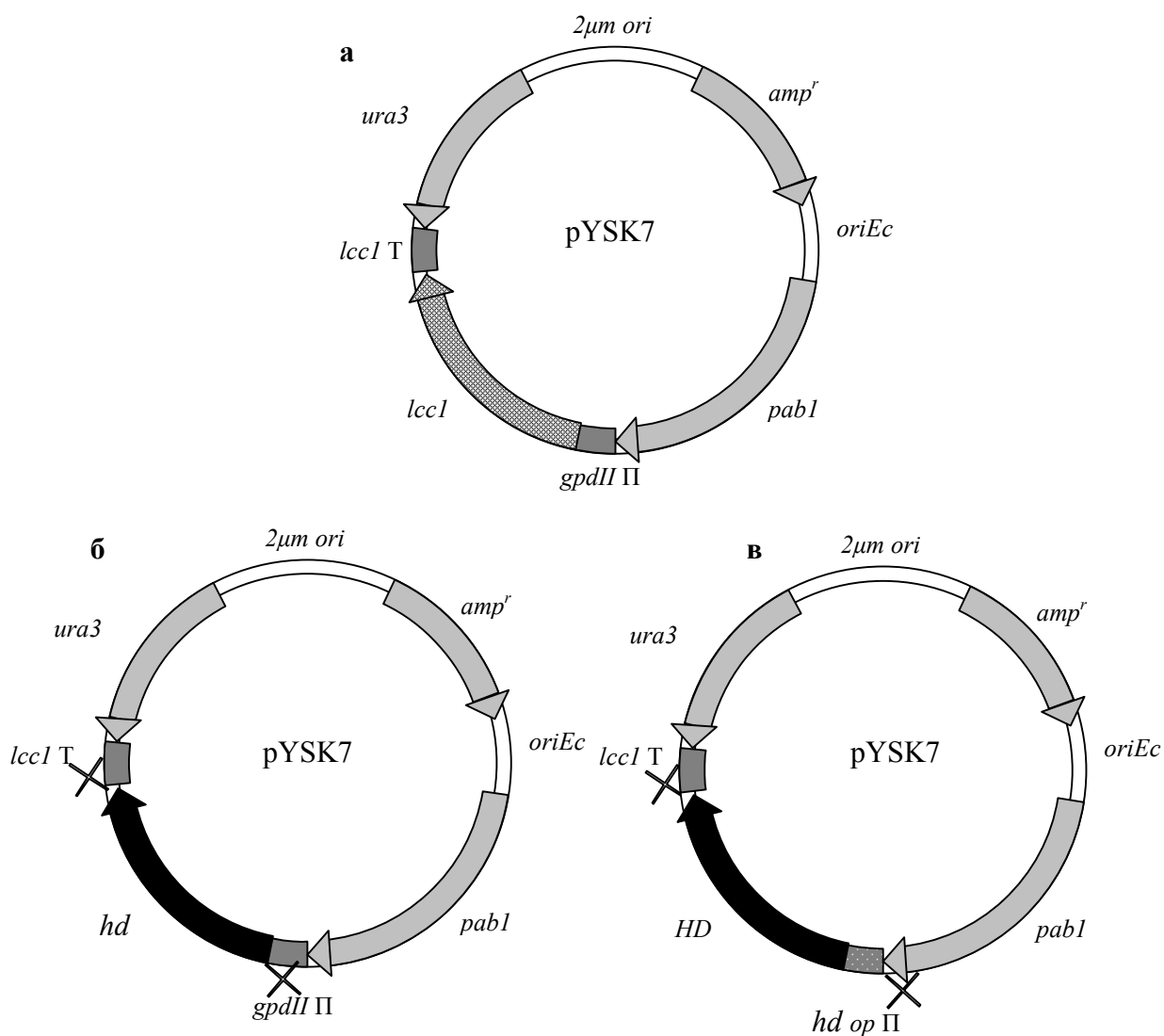
предсказать, основываясь на данных секвенирования, трудно, так как копии генов (*hd1.1* и *hd1.2*) транскрибируются в противоположных направлениях, хотя и имеют общую промоторную область. Вполне вероятно, что одна из копий гена *hd1* возникла в результате дупликации или инсерции. Следует заметить, что возникновение инсерций и делеций в пределах *matA* локуса происходит довольно-таки часто (Lengeler *et al.*, 2000). Высокая вариабельность нуклеотидных последовательностей *hd* генов, вероятно, связана с механизмом накопления точковых мутаций и является инструментом достижения большего аллельного разнообразия локусов, а мультиаллельность в итоге направлена на снижение вероятности инбридинга в природных популяциях грибов. Помимо анализа аллельных взаимодействий в задачу данного исследования входило выяснить, какая из двух копий *hd1*-генов является функционально значимой у штамма PC15. Протяженность *hd* генов у представителей рода *Pleurotus* варьирует; их средний размер колеблется от 2000 п.н. и более. Как и у других исследованных базидиальных грибов, у обоих штаммов *P. ostreatus* высоковариабельный *matA* локус фланкирован более консервативными последовательностями, кодирующими ген *mip* (mitochondrial intermediate peptidase) и ген с неизвестной функцией *fg* (beta-flanking protein) (Рисунок 16).



**Рисунок 16.** Структура *matA* локуса половой совместимости и схема аллельных взаимодействий гомеодоменных белков *P.ostreatus*. Ген *mip* кодирует пептидазу (mitochondrial intermediate peptidase); ген *fg* (beta-flanking protein) кодирует белок с неизвестной функцией; гены *hd* кодируют соответствующие гомеодоменные белки.

Так как полные геномные последовательности штаммов PC9 и PC15 известны, а рамки считывания многих генов биоинформатически предсказаны, в геномной базе данных JGI были найдены рамки считывания двух генов - *hd1* (белок HD1) и *hd2* (белок HD2) - штамма

PC9 и и трех генов *hd1.1* (белок HD1.1), *hd1.2* (белок HD1.2) и *hd2* (белок HD2) штамма PC15. Для создания конструкции на основе *hd* генов и pYSK7 плазмиды на первом этапе была проведена амплификация *hd* генов с ДНК матриц штаммов PC9 и PC15 с соответствующими праймерами (Таблица 3). Праймеры для ПЦР были подобраны таким образом, чтобы интеграция генов в конструкции проходила с правильной рамки считывания. Для встраивания целевого гена в конструкцию использовали метод гомологичной рекомбинации в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Для успешного прохождения рекомбинации необходима область гомологии, по крайней мере, в 40 п.н. между кольцевой конструкцией и встраиваемым участком (Oldenburg *et al.*, 1997; Raymond *et al.*, 1999). Поэтому для клонирования *hd* генов в клетках дрожжей была проведена амплификация *hd* последовательностей в два этапа с целью создания длинных «концов» (свыше 40 п.н.), гомологичных последовательности плазмиды pYSK7 (для прохождения успешной гомологичной рекомбинации). Для обеспечения эффективной экспрессии *hd* генов с правильной рамки считывания, области гомологии подбираемых праймеров с исследуемыми генами начинались непосредственно с последовательности ATG исследуемых генов, то есть с 5'-конца гена. Список всех подобранных праймеров представлен в Таблице 3. Для проведения гомологичной рекомбинации было сконструировано две группы прямых праймеров (обозначены как f, forward). Первая группа прямых f праймеров была гомологична 3'-концу конститутивного *gpdII* промотора для того, чтобы *hd* ген мог встроиться под данный промотор и был способен постоянно (конститутивно) транскрибироваться в монокариотических гаплоидных трансформантах гетерологичного хозяина *C. cinerea*. Следует заметить, что гомеодоменные белки являются транскрипционными факторами, выполняющими одну из важнейших функций в развитии, и, следовательно, конститутивная экспрессия подобных регуляторных генов может в итоге привести к нежизнеспособности трансформантов. В связи с этим была смоделирована вторая группа прямых f праймеров, имеющих область гомологии с участком плазмиды левее 5'-конца *gpdII* промотора, что позволило встроить в плазмиду целевой *hd* ген под собственным промотором на участке гена *lcc1* плазмиды в ходе гомологичной рекомбинации (Рисунок 17). Вторая группа прямых праймеров (с возможностью экспрессировать *hd* гены с собственных промоторов) была смоделирована таким образом, чтобы амплифицировать межгенную промоторную область со всеми элементами, участвующими в транскрипции гена. Так, для штамма PC9 была взята межгенная область в 200 п.н., с которой происходит транскрипция *hd1* и *hd2* генов в противоположных направлениях. Для штамма PC15 при моделировании f праймеров второй группы была взята межгенная промоторная область в 200 п.н. между *hd1.1* и *hd1.2* последовательностями, с которой происходит транскрипция данных



**Рисунок 17.** а). Вектор pYSK7 для клонирования и экспрессии *hd* генов в монокариотических гаплоидных клетках *C. cinerea*. б). Рекombинантная конструкция на основе *hd* гена под *gpdII* промотором в векторе pYSK7. в). Рекombинантная конструкция на основе *hd* гена под собственным промотором (*hd op*) в векторе pYSK7(в). Области гомологии, по которым проходила гомологичная рекомбинация и, соответственно, интеграция последовательности *hd* генов в вектор, обозначены крестиками (X) на схемах.

генов в противоположных направлениях. Последовательность *hd2* гена штамма PC15 была амплифицирована вместе с межгенной областью в 900 п.н. между 3'-концом *hd1.2* гена и 5'-концом *hd2* гена. Обратные праймеры (r) в обоих случаях были одинаковыми. Обратные праймеры подбирали в соответствии с рамкой считывания *hd* генов с добавлением по 5'-концу праймеров области гомологии с точкой начала терминации транскрипции *lcc1* гена плазмиды pYSK7. Таким образом, для каждого из пяти *hd* генов было создано по две группы праймеров: для амплификации собственно гена и интеграции его под конститутивный промотор *gpdII* плазмиды pYSK7, а также для амплификации гена с собственной промоторной областью и встраивания его под собственным промотором в вектор pYSK7 (Таблица 3).

Химерные праймеры были предварительно проверены биоинформатически на вероятность образования внутренних шпилек, вторичных структур и гетеродимеров в программе OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, USA; <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>; Owczarzy *et al.*, 2008). Учитывая все вышеупомянутые параметры, рассчитанная температура отжига праймеров составила 63°C для первого шага ПЦР; для второго шага температура отжига составила 58°C. Подобранная температура оказалась оптимальной для всех пар праймеров, и все последовательности *hd* генов удалось получить в виде ПЦР продуктов.

Таким образом, было получено десять ампликонов пяти гомеодоменных генов для последующего клонирования в вектор pYSK7 (Рисунок 18):

последовательность *hd1.1* штамма PC15 с промоторной областью в 200 п.н.;

последовательность *hd1.1* штамма PC15 без промоторной области;

последовательность *hd1.2* штамма PC15 с промоторной областью в 200 п.н.;

последовательность *hd1.2* штамма PC15 без промоторной области;

последовательность *hd2* штамма PC15 с промоторной областью в 900 п.н.;

последовательность *hd2* штамма PC15 без промоторной области;

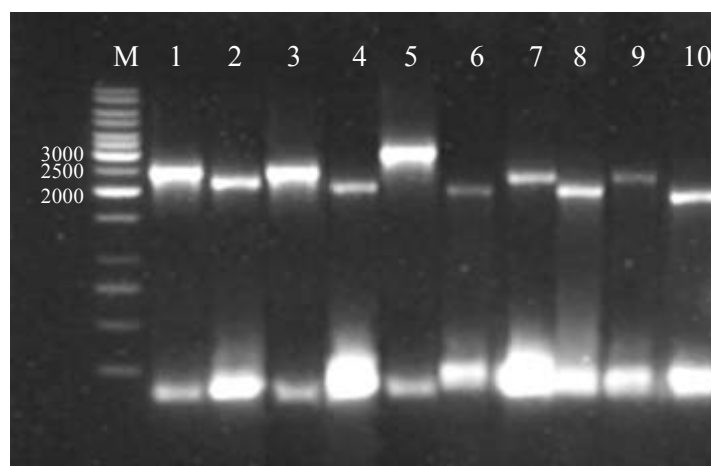
последовательность *hd* штамма PC9 с промоторной областью в 200 п.н.;

последовательность *hd1* штамма PC9 без промоторной области;

последовательность *hd2* штамма PC9 с промоторной областью в 200 п.н.;

последовательность *hd2* штамма PC9 без промоторной области.



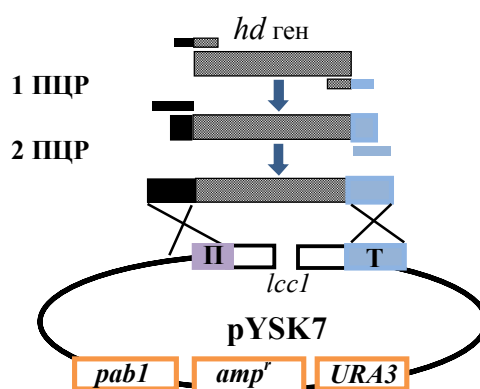


**Рисунок 18.** Электрофореграмма ПЦР-продуктов первого шага амплификации с химерными геноспецифичными праймерами. М – маркер длин ДНК фрагментов (1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Дорожки: 1 - *hd1.1* PC15 с промоторной областью в 200 п.н.; 2- *hd1.1* PC15 без промоторной области; 3 - *hd1.2* PC15 с промоторной областью в 200 п.н.; 4 - *hd1.2* PC15 без промоторной области; 5 - *hd2* PC15 с промоторной областью в 900 п.н.; 6 - *hd2* PC15 без промоторной области; 7 - *hd1* PC9 с промоторной областью в 200 п.н.; 8 - *hd1* PC9 без промоторной области; 9 - *hd2* PC9 с промоторной областью в 200 п.н.; 10 - *hd2* PC9 без промоторной области.

Общая схема двухшаговой ПЦР с последующей интеграцией гена в вектор pYSK7 методом гомологичной рекомбинации представлена на Рисунке 19. Матрицей ДНК при амплификации гомеодоменных последовательностей на первом шаге служила тотальная ДНК штаммов. Второй шаг амплификации проводили на матрице ПЦР-продукта, полученного на первом этапе. ПЦР-продукт каждого гена, полученного в результате второго шага амплификации, трансформировали в клетки *S. cerevisiae* совместно с вектором pYSK7, который был линейаризован по уникальным сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hpa*I, находящимися внутри гена *lcc1* плазмиды. Двухцепочечные разрывы в цепи ДНК плазмиды способствовали прохождению репарационных процессов в клетках дрожжей для восстановления кольцевой молекулы в ходе гомологичной рекомбинации; при этом матрицей при репарации служил ПЦР-продукт с участками гомологии с вектором. Таким образом, происходило замещение лакказного гена *lcc1* (с *gpdII* промотором или без него) вектора на целевой ген *hd*. Использование двойной рестрикции вектора (по двум сайтам *Bam*HI и *Hpa*I) исключало возможность обратного замыкания вектора в кольцо и, тем самым, способствовало прохождению гомологичной рекомбинации и интеграции *hd* гена в вектор. Используемый для трансформации штамм *S. cerevisiae* RH1385 (*MATa*, *ura3Δ*) был ауксотрофен по урацилу. Соответственно отбор трансформантов проводили на селективной среде по маркеру ауксотрофности *ura3*. У трансформантов происходило восстановление прототрофности (комплементация) по урацилу за счет гена, находящегося в векторе pYSK7; соответственно,

на минимальной среде без добавления урацила выживали только трансформанты (Oldenburg *et al.*, 1997). В результате манипуляций были получены по два типа конструкций для каждого из пяти *hd* генов – под собственным промотором и под конститутивным *gpdII* промотором; в итоге - 10 рекомбинантных конструкций. Таким образом, амплификация генных последовательностей с химерными праймерами, выполненная в два этапа, позволила увеличить область гомологии ампликона с плазмидой и, соответственно, повысить эффективность интеграции амплифицированного фрагмента ДНК в вектор pYSK7.

Полученные конструкции исследуемых генов на основе pYSK7 плазмиды были выделены из клеток *S. cerevisiae* и трансформированы в штамм *E. coli* XL1-Blue. Трансформанты *E. coli* были отобраны на среде LB с добавлением антибиотика ампициллина по маркеру устойчивости *amp<sup>r</sup>*. Трансформация в клетки *E. coli* позволяла сохранить полученные конструкции и увеличить их копийность, так как предполагаемая эффективность трансформации в клетки *C. cinerea* низка (около 20%).



**Рисунок 19.** Схема пошаговой амплификации *hd* генов и интеграции ПЦР-продукта в вектор pYSK7 для последующей экспрессии в монокариотических гаплоидных клетках *C. cinerea*.

В будущих экспериментах планируется провести трансформацию десяти полученных конструкций, несущих *hd* гены под собственным или конститутивным промотором, в монокариотические гаплоидные клетки штаммов FA2222 и AT3 *C. cinerea* (May, Matzke, 1995; Kertesz-Chaloupková *et al.*, 1998). Выбор штаммов *C. cinerea* был неслучайным. Лocus *matA* у представителей данного вида характеризуется сложной структурой и состоит из нескольких групп *hd* генов (кассет *a*, *b*, *d*). У различных штаммов в пределах вида *C. cinerea* встречаются штаммы с делециями одного или нескольких генов внутри кассет (Casselton, Olesnický, 1998). Поэтому для максимальной вероятности аллельных взаимодействий между *hd* генами от гетерологичных хозяев - *C. cinerea* и *P. ostreatus* - необходимо было подобрать такие штаммы *C. cinerea*, которые содержали бы гены гомеодоменных белков HD1 и HD2

во всех трех кассетах. Среди присутствовавших в коллекции штаммов *C. cinerea* не было ни одного штамма с аллелем локуса *matA*, имеющим полный набор всех трех групп *hd* генов (*a*, *b*, *d*; без частичных делеций). В связи с этим для экспериментов по клонированию и экспрессии чужеродных гомеодоменных последовательностей были выбраны два штамма с взаимно перекрывающимися по полноте набора *hd* генов кассетами: штамм FA2222 (отсутствует *d1* ген в *matA* локусе, аллель *A5*) и штамм AT8 (отсутствуют *a2* и *d2* гены в *matA* локусе; аллель *A43*). Оба штамма для трансформации являются ауксотрофными по триптофану. Ранее было показано, что для увеличения эффективности трансформации клеток *C. cinerea* требуется так называемая котрансформация, или параллельная трансформация двумя плазмидами (Binninger *et al.*, 1987; Dörnte, Kües, 2012). Для проведения котрансформации предложено использовать плазмиду pCc1001 (*trp1*+), отбор рекомбинантов по которой будет проводиться по признаку восстановления прототрофности по триптофану у трансформантов *C. cinerea* (Binninger *et al.*, 1987). В ходе будущих экспериментов планируется провести котрансформацию каждой из полученных рекомбинантных конструкций *hd* генов в составе pYSK7 плазмиды с вектором pCc1001. Трансформанты *C. cinerea* будут проанализированы на наличие пряжек или пряжкоподобных структур. Кроме того, будет произведена тройная котрансформация с вектором pCc1001 конструкций, содержащих гены класса *hd1* и *hd2*, которые принадлежат разным аллелям *matA* локуса, в качестве положительного контроля аллельного взаимодействия (образование пряжек). Теоретически, у подобных трансформантов должно происходить регулирование экспрессии генов дикариогенеза за счет образования активного HD1-HD2 гетеродимера, сформированного генопродуктами генов от разных аллелей *matA* локуса *P. ostreatus*. Кроме того, по наличию или отсутствию образования пряжек можно будет судить о совместимости систем регулирования экспрессии генов дикариогенеза у разных групп базидиальных грибов. Таким образом, эксперименты по трансформации полученных рекомбинантных конструкций *hd* генов гриба *P. ostreatus* в гаплоидные клетки гетерологичного хозяина *C. cinerea* позволят изучить механизм взаимной совместимости и функционального взаимодействия гомеодоменных белков от гетерологичных хозяев с последующим формированием функциональных гетеродимерных факторов транскрипции, а также проанализировать сходство систем генетического контроля полового размножения у различных групп базидиальных грибов.

#### Глава 4. Заключение

В работе было проведено молекулярное генотипирование десяти видов рода *Pleurotus* - *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. pulmonarius*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae*, *P. calyptratus*, *P. citrinopileatus* -, включая два вида, образующих анаморфные коремияльные стадии, - *P. cystidiosus* и *P. dryinus*. При разработке системы баркодов для представителей рода *Pleurotus* помимо штаммов из нашей коллекции в анализ были взяты ITS1-5.8S-ITS2 последовательности восьми редких видов из ГенБанка, которые не представлены в коллекции: виды *P. abieticola*, *P. albidus*, *P. australis*, *P. fuscoquamus*, *P. levis*, *P. populinus*, *P. purpureo-olivaceus*, *P. tuber-regium*. Многие из исследованных видов вешенок являются съедобными, а такие виды как *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *P. djamor*, *P. cornucopiae* широко культивируются по всему миру в промышленных масштабах для пищевых целей. Для молекулярного генотипирования, или баркодинга, было предложено четыре маркера на основе сайтов рестрикции ITS последовательностей. Поиск уникальных сайтов рестрикции сначала проводили *in silico* с последующей апробацией в эксперименте. Из 35 проанализированных *in silico* рестриктаз только три фермента были способны дифференцировать виды *Pleurotus*: эндонуклеазы *AluI*, *BsuRI*, *HinPI*, а также *EcoRI* в качестве вспомогательной при двойной рестрикции. Уникальные сайты рестрикции и размер фрагментов рестрикции служили в качестве молекулярных маркеров (баркодов) для идентификации видов. В результате молекулярного генотипирования на основе баркодов 18-ти видов рода *Pleurotus* было выявлено 17 генотипов. Генотипы близкородственных видов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* были идентичны, поэтому дифференциация данных видов на основе предложенных молекулярных маркеров была затруднена. Трудно дифференцируемыми на основе молекулярных баркодов оказались также виды *P. cornucopiae* и *P. euosmus*. Экспериментально была подтверждена эффективность молекулярной идентификации видов рода *Pleurotus* при помощи рестрикционного анализа амплифицированной ITS1-5.8S-ITS2 последовательности с использованием четырех подобранных эндонуклеаз рестрикции *AluI*, *BsuRI*, *HinPI* и *EcoRI*. Предложенный метод баркодинга является хорошей альтернативой рутинному секвенированию ITS последовательностей (особенно при анализе большого количества образцов) в виду того, что он является более дешевым и менее затратным по времени.

Экспериментальные данные по генотипированию были подтверждены филогенетическим анализом. На основе отсеквенированных ITS последовательностей 31 штамма вешенок из нашей коллекции и девяти референсных ITS последовательностей из ГенБанка было построено филогенетическое дерево родства между видами, а также подсчитаны эволюционные дистанции между видами. Показано монофилетическое

происхождение видов рода *Pleurotus*. Полученные данные по подразделению видов на клады, а также эволюционные дистанции между ними показали полное соответствие результатам, полученным при создании системы молекулярного ITS-баркодинга для видов рода *Pleurotus*.

Видовая дифференциация на основе ITS последовательностей оказалась затруднительной для близкородственных видов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius*, а также *P. cornicopiae* и *P. euosmus*. В этих случаях дифференциация по молекулярным признакам сопровождалась анализом репродуктивной изоляции с использованием скрещиваний монобазидиоспоровых тестеров половой совместимости. Согласно биологической концепции вида, анализ репродуктивной изоляции является одним из основных критериев разграничения видов. Базидиальные грибы обладают наиболее эволюционно продвинутой системой половой совместимости – тетраполярным гетероталлизмом, обеспечивающим наибольшее генетическое разнообразие популяций среди имеющихся у грибов систем полового воспроизведения. Контроль половой совместимости при тетраполярном гетероталлизме осуществляется двумя несцепленными *mat* локусами со множественными аллелями.

Детальный анализ половой совместимости на основе *мон-мон* скрещиваний был проведен между близкородственными видами *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* и видами *P. euosmus* и *P. cornicopiae*. Филогенетический анализ не позволил достоверно разделить (дифференцировать) данные виды. Для анализа половой совместимости предварительно были получены монобазидиоспоровые тестеры (для каждого вида) путем проведения *мон-мон* скрещиваний между базидиоспоровым потомством, полученным из плодовых тел. По результатам скрещиваний тестеров спорных видов было показано, что, несмотря на сходство морфологии и ITS последовательностей, виды *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* являются репродуктивно изолированными, и, следовательно, отдельными видами. Во всяком случае, это заключение правомерно для трех штаммов *P. sajor-caju*, использованных в настоящем анализе. Следует заметить, что видовой статус *P. sajor-caju* до сих пор обсуждается в литературе. В результате скрещиваний между тестерами видов *P. euosmus* и *P. cornicopiae* не было выявлено репродуктивной изоляции: исследованные штаммы были совместимы по полу. Следовательно, данные виды относятся к одной интерстерильной группе, и статус редко встречающейся вешенки *P. euosmus* как самостоятельного вида остается под вопросом.

По результатам филогенетического анализа четкую подразделенность на подкластеры наблюдали между культивируемыми сортами и природными изолятами *P. ostreatus*. Для некоторых представителей как культивируемых, так и природных штаммов были получены

тестеры половой совместимости. В ходе скрещиваний репродуктивной изоляции между культивируемыми штаммами и природными изолятами *P. ostreatus* выявлено не было. Однако у некоторых культивируемых сортов был обнаружен общий аллель *matB* локуса, что свидетельствует об общем происхождении штаммов.

В работе проводили культивирование грибов с целью получения плодовых тел и споровых отпечатков. Плодовые тела получали как в стерильных условиях непосредственно на чашках Петри, так и путем лабораторного культивирования на растительных субстратах. Семь из девяти проанализированных видов давали плодовые тела при культивировании в стеклянных банках и пластиковых мешках на пшеничной соломе в качестве субстрата. Помимо съедобных видов вешенки (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. djamor*, *P. cornucopiae*) были получены плодовые тела для некоторых несъедобных или условно съедобных видов (*P. calyptratus*, *P. cystidiosus*). Впервые в лабораторных условиях были получены полноценные плодовые тела для изолятов несъедобного вида *P. calyptratus*. Наилучшую урожайность на субстрате из пшеничной соломы показали представители видов *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. djamor* и *P. sajor-caju* с выходом плодовых тел от массы субстрата, равным 97%, 87%, 85%, 84% и 79% соответственно. Штамм вида *P. cystidiosus*, образующий анаморфную коремияльную стадию, показал наилучшие результаты как по продуктивности, так и по срокам плодоношения первой волны (15-19 сутки). Для всех участвовавших в эксперименте видов, кроме *P. calyptratus*, были получены по две волны плодоношений. Виды *P. eryngii*, *P. dryinus*, *P. citrinopileatus* не образовывали плодовых тел в лабораторных условиях.

Одной из задач исследования было проведение *in silico* молекулярно-структурного анализа *matA* локуса половой совместимости. Локус *matA* кодирует гомеодоменные белки (HD), которые выполняют функцию транскрипционных факторов, участвуя в образовании и мофрогенезе дикариотического фертильного мицелия. Проведенный анализ *in silico* аминокислотных последовательностей генов гомеодоменных белков *matA* локуса половой совместимости для видов *P. ostreatus*, *P. djamor* и *P. eryngii* показал наличие у всех консервативных мотивов ДНК-связывающих доменов и высоковариабельных димеризационных доменов на N-конце белковых молекул. Более детальный анализ был проведен на двух гаплоидных штаммах *P. ostreatus* – PC9 и PC15, геномы которых полностью секвенированы и опубликованы на сайте DOE JGI (Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA; <http://genome.jgi.doe.gov/>). Штаммы PC9 и PC15 были получены от одного и того же дикариотического родителя путем дедикариотизации. Анализ *in silico* показал чрезвычайно дивергентную структуру *matA* локуса у этих штаммов: *matA* локус штамма PC9 представлен одной копией гена *hd1* (класс HD1 белков) и одной копией гена *hd2* (класс HD2

белков), в то время как *mata* locus штамма PC15 имеет две копии *hd1.1* и *hd1.2* (класс HD1) и одну копию *hd2* (класс HD2). Кроме того, в ходе анализа было выявлено, что нуклеотидные последовательности *hd* генов очень вариабельны, и сравнение их последовательностей возможно исключительно на аминокислотном уровне. В результате анализа аминокислотных последовательностей *in silico* было показано, что все исследуемые HD белки обладают глобулярной структурой и характеризуются ядерной локализацией. У всех HD последовательностей был обнаружен вариабельный N-конец, участвующий в димеризации HD1-HD2 белков и образовании гетеродимерного белка - активного транскрипционного фактора, а также более консервативный ДНК-связывающий домен. У обоих классов HD последовательностей была предсказана вторичная структура ДНК-связывающего домена, характерная для данного семейства белков: три  $\alpha$ -спирали, соединенные небольшими петлями. В третьей спирали находится ДНК-связывающий мотив **WFXNXXR**, первая и вторая спирали участвуют в связывании ДНК и стабилизации комплекса. Для всех последовательностей были предложены модели структурной организации ДНК-связывающего домена, а также предложены модели связывания с ДНК.

В данной работе было также проведено клонирование исследуемых *hd* генов *mata* локуса штаммов PC9 и PC15 (гены *hd1*, *hd2*, *hd1.1*, *hd1.2*, *hd2*). Было получено десять конструкций на основе пяти *hd* генов двух классов под собственным и конститутивным промоторами в рекомбинантном векторе pYSK7, пригодном для эукариотической трансформации. Для этого последовательности генов были амплифицированы в два этапа на матрице геномной ДНК двух штаммов (PC9 и PC15) с предварительно подобранными химерными праймерами. Клонирование в вектор pYSK7 проводили методом гомологичной рекомбинации в клетках дрожжей. Амплификацию *hd* последовательностей проводили в два этапа с целью увеличения области гомологии ампликона с плазмидой и, соответственно, повышения эффективности интеграции амплифицированного фрагмента ДНК в вектор. Полученные конструкции в дальнейшем планируется трансформировать в гаплоидные клетки *C. cinerea* с целью анализа взаимной совместимости систем размножения различных видов базидиальных грибов.

## Выводы

1. Разработан подход для молекулярного генотипирования и молекулярной идентификации видов рода *Pleurotus* - баркодинг - на основе рестрикционного анализа ITS-последовательности; для баркодинга предложено использовать четыре эндонуклеазы рестрикции – *AluI*, *BsuRI*, *HinfI* и *EcoRI* в качестве вспомогательной. Данный метод позволяет быстро определить видовую принадлежность штаммов, не используя процедуру секвенирования.
2. При анализе 18 видов рода *Pleurotus* было выявлено 17 генотипов. Показано, что генотипирование штаммов *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. cornucopiae* и *P. euosmus* на основе молекулярных маркеров требует дополнительного анализа половой совместимости. Для разграничения близкородственных видов базидиальных грибов необходимо применять комплексный подход, сочетающий молекулярные и классические генетические методы.
3. Показано, что виды *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius*, несмотря на сходство морфологии и идентичность ITS последовательностей рДНК кластера, являются репродуктивно изолированными видами. Виды *P. euosmus* и *P. cornucopiae* не показали наличия репродуктивного барьера, следовательно, это один биологический вид.
4. Проведенный *in silico* молекулярный структурный анализ генов гомеодоменных белков *matA* локуса половой совместимости для видов *P. ostreatus*, *P. djamor* и *P. eryngii* показал наличие у этих видов консервативных мотивов **WFXNXR** в ДНК-связывающих доменах и высоковариабельных димеризационных доменов на N-конце.
5. Показана чрезвычайно дивергентная структура *matA* локуса у двух совместимых по полу гаплоидных штаммов (PC9 и PC15) вида *P. ostreatus*: *matA* локус штамма PC9 представлен одной копией гена *hd1* и одной копией гена *hd2*, в то время как *matA* локус штамма PC15 имеет две копии *hd1.1* и *hd1.2* и одну копию гена *hd2*.
6. Были созданы 10 рекомбинантных конструкций на основе pYSK7 вектора для трансформации *hd* генов *P. ostreatus* в клетки *C. cinerea* с целью анализа их экспрессии.



### Список литературы

1. Алтухов Ю.П. Вид и видообразование // Соросовский Образовательный Журнал. - 1997. – Т. 4. - С. 2–10.
2. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. - М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. – 431 с.
3. Гарибова Л.В., Сидорова И.И. Грибы. Энциклопедия природы России. - М.: ABF, 1997. - 352 с.
4. Дудка И.А., Вассер С.П. Справочник миколога и грибника. - Киев: Наукова думка, 1987. - 536 с.
5. Дьяков Ю.Т. Системы размножения грибов и их эволюция // Микология и фитопатология. - 1999. - Т. 33, вып. 3. - С. 137-149.
6. Майр Э. Принципы зоологической систематики. – М.: Мир, 1971. - 454 с.
7. Радзиевская М.Г. Проблема определения вида и структура популяций высших базидиальных грибов // Успехи совр. Биол. – 1987. - Т. 103. - С. 271-286.
8. Сержанина Г. И. Шляпочные грибы Белоруссии. — Минск: Наука и техника, 1984.
9. Шнырева А.А., Сиволапова А.Б., Шнырева А.В. Съедобные культивируемые грибы вешенки *Pleurotus sajor-caju* и *P. pulmonarius* сходны по морфологии, но являются самостоятельными репродуктивно изолированными видами // Генетика. - 2012. - Т. 48. - N11. - С. 1260-1270. (Shnyreva A.A., Sivolapova A.B., Shnyreva A.V. The commercially cultivated edible oyster mushrooms *Pleurotus sajor-caju* and *P. pulmonarius* are two separate species, similar in morphology but reproductively isolated // Rus. J. Genetics. - 2012. - Vol. 48. - N11. - P. 1080-1088)
10. Шнырева А.А., Шнырева А.В. Филогенетический анализ видов рода *Pleurotus* // Генетика. – 2014. – Т. 51. – N2. – С. 177-187.
11. Шнырева А.В. Род *Pleurotus* // Новое в систематике и номенклатуре грибов. М.: Национальная академия микологии – Медицина для всех. - 2003. – С.418-441.
12. Шнырева А.В. Геносистематика и проблема вида у грибов: подходы и решения // Микология и фитопатология. - 2011. - Т. 45, вып. 3. - С. 209-220.
13. Шнырева А.В. Популяционная генетика грибов // Микология сегодня, под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. М.: Национальная академия микологии. - 2007. – Т. 1. - С. 195-225.

14. Шнырева А.В., Белоконь Ю.С., Белоконь М.М., Алтухов Ю.П. Внутривидовое генное разнообразие вешенки устричной, *Pleurotus ostreatus*, изученное по совокупности аллозимных генов // Генетика. - 2004. - Т. 40. - N8. - С. 1068-1080. (Shnyreva A.V., Belokon Yu.S., Belokon M.M., Altukhov Yu.P. Interspecific genetic variability of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* as revealed by allozyme gene analysis // Rus. J. Genetics. - 2004. - Vol. 40. - N8. - P. 871-881)
15. Шнырева А.В., Дружинина И.С., Дьяков Ю.Т. Генетическая структура комплекса *Pleurotus ostreatus* sensu lato на территории Московской области // Генетика. - 1998. - Т. 34. - N12. - С. 1610–1618. (Shnyreva A.V., Druzhinina I.S., Dyakov Yu.T. Genetic structure of the *Pleurotus ostreatus* sensu lato complex in Moscow region // Rus. J. Genetics. - 1998. - Vol. 34. - N12. - P. 1371-1378.)
16. Шнырева А.В., Ломов А.А., Медников Б.М., Дьяков Ю.Т. Дифференциация видов и сортов вешенки (*Pleurotus spp.*) с помощью скрещиваний и молекулярных маркеров // Микология и фитопатология. - 1996. - Т. 30. - С. 37-44.
17. 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. - N5. - С. 667-674. (Shnyreva A.V., Shtaeer O.V. Differentiation of closely related oyster fungi *Pleurotus pulmonarius* and *P. ostreatus* by mating and molecular markers // Rus. J. Genetics. - 2006. - Vol. 42. - N5. - P. 539-545.)
18. Alberto E.O., Petersen R.H., Hughes K.W., Lechner B.E. Miscellaneous notes on *Pleurotus* // Persoonia. - 2002. - Vol. 18(1). - P. 55-69.
19. Amore A., Honda Y., Faraco V. Copper induction of enhanced green fluorescent protein expression in *Pleurotus ostreatus* driven by laccase *poxa1b* promoter // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – Vol. 332(2). – P. 155-163. doi: 10.1111/1574-6968.12023.
20. Anderson J.B., Kohn L.M. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground // Trends Ecol. Evol. - 1998. - Vol.13 (11). - P. 444-449.
21. Anderson N.A., Furneir G.R., Wang A.S., Schwandt J.W. The number and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sapidus* // Can. J. Bot. – 1991. – Vol. 69. – P. 2187-2191.
22. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling // Bioinformatics. – 2006. – Vol. 22. – P. 195-201.

23. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. 5th Edition. New York, USA: John Wiley & Sons. – 2002.
24. Avin F.A., Bhassu S., Shin T.Y., Sabaratnam V. Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes species // Mol. Biol. Rep. - 2012. - Vol. 39. - P. 7355-7364. doi 10.1007/s11033-012-1567-2.
25. Baars J., Sonnenberg A., Mikosch T., Griensven L. Development of a sporeless strain of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* // Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi; ed. L. Griensven. Vol. 1. Rotterdam, the Netherlands: A. A. Balkema. - 2000. - P. 317-323.
26. Bakkeren G., Jiang G., Warren R., Butterfield Y., Shin H., Chiu R., Schein J., Lee N., Kupfer D., Roe B., Jones S., Marra M., Kronstad J.W. Physical mapping of the genome of the fungal pathogen *Ustilago hordei* and annotation of the 500 kb *MAT-1* sequence // Fungal Genet Biol. – 2006. – Vol. 43. – P. 655-666.
27. Bakkeren G., Kamper J., Schirawski J. Sex in smut fungi: structure, function and evolution of mating-type complexes // Fungal Genet. Biol. - 2008. - Vol. 45S. - P. 15-21.
28. Bakkeren G., Kronstad J.W. Conservation of the *b* mating-type gene complex among bipolar and tetrapolar smut fungi // Plant Cell. – 1993. – Vol. 5. - P. 123-136.
29. Bakkeren G., Kronstad J.W. Linkage of mating-type loci distinguishes bipolar from tetrapolar mating in basidiomycetous smut fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1994. – Vol. 91. – P. 7085–7089.
30. Bakkeren G., Kronstad J.W. The pheromone cell signalling components of the *Ustilago a* mating-type loci determine intercompatibility between species // Genetics. – 1996. – Vol. 143. – P. 1601-1613.
31. Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases // BMC Microbiology. - 2010. Vol. 10. – P. 189-198.
32. Binniger D.M., Skrzynia C., Pukkila P.J., Casselton L.A. DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus* // The EMBO Journal. – 1987. – Vol. 6. – P. 835-840.
33. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Res. – 1979. – Vol. 7. - N6. – P. 1513–23.
34. Bolker M., Urban M., Kahmann R. The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components // Cell. - 1992. - Vol. 68. - P. 441-450.

35. Bonatti M., Karnopp P., Soares H.M., Furlan S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes // Food Chemistry. - 2004. - V. 88. - N3. - P. 425-428.
36. Bresinsky A., Fischer M., Meixner B., Paulus W. Speciation in *Pleurotus* // Mycologia. - 1987. – Vol. 79. - N2. - P. 234-245.
37. Casselton L.A., Kues U. The origin of multiple mating types in model mushrooms *Coprinopsis cinerea* and *Schizophyllum commune* // Sex in Fungi. Ed. J.Heitman, J.Kronstad, J.Taylor, L.Casselton. Washington DC, USA: ASM. - 2007. - P. 142-147.
38. Casselton L.A., Olesnický N.S. Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – Vol. 62. – P. 55-70.
39. Chandra S., Ghosh K., Acharya K. Comparative studies on the Indian cultivated *Pleurotus* species by RAPD fingerprinting // Nature and Science. - 2010. - Vol. 8. - N7. - P. 90-94.
40. Chiu S.W., Chan Y.H., Law S.C., Cheung K.T., Moore D. Cadmium and manganese in contrast to calcium reduce yield and nutritional values of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* // Mycol. Res. - 1998. - Vol. 102. – N4. - P. 449-457.
41. Coelho M.A., Sampaio J.P., Gonçalves P. A deviation from the bipolar-tetrapolar mating paradigm in an early-diverged basidiomycete // PLoS Genet. – 2010. - Vol. 6. - N8. – P. e1001052. doi: 10.1371/journal.pgen.1001052.
42. Corner E.J.H. The agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species // Beihefte zur Nova Hedwigia. - 1981. - Vol. 69. - P. 1-169.
43. Dagert M., Ehrlich S.D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells // Gene. – 1979. – Vol. 6. - N1. – P. 23-28.
44. Day P.R. The structure of the *A* mating-type factor in *Coprinus lagopus*: wild alleles // Genet. Res. – 1963. – Vol. 4. – P. 323-325.
45. Devier B., Aguileta G., Hood M.E., Giraud T. Ancient *trans*-specific polymorphism at pheromone receptor genes in basidiomycetes // Genetics. - 2008. - Vol. 181. - N1. – P. 209-223.
46. Dörnte B., Kües U. Reliability in Transformation of the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea* // Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. – 2012. - Vol. 6. - N3. – P. 340-355.
47. Eger G. Biology and breeding of *Pleurotus* // The biology of cultivation of edible mushrooms. N.Y.: Academic Press. - 1978. - P. 497-519.
48. Endler J.A. Natural selection in the wild. N.Y.: Princeton University Press. - 1986. – 267 p.

49. Erdmann S., Freihorst D., Raudaskoski M., Schmidt-Heck W., Jung E.M., Senftleben D., Kothe E. Transcriptome and functional analysis of mating in the basidiomycete *Schizophyllum commune* // Eukaryot. Cell. - 2012. - Vol. 11. - P. 571-589.
50. Eugenio C.P., Anderson N.A. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus* // Mycologia. – 1968. - Vol. 60. – P. 627-634.
51. Fleissner A., Diamond S., Glass N.L. The *Saccharomyces cerevisiae* *PRM1* homolog in *Neurospora crassa* is involved in vegetative and sexual cell fusion events but also has postfertilization functions // Genetics. - 2009. - Vol. 181. - P. 497-510.
52. Fleissner A., Simonin A.R., Glass N.L. Cell fusion in the filamentous fungus *Neurospora crassa* // Methods Mol. Biol. - 2008. - Vol. 475. - P. 21-38.
53. Fowler T.J., Mitton M.F., Rees E.I., Raper C.A. Crossing the boundary between the *B $\alpha$*  and *B $\beta$*  mating-type loci in *Schizophyllum commune* // Fungal Genet. Biol. - 2004. - Vol. 41. - P. 89-101.
54. Fowler T.J., Mitton M.F., Vaillancourt L.J., Raper C.A. Changes in mate recognition through alterations of pheromones and receptors in the multisexual mushroom fungus *Schizophyllum commune* // Genetics. - 2001. - Vol. 158. - P. 1491-1503.
55. Fries E. Systema Mycologicum. Berlin, Germany: Officina Berlingiana Press. - 1821.
56. Frøslev T.G., Jeppesen T.S., Læssøe T., Kjøller R. Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section *Calochroi* (Basidiomycota, Agaricales) in Europe // Mol. Phylogenet. Evol. - 2007. - Vol. 44. - N1. - P. 217–227.
57. Gerbi S.A. Evolution of ribosomal DNA // Molecular evolution. Chapter 7. Ed. R. McIntyre. - 1986. - P. 419-517.
58. Gietz R.D., Schiestl R.H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method // Nat. Protoc. – 2007. – Vol. 2. - N1. – P. 31-41.
59. Glass N.L., Rasmussen C., Roca M.G., Read N.D. Hyphal homing, fusion and mycelial inter connectedness // Trends Microbiol. - 2004. - Vol. 12. - P. 135-141.
60. Gola S., Kothe E. The little difference: *in vivo* analysis of pheromone discrimination in *Schizophyllum commune* // Curr. Genet. - 2003. - Vol. 42. - P. 276-283.
61. Gonzalez P., Labarere J. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial SSU rRNA V4, V6 and V9 domains // Microbiology. - 2000. - Vol. 146. - P. 209-221.

62. Grand E.A., Hughes K.W., Petersen R.H. Relationships within *Lentinus* subg. *lentinus* (Polyporales, Agaricomycetes), with emphasis on sects. *Lentinus* and *Tigrini* // Mycological Progress. - 2011. - Vol. 10. - P. 399–413.
63. Halsall J.R., Milner M.J., Casselton L.A. Three subfamilies of pheromone and receptor genes generate multiple *B* mating specificities in the mushroom *Coprinus cinereus* // Genetics. - 2000. - Vol. 154. - P. 1115-1123.
64. Harris D. Can you bank on GenBank? // Trends in Ecology and Evolution. - 2003. – Vol. 18. N7. – P. 317-319.
65. Hebert P., Cywinska A., Ball S.L., deWaardet J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proceedings of the Royal Society London, Biological Science. - 2003. – Vol. 270. – P. 313–321. doi 10.1098/rspb.2002.2218.
66. Heiman M.G., Walter P. Prmlp, a pheromone-regulated multispinning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating // J. Cell Biol. - 2000. - Vol. 151. - P. 719-730.
67. Hibbett D.S., Donoghue M.J. Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes // Syst. Biol. - 2001. - Vol. 50. - P. 215-242.
68. Hilber O. Valid, invalid and confusing taxa of the genus *Pleurotus* // Mushroom Science. - 1989. - Vol. 12. - P. 241-248.
69. Horton P., Nakai K. Better Prediction of Protein Cellular Localization Sites with the *k* Nearest Neighbors Classifier // Intelligent Systems for Molecular Biology. – 1997. – Vol. 5. – P. 147-152.
70. Hsueh Y.P., Heitman J. Orchestration of sexual reproduction and virulence by the fungal mating-type locus // Curr. Opin. Microbiol. – 2008. – Vol. 11. – P. 517–524.
71. Idowu O. Evaluation of different substrates and combinations on the growth of *Pleurotus pulmonarius* (Fries) Quelet (*P. sajor-caju*) // Nigerian Journal of Horticultural Science. - 2003. - Vol.8. - P. 112-221.
72. Inada K., Morimoto Y., Arima T., Murata Y., Kamada T. The *clp1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for *A*-regulated sexual development // Genetics. - 2001. - Vol. 157. - P. 133-140.

73. Iraçabal B., Zervakis G., Labarère J. Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of the restriction polymorphism in ribosomal DNA // Microbiology. - 1995. - Vol. 141. - P. 1479-1490.
74. Izumitsu K., Hatoh K., Sumita T., Kitade Y., Morita A., Gafur A., Ohta A., Kawai M., Yamanaka T., Neda H., Ota Y., Tanaka C. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR // Mycoscience. - 2012. - Vol. 53. – P. 396-401. doi 10.1007/s10267-012-0182-3.
75. James T.Y., Kauff F., Schoch C., Matheny P.B. et al. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny // Nature. - 2006. - Vol. 443. - P. 818-822.
76. James T.Y., Liou S.R., Vilgalys R. The genetic structure and diversity of the *A* and *B* mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor* // Fungal Genet. Biol. – 2004. – Vol. 41. – P. 813-825.
77. James T.Y., Srivilai P., Kues U., Vilgalys R. Evolution of the bipolar mating system of the mushroom *Coprinellus disseminatus* from its tetrapolar ancestors involves loss of mating-type-specific pheromone receptor function // Genetics. - 2006. - Vol. 172. - P. 1877-1891.
78. Kahmann R., Romeis T., Bolker M., Kamper J. Control of mating and development in *Ustilago maydis* // Curr. Opin. Genet. Dev. - 1995. - Vol. 5. - P. 559-564.
79. Kahmann R., Schirawski J. Mating in the smut fungi: from *a* to *b* to the downstream cascades // Sex in fungi. Ed. J.Heitman, J. Kronstad, J.Taylor, L.Casselton. Washington DC, USA: ASM Press. - 2007. - P. 377-387.
80. Kamada T. Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus* // Bioessays. - 2002. - Vol. 24. - P. 449-459.
81. Karaoglu H., Lee C.M., Meyer W. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes // Mol. Biol. Evol. - 2005. - Vol. 22. - N3. - P. 639-649.
82. Kashangura C., Hallsworth J., Mswaka A. Phenotypic diversity amongst strains of *Pleurotus sajor-caju*: implications for cultivation in arid environments // Mycological Research. – 2006. – Vol. 110. – N3. – P. 312-317.
83. Kertesz-Chaloupková K., Walser P.J., Granado J.D., Aebi M., Kues U. Blue light overrides repression of asexual sporulation by mating type genes in the basidiomycete *Coprinus cinereus* // Fungal Genet. Biol. – 1998. – Vol. 23. – P. 95–109.

84. Kilaru S. Identification of fungal multi-copper oxidase gene families: overexpression and characterization of *Coprinopsis cinerea* laccases for applications in biotechnology. PhD Thesis. Georg-August University of Göttingen, Göttingen, Germany. - 2006.
85. Ko Ko T.W., Stephenson S.L., Bahkali A.H., Hyde K.D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? // Fungal Diversity. - 2011. - Vol. 50. - P. 113-120.
86. Kong W.S. Chapter 4. Description of commercially important *Pleurotus* species // Mushroom Growers' Handbook 1. Seoul, Korea: MushWorld. - 2004. - P. 54-61.
87. Kothe E. Mating types and pheromone recognition in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* // Fungal Genet. Biol. - 1999. - Vol. 27. - P. 146-152.
88. Kües U. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2000. - Vol. 64. - P. 316-353.
89. Kües U., James T.Y., Heitman J. Mating type in Basidiomycetes: unipolar, bipolar and tetrapolar patterns of sexuality // The Mycota XIV. Ed. S.Pöggeler, J.Wöstemeyer. Germany: Springer. - 2011. - P. 97-150.
90. Kües U., Richardson W.V.J., Tymon M., Mutasa E.S., Göttgens B. The combination of dissimilar alleles of the *A $\alpha$*  and *A $\beta$*  gene complex, whose proteins contain homeodomain motifs, determines sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus* // Genes Dev. - 1992. - Vol. 6. - P. 568-577.
91. Kües U., Walser P.J., Klaus M.J., Aebi M. Influence of activated *A* and *B* mating type pathways on developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus* // Mol. Genet. Genom. - 2002. - Vol. 268. - P. 262-271.
92. Kurtzman R.H., Zadravil F. Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus* mushrooms // Tropical Mushrooms: Biological Nature and Cultivation Methods. Ed. S.T. Chang, T.H. Quimio. Hong Kong: Chinese Univ. Press. - 1982. - P. 299-348.
93. Kyte J., Doolittle R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein // J. Mol. Biol. - 1982. - Vol. 157. - P. 105-132.
94. Lakshmi B., Tilak J.C., Adhikari S., Devasagayam T.P.A., Janardhanan K.K. Inhibition of lipid peroxidation induced by  $\gamma$ -radiation and AAPH in rat liver and brain mitochondria by mushrooms // Current Science. - 2005. - Vol. 88. - N 3. - P. 484-488.
95. Larraya L., Peñas M.M., Pérez G., Santos C., Ritter E., Pisabarro A.G., Ramirez L. Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically linked



- to the *A* incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* // Curr. Genet. – 1999. – Vol. 34. – P. 486-493.
96. Larraya L.M., Pérez G., Iribarren I., Blanco J.A., Alfonso M., Pisabarro A.G., Ramírez L. Relationship between monokaryotic growth rate and mating type in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus* // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. - N8. – P. 3385–3390.
  97. Lechner B.E., Wright J.E., Albertó E. The genus *Pleurotus* in Argentina // Mycologia. – 2004. – Vol. 96. - N4. – P. 845-858.
  98. Lee S.B., Milgroom M.G., Taylor J.W. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi // Fungal Genet. Biol. - 1988. – Vol. 35. - P. 23-24.
  99. Lengeler K.B., Kothe E. Identification and characterization of *brt1*, a gene down-regulated during *B*-regulated development in *Schizophyllum commune* // Curr. Genet. - 1999a. - Vol. 35. - P. 551-556.
  100. Lengeler K.B., Kothe E. Mated: a putative peptide transporter of *Schizophyllum commune* expressed in dikaryons // Curr. Genet. - 1999b. - Vol. 36. - P. 159-164.
  101. Lengeler K.B., Wang P., Cox G.M., Perfect J.R., Heitman J. Identification of the *MATa* mating-type locus of *Cryptococcus neoformans* reveals a serotype A *MATa* strain thought to have been extinct // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 14455-14460.
  102. Li X.L., Yao Y.J. Revision of the taxonomic position of the Phoenix Mushroom // Mycotaxon.- 2005. – Vol. 91. – P. 61–73.
  103. Liou S.R. Evolutionary genetics of speciation in basidiomycetes: genetic studies of reproductive isolation in *Pleurotus djamor/calypttratus* complex. PhD Thesis. Duke University, Durham, North Carolina, USA. - 2000.
  104. Makino R., Kamada T. Isolation and characterization of mutations that affect nuclear migration for dikaryosis in *Coprinus cinereus* // Curr. Genet. - 2004. - Vol. 45. - P. 149-156.
  105. Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection // J. Mol. Biol. – 1970. – Vol. 53. - N1. – P. 159-62.
  106. Mannervik M. Target genes of homeodomain proteins // Bioessays. – 1999. – Vol. 21. – P. 267-270.
  107. Massee G.E. British Fungus-Flora. London, England: George Bell & Sons. - 1893. - Vol. 2. - P. 372.

108. May G., Matzke E. Recombination and variation at the *A* mating-type of *Coprinus cinereus* // Mol. Biol. Evol. – 1995. – Vol. 12. – P. 794-802.
109. Miyazono K., Zhi Y., Takamura Y., Nagata K., Saigo K., Kojima T., Tanokura M. Cooperative DNA-binding and sequence-recognition mechanism of *aristaless* and *clawless* // EMBO J. – 2010. – Vol. 29. - N9. – P. 1613-1623.
110. Morgenstern B. DIALIGN: Multiple DNA and Protein Sequence Alignment at BiBiServ // Nucl. Acids Res. – 2004. – Vol. 32. – P. W33-W36.
111. Murata Y., Fujii M., Zolan M.E., Kamada T. Molecular analysis of *pcc1*, a gene that leads to *A*-regulated sexual morphogenesis in *Coprinus cinereus* // Genetics. - 1998. - Vol. 149. - P. 1753-1761.
112. Nauman A., Navarro-González M., Sánchez-Hernández O., Hoegger P.J., Kües U. Correct identification of wood-inhabiting fungi by ITS analysis // Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. - 2007. - Vol. 1. – P. 41–61.
113. Niculita-Hirzel H., Labbe J., Kohler A., le Tacon F., Martin F., Sanders I.R., Kues U. Gene organization of mating type regions in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* reveals distinct evolution between the two mating type loci // New Phytol. - 2008. - Vol. 180. - P. 329-342.
114. Nilsson R., Ryberg M., Abarenkov K., Sjökvist E., Kristiansson E. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies // FEMS Microbiology Letters. - 2009. – Vol. 296. – P. 97-101.
115. Nilsson R., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Larsson K., Koljalg U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective // PLoS One. - 2006. – Vol. 1. - N1. – P. e59.
116. Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N., Larsson K.H. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the internal sequence databases and its implications for molecular species identification // Evolutionary Bioinformatics. - 2008. - Vol. 4. - P. 193-201.
117. Ohira I. A revision of the taxonomic status of *Pleurotus citrinopileatus* // Reports of the Tottori Mycological Institute. – 1990. – Vol. 28. – P. 143–150.
118. Oldenburg K.R., Vo K.T., Michaelis S., Paddon C. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast // Nucl. Acids Res. – 1997. – Vol. 25. - N2. – P. 451-452.
119. Owczarzy R., Tataurov A.V., Wu Y., Manthey J.A., McQuisten K.A., Almaguer H.G., Pedersen K.F., Lin Y., Garretson J., McEntaggart N.O., Sailor C.A., Dawson R.B., Peek A.S. IDT

- SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – Vol. 36. – P. W163–W169. doi:10.1093/nar/gkn198.
120. Parmasto E. *Pleurotus citrinopileatus*, one of the favourites // *Mycologist.* – 1987. – Vol. 1. - N3. – P. 106–107. doi:10.1016/S0269-915X(87)80076-9.
121. Pawlik A., Janusz G., Koszerny J., Małek W., Rogalski J. Genetic diversity of the edible mushroom *Pleurotus* sp. by amplified fragment length polymorphism // *Curr. Microbiol.* - 2012. - Vol. 65. - P. 438–445. doi:10.1007/s00284-012-0175-7.
122. Pegler D.N. The genus *Lentinus* // *Kew Bulletin Additional Series.* - 1983. – Vol. 10. - P. 1-281.
123. Petersen R.H., Hughes K.W. A new species of *Pleurotus* // *Mycologia.* – 1997. – Vol. 89. - N1. – P. 173-180.
124. Petersen R.H., Hughes K.W., Psurtseva N. Biological species in *Pleurotus* // *Pleurotus Website.* 2011. The University of Tennessee-Knoxville. <http://www.bio.utk.edu/mycology/Pleurotus/default.htm>
125. Petersen R.H., Krisai-Greilhuber I. Type specimen studies in *Pleurotus* // *Persoonia.* - 1999. - Vol. 17. - N2. - P. 201-219.
126. Petersen T.N., Brunak S., Heijne G., Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions // *Nature Methods.* – 2011. – Vol. 8. – P. 785-786.
127. Rajarathnam S., Bano Z. *Pleurotus* mushrooms. Part I A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 1987. – Vol. 26. - N2. – P. 157-223.
128. Raper J. Sexuality of higher fungi. N.Y., USA: The Roland Press. - 1966. - P. 1-283.
129. Raudaskoski M. The relationship between *B* mating type genes and nuclear migration in *Schizophyllum commune* // *Fungal Genet. Biol.* - 1998. - Vol. 24. - P. 207-227.
130. Raudaskoski M., Kothe E. Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling // *Eukaryot. Cell.* - 2010. - Vol. 9. - P. 847-859.
131. Raymond C.K., Pownder T.A., Sexson S.L. General method for plasmid construction using homologous recombination // *BioTechniques.* – 1999. – Vol. 26. - N1. – P. 134-141.
132. Richard G.F., Kerrest A., Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in Eukaryotes // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2008. - Vol. 72. - P. 686-727.

133. Robertson C.I., McMahon Kende A., Toenjes K., Novotny C.P., Ullrich R.C. Evidence for interaction of *Schizophyllum commune* Y mating-type proteins *in vivo* // Genetics. - 2002. - Vol. 160. - P. 1461-1467.
134. Rodriguez Estrada A.E., Jimenez-Gasco M., Royse D.J. *Pleurotus eryngii* species complex: sequence analysis and phylogeny based on partial *EF1 $\alpha$*  and *RPB2* genes // Fungal Biology. - 2010. - Vol. 114. - N5-6. - P. 421-428. doi:10.1016/j.funbio.2010.03.003.
135. Salame T.M., Knop D., Levinson D., Yarden O., Hadar Y. Redundancy amongst manganese-peroxidases in *Pleurotus ostreatus* // Appl. Environ. Microbiol. - 2013. - Vol. 79. - N7. - P. 2405-2015. doi: 10.1128/AEM.03849-12.
136. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 2001. - 478 p.
137. Sánchez C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2010. - Vol. 85. - N5. - P. 1321-1337. doi: 10.1007/s00253-009-2343-7.
138. Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi // Biotechnol. Adv. - 2009. - Vol. 27. - P. 85-194.
139. Sánchez C. Modern aspects of mushrooms culture technology // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2004. - Vol. 64. - P. 756-762.
140. Scherer M., Heimel K., Starke V., Kamper J. The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis* // Plant Cell. - 2006. - Vol. 18. - P. 2388-2401.
141. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2012. - Vol. 109. - N16. - P. 6241-6246.
142. Segedin B.P., Buchanan P.K., Wilkie J.P. Studies in the Agaricales of New Zealand: new species, new records and renamed species of *Pleurotus* (*Pleurotaceae*) // Aust. Syst. Bot. - 1995. - Vol. 8. - N3. - P. 453-482.
143. Shen G.P., Park D.C., Ullrich R.C., Novotny C.P. Cloning and characterization of *Schizophyllum* gene with *A $\beta$ 6* mating-type activity // Curr. Genet. - 1996. - Vol. 29. - P. 136-142.
144. Sikorski R.S., Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. - 1989. - Vol. 122. - N1. - P. 19-27.

145. Singer R. The Agaricales in modern taxonomy // Lilloa. - 1949. - Vol. 22. - P. 1-832.
146. Sivolapova A.B., Shnyreva A.V., Sonnenberg A., Baars I. DNA marking of some quantitative trait loci in the cultivated edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Fr.) // Russian Journal of Genetics. - 2012. – Vol. 48. - N4. - P. 383-389.
147. Srivastava M.A. Pink Coloured *Pleurotus djamor* (Rumph.) Boedijn from natural habitat of North Bihar, India // Current Science. – 2001. – Vol. 80. – N3. – P. 337-338.
148. Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Berkley, Ca., USA: Ten Speed Press. - 1993. - P. 544 - 574.
149. Stankis M.M., Specht C.A., Yang H., Giasson L., Ullrich R.C., Novotny C.P. The *Aα* mating locus of *Schizophyllum commune* encodes two dissimilar multiallelic homeodomain proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1992. - Vol. 89. - P. 7169-7173.
150. Takemaru T. Genetic studies on fungi. X. The mating system in Hymenomycetes and its genetic mechanism // Biol. J. Okayama Univ. – 1961. – Vol. 7. – P. 133-211.
151. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods // Mol. Biol. Evol. - 2011. - Vol. 28. - P. 2731-2739. <http://www.kumarlab.net/publications>
152. Vilgalys R., Moncalvo J.M., Liou S.R., Volovcek M. Recent advances in molecular systematics of the genus *Pleurotus* // Mushroom biology and mushroom products. ed: D.J. Royse. University Park, USA: Pennsylvania State University Press. - 1996. - P. 91–101.
153. Vilgalys R., Smith A., Sun B.L., Miller O.K. Intersterility groups in the *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada // Can. J. Botany. – 1993. – Vol. 71. - N1. – P. 113–128. doi:10.1139/b93-013.
154. Vilgalys R., Sun B. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1994. – Vol. 91. – P. 4599-4603.
155. Vilgalys<sup>2</sup> R., Sun B.L. Assessment of species distributions in *Pleurotus* based on trapping of airborne basidiospores // Mycologia. - 1994. - Vol. 86. - N2. - P. 270-274.
156. Wasser S.P., Weis A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective // Crit. Rev. Immunol. - 1999. – Vol. 19. - N1. - P. 65-96.

157. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols: a guide to methods and applications. Ed: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. New York, USA: Academic Press. - 1990. - P. 315–322.
158. Whitehouse H.L.K. Multiple-allelomorph heterotallism in the fungi // New Phytol. – 1949. – Vol. 48. - N2. – P. 212-244.
159. William C. Roody Mushrooms of West Virginia and the Central Appalachians. USA: The University Press of Kentucky. - 2003. – 42 P.
160. Wilson D.S., Guenther B., Desplan C., Kuriyan J. High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA // Cell. – 1995. – Vol. 82. - N5. – P. 709-719.
161. Yi R., Tachikawa T., Ishikawa M., Mukaiyama H., Bao D., Aimi T. Genomic structure of the *A* mating-type locus in bipolar basidiomycete, *Pholiota nameko* // Mycol. Res. - 2008. - Vol. 113. - P. 240-248.
162. Zervakis G. Mating competence and biological species within the subgenus *Coremiopleurotus* // Mycologia. - 1998. - Vol. 90. - P. 1063-1074.
163. Zervakis G., Balis C. A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa // Mycol. Res. - 1996. - Vol. 100. - N6. - P. 717–731.
164. Zervakis G., Sourdis J., Balis C. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis // Mycol. Res. - 1994. - Vol. 98. - P. 329-341.
165. Zervakis G.I., Moncalvo J.M., Vilgalys R. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa // Microbiology. - 2004. - Vol. 150. - P. 715–726.

#### **Интернет-ресурсы:**

[http://mycoweb.narod.ru/fungi/Pleurotus\\_calyptratus.html](http://mycoweb.narod.ru/fungi/Pleurotus_calyptratus.html)  
[www.fungalbarcoding.org](http://www.fungalbarcoding.org)  
<http://genome.jgi.doe.gov/>  
[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)  
[http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15\\_1/PleosPC15\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15_1/PleosPC15_1.home.html)  
[http://genome.jgi-psf.org/PleosPC9\\_1/PleosPC9\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/PleosPC9_1/PleosPC9_1.home.html)  
<http://dateandtime.info/>  
<http://technelysium.com.au>  
<http://www.megasoftware.net>  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

[www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)  
<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/welcome.html>  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>  
<http://psort.hgc.jp/>  
<http://wolfpsort.org/>  
<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>  
[http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools\\_sequencescan1](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_sequencescan1)  
<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>

### **Благодарности**

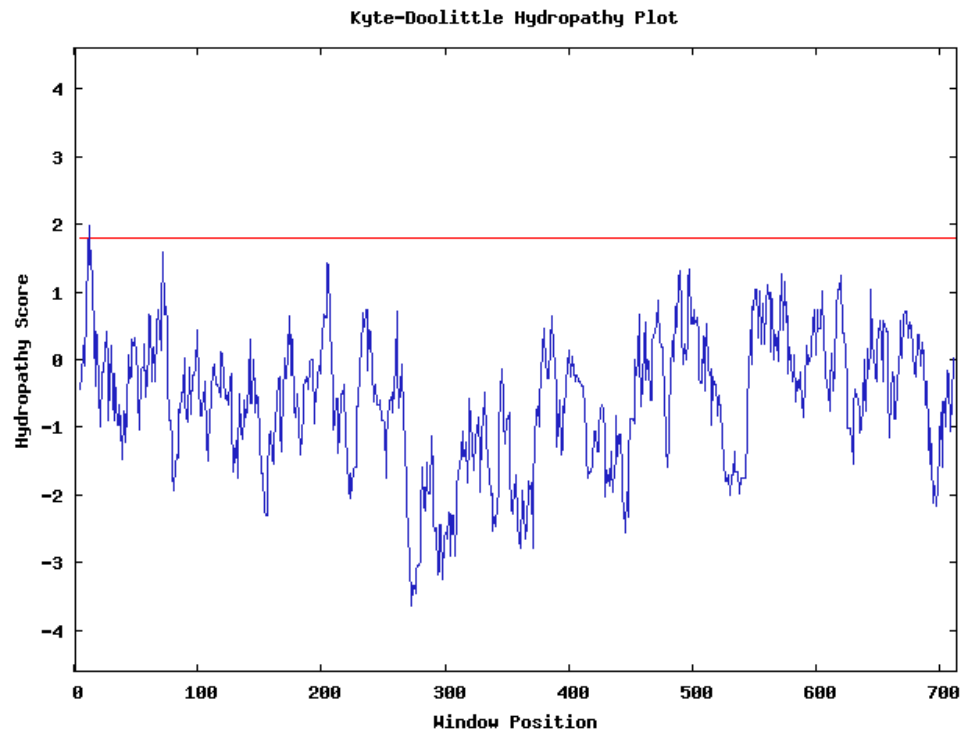
Я выражаю огромную благодарность своему научному руководителю д.б.н., профессору Дьякову Юрию Таричановичу за чуткое руководство и всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения работы. Искренне благодарю д.б.н., профессора Шныреву Аллу Викторовну за неоценимую помощь во время планирования и проведения экспериментов и научные консультации. Благодарю профессора Урсулу Кьюс и коллег из Лаборатории молекулярной лесной биотехнологии университета Геттингена, Германия, за гостеприимство во время моего визита. Отдельное спасибо всем сотрудникам кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, а также друзьям и близким.



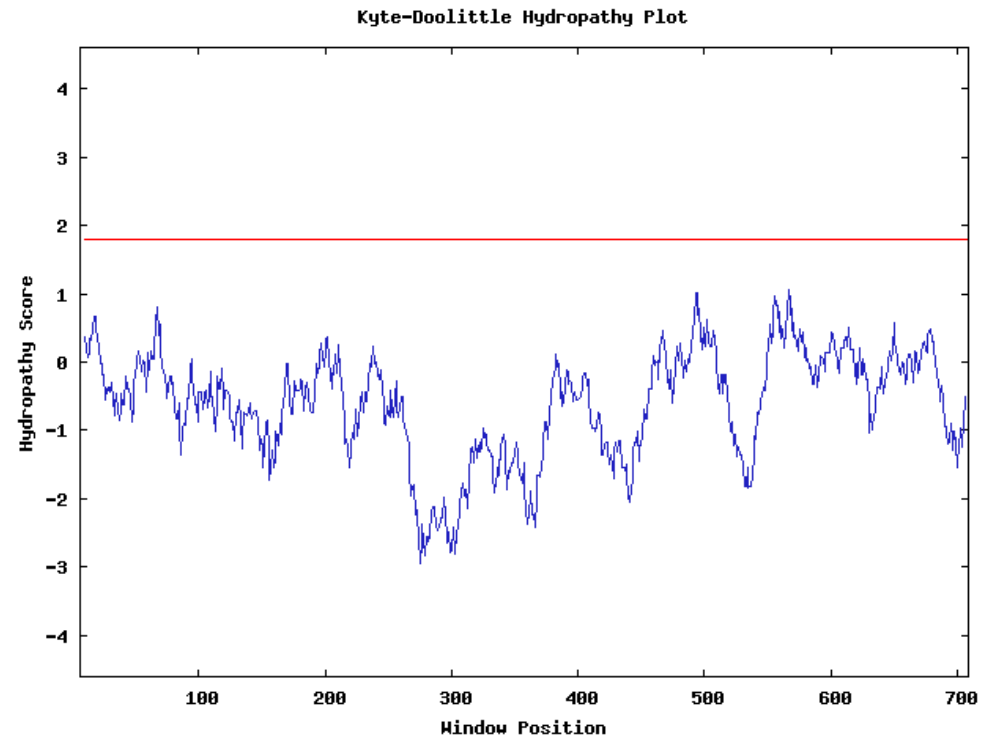
## Приложения

**Приложение 1.** Определение структурной организации гомеодоменных белков в программе Kyte Doolittle Hydropathy Plot (Kyte, Doolittle, 1982), основанное на гидрофильности/гидрофобности аминокислот, составляющих последовательность.

**Штамм PC15 белок HD1.1**

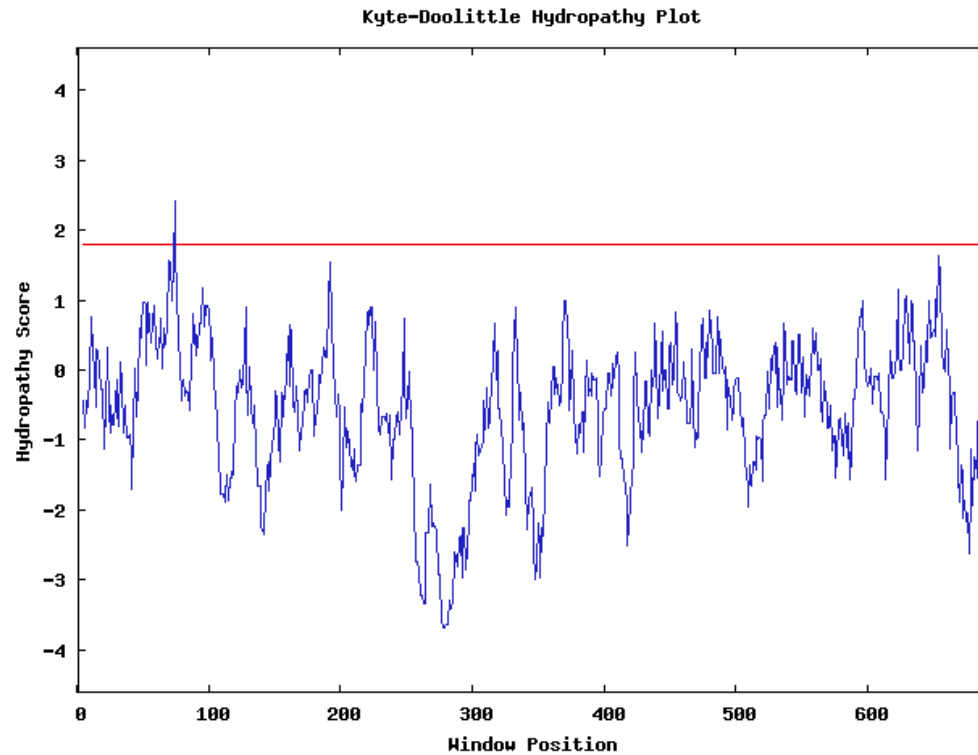


Query Statistics:  
Window Size = 9  
Start Position = 1  
End Position = 717  
Query Length = 717  
Effective Length = 709

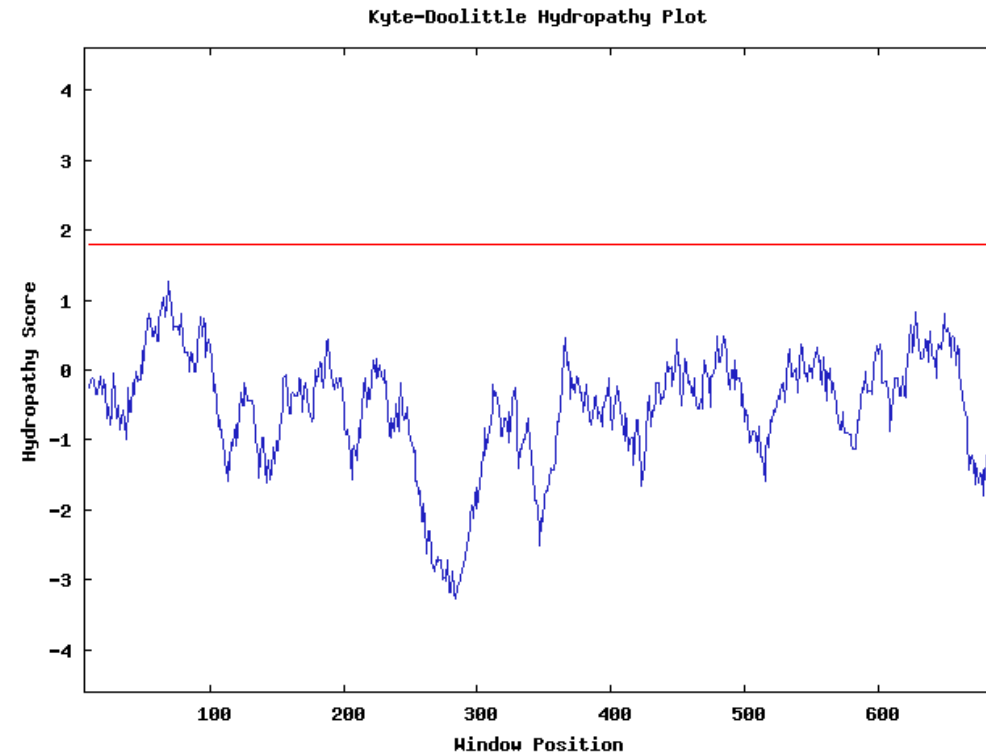


Query Statistics:  
Window Size = 19  
Start Position = 1  
End Position = 717  
Query Length = 717  
Effective Length = 699

## Штамм PC15 белок HD1.2

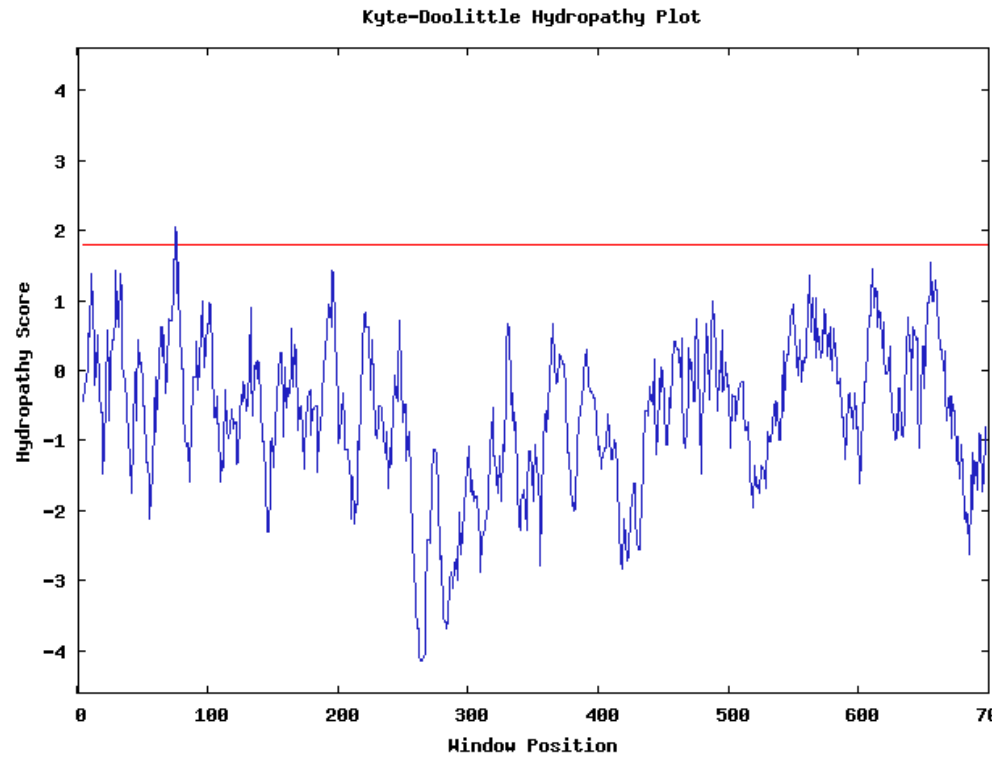


**Query Statistics:**  
Window Size = 9  
Start Position = 1  
End Position = 695  
Query Length = 695  
Effective Length = 687

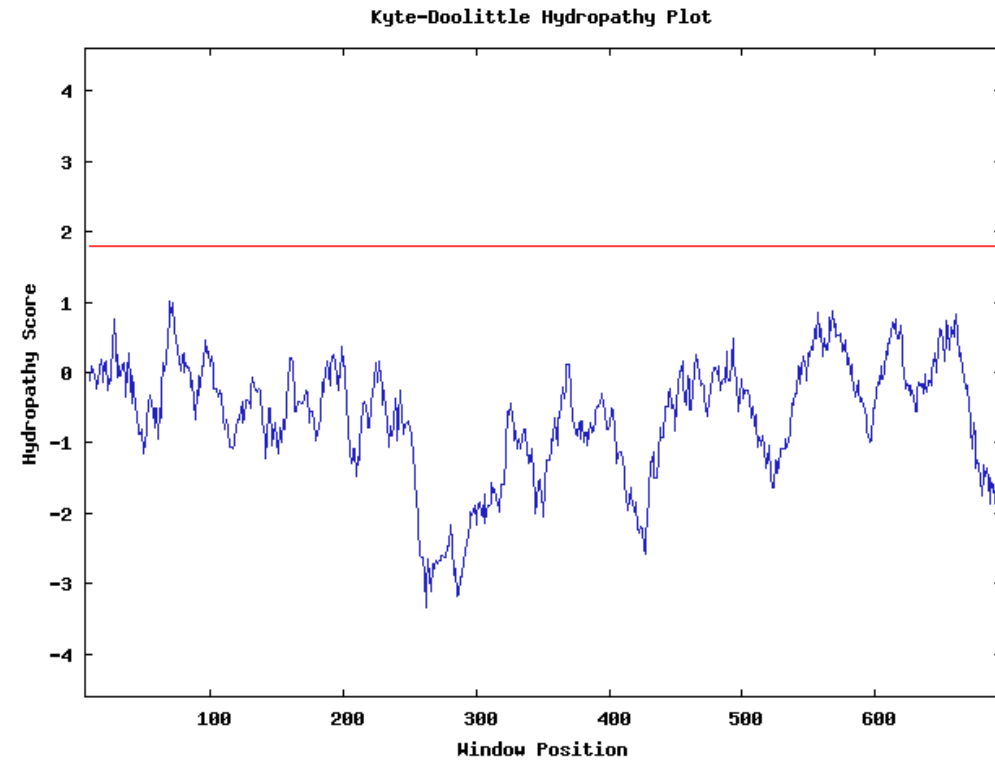


**Query Statistics:**  
Window Size = 19  
Start Position = 1  
End Position = 695  
Query Length = 695  
Effective Length = 677

## Штамм PC9 белок HD1

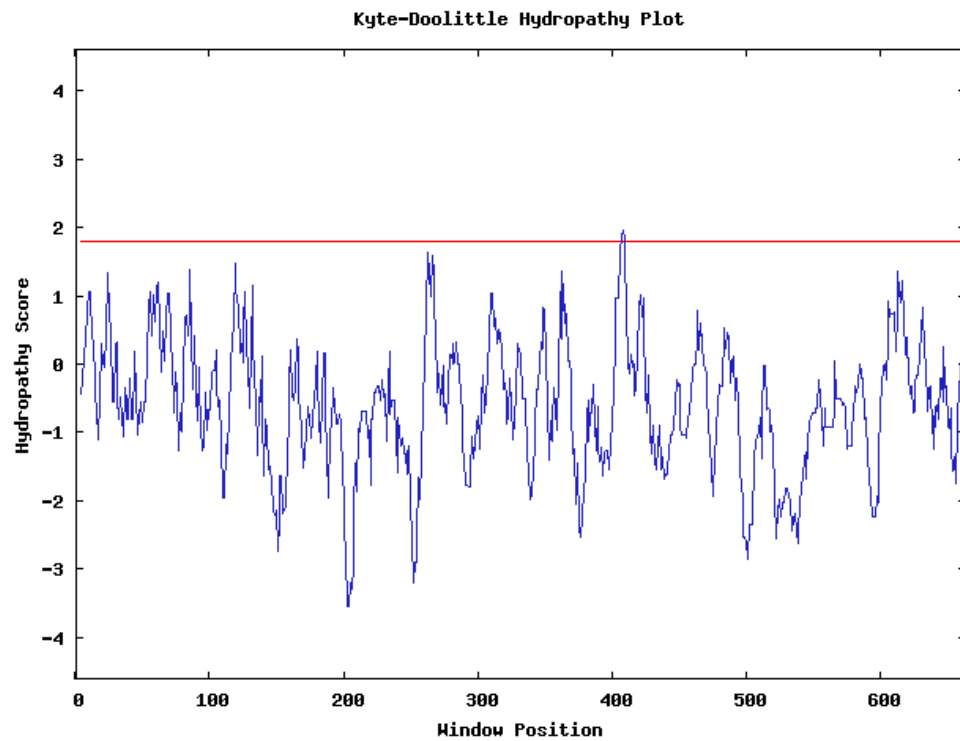


**Query Statistics:**  
Window Size = 9  
Start Position = 1  
End Position = 703  
Query Length = 703  
Effective Length = 695

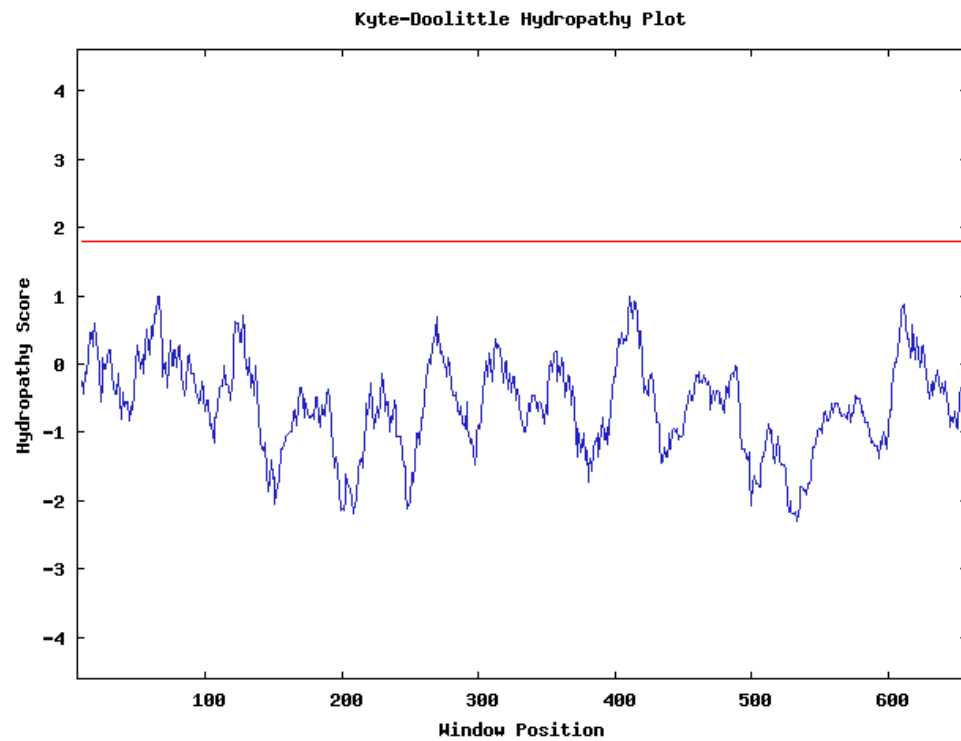


**Query Statistics:**  
Window Size = 19  
Start Position = 1  
End Position = 703  
Query Length = 703  
Effective Length = 685

## Штамм PC15 белок HD2

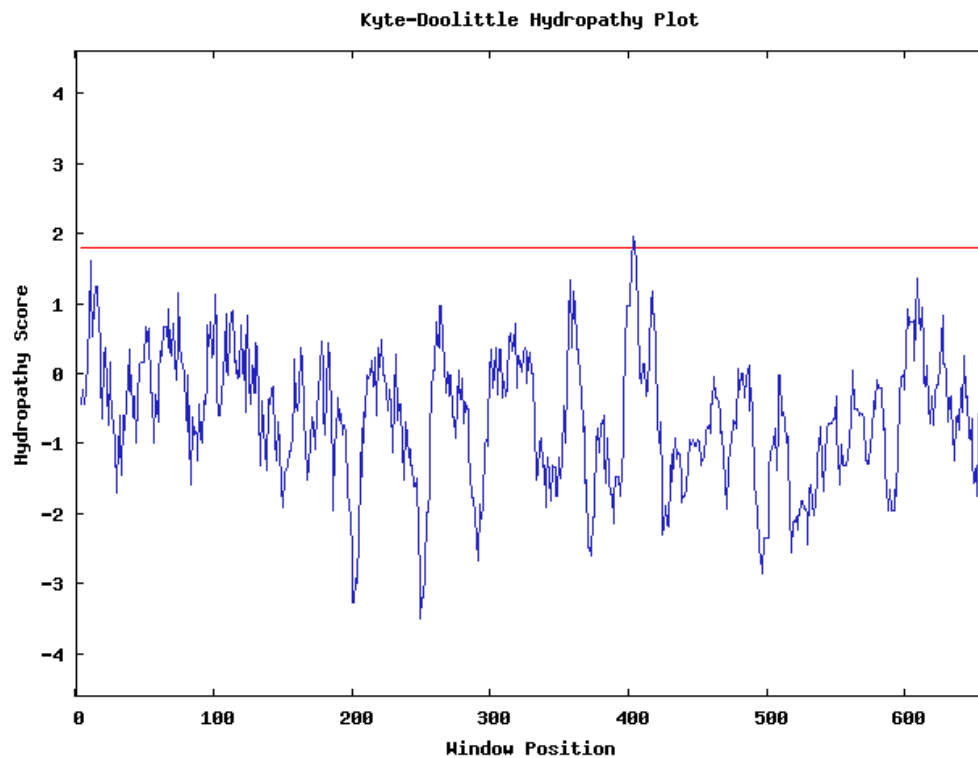


**Query Statistics:**  
Window Size = 9  
Start Position = 1  
End Position = 666  
Query Length = 666  
Effective Length = 658



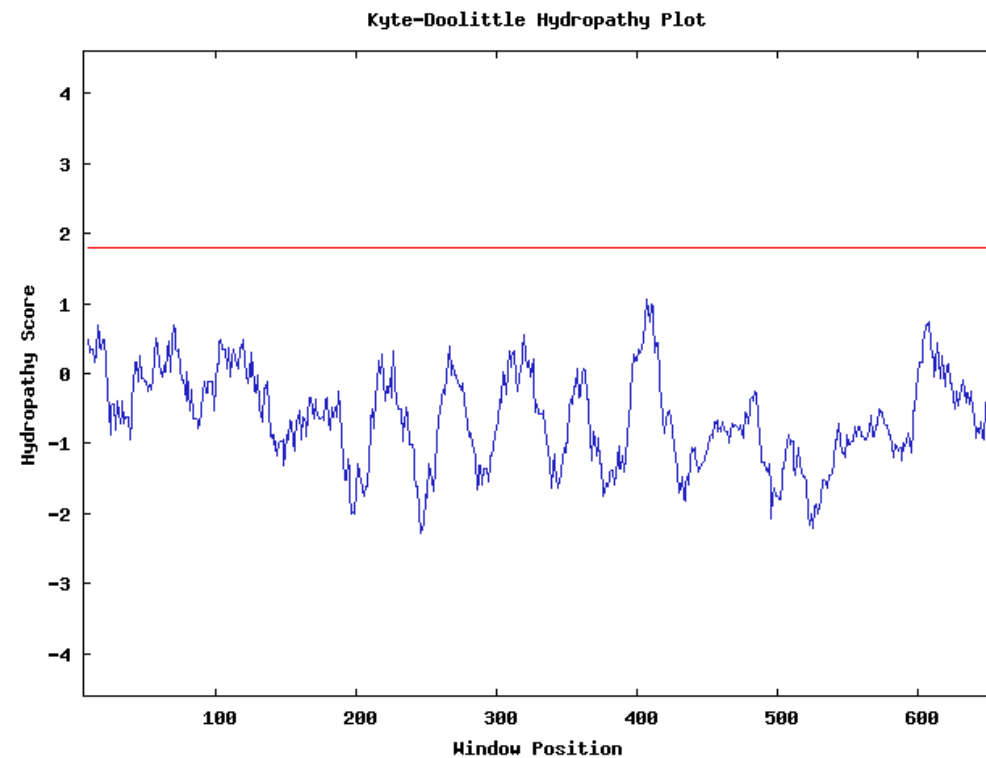
**Query Statistics:**  
Window Size = 19  
Start Position = 1  
End Position = 666  
Query Length = 666  
Effective Length = 648

## Штамм PC9 белок HD2



**Query Statistics:**  
Window Size = 9  
Start Position = 1  
End Position = 662  
Query Length = 662  
Effective Length = 654

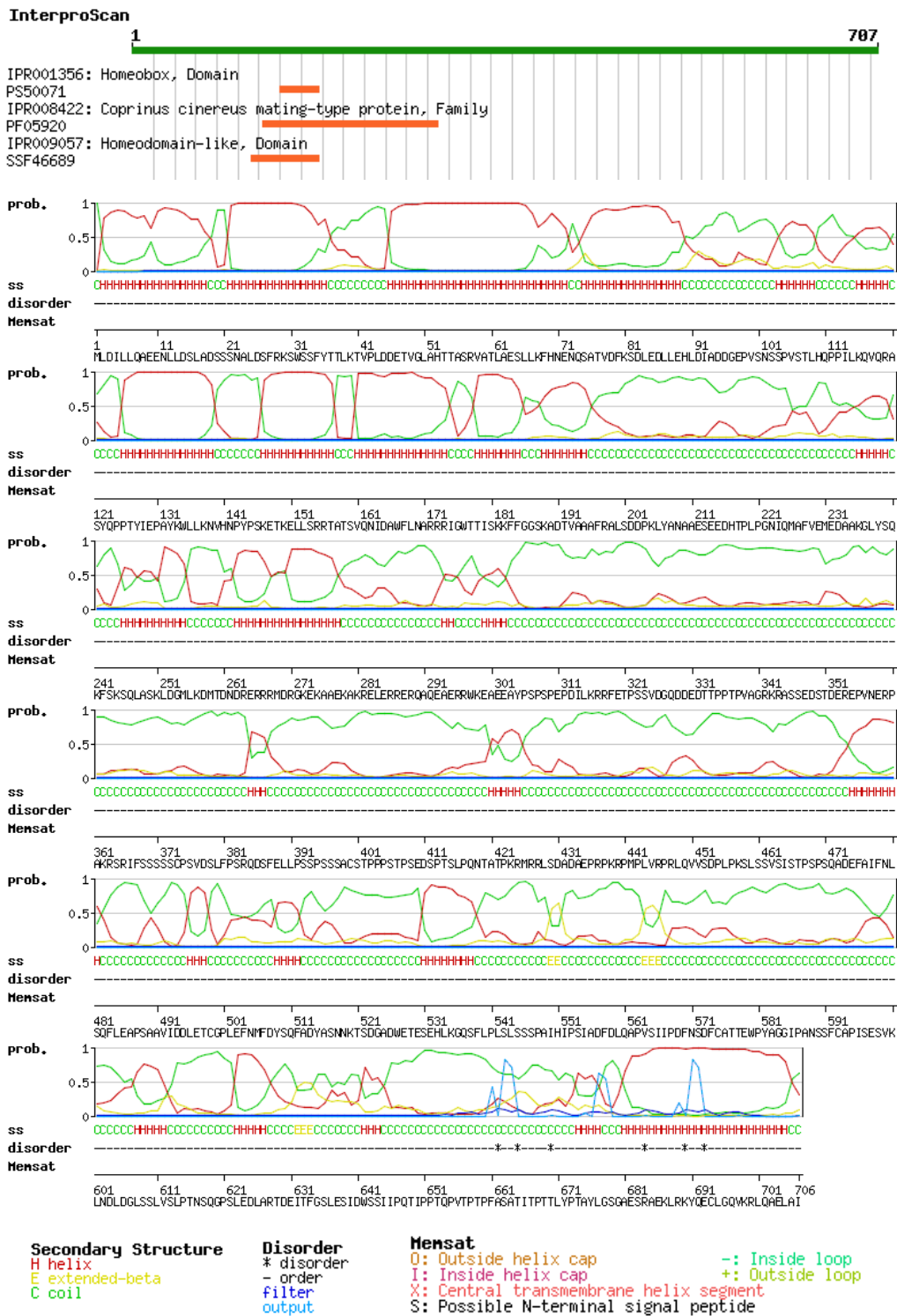
**Query Statistics:**  
Window Size = 19



Start Position = 1  
End Position = 662  
Query Length = 662  
Effective Length = 644

**Приложение 2.** Предсказание вторичной структурной организации белков класса HD1 и HD2 в программе SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006). Результаты анализа для белков класса HD1: штамм PC15 HD a1-2a (а), штамм PC15 HD a1-2b (б), штамм PC9 HD a1-1 (в). Для белков класса HD2: штамм PC15 HD a2-2a (г), PC9 HD a2-1 (д).

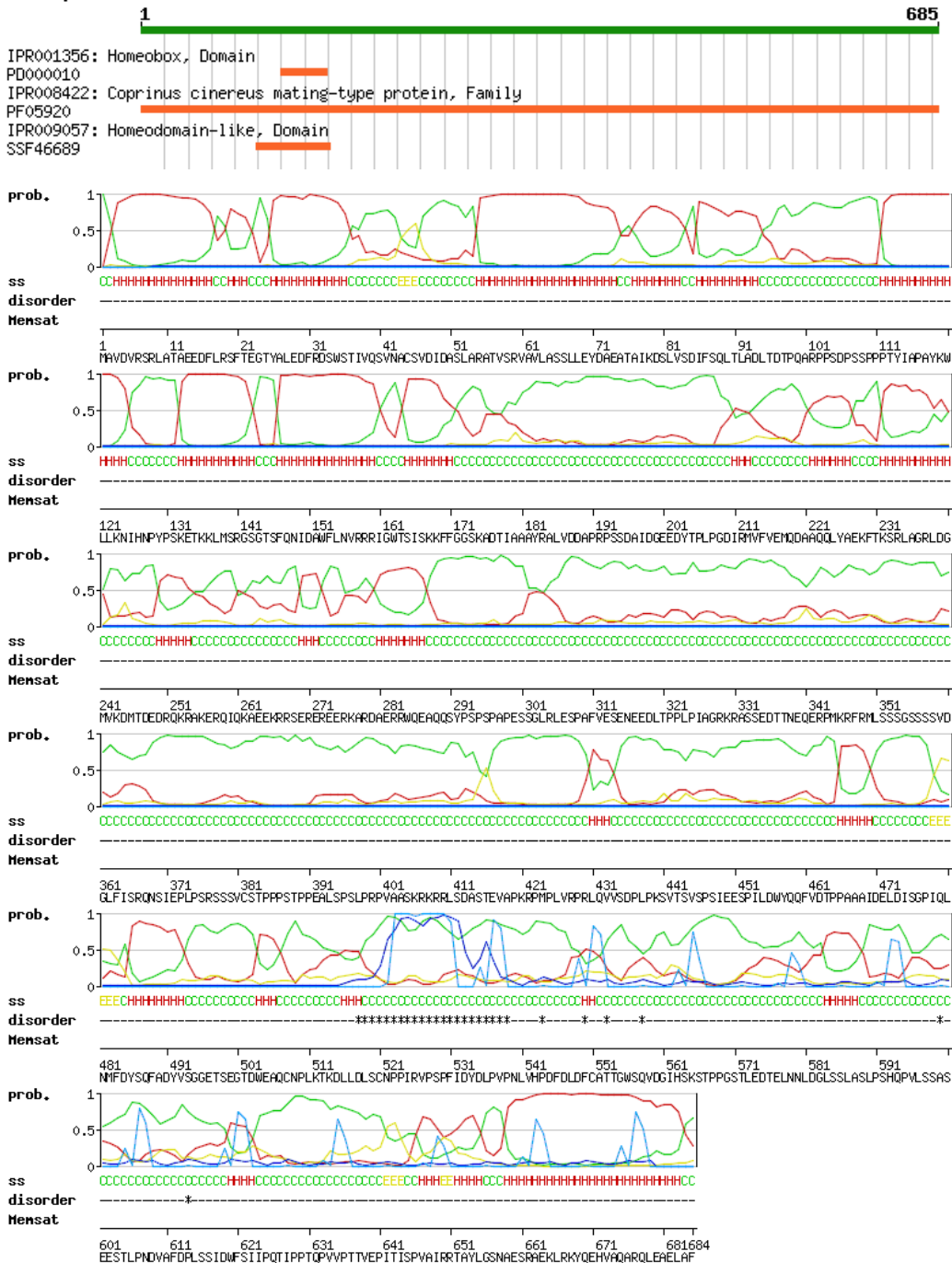
### а. Штамм PC15 белок HD1.1



IPR008422: *Coprinus cinereus* mating-type protein, Family  
 PF05920: 125 - 290 *Coprinus*\_mating  
 IPR009057: Homeodomain-like, Domain  
 SSF46689: 114 - 177 Homeodomain-like

## 6. Штамм PC15 белок HD1.2

### InterproScan

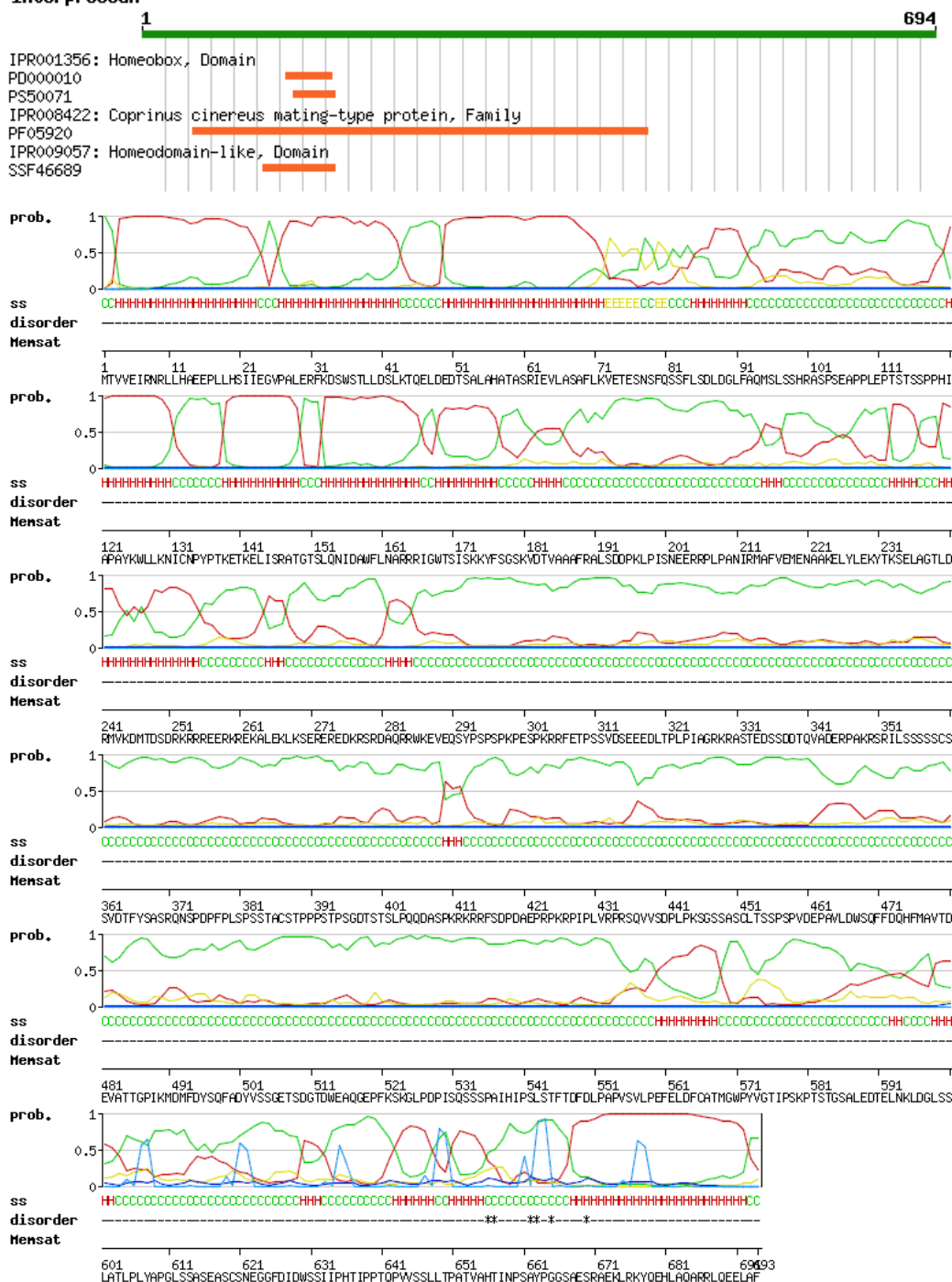


### InterproScan:

IPR001356: Homeobox, Domain  
 PD000010: 120 - 160 Q9VPL4\_DROME\_Q9VPL4;  
 IPR008422: *Coprinus cinereus* mating-type protein, Family  
 PF05920: 1 - 685 *Coprinus*\_mating  
 IPR009057: Homeodomain-like, Domain  
 SSF46689: 100 - 163 Homeodomain-like

## В. Штамм PC9 белок HD1

### InterproScan



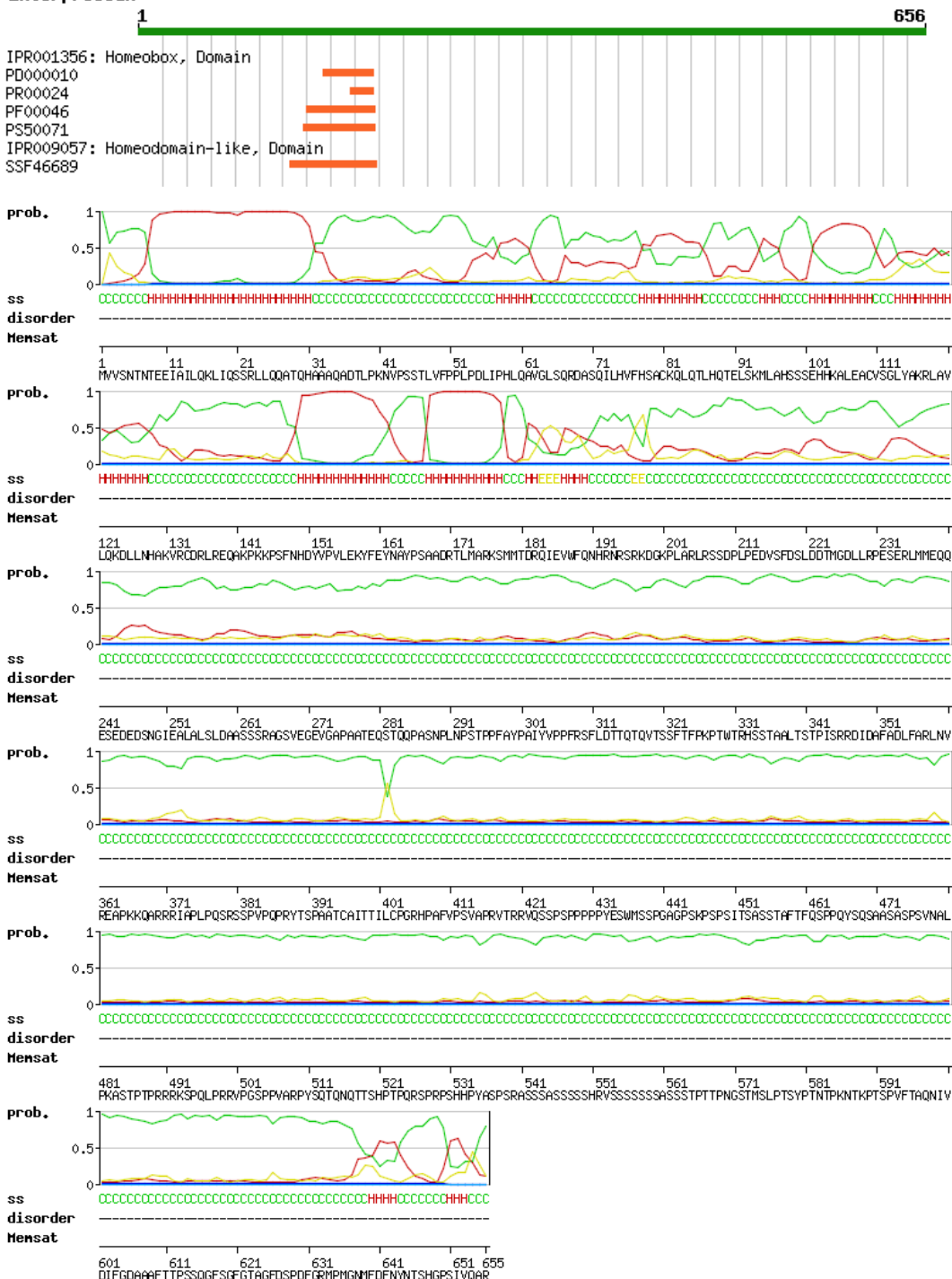
### InterproScan:

IPR001356: Homeobox, Domain  
PD000010: 126 - 166 Q7YTC4\_SACKO\_Q7YTC4;  
IPR001356: Homeobox, Domain  
PS50071: 133 - 169 HOMEBOX\_2  
IPR008422: *Coprinus cinereus* mating-type protein, Family  
PF05920: 45 - 443 *Coprinus* mating  
IPR009057: Homeodomain-like, Domain  
SSF46689: 106 - 169 Homeodomain-like



## г. Штамм PC15 белок HD2

### InterproScan



### InterproScan:

IPR001356: Homeobox, Domain

PD000010: 155 - 196 Q7M508\_COPCI\_Q7M508;

IPR001356: Homeobox, Domain

PR00024: 177 - 187 HOMEBOX

PR00024: 187 - 196 HOMEBOX

IPR001356: Homeobox, Domain

PF00046: 141 - 197 Homeobox

IPR001356: Homeobox, Domain

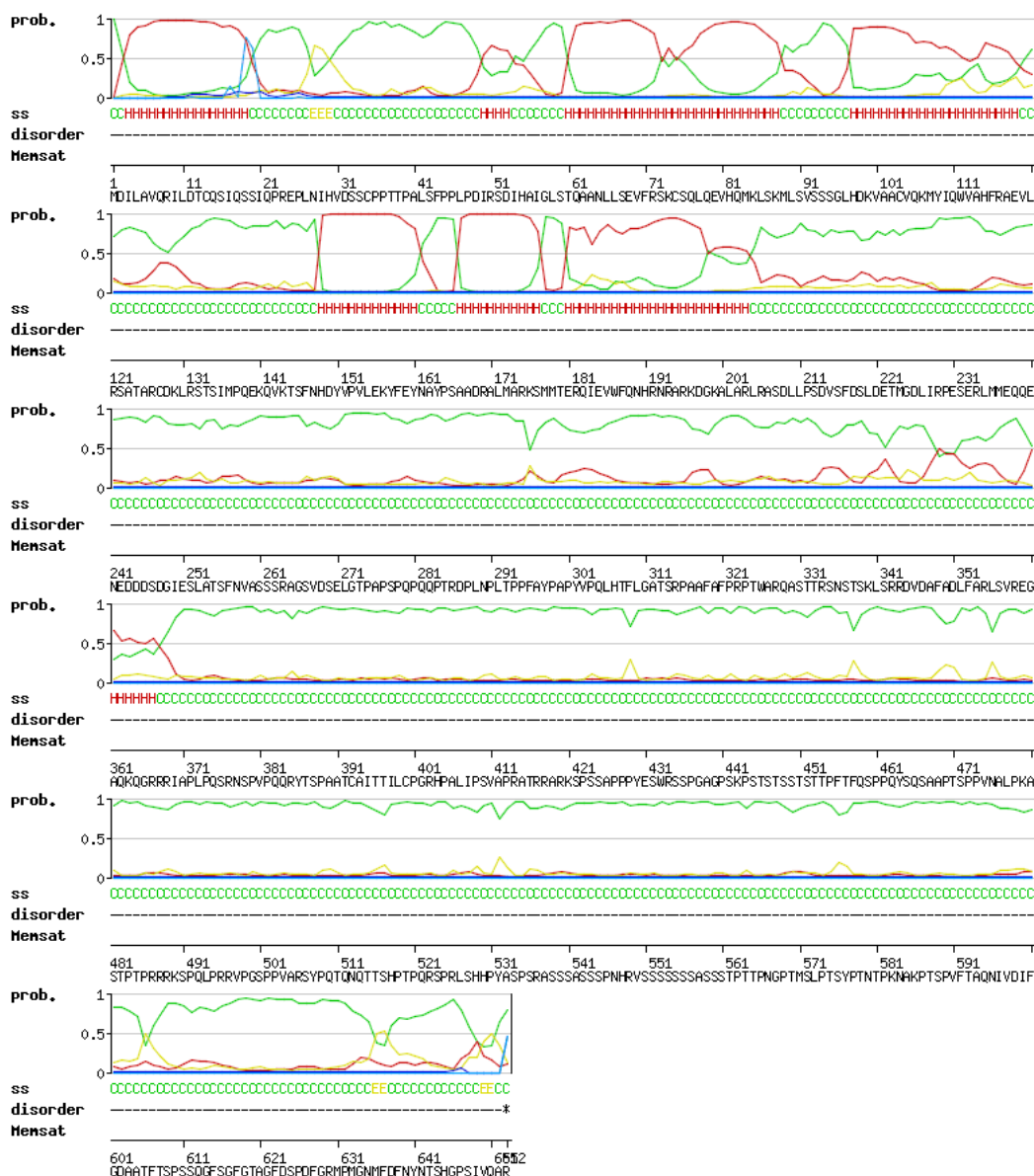
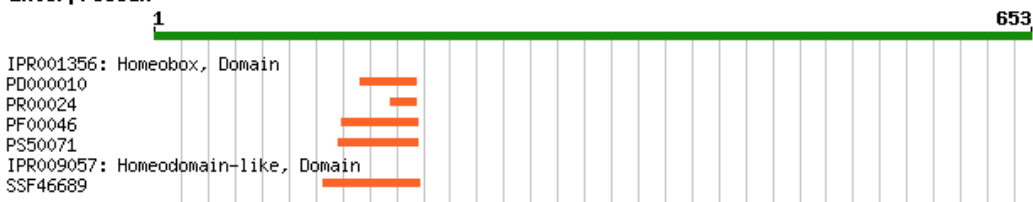
PS50071: 138 - 198 HOMEBOX\_2

IPR009057: Homeodomain-like, Domain

SSF46689: 127 - 199 Homeodomain-like

## д. Штамм PC9 белок HD2

### InterproScan



### InterproScan:

IPR001356: Homeobox, Domain  
 PD000010: 154 - 195 Q7M508\_COPCI\_Q7M508;  
 IPR001356: Homeobox, Domain  
 PR00024: 176 - 186 HOMEBOX  
 PR00024: 186 - 195 HOMEBOX  
 IPR001356: Homeobox, Domain  
 PF00046: 140 - 196 Homeobox  
 IPR001356: Homeobox, Domain  
 PS50071: 137 - 197 HOMEBOX\_2  
 IPR009057: Homeodomain-like, Domain  
 SSF46689: 126 - 198 Homeodomain-like