

**ВНУТРИВИДОВОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ТРУТОВИКА ОКАЙМЛЕННОГО, *FOMITOPSIS PINICOLA***Шнырева, А.В.,<sup>1</sup> Шнырева, А.А.,<sup>1</sup> Бадалян. С.М.<sup>2</sup><sup>1</sup>Кафедра микологии и альгологии, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр.12, биологический факультет, Москва 199991.<sup>2</sup>Лаборатория биологии и биотехнологии грибов, Ереванский государственный университет, ул. А. Манукяна 1, Ереван 0025, Армения

Базидиальный гриб трутовик окаймленный, *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. (подотдел Agaricomycotina, класс Agaricomycetes, порядок Polyporales, семейство Fomitopsidaceae) - широко распространённый вид в природных экотопах средней полосы России. Базидиальные грибы составляют важный компонент биоценозов, и многие виды дереворазрушающих трутовых грибов являются активными биодеструкторами древесины и лигноцеллюлозных остатков в природных экотопах в силу того, что способны секретировать широкий спектр лигнинразрушающих и целлюлозоразрушающих ферментов (Lundell et al., 2010). Кроме того, многие виды трутовых грибов, например, *Ganoderma spp.*, *Fomes fomentarius*, *Piptoporus betulinus*, *Inonotus obliquus* и др. издавна считали ценным лекарственным средством, и интерес к изучению биоактивных метаболитов этих грибов неуклонно растёт (Reshetnikov et al., 2001). Целью данной работы было охарактеризовать генотипическое разнообразие природной популяции *F. pinicola*.

Плодовые тела трутовика окаймленного собирали на территории Московской области и в природно-парковых зонах г. Москвы. Чистые мицелиальные культуры выделяли тканевым способом на сусло-агаре. Для культивирования были апробированы три питательные среды: сусло-агар (СА: 150мл сусла, 850мл H<sub>2</sub>O дист., 15г агара), жидкая глюкозо-дрожжевая среда (ГДС: 1% дрожжевого экстракта и 1% глюкозы) и солодово-дрожжевая среда (СДС: 5г солодового экстракта, 2.5г дрожжевого экстракта, 10 г глюкозы, 1000мл H<sub>2</sub>O дист). Наилучшей для наращивания мицелиальной биомассы была среда ГДС. Для получения стерильных споровых отпечатков использовали сусло-агар. Для выделения тотальной ДНК использовали твердые и жидкие питательные среды – сусло-агар и ГДС. Средняя скорость роста мицелия природных штаммов *F. pinicola* составила 6.97 мм/сутки; морфология мицелия у разных штаммов была сходной, что не позволило выделить морфотипы.

Для проведения анализа генетического контроля половой совместимости в популяции трутовика были получены стерильные споровые отпечатки непосредственно на чашках Петри. Фертильный гимений со зрелыми базидиоспорами наблюдали на 10-14 сутки инкубации со сменой режима светового дня «день-ночь». Споровые отпечатки *F. pinicola* были беловато-кремового цвета. Одним из условий, необходимых для образования плодовых тел *F. pinicola*, как и для многих базидиальных грибов, является свет. Чашки, все время находившиеся в темноте, плодовых тел не давали. Мы провели тест на влияние холодового шока (4 °С) на плодообразование у *F. pinicola*. Результаты показали, что холодовой шок не является обязательным условием плодообразования у трутовых грибов *in vitro*. Наоборот, обработка штаммов *F. pinicola* холодным шоком лишь тормозила развитие плодовых тел; при этом площадь формирования фертильного гимения на чашке Петри была значительно меньше (не более 5% от общей площади чашки Петри), чем у тех же штаммов, росших при комнатной температуре (до 30 % от общей площади чашки Петри). Таким образом, холодовой шок оказывал негативный эффект на плодообразование *F. pinicola*. Все штаммы, образующие плодовые тела на чашках Петри, давали зрелые базидиоспоры (гаплоидное

потомство от дикариотического родителя – мицелиальной культуры). Споровые отпечатки использовали для получения монокариотических гаплоидных штаммов-тестеров половой совместимости. Монокариотические штаммы использовали впоследствии для анализа половой совместимости у природных изолятов трутовых грибов. Была создана коллекция из 43 монобазидиоспоровых штаммов *F. pinicola*). Таким образом, для базидиального гриба *F. pinicola* был фактически воссоздан полный жизненный цикл – «от споры до споры» – в культуре. Жизненный цикл гриба сопровождается сменой двух ядерных фаз – гаплоидной (базидиоспоры) и дикариотической (мицелий). Следует отметить, что разработка данной методики позволяет значительно облегчить проведение генетического анализа, минуя трудоемкую процедуру «выгонки» плодовых тел в лабораторных условиях.

Для оценки внутривидового генетического разнообразия использовали минисателлитные маркеры, отсекуемые ITS-последовательностей кластера генов рРНК, тесты на вегетативную (соматическую) совместимость и частоты аллелей встречаемости локусов половой совместимости. Из шести подобранных и апробированных минисателлитных праймеров было выбрано для анализа три праймера ISP1, ISP2 и ISP4. Для анализа внутривидового генетического полиморфизма использовали также относительно переменные ITS-участки (внутренние транскрибируемые спейсеры) кластера генов рибосомальных РНК. На основе ITS-локусов проводили также генотипирование природных штаммов трутовых грибов. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems на базе ЦКП «Геном». Отсеквенированные последовательности 17 штаммов были депонированы в GenBank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). По данным ПЦП-анализа с использованием минисателлитов были построены дендрограммы сходства на основе матриц бинарных состояний признаков с использованием программы TREECON V.1.3.

Внутривидовой генетический полиморфизм по ДНК-маркерам для 27 штаммов *F. pinicola*, собранных на территории г. Москвы и Московской области, был незначителен: генетические дистанции между штаммами составили от 0.05 до 0.18. Кластеризация штаммов трутовика окаймленного соответствовала районам сбора образцов. Штаммы объединились в три кластера в соответствии с районом сбора природных изолятов – Звенигородский, Солнечногорский районы Московской области и юго-западный округ г. Москвы. В целом природные изоляты *F. pinicola* показали относительно низкий уровень генетического полиморфизма, а также однообразие по морфологическим признакам. Секвенирование ITS-участков кластера рибосомальных генов 20 штаммов показало очень высокий процент сходства (99 %) между штаммами. Такой же высокий процент сходства по ITS-последовательностям наблюдали при проведении процедуры множественных выравниваний с последовательностями этого вида, депонированными в ГенБанке (например, со штаммами, собранными на территории Чехии). Таким образом, нами был отмечен относительный консерватизм ITS1 и ITS2 локусов у гриба *F. pinicola*. Среди собранных в Московской области природных изолятов *F. pinicola* были обнаружены вегетативно совместимые клоны, произраставшие на одном субстрате (бревне) или на соседних субстратах в лесу (на расстоянии не более пяти метров). В тестах на вегетативную несовместимость эти штаммы-клоны продемонстрировали полную вегетативную совместимость (сращивание мицелиев без видимых зон антагонизма в виде барража).

Проведенные мон-мон скрещивания между гаплоидными тестерами половой совместимости, которые были получены от одного дикариотического родителя (штамма), показали тетраполярную систему контроля половой совместимости у трутовика окаймленного. Тетраполярная система (или бифакторная) подразумевает наличие двух несцепленных локусов (*matA* и *matB*) половой совместимости со множественными аллелями

(Шнырева и др., 2012). Анализ частот аллелей локусов половой совместимости у штаммов из выборки восьми природных штаммов показал присутствие различных аллелей по этим локусам и, следовательно, полную половую совместимость природных штаммов трутовика окаймленного. Наличие репродуктивных барьеров или, так называемых, интерстерильных групп в пределах вида отмечено не было.

Работа выполнена при финансовой поддержке Армяно-Российского совместного проекта: РФФИ №15-54-05065\_арм и ГКН МОН Республики Армения № 15RF-064. Часть работы по сбору природных изолятов грибов и депонированию их в коллекцию МГУ\_БИО\_СБГ была поддержана грантом РНФ 14-50-00029.

### Список литературы

Lundell TK, Makela MR, Hilden K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes—ecological, functional and phylogenetic review // *J. Basic Microbiol.*, 2010, Vol.50, P.5–20.

Reshetnikov SV, Wasser SP, Tan KK. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (review) // *Int. J. Med. Mushrooms*, 2001, Vol.3, P. 361–394.

Шнырева АА, Сиволапова АБ, Шнырева АВ. Съедобные культивируемые грибы вешенки *Pleurotus sajor-caju* и *P. pulmonarius* сходны по морфологии, но являются самостоятельными репродуктивно изолированными видами // *Генетика*, 2012, Т. 48, №11, С.1260–1270.