ГЕНЕТИКА, 2012, том 48, № 11, с. 1260–1270

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.174:582.287.238

СЪЕДОБНЫЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ ГРИБЫ ВЕШЕНКИ *Pleurotus sajor-caju* И *P. pulmonarius* СХОДНЫ ПО МОРФОЛОГИИ, НО ЯВЛЯЮТСЯ САМОСТОЯТЕЛЬНЫМИ РЕПРОДУКТИВНО ИЗОЛИРОВАННЫМИ ВИДАМИ

© 2012 г. А. А. Шнырева, А. Б. Сиволапова, А. В. Шнырева

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра микологии и альгологии, Москва 119991

e-mail: ashn@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2012 г.

Дифференциация двух близкородственных культивируемых видов вешенки, *Pleurotus pulmonarius* и *P. sajor-caju*, проведена с помощью традиционных скрещиваний и анализа вариабельных ITS и IGS последовательностей кластера рибосомальных генов. Молекулярный анализ по ITS и IGS последовательностям не позволил четко разграничить морфологически сходные виды *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* и подтвердить статус самостоятельного вида *P. sajor-caju* для исследуемых штаммов CS-32, H-1, H-2. Анализ половой совместимости между гаплоидными тестерами штаммов анализируемых видов в *мон-мон* скрещиваниях продемонстрировал, что виды *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju* являются репродуктивно изолированными и, следовательно, самостоятельными видами.

Виды рода вешенка (*Pleurotus*) широко культивируются в России и за рубежом благодаря их пищевой ценности. Давно введены в культуру такие виды вешенки, как *P. ostreatus* и *P. pulmonarius*, а в последние годы возрос интерес и к экзотическим видам, в частности к *P. sajor-caju* (Fr.) Singer. Этот вид перспективен для культивирования в пищевых целях благодаря высокому содержанию белка и витаминов [1]. Кроме того, этот вид перспективен и в медицинских целях. Из плодовых тел *P. sajor-caju* были выделены полисахариды ксилоглюкан и ксиланпротеин, обладающие противоопухолевой активностью [2]. Было также показано, что водные экстракты плодовых тел *P. sajor-caju* обладают антибактериальной и противоопухолевой активностями [3], а также высокой антиоксидантной активностью [4]. Следует отметить, что до сих пор точно не установлен таксономический статус *P. sajor-caju*, плодовые тела которого морфологически трудноотличимы от плодовых тел *P. pulmonarius*. В связи с этим некоторые исследователи считают его отдельным видом [4, 5], другие авторы – разновидностью *P. pulmonarius* var. *sajor-caju* [6], третьи – температуроустойчивым штаммом *P. pulmonarius* [7]. Кроме того, некоторые ученые отмечали различия в морфологии диких и культивируемых штаммов *P. sajor-caju* [8–10]. Было показано, что некоторые коммерческие штаммы, обозначенные как *P. sajor-caju*, были определены ошибочно и относятся к виду *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. [11].

Традиционная систематика гименомицетов (отдел Basidiomycota, класс Basidiomycetes, подкласс Homobasidiomycetidae) издавна основывалась на макроморфологических особенностях плодовых тел, что, прежде всего, объяснялось простотой их визуального выявления. Однако в большинстве случаев трудно было показать, что какие-либо морфологические признаки, используемые для разграничения (идентификации) видов, действительно лежат в основе видообразования.

Совокупность недавних исследований биохимической генетики популяций и сравнительной генетики вида заставляет признать, что процесс видообразования, а тем более макроэволюция далеко не всегда сводятся 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 [12].

По этой причине все более актуальными становятся молекулярно-генетические методы исследований при изучении биологии и таксономии высших базидиальных грибов. Целью данного исследования было установить видовую принадлежность культивируемого вида вешенки *P. sajor-caju* на основе сравнительного молекулярного анализа ITS и IGS спейсерных последовательностей кластера генов рРНК и проведения генетического анализа половой совместимости (скрещиваний) с видом *P. pulmonarius*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали три штамма *P. sajor-caju* (CS-32, H-1 и H-2) из разных источников проис-

Таблица 1. Список видов и штаммов вешенки, использованных в работе

Вид	Штамм	Источник происхождения/получения
P. sajor-caju	CS-32	Производственный штамм, Northwest Mycological Consultants, USA
	H-1 (Amycel 3011)	Производственный штамм, Plant Research Institute, University of Wageningen, Holland
	H-2 (Champignon 29)	То же
P. pulmonarius	06-1	Дикорастущий изолят, ЗБС МГУ, Московская область
	14d	То же
P. ostreatus	M-8	Дикорастущий изолят, г. Москва
	M-9	То же
	38d	Дикорастущий изолят, Московская область
	38k	Моноспоровый изолят штамма 38d
	H-8 (PC001-15)	Производственный штамм, Plant Research Institute, University of Wageningen, Holland
	H-9 (EP 57)	То же
P. djamor	Z1	Выделен из производственного штамма, Россия
	H-10	То же
P. eryngii	3-1	Производственный штамм, Корея
	3-2	Выделен из производственного штамма, Россия
	3-3	То же
	H-6 (Le Lion PE)	Производственный штамм, Plant Research Institute, University of Wageningen, Holland
P. cornucopiae	H-14	Выделен из производственного штамма, Россия
P. calyptratus	C-1	Дикорастущий изолят, г. Москва
	C-2	То же

хождения и штаммы близкородственных видов *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*, выделенные из природных экотопов на территории Москвы и Московской области. В филогенетическом анализе были использованы также представители других культивируемых видов рода *Pleurotus* – *P. cornucopiae, P. calyptratus, P. eryngii* и *P. djamor.* Описание штаммов, использованных в работе, приведено в табл. 1.

Культивирование штаммов вешенки, выделение чистых мицелиальных дикариотических и монобазидиоспоровых культур и скрещивания проводили на сусло-агаре (150 мл пивного сусла, 850 мл воды, 20 г агара) в чашках Петри при 25°C. При работе с природным материалом в случае необходимости в среду добавляли антибиотики в следующих концентрациях: фундазол – 100 мкг/л, стрептомицин – 50 мкг/л.

Для получения мицелиальной биомассы штаммы культивировали в жидкой питательной среде, содержащей 1% дрожжевого экстракта и 1% глюкозы, в стерильных условиях при 25°C, в темноте.

В исследовании использовали дикариотические мицелиальные культуры, выделенные из свежесобранных плодовых тел, и монобазидиоспоровые гаплоидные изоляты, полученные из споровых отпечатков, видов *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju*. Споровые отпечатки получали из зрелых плодовых тел, помещая их в стерильные чашки Петри при 100%-ной влажности. Монобазидиоспоровые (гаплоидные) изоляты получали рассевом водной суспензии базидиоспор, полученных из споровых отпечатков, на сусло-агаре (20–30 колоний на чашку Петри); при появлении едва заметных колоний их изолировали на чашки со свежей питательной средой. Гомокариотичность отобранных монобазидио-споровых изолятов подтверждали по отсутствию пряжек на мицелии при микроскопировании. Дикариотический (функционально диплоидный) мицелий большинства гомобазидиомицетов, в том числе и вешенки, характеризуется наличием пряжек в местах клеточных септ.

Получение (выгонка) зрелых плодовых тел в лабораторных условиях

Предварительно сваренное и слегка просушенное зерно пшеницы смешивали для разрыхления с мелом в количестве 1.5 г карбоната кальция на 1 кг субстрата. Затем зерно помещали в стеклянные колбы с ватной пробкой и стерилизовали при 120°С в течение 30 мин. После охлаждения колбы с зерном инокулировали мицелием и помещали в термостат при 25°С, периодически встряхивая для равномерного обрастания зерна. Заросшее мицелием зерно служило инокуляционным (посевным) материалом для последующей выгонки плодовых тел. В качестве субстратов для получения плодовых тел использовали лузгу, которую запаривали кипятком и оставляли на ночь. Затем ее отжимали и для разрыхления добавляли карбонат кальция в количестве 1–1.5 г на 1 кг лузги. Далее субстрат весом 1 кг помещали в полипропиленовые мешки и стерилизовали при 120°С в течение одного часа. Затем эти мешки с субстратом инокулировали зерновым мицелием и инкубировали в термостате при температуре 25°С. После полной колонизации субстрата мицелием открытые мешки переносили в камеру с температурой 25–26°С и 10-часовым освещением. Камеру периодически увлажняли с помощью пульверизатора и продували увлажненным воздухом. После появления зрелых плодовых тел их срезали и помещали в стерильные чашки Петри для получения споровых отпечатков.

В некоторых случаях плодовые тела формировались непосредственно на дикариотическом мицелии, выращенном на чашках Петри с сусло-агаром при 10-часовом периоде освещения. В этих случаях стерильные споровые отпечатки получали непосредственно на крышке чашки Петри путем перевертывания чашки вверх дном.

Получение тестерных штаммов

Отбор гаплоидных тестеров типов спаривания и определение факторов половой (гомогенной) совместимости осуществляли согласно стандартным методикам [13, 14]. В типе у базидиомицетов продуктом мейоза являются четыре гаплоидные базидиоспоры, созревающие в массе на базидиомах (плодовых телах). Так как *Pleurotus* обладает тетраполярной системой гомогенной несовместимости, то для формирования дикариона необходимо слияние моноспоровых гаплоидных изолятов, различающихся (гетероаллельных) по двум *A*- и *B*-факторам (локусам) половой совместимости с множественными аллелями (A_xB_x, A_yB_y) (биполярный гетероталлизм) [15, 16]. Наличие регулярных, хорошо заметных пряжек в районе клеточных септ является надежным критерием, подтверждающим миграцию ядер между скрещиваемыми гомокариотическими мицелиями с последующим формированием дикариона (генетического диплоида). Появление пряжек на мицелии фактически указывает на фертильность (половую совместимость) партнеров и их принадлежность к одному и тому же виду [15].

Выделение моноспоровых гаплоидных тестеров, гетероаллельных по *A*- и *B*-факторам, проводили следующим образом: 12 моноспоровых культур скрещивали во всех возможных комбинациях на агаризованной питательной среде (по две монобазидиоспоровые культуры 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 не была 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 гаплоидных штаммов, гетероаллельных по локусам половой совместимости, которые и служили в дальнейшем гаплоидными тестерами половой совместимости (A_xB_x, A_yB_y, A_xB_y, A_yB_x). Тестерным штаммом мог быть любой штамм из каждой группы.

В работе использовали также гаплоидные штаммы-тестеры вида *P. pulmonarius* (штамм О6-1) из нашей коллекции.

Выделение ДНК и проведение ПЦР

ДНК выделяли из свежего 7-суточного мицелия, выращенного на сусло-агаре на чашках Петри, согласно стандартной методике [17]. ПЦР проводили в термоциклере Amply 4L (Биоком) в общем объеме реакционной смеси 50 мкл, содержащей 40–100 нг ДНК, 10 мМ Tris HCl (pH 8.3), 50 мМ KCl, 1.5 мМ $MgCl_2$, 50 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 15 пМ каждого из праймеров, 1–2 ед. *Taq*-полимеразы (Sileks M). ПЦР осуществляли в следующем режиме: 5-минутная денатурация при 95°С с последующими 30 циклами, каждый из которых состоял из трех этапов – денатурации ДНК (60 с при 94°С), отжига праймеров (60 с при 57°С) и синтеза ДНК (120 с при 72°С), – с последующим циклом в 10 мин при 72°С. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли путем электрофореза в 1.2%-ном агарозном геле в трис-ацетатном бу-

фере с последующим окрашиванием бромистым этидием [18]. В качестве маркеров длин фрагментов ДНК использовали GeneRuler 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas). В контрольные реакции ДНК-матрицу не добавляли. Окрашенные гели фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Были использованы геноспецифичные праймеры на участки ITS (internal transcribed spacer, внутренний транскрибируемый спейсер) и IGS (internal gene spacer, внутренний генный спейсер) областей кластера рибосомальных генов [19]. Последовательности праймеров:

ITS1 (прямой): 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G

ITS4 (обратный): 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

ITS1-F (прямой): 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A

ITS4-B (обратный): 5'-CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG

5sRNA (прямой): 5'-ATC AGA CGG GAT GCG GT

LR20R (обратный): 5'-GTG AGA CAG GTT AGT TTT ACC CT.

Секвенирование ДНК и построение филогенетических деревьев

Ампликоны очищали с помощью набора “Выделение ДНК из агарозных гелей на магнитных частицах, покрытых SiO_2” (Силекс М) или методом прямого осаждения смесью этанола с ацетатом аммония. Количество необходимой для секвенирования ДНК-матрицы определяли визуально в агарозном геле, нанося 10-кратные разведения очищенных препаратов ДНК. В реакцию брали 30–40 нг ДНК-матрицы и 5 пМ соответствующего праймера. Секвенирование ДНК проводили на базе ЦКП “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.

Для проведения процедуры множественных выравниваний последовательностей ДНК (multiple sequence alignments) и построения филогенетических деревьев использовали программы BioEdit (v. 7.0.0) и MEGA 5.05 [20, 21]. Выравнивания проводили по последовательностям, полученным в результате ПЦР с праймерами на ITS и IGS области. При построении филогенетических деревьев были использованы также ITS и IGS последовательности видов *Pleurotus*, взятые из GenBank (www.ncbi.nih.gov.org). Филогенетические деревья строили по методу максимального правдоподобия (maximum likelihood) для близкородственных последовательностей, руководствуясь моделью Jukes-Cantor. Редактирование отсеквенированных нуклеотидных последовательностей и получение консенсусных последовательностей проводили в программе BioEdit (v. 7.0.0) [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология плодовых тел культивируемых видов вешенки Pleurotus pulmonarius и P. sajor-caju

В ходе эксперимента при выгонке плодовых тел в лабораторных условиях наблюдали две волны плодоношения штамма CS-32 *P. sajor-caju* – на 10-е и 22-е сутки после помещения мешков с мицелием в камеру для культивирования. Для двух других штаммов *P. sajor-caju* – H-1 и H-2 – споровые отпечатки получали из плодовых тел непосредственно на чашках Петри.

Исходя из описания Стейметса [22], вид *P. sajor-caju* отличается от *P. pulmonarius* наличием тонкого кольца на ножке плодового тела, однако коммерческие штаммы, культивируемые в лабораторных условиях, часто не имеют этого признака, что делает их практически неотличимыми от штаммов вида *P. pulmonarius* [16]. Полученные нами плодовые тела также не имели кольца на ножке. Исследуемый штамм CS-32 *P. sajor-caju* формировал мясистые плодовые тела на выраженной светлой эксцентрической ножке и с шляпкой серого цвета; средний вес плодового тела составил 35.9 ± 2.02 г. Длина ножки составила в среднем 4.6 ± ± 1.5 см, диаметр шляпки – 6.4 ± 2.1 см. Споровые отпечатки от полученных базидиом были светло-лилового цвета. Данное описание плодовых тел совпадает с таковым для вида *P. pulmonarius*: шляпка 4–9 см в диаметре, языковидная, выпуклораспростертая, белая, иногда с сероватым или палевым оттенком; пластинки нисходящие; ножка эксцентрическая или боковая 2–4 см длиной, цилиндрическая, белая, гладкая [23]. Колонии, сформированные дикариотическим мицелием на чашках Петри, также были сходны по морфологии: колонии белого цвета, пушистые, с хорошо развитым воздушным мицелием и заметными концентрическими зонами прироста, с нижней поверхности (со дна чашки Петри) без видимой пигментации. Таким образом, по морфологии плодовых тел и культурально-морфологическим признакам разделение видов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* оказалось затруднительным.

Молекулярная идентификация вида P. sajor-caju на основе ITS и IGS последовательностей кластера генов рРНК

В данной работе для разделения сходных по морфологии видов вешенки *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* был использован также биоинформатический подход – проведен сравнительный анализ штаммов грибов на основе спейсерных последовательностей (ITS и IGS) кластера генов рРНК. В

настоящее время использование кластера генов рРНК является универсальным методом грибной таксономии и молекулярной идентификации видов грибов. Большинство филогенетических анализов в царстве грибов сделано на основе кластера рибосомальных генов [24]. В кластере помимо консервативных последовательностей структурных генов 5.8S, 18S и 28S рРНК имеются более вариабельные транскрибируемые спейсерные участки (ITS и IGS), накопление изменений (точковых мутаций) по которым идет гораздо быстрее. Поэтому различные локусы рРНК кластера могут быть использованы для разделения таксономических групп грибов различного уровня (внутривидового, видового, родового и т.д.). Высоковариабельные спейсерные последовательности чаще всего используют для молекулярной идентификации видов и подтверждения видового статуса грибов путем проведения сравнений с соответствующими базами данных из GenBank.

В результате секвенирования ITS и IGS областей штаммов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* были прочтены последовательности длиной 680 пн и 765 пн соответственно. Полученные последовательности были сопоставлены с аналогичными последовательностями из GenBank. Следует отметить, что в электронной базе имеется достаточно большое количество аналогичных последовательностей для исследуемых нами видов. Однако проведенная процедура выравнивания отсеквенированных ITS и IGS последовательностей исследуемых штаммов *P. sajor-caju* CS-32, H-1, H-2 с последующими множественными сравнениями с базами данных из ГенБанка не позволила надежно подтвердить видовой статус данных штаммов. В ГенБанке происходило выравнивание исследуемых нами штаммов вешенки *P. sajor-caju* в равной степени как с последовательностями *P. sajor-caju*, так и с последовательностями *P. pulmonarius*.

Были обнаружены лишь единичные точковые замены нуклеотидов по двум позициям в ITS последовательности и по трем позициям в IGS области. Процедура выравнивания последовательностей показала 99%-ную гомологию между анализируемыми ITS и IGS последовательностями штаммов *P. sajor-caju* и таковыми, депонированными в GenBank под видовыми названиями *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju*, причем в списке оба вида были представлены в равных долях, что нашло отражение и на кладограмме (рис. 1). В филогенетический анализ помимо последовательностей штаммов *P. sajor-caju* (CS-32, H-1 и H-2) были взяты последовательности близкородственных видов *P. pulmonarius, P. ostreatus, P. calyptratus, P. cornucopiae, P. djamor* и *P. eryngii* из коллекции кафедры, а также последовательности данных видов из GenBank. Как видно из кладограммы, штаммы видов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* сформировали общий кластер, не дифференцированный по видовой принадлежности. Другие виды вешенки – *P. ostreatus, P. calyptratus, P. djamor, P. cornucopiae* и *P. eryngii* – сформировали обособленные кластеры, соответствующие данным видам. Филогенетический анализ ITS и IGS последовательностей только 20 штаммов из нашей коллекции (табл. 1) также не позволил разделить виды *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* (рис. 2).

Таким образом, в результате проведенного филогенетического анализа нам не удалось четко разграничить виды *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius*, т.е. провести молекулярно-генетическую дифференциацию между видами. Молекулярный анализ по ITS и IGS последовательностям не позволил четко подтвердить видовую принадлежность исследуемых штаммов CS-32, H-1, H-2. Поэтому на следующем этапе были проведены половые скрещивания штаммов CS-32, H-1, H-2 между собой и с тестерами половой совместимости вида *P. pulmonarius* с целью анализа присутствия репродуктивных барьеров (репродуктивной изоляции, или нескрещиваемости) между штаммами данных видов.

Анализ половой совместимости между штаммами P. cajor-caju и P. pulmonarius

Грибы рода *Pleurotus*, как и многие другие гомобазидиальные шляпочные грибы, характеризуются гапло-дикариотическим жизненным циклом, основанным 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. 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 [14, 16].

В случае полной половой совместимости между гаплоидными штаммами происходит формирование фертильного дикариотического мицелия (дикариона) с последующим плодоношением. 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 по-

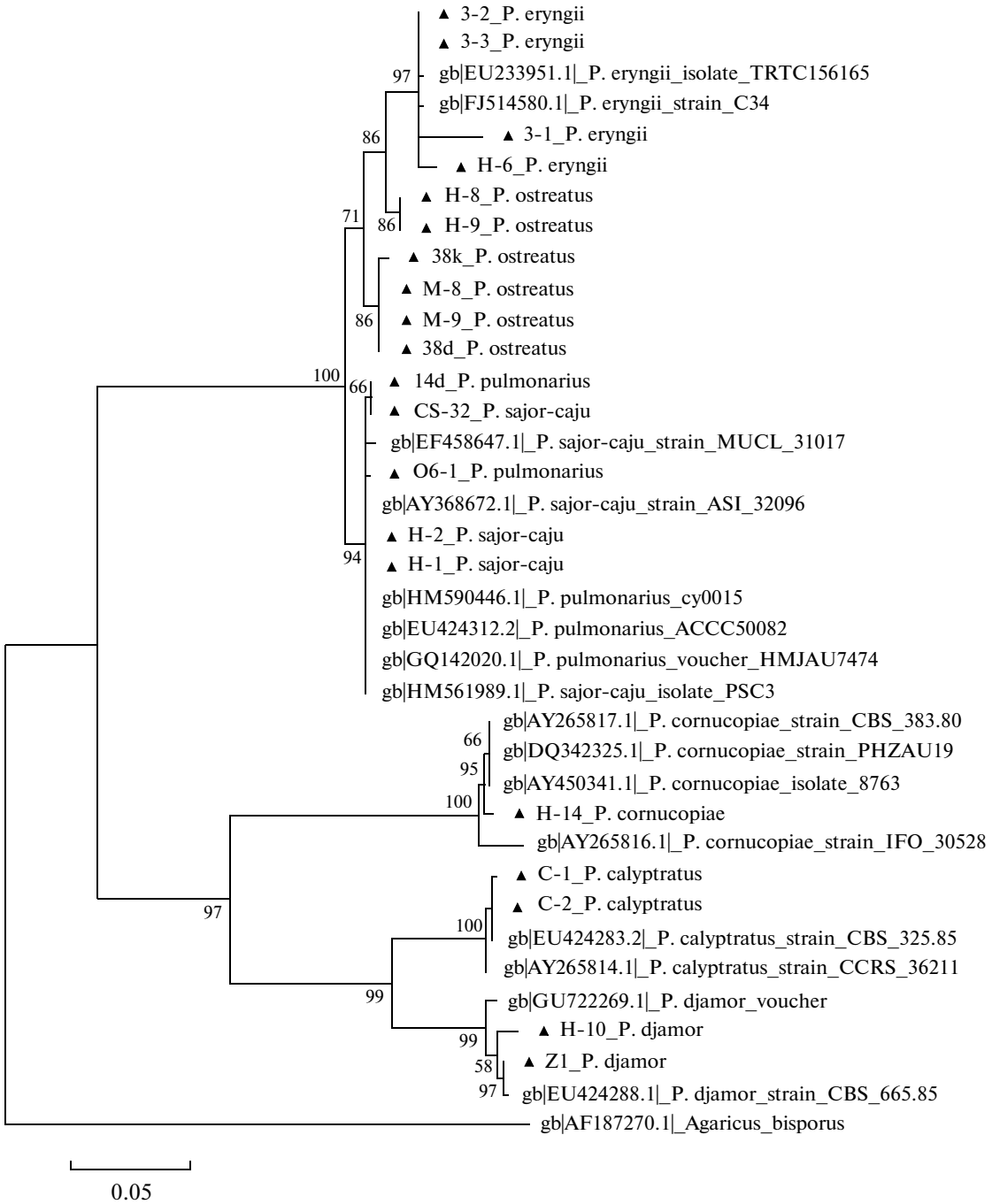

Рис. 1. Дендрограмма сходства между штаммами видов *Pleurotus*, построенная на основе ITS и IGS последовательностей. Треугольниками помечены штаммы, секвенирование последовательностей которых проводили в данной работе; остальные последовательности были взяты из GenBank (номера последовательностей в GenBank представлены). Цифры на ветвях указывают значения бутстрепа (в %).

ловой совместимости, либо принадлежат различным интерстерильным группам (репродуктивно изолированным биологическим видам). Критерий скрещиваемости широко применяется в систематике базидиомицетов, основным способом репродукции которых является половое размножение базидиоспорами мейотического происхождения [15, 16]. Многочисленные тесты на половую совместимость показали, что барьеры интерстерильности большинства видов презиготические и почти всегда непреодолимые, хотя известны примеры частичной интерстерильности или гибридизации у базидиомицетов [14, 15]. Именно критерий нескрещиваемости, или репродуктивной

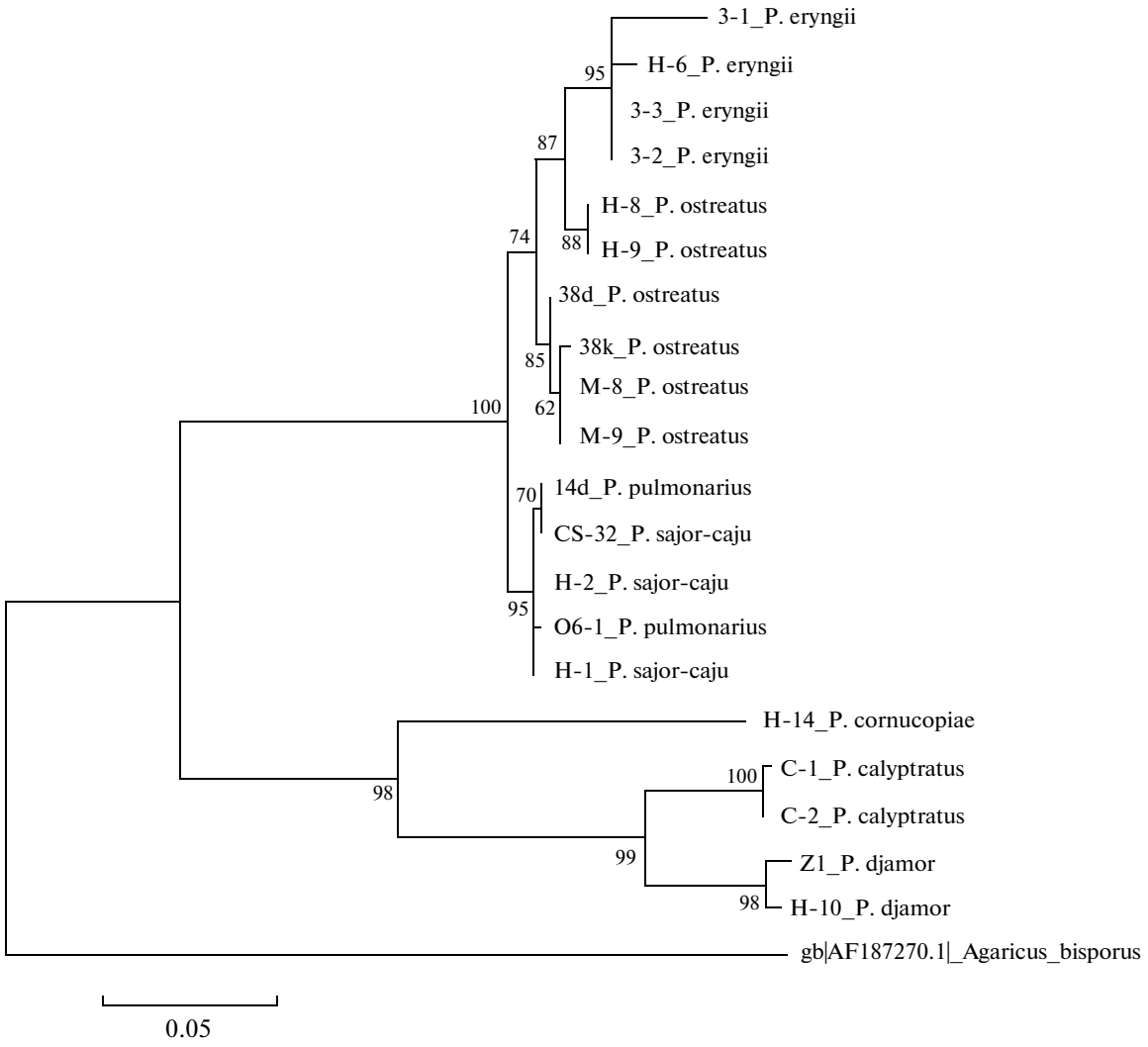

Рис. 2. Дендрограмма сходства между изучаемыми штаммами видов *Pleurotus*, построенная на основе ITS и IGS последовательностей. Цифры на ветвях указывают значения бутстрепа (в %).

изоляции является основным в концепции биологического вида.

Для штаммов *P. sajor-caju* CS-32, H-1 и H-2 с помощью монобазидиоспорового рассева 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 (табл. 2). При внутриштаммовых скрещиваниях сестринских гаплоидов наблюдали три типа взаимодействия контактирующих мицелиев: сращивание мицелиев без видимой границы между ними; образование небольшого мицелиального валика – барража – в зоне контакта мицелиев (в случае одинаковых аллелей по локусу *B* половой совместимости); flat-реакция – менее плотный слой мицелия в зоне контакта (в случае одинаковых аллелей по локусу *A*) [13]. Таким образом, наблюдая различные фенотипы в зоне контакта скрещиваемых сестринских монокарионов, нам удалось определить аллели локусов половой совместимости тестерных штаммов (табл. 2).

Далее полученные тестеры штаммов *P. sajor-caju* были скрещены с имеющимися в нашей коллекции гаплоидными тестерами вида *P. pulmonarius*. Результаты *мон-мон* скрещиваний (монокарион-монокарион) между гаплоидными тестерами *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* представлены в табл. 3. Во всех 16 комбинациях при скрещивании четырех гаплоидных тестеров штамма CS-32 *P. sajor-caju* с четырьмя тестерами *P. pulmonarius* (штамм O6-1) не наблюдали формирования фертильного дикариотического мицелия с пряжками, что свидетельствует о том, что между данными видами – *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius* – существует репродуктивная изоляция. Аналогичные результаты были получены в скрещиваниях гаплоидных те-

Таблица 2. Получение монокариотических гаплоидных тестеров для штаммов *P. sajor-caju*

Дикариотический родительский штамм	Гаплоидные тестеры	Аллели локусов половой совместимости	Половая совместимость с 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 (дикариотизация и образование пряжек); “–” – несовместимость.

стеров штаммов H-1 и H-2 с тестерами *P. pulmonarius*. Во всех *мон-мон* скрещиваниях между штаммами CS-32, H-1 и H-2, принадлежащими виду *P. sajor-caju*, всегда происходило образование фертильного дикариотического мицелия с пряжками. Значит, исследуемые штаммы CS-32, H-1 и H-2 принадлежат самостоятельному виду *P. sajor-caju*, который демонстрирует репродуктивную изоляцию (нескрещиваемость) со сходным по морфологии близкородственным видом *P. pulmonarius*.

ОБСУЖДЕНИЕ

При секвенировании наиболее вариабельных участков в кластере рибосомальных генов – ITS и IGS 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. Прояснить ситуацию о видовом статусе данных штаммов мы смогли только после проведения классических скрещиваний гаплоидных тестеров, которые позволили продемонстрировать наличие репродуктивного барьера с видом *P. pulmonarius*. Поэтому можно сделать заключение об ограничениях применения исключительно молекулярных методов в диагностике видов. Необходимо применять комплексный подход, сочетающий в себе молекулярные критерии и генетический критерий скрещиваемости.

Следует заметить, 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 [24, 25]. Ввиду 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 скре-

Таблица 3. *Мон-мон* скрещивания между гаплоидными тестерами видов *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius*

Гомокариотические 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*
P. sajor-caju	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*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
P. pulmonarius	O6-1	m1	*AxBx*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		m6	*AyBy*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		m8	*AyBx*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		m11	*AyBy*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. “+” – половая совместимость (дикариотизация и образование пряжек); “–” – несовместимость.

щивающихся организмов, дающих жизнеспособное потомство, и репродуктивно изолированных от других таких же групп [12, 26]. Молекулярные виды дифференцируют на основе молекулярных признаков, и на филограммах молекулярные виды группируются в отдельные кластеры. В царстве грибов ввиду вышеупомянутых особенностей совпадение этих трех концепций не всегда достижимо. Концепция биологического вида является наиболее приемлемой для базидиальных грибов, основным способом размножения которых является половое воспроизведение [27, 28].

В нашем исследовании оба анализируемых вида вешенки, *P. sajor-caju* и *P. pulmonarius*, по данным секвенирования ITS и IGS 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 [15]. В нашей работе при сравнении двух сходных по морфологии видов вешенки *P. pulmonarius* и *P. ostreatus* также было показано существование полной репродуктивной изоляции [29]. 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.

Отсеквенированные ITS последовательности видов *Pleurotus* были депонированы в GenBank (www.ncbi.nih.gov) под следующими номерами: JQ814757, JQ837470–JQ837488.

Авторы благодарят А. Соненберга и И. Баарса из университета Вагенингена (Голландия) за предоставленные коммерческие штаммы вешенки.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 06-04-08161).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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. № 3. P. 425–428.
2. *Zhuang C., Li W., Chen S.* Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom jengweigu or houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993. № 57. P. 901–906.
3. *Ngai P.H., Ng T.B.* A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* // Peptides. 2004. V. 25. № 1. P. 11–17.
4. *Lakshmi B., Tilak J.C., Adhikari S. et al.* Inhibition of lipid peroxidation induced by γ-radiation and AAPH in rat liver and brain mitochondria by mushrooms // Current Science. 2005. V. 88. № 3. P. 484–488.
5. *Kashangura C., Hallsworth J., Mswaka A.* Phenotypic diversity amongst strains of *Pleurotus sajor-caju*: implications for cultivation in arid environments // Mycological Research. 2006. V. 110. № 3. P. 312–317.
6. *Chiua S.W., Chana Y.H., Lawa S.C. et al.* Cadmium and manganese in contrast to calcium reduce yield and nutritional values of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* // Mycologist. 1998. V. 12. P. 56–64.
7. *Idowu O.* Evaluation of different substrates and combinations on the growth of *Pleurotus pulmonarius* (Fries) Quelet (*P. sajor-caju*) // Nigerian J. Horticultural Science. 2003. V. 8. P. 95–98.
8. *Corner E.J.H.* The agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species // Beihefte zur Nova Hedwigia. 1981. V. 69. 169 p.
9. *Kurtzman R.H., Zadrazil F.* Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus* mushrooms // Tropical Mushrooms: Biological Nature and Cultivation Methods / Eds Chang S.T., Quimio T.H. Hong Kong: Chinese Univ. Press, 1982. P. 299–348.
10. *Pegler D.N.* The genus *Lentinus* // Kew Bulletin Additional Series. 1983. № 10. 281 p.
11. *Hilber O.* Valid, invalid and confusing taxa of the genus *Pleurotus* // Mushroom Science. 1989. V. 12. P. 241–248.
12. *Алтухов Ю.П.* Вид и видообразование // Сорос. Образоват. Журн. 1997. № 4. С. 2–10.
13. *Eger G.* Biology and breeding of *Pleurotus* // The Biology of Cultivation of Edible Mushrooms. N.Y.: Acad. Press, 1978. P. 497–519.
14. *Шнырева А.В., Дружинина И.С., Дьяков Ю.Т.* Генетическая структура комплекса *Pleurotus ostreatus* sensu lato на территории Московской области // Генетика. 1998. Т. 34. № 12. С. 1610–1618.
15. *Vilgalys R., Sun B.L.* Assessment of species distributions in *Pleurotus* based on trapping of airborne basidiospores // Mycologia. 1994. V. 86. № 2. P. 270–274.
16. *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. V. 100. № 6. P. 717–731.
17. *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. V 35. P. 23–24.
18. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.A.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. V. 1–3. 1626 p.
19. *Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M. et al.* Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the internal sequence databases and its implications for molecular species identification // Evolutionary Bioinformatics. 2008. V. 4. P. 193–201.
20. *Hall T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symp. Ser. 1999. V. 41. P. 95–98.
21. *Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739. http: // www.kumarlab.net/publications
22. *Stamets P.* Growing gourmet and medicinal mushrooms. Berkley, Hong Kong: Ten Speed Press, 1993. 544 p.
23. *Гарибова Л.В., Сидорова И.И.* Грибы // Энциклопедия природы России. М., 1997. 352 с.
24. *Шнырева А.В.* Геносистематика и проблема вида у грибов: подходы и решения // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. Вып. 3. С. 209–220.
25. *Дьяков Ю.Т.* Системы размножения грибов и их эволюция // Микология и фитопатология. 1999. Т. 33. Вып. 3. С. 137–149.
26. *Майр Э.* Принципы зоологической систематики. М: Мир, 1971. 454 с.
27. *Anderson J.B., Kohn L.M.* Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground // Trends Ecol. Evol. 1998. V. 13. № 11. P. 444–449.
28. *Шнырева А.В.* Популяционная генетика грибов // Микология сегодня / Под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. Том 1. М: Национ. акад. микологии, 2007. С. 195–225.
29. *Шнырева А.В., Штаер О.В.* Дифференциация близкородственных видов *Pleurotus pulmonarius* и *P. ostreatus* с помощью скрещиваний и молекулярных маркеров // Генетика. 2006. Т. 42. № 5. С. 667–674.

The Commercially Cultivated Edible Oyster Mushrooms *Pleurotus sajor-caju* and *P. pulmonarius* Are Two Separate Species, Similar in Morphology but Reproductively Isolated

A. A. Shnyreva, A. B. Sivolapova, and A. V. Shnyreva

Department of Mycology and Algology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: ashn@mail.ru

Two closely related commercially cultivated oyster mushroom species, *Pleurotus pulmonarius* and *P. sajor-caju* have been differentiated by traditional mating experiments as well as analysis of the variable ITS and IGS sequences of the ribosomal gene cluster. Molecular analysis of the variable ITS and IGS regions has allowed neither reliable differentiation between the morphologically similar species *P. pulmonarius* and *P. sajor-caju* nor confirmation of species identity of the *P. sajor-caju* strains CS-32, H-1, and H-2. Analysis of the sexual (mating) compatibility between haploid tester strains of these two species in monokaryon–monokaryon mating experiments has demonstrated complete reproductive isolation between *P. pulmonarius* and *P. sajor-caju*, thereby confirming that these are separate species.