М И К О Л О Г И Я И Ф И Т О П А Т О Л О Г И Я

Том 43 2009 Вып. 5

УДК 582.284.5:581.52(234.91)

© *С. В. Копыльцов, Ю. В. Пономарева, Г. И. Иванов*

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *PLEUROTUS PULMONARIUS* ЛЕСНЫХ БИОГЕОЦЕНОЗОВ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО КАВКАЗА

KOPYLTSOV S. V., PONOMAREVA Yu. V., IVANOV G. I. THE CHARACTERISTICS OF *PLEUROTUS PULMONARIUS* STRAINS IN FOREST BIOGEOCENOSES OF NORTHWEST CAUCASUS

Среди промышленно культивируемых грибов *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (вешенка) занимает одно из ведущих мест по объему производства грибной продукции в России. Мощная система внеклеточных ферментов гриба, включающая, в частности, комплекс целлюлаз и лакказ, позволяет использовать эту культуру для эффективной биоконверсии лигноцеллюлозного сырья с получением товарной продукции в виде плодовых тел гриба.

Динамичное развитие грибоводства в России выявило потребность производства штаммов вешенки, удовлетворяющих современным требованиям интенсивных технологий: сокращению сроков обрастания субстрата и выгонки плодовых тел, устойчивости к конкурентной микрофлоре, бесшоковости, высокой продуктивности и товарным качествам плодовых тел. Несмотря на возрастающие объемы культивирования вешенки, промышленное производство в значительной степени сдерживается из-за отсутствия продуктивных отечественных сортов и штаммов (Гарибова и др., 2002). Природные штаммы расширяют генетическую базу и являются исходным материалом для селекции (Urbanelli et al., 2007). Особую ценность представляют «летние штаммы», способные формировать плодовые тела при температуре 25—28 °С без прохождения «холодового шока». Кроме того, при подборе селекционного материала и использовании генетического ресурса природных штаммов важно иметь широкую вариацию макроморфологических признаков, по которым ведется отбор. В этой связи изучение природных мест обитания вешенки в конкретных климатических условиях имеет большое прикладное значение.

Целью данной работы было выявление мест обитания «летних штаммов» рода *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. на территории Северо-Западного Кавказа и установление степени генетического внутривидового разнообразия. Для реализации поставленной цели обследовали лесные биогеоценозы с последующим отбором плодовых тел вешенки и выделением из них чистой культуры; провели видовую идентификацию собранных штаммов и анализ генетического полиморфизма популяций на основании RAPD-профилей.

Материал и методы

Полевые исследования проводили в августе—сентябре 2008 г. на северном макросклоне Главного Кавказского хребта в Апшеронском районе Краснодарского края. По климатическим характеристикам обследованная территория относится к зоне умерен-

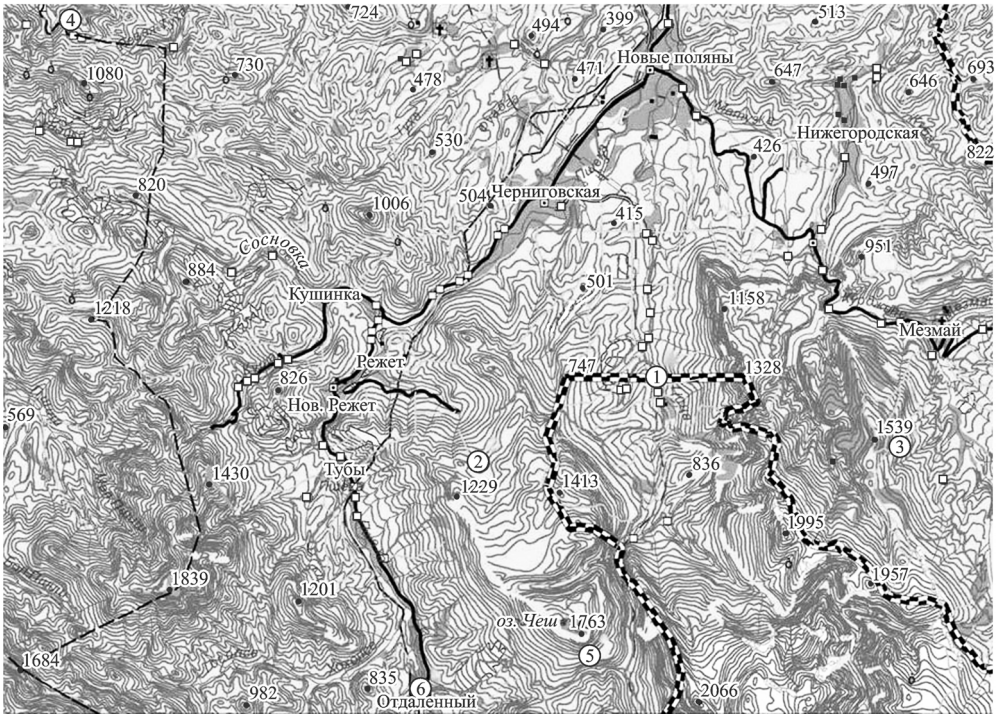

Рис. 1. План-схема мест сбора природных штаммов вешенки (обозначены цифрами в кружках).

но континентального климата с повышенной увлажненностью. Согласно геоботаническому районированию, Апшеронский район относится к Средиземноморской области, Западно-Кавказской провинции, Черкесскому округу, Туапсинско-Пшишскому (основная часть) и Сочи-Майкопскому (только крайний юго-восток) районам. В пределах обследованной территории современная растительность представлена широколиственными лесами с преобладанием бука восточного, а также пихтовыми и пихтово-еловыми лесами (Зернов, 2006). Период исследований характеризовался засушливой погодой без существенных осадков. Дневная температура воздуха составляла 25—30 °С, относительная влажность воздуха в местах сбора базидиом — 47—66 %. Рекогносцировочное обследование местности проводили по случайным площадкам. Разница высот, на которых располагались исследованные площадки, составляла от 300 до 1380 м над ур. моря.

Материалом для исследований послужили плодовые тела вешенки из 6 локалитетов (рис. 1). Координаты локализации природных штаммов, использованных при анализе генетического полиморфизма, отражены в таблице. В пределах обследованной территории было отобрано 23 образца базидиом вешенки, из которых 18, наиболее различающихся по макроморфологическим признакам, были использованы для оценки генетического полиморфизма; из 15 образцов были получены чистые культуры для дальнейшего изучения. Типовой мицелий, выделенный из собранных плодовых тел, хранится в коллекции кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики Кубанского государственного аграрного университета в стандартных условиях.

Выделение чистых мицелиальных дикариотических культур проводили из трамы базидиом на глюкозо-дрожжевой среде (г/л: глюкоза — 5.0, $(NH_4)_2SO_4$ — 4.0, KH_2PO_4 — 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.3, дрожжевой экстракт — 4.5) в чашках Петри при 25 °С. Геномная ДНК для осуществления RFLP- и RAPD-анализов была изолирована из плодовых тел стандартным методом (Kumeda, Asao, 1996). Хранение выделенной ДНК осуществляли при –20°.

Координаты локализации природных штаммов, использованных при анализе генетического полиморфизма

Номер популяции	Координаты	Шифр штаммов
1	44°10′50′′ с. ш., 39°49′29′′ в. д.	IX, X, XI
2	44°09′12′′ с. ш., 39°43′55′′ в. д.	XII
3	44°09′26′′ с. ш., 39°56′36′′ в. д.	XIII-1, XIII-2, XIII-3, XIII-4
4	44°18′51′′ с. ш., 39°31′39′′ в. д.	XIV, XV, XVI
5	44°04′58′′ с. ш., 39°47′11′′ в. д.	XVII, XVIII-1, XVIII-2, XVIII-3, XVIII-4
6	44°04′11′′ с. ш., 39°42′05′′ в. д.	XX-2, XX-3

Примечание. Географические координаты даны в формате WGS-84.

Для иллюстрации масштаба внутривидовой генетической дистанции между исследованными штаммами в качестве внешней группы был использован штамм *Pleurotus cornucopiae* ВКМ F-1979.

RFLP-анализ фрагментов рибосомального оперона ITS. Для определения видовой принадлежности штаммов использовали молекулярные методы видовой идентификации, основанные на применении RFLP-анализа (restriction fragment lengh polymorphism) фрагментов рибосомального оперона ITS (internal transcribed spacer). ПЦР амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2.5 мкл 10×Taq-буфера (700 mM Трис-HCl, pH 8.6/25°, 166 mM $(NH_4)_2SO_4$); 2.5 мМ $MgCl_2$; 150 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата; 50 пмоль каждого праймера; 2.5 ед. Taq-ДНК-полимеразы («Силекс М», Москва) и 20 нг ДНК. Условия амплификации: начальная денатурация при 95° — 2 мин; 30 циклов денатурации при 95° — 30 с, отжига при 50° — 30 с, синтеза при 72° — 45 с; финальный цикл при 72° в течение 7 мин. ITS-участки рибосомальной ДНК были амплифицированы с использованием праймеров ITS4 и ITS5 (White et al., 1990). Рестрикцию продукта ПЦР проводили согласно Янгу (Yang et al., 2007) с использованием рестриктазы Hae III и поставляемого с ней буфера (ООО «СибЭнзим», Москва). Реакционная смесь общим объемом 20 мкл содержала 2 мкл десятикратного буфера, 0.5 мкл рестриктирующего фермента (10 ед./мкл) и 17.5 ПЦР-продукта. Смесь инкубировали при 37° в течение 1.5 ч. Продукты рестрикции разделяли горизонтальным электрофорезом в 1.5%-м агарозном геле с TAE-буфером при U = 5 В/см. Визуализацию проводили в УФ-свете после окрашивания геля в водном растворе бромистого этидия (0.1 мг/мл) и фотографировали с использованием системы видеодокументирования гелей «Gel Imager 2». Размер ITS-фрагментов и продуктов рестрикции определяли путем сравнения со стандартным маркером молекулярной массы ДНК MassRuler™ DNA Ladder Mix («MBI Fermentas»).

RAPD-анализ генотипов. Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере «ДТ-322» (ЗАО ДНК-технология, Москва) с RAPD-праймером S-13 — 5’-gtcgttcctg-3’ (ЗАО «Синтол», Москва), рекомендованным А. В. Шныревой и соавторами (2003). Реакционная смесь для ПЦР (30 мкл) содержала следующие компоненты: 1.5 мМ $MgCl_2$; 3 мкл 10×Taq-буфера (700 mM Трис-HCl, pH 8.6/25°, 166 mM $(NH_4)_2SO_4$); дезоксинуклеозидтрифосфаты (по 50 мкМ каждого; «Силекс М», Москва); 15 пмоль RAPD-праймера; 2 ед. Taq-ДНК-полимеразы («Силекс М», Москва); 20 нг тотальной геномной ДНК. Амплификацию проводили при следующих условиях: начальная денатурация — 5 мин при 95°; 35 циклов при 94° — 60 с; 39° — 60 с; 72° — 120 с; финальный цикл в 10 мин при 72° (Шнырева и др., 2003).

Смешанные с бромфеноловым красителем продукты ПЦР (5 мкл) разделяли горизонтальным электрофорезом в 1.5%-м агарозном геле с TAE-буфером при U = 5 В/см. Визуализацию проводили в УФ-свете после окрашивания геля в водном растворе бро-

мистого этидия. Учитывали только четко различимые ПЦР-фрагменты. Полиморфными считали фрагменты ДНК, присутствующие в спектре не всех изолятов. На основе этих фрагментов составляли матрицу бинарных состояний спектров и рассчитывали генетические дистанции по Неи (Nei, 1978) с использованием программы STATISTICA 5.5®.

Результаты и обсуждение

Обнаруженные природные штаммы вешенки представляли собой группу, гетерогенную по комплексу таксономических признаков, характеризующих габитус плодового тела. Среди типично «летних штаммов», формирующих мелкие плодовые тела молочно-белого, коричневого и серого цвета, встречались формы с крупными базидиомами до 18 см в диам., кутикула которых имела кремовую окраску. Значительно варьировала форма шляпок, среди которых были уховидные, воронковидные и округлые. При этом на одной изучаемой площадке, содержащей несколько валежных деревьев, встречались базидиомы, резко различающиеся по макроморфологическим признакам. Субстрат, на котором происходило развитие плодовых тел, был представлен лишь буком и вязом, что указывает на узкую специализацию в деструкции древесных остатков, хотя известно, что вешенка обладает широкой трофической специализацией по отношению к древесным субстратам, которые могут быть представлены березой, осиной, ольхой, липой, кленом, рябиной, пихтой.

По данным ряда исследователей (Барсукова, Иванов, 1987; Барсукова и др., 1989; Гарибова, 1989), на Кавказе широкое распространение имеют виды *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland и *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. Учитывая, что таксономические признаки, основанные на морфологии базидиом, зависят от типа субстрата, сроков плодоношения и сопряжены с абиотическими факторами среды обитания, проводить идентификацию аборигенных штаммов весьма затруднительно. Кроме того, эта работа осложняется еще и тем, что некоторые виды обладают широким внутривидовым полиморфизмом. В связи с этим в работе был использован молекулярно-генетический метод видовой идентификации. С использованием праймеров ITS4 и ITS5 были амплифицированы ITS-участки рибосомальной ДНК размером около 720 пн, которые подвергали рестрикции ферментом Hae III. После проведения электрофореза на фореграммах были отмечены фрагменты с выраженной видоспецифичностью (рис. 2).

Проведенный ПЦР-RFLP-анализ показал, что все 23 образца базидиом принадлежат к одному биологическому виду *P. pulmonarius*. Учитывая высокую температуру в сравнении с биологическим оптимумом гриба и низкую относительную влажность воздуха в период плодоношения, *P. pulmonarius* можно отнести к термофильным видам, что согласуется с мнением Т. Н. Барсуковой и соавторов (1989). Направленная селекция этого вида позволяет отбирать штаммы, не уступающие по величине плодовых тел и продуктивности штаммам *P. ostreatus* (Vogel, Salmonco, 2000), и использовать этот вид для промышленного культивирования.

Для изучения генетического полиморфизма использовали RAPD-анализ с применением маркерной системы. На рис. 3 представлен спектр амплификации последовательностей ДНК *P. pulmonarius* из разных популяций, полученный при использовании праймера S-13.

Выбранный RAPD-праймер S-13 позволил получить достаточно четкие и воспроизводимые полиморфные фрагменты. Все образцы базидиом имели специфические RAPD-спектры, различающиеся числом амплификонов, их размером и степенью выраженности на электрофореграмме. Число амплификонов составляло от 4 до 12, их размеры варьировали в пределах 300—2150 пн. Наряду с наличием общих амплификонов бóльшую часть спектров составляли фрагменты, которые присутствовали в одних и отсутствали в других геномах. Эти фрагменты являются полиморфными маркерами исследуемой ДНК. Соотношение между общим числом выявленных и полиморфных амплификонов для праймера S-13 составляет 14/13. Генетический полимор-

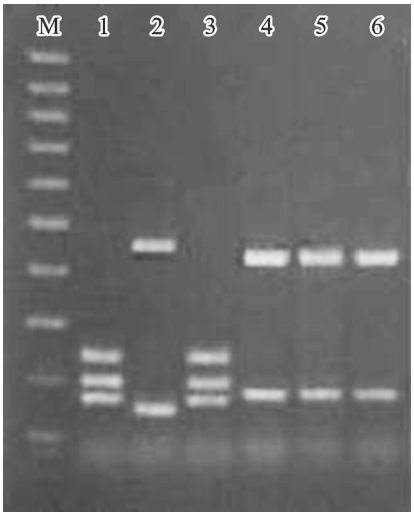

Рис. 2. ПЦР-RFLP-фрагменты, полученные рестрикцией ITS участка рибосомальной ДНК с использованием рестриктазы Hae III.

Линии: 1, 3 — *P. ostreatus* ВКМ F-3889D; 2 — *P. cornucopiae* ВКМ F-1979; 4 — *P. pulmonarius* ВКМ F-2006; 5, 6 — природные изоляты; М — маркер молекулярной массы ДНК MassRuler™ DNA Ladder Mix.

физм оценивали как суммарную долю RAPD-признаков, по которым наблюдается изменчивость, от их общего числа. Применительно к объединенной выборке доля полиморфных локусов в общей совокупности составила 92.8 %, что создает широкую генетическую базу для отбора штаммов и использования их в селекционном процессе. Был выявлен фрагмент размером около 280 пн, стабильно присутствующий в RAPD-спектрах всех образцов базидиом *P. pulmonarius*, но отсутствовавший у *P. cornucopiae*. По данным ранее проведенных исследований (Шнырева др., 2003), фрагмент того же размера был характерен и для штаммов *P. ostreatus*. По-видимому, это обусловлено близостью *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*, что долго создавало трудности для их разделения и отнесения к разным видам.

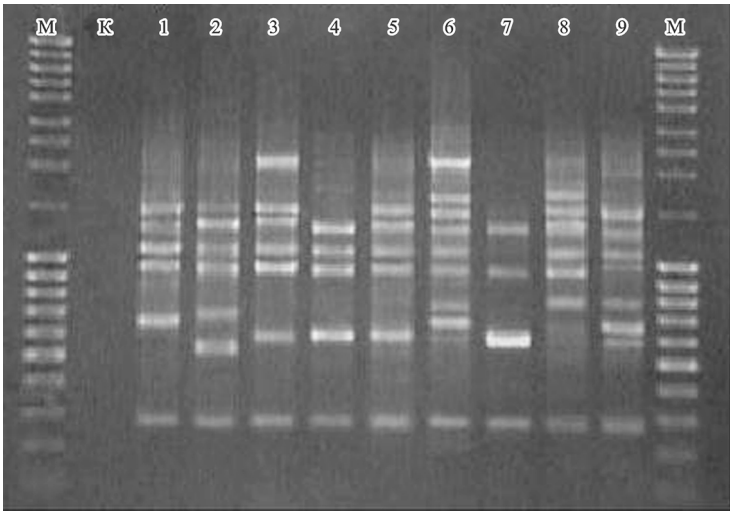

Рис. 3. ПЦР-профили природных изолятов вешенки с использованием RAPD-праймера S-13: 1 — IX, 2 — X, 3 — XI, 4 — XII, 5 — XIII-1, 6 — XIII-2, 7 — XIII-3, 8 — XIV, 9 — XV.

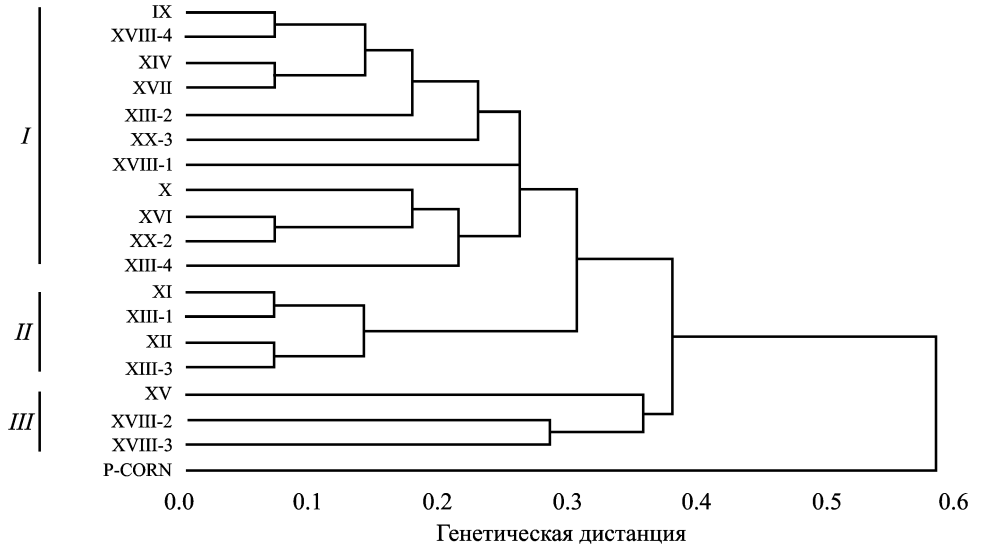

Рис. 4. Дендрограмма генетического сходства по результатам RAPD-анализа между природными штаммами *P. pulmonarius.*

I—III — кластеры.

Для исключения вклада индивидуальной изменчивости в полиморфизм RAPD-спектров был проведен анализ семи монокариотических изолятов, полученных из базидиоспор одного природного штамма *P. pulmonarius.* Результаты анализа свидетельствуют об отсутствии у близкородственных штаммов полиморфизма в RAPD-спектре с использованием праймера S-13. Следовательно, используемый праймер позволяет выявлять более значительные генетические различия.

Для построения дендрограммы, отражающей филогенетические отношения между исследуемыми штаммами по результатам RAPD-анализа, применяли метод невзвешенного попарно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA). На рис. 4 приведена дендрограмма, полученная для набора данных 19 изученных объектов по праймеру S-13 и включающая 14 бинарных признаков.

Территориальная отдаленность мест отбора штаммов позволила выделить 6 локальных популяций. Дендрограмма генетического сходства по результатам RAPD-анализа выявляет 3 основных кластера, однако группировка штаммов внутри кластера не имеет какой-либо связи с местами их отбора, т. е. изоляты сочетались независимо от их географического положения (см. таблицу), что указывает на пространственную внутрипопуляционную гетерогенность генетической структуры *P. pulmonarius* (рис. 4) и свидетельствует о большом генетическом разнообразии этого вида в лесных биогеоценозах Апшеронского района.

Известно, что определяющим фактором стабильности популяции является внутривидовой полиморфизм, который формируется в процессе стабилизирующего отбора. Селекция, основанная на одном хозяйственно важном признаке, чаще всего по продуктивности, приводит к узкому отбору. Однако любой отбор ведет к снижению уровня полиморфизма. Хотя особи, сформированные в естественных условиях, не обязательно имеют высокую продуктивность, они обладают высоким биоценотическим гомеостазом (Шмальгаузен, 1969). Это обстоятельство определяет необходимость постоянного использования новых генотипов при селекции штаммов.

Полученные результаты свидетельствуют о существенном внутривидовом генетическом полиморфизме представителей вида *P. pulmonarius* на территории Северо-Западного Кавказа. Тем не менее генетическая обособленность данных популяционных групп не является строгой; фиксированные различия между ними по RAPD-спектрам

не обнаружены. Полученные данные указывают на достаточно равномерное распределение особей с разными генотипами в пределах исследованной территории, причиной чему могут являться активные лесоразработки, способствующие распространению изолятов по всей территории.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что выявленные природные локалитеты *P. pulmonarius* представляют собой генетически и фенотипически гетерогенную популяцию с высоким уровнем полиморфизма особей. Выборка из природных штаммов может быть использована в качестве источника нового генетического материала для селекции, а также внедрения в производство штаммов, способных формировать плодовые тела в условиях летних температур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барсукова Т. Н., Иванов А. И. Pleurotus cornucopiae (Poulet) Rolland — перспективный вид для искусственного культивирования // Микология и фитопатология. 1987. Т. 21, вып. 2. С. 113—117.

Барсукова Т. Н., Гарибова Л. В., Иванов А. И. Эколого-биологическая характеристика Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quél. // Микология и фитопатология. 1989. Т. 23, вып. 1. С. 14—19.

Гарибова Л. В., Завьялова Л. А., Инсарова И. Д., Комаров В. Б., Лекомцева С. Н., Чайка М. Н. Таксономический анализ коллекции видов и штаммов грибов рода вешенки Pleurotus (Fr.) Kumm. (Mycota, Basidiomicetes, Agaricales s. l.) кафедры микологии и альгологии Московского университета. 1. Морфологические особенности видов Pleurotus in vitro и in vivo // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2002. № 2. С. 46—51.

Гарибова Л. В., Барсукова Т. Н., Иванов А. И. Эколого-биологическая характеристика Pleurotus ostreatus (Fr.) Kumm. // Биол. науки. 1989. № 7. С. 73—77.

Зернов А. С. Флора Северо-Западного Кавказа. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 664 с.

Шмальгаузен И. И. Проблемы дарвинизма. Л.: Наука, 1969. 493 с.

Шнырева А. В., Белоконь Ю. С., Белоконь М. М. Использование молекулярных маркеров для дифференциации культивируемых штаммов вешенки и шампиньона // Общ. генетика. 2003. Т. 39, № 11. С. 1461—1469.

Kumeda Yuko, Asao Tsutomu. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal spacers to differentiate species of Aspergillus section Flavi // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62, N 8. P. 2947—2952.

Nei M. Estimation of average geterozygosity and genetic distance from a smoll number of individuals // Genetics. 1978. Vol. 89. P. 583—590.

Urbanelli S., Della Rossa V., Punelli F., Porretta D., Reverberi M., Fabbri A. A., Fanelli C. DNA-fingerprinting (AFLP and RFLP) for genotypic identification in species of the Pleurotus eryngii complex // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 74. P. 592—600.

Vogel F., Salmoneo D. Comparative study on the productivity of strains of Pleurotus spp. in commercial cultivation // Rev. Iberoamer. Micol. 2000. Vol. 17. P. 138—141.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and application. London: Acad. press, 1990. P. 315—322.

Yang Zhi-hui, Huang Ji-xiang, Yao Yi-jian. Autoscreening of restriction endonucleases for PCR-restriction fragment length polymorphism identification of fungal species, with Pleurotus spp. as an example // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73, N 24. P. 7947—7958.

Кубанский государственный аграрный университет
Краснодар
serge 1983y@rambler.ru

Поступила 2 XII 2008

РЕЗЮМЕ

Представлена информация по результатам молекулярного анализа геномов природных изолятов рода *Pleurotus.* С использованием рестрикционного анализа установлена принадлежность «летних штаммов» вешенки к виду *Pleurotus pulmonarius*; на основании RAPD-анализа установлен генетический полиморфизм природных штаммов. Методом иерархического кластерного анализа вычислена генетическая дистанция между штаммами вешенки из разных природных локалитетов. Проведенные исследования позволили выявить места обитания «летних штаммов» и продемонстрировать целесообразность использования обозначенной территории при формировании нового исходного материала для селекции вешенки.

Ключевые слова: *Pleurotus pulmonarius*, генетический полиморфизм, холодовый шок, селекция вешенки.

SUMMARY

The data on the molecular analysis of genomes of wild isolates of the genus *Pleurotus* are given. With use of RFLP-analysis the belonging of «summer strains» to the species *Pleurotus pulmonarius* is determined; by the results of RAPD-analysis the genetic polymorphism of isolates is established. On the basis of the obtained spectra with use of the method of hierarchical cluster analysis the genetic distances between strains from different natural locality of oyster mushrooms are determined. The carried investigations have allowed to reveal places of growth of «summer strains» and to prove expediency of use of the surveyed territory for formation of new initial material for selection of oyster mushrooms.

Key words: *Pleurotus pulmonarius*, genetic polymorphism, cold shock, selection of oyster mushrooms.