

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ  
*GANODERMA APPLANATUM* (PERS.)  
РАТ. МОСКОВСКОГО РЕГИОНА

Выпускная квалификационная работа магистра

Федоровой Марьи Дмитриевны

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Шнырева Алла Викторовна



# Актуальность

Отдел Basidiomycota

Подотдел Agaricomycotina

Класс Agaricomycetes

Порядок Polyporales

Семейство Ganodermataceae

- *Ganoderma applanatum* является одним из самых распространенных полипоровых грибов в мире.
- Виды рода *Ganoderma* являются продуцентами стеролов, полисахаридов, фенолов, тритерпенов, демонстрирующих цитотоксическую, антибактериальную, антиоксидантную, антипролиферативную, противовирусную и другие активности.
- Разные штаммы одного вида могут в разной степени продуцировать вышеперечисленные соединения. В связи с чем изучение внутривидового генетического разнообразия может привести к обнаружению интересных с практической точки зрения штаммов и их дальнейшему применению в биотехнологии.

# Цель и задачи

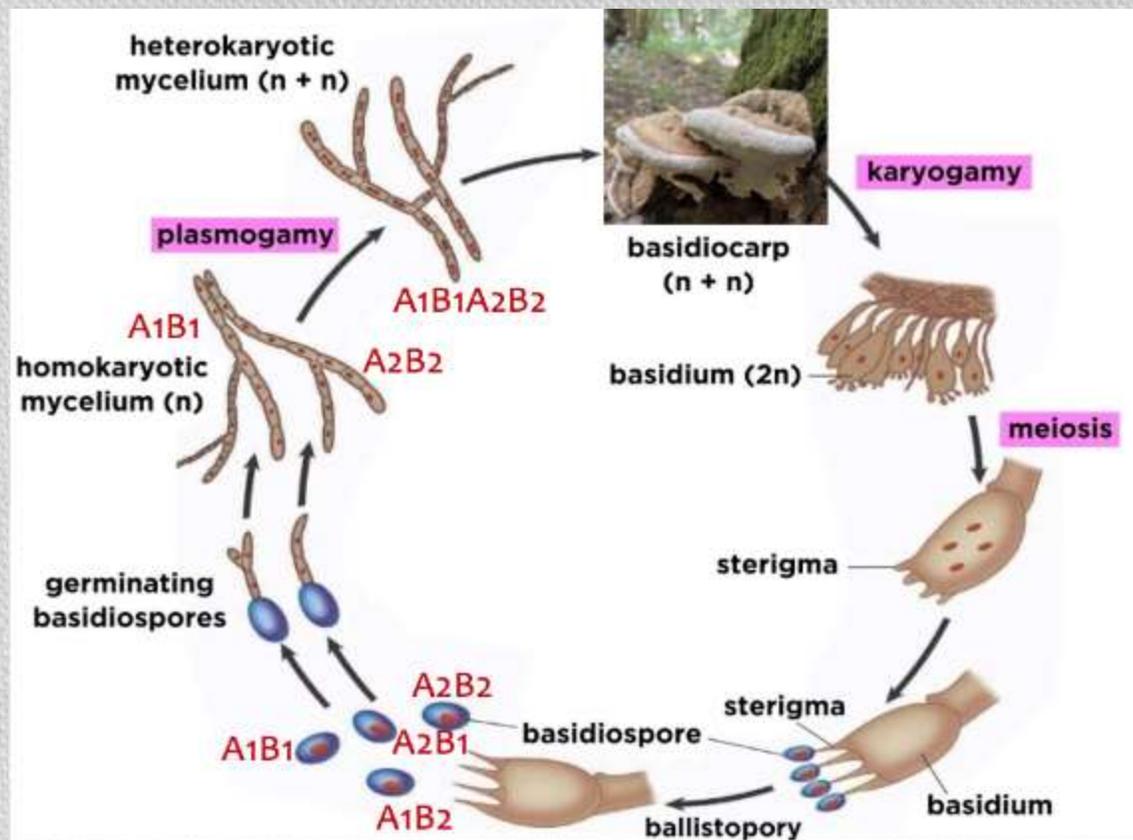
**Целью** данной работы является изучение генетического полиморфизма *G. applanatum* в Московском регионе.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- Сбор плодовых тел *G. applanatum* в лесопарках и парках Москвы и Московской области;
- Выделение чистых культур и подтверждение видового статуса природных изолятов молекулярными методами (молекулярная идентификация);
- Получение монокариотических тестерных штаммов половой совместимости для вида *G. applanatum*;
- Анализ половой совместимости природных изолятов с помощью мон-мон и ди-мон скрещиваний;
- Анализ вегетативной совместимости природных изолятов;
- Оценка уровня генетического разнообразия природных штаммов *G. applanatum* в Московском регионе.

# Жизненный цикл *G. arplanatum*

- Гаплоидно-дикариотический жизненный цикл, дикариотическая фаза явно преобладает.
- Тетраполярный (двухфакторный) гетероталлизм: половой процесс контролируется двумя несцепленными факторами спаривания A и B, которые имеют множество аллелей.



Тестеры половой совместимости

F <sub>1</sub> базидио споры	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>
A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	-	-	-	+
A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	-	-	+	-
A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	-	+	-	-
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	+	-	-	-

# Половая и вегетативная совместимость базидиомицетов

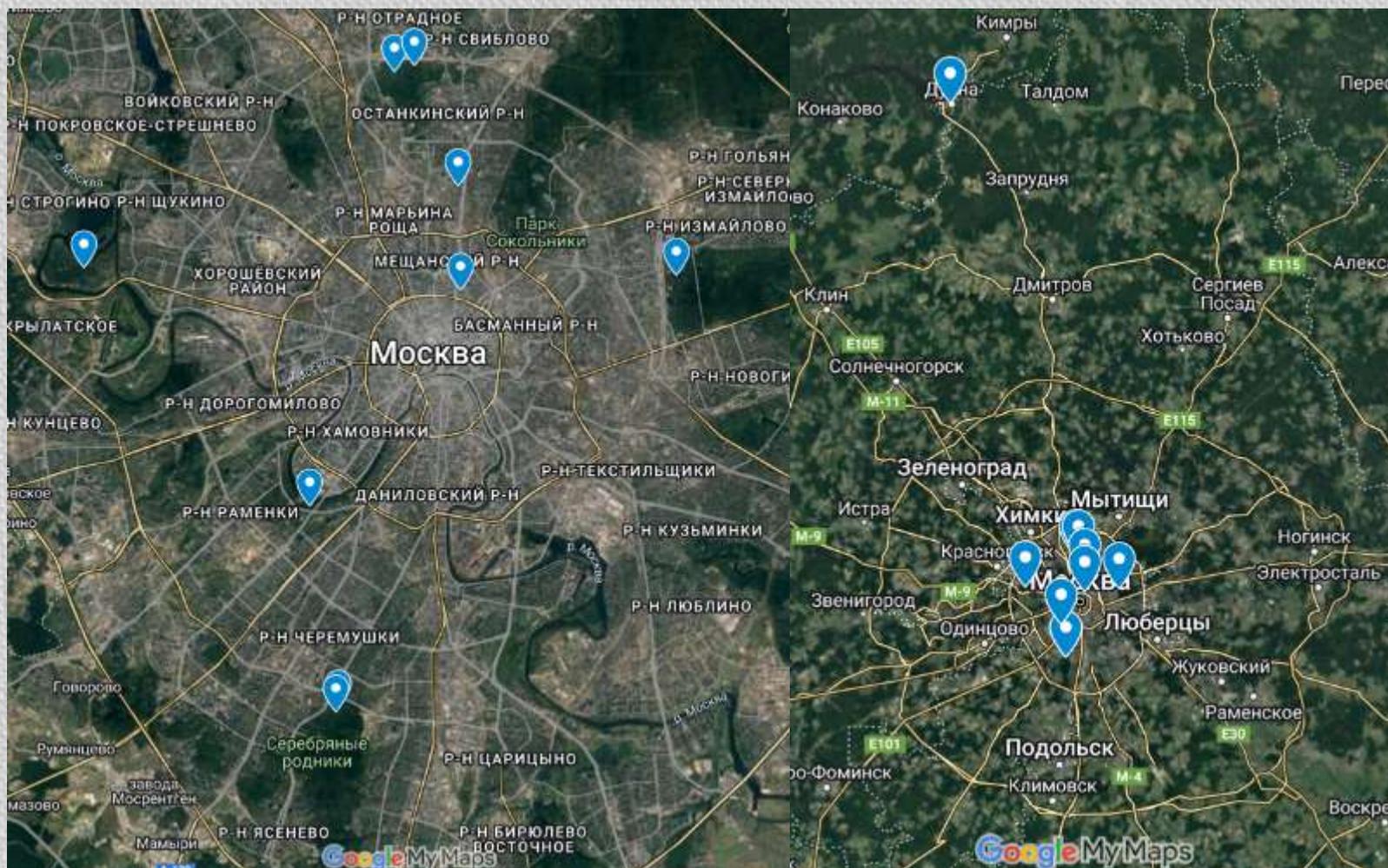
- **Половая совместимость:** контролируется *mat* локусами. Имеет место при контакте двух монокарионов или монокариона и дикариона. Совместимыми являются мицелии с различными аллелями по обоим локусам. Половая несовместимость предотвращает формирование вторичного мицелия и репродуктивных структур.
- **Вегетативная совместимость:** контролируется *het* локусами. Имеет место при контакте двух дикарионов. Совместимыми являются мицелии с одинаковыми аллелями по всем локусам. Вегетативная несовместимость разграничивает индивидов в природных популяциях и предотвращает обмен генетической информацией.
- Системы вегетативной и половой совместимости регулируются независимо.

# Схема эксперимента



# Места сбора и природные изоляты, использованные в работе

Сбор плодовых тел проводили осенью 2021 года, а также весной, летом и осенью 2022 в различных парках и лесопарках Москвы и Московской области.





Было собрано 23 плодовых тела, чистые культуры выделены из 16.

Все базидиомы развивались на мертвой древесине лиственных пород, за исключение штамма GA-M-11-1, найденного на живой осине.

Возраст плодовых тел не превышал двух лет: большинство базидиом были однолетними, четыре штамма (GA-M-3-4, GA-M-7-1, GA-M-7-2, GA-M-11-1) имели два слоя гименофора.

# Получение монокариотических тестерных штаммов половой совместимости

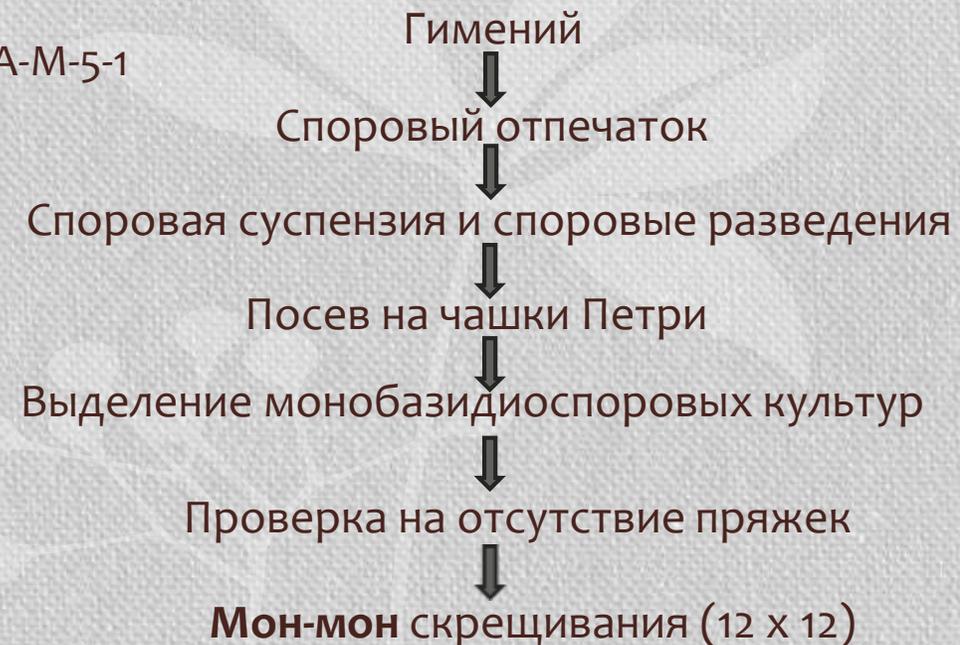
Мон-мон скрещивания между монобазидиоспоровым потомством штамма GA-M-5-1

Монокариот. штаммы		m3	m8	m13	m16	m18	m19	m5	m9	m12	m11	m17	m20
		A1B1					A1B2			A2B1	A2B2		
m3	A1B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
m8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
m13		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
m16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
m18		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
m19		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
m5	A1B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
m9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
m12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
m11	A2B1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
m17	A2B2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
m20		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие пружек, половая несовместимость;

«+» – наличие пружек, половая совместимость;

A и B – аллели локусов половой совместимости.



## Монокариотические штаммы-тестеры

Штаммы		GA5-m3	GA5-m5	GA5-m11	GA5-m17
		A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
GA5-m3	A1B1	-	-	-	+
GA5-m5	A1B2	-	-	+	-
GA5-m11	A2B1	-	+	-	-
GA5-m17	A2B2	+	-	-	-

**Мон-мон скрещивания между монобазидиоспоровым потомством штамма GA-M-8-1**

Монокариот. штаммы	m1	m2	m8	m11	m4	m7	m3	m6	m13	m12
	A3B3				A3B4		A4B3			A4B4
m1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
m2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
m8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
m11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
m4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
m7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
m3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
m6	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
m13	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
A4B4	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие пружек, половая несовместимость; «+» – наличие пружек, половая совместимость; А и В – аллели локусов половой совместимости.

Выделение четырех гаплоидных штаммов-тестеров, различающихся аллелями локусов половой совместимости, свидетельствует о **тетраполярном гетеротализме *G. applanatum***.



Гимений GA-M-8-1 на чашке Петри

**Монокариотические штаммы-тестеры**

Штаммы	GA8-m1	GA8-m4	GA8-m3	GA8-m12
	A3B3	A3B4	A4B3	A4B4
GA8-m1	A3B3	-	-	+
GA8-m4	A3B4	-	+	-
GA8-m3	A4B3	-	+	-
GA8-m12	A4B4	+	-	-

Фенотипические различия в зоне скрещивания монокарионов, различающихся аллелями локусов  
половой совместимости

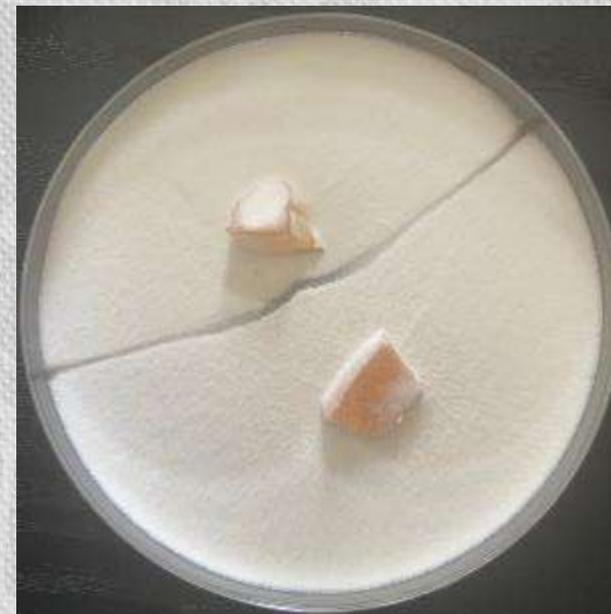


Бarrage-фенотип  
 $A \neq B =$

- $A_1B_1 + A_2B_2$  совместимость (+)
- $A_1B_1 + A_2B_1$  полусовместимость (-)
- $A_1B_1 + A_1B_2$  полусовместимость (-)
- $A_1B_1 + A_1B_1$  несовместимость (-)



Половая совместимость  
 $A \neq B \neq$



Flat-фенотип  
 $A = B \neq$

# Анализ половой совместимости природных изолятов

Мон-мон скрещивания между тестерами GA-M-5-1 и GA-M-8-1

Монокариотические штаммы-тестеры		GA8-m1	GA8-m4	GA8-m3	GA8-m12
		A3B3	A3B4	A4B3	A4B4
GA5-m3	A1B1	+	+	+	+
GA5-m5	A1B2	+	+	+	+
GA5-m11	A2B1	+	+	+	+
GA5-m17	A2B2	+	+	+	+

Примечание: «+» – наличие пряжек, половая совместимость

Половая совместимость дикариотических природных изолятов с четырьмя гаплоидными тестерами (дикариотизация монокариотических тестеров) свидетельствует о присутствии различных аллелей в локусах А и В половой совместимости, т.е. о мультиаллельности этих локусов.

Ди-мон скрещивания природных изолятов с тестерами половой совместимости GA-M-8-1

Монокариотические тестеры	GA8-m1	GA8-m4	GA8-m3	GA8-m12
	A3B3	A3B4	A4B3	A4B4
Дикариотические штаммы				
GA-M-1-1	+	+	+	+
GA-M-2-1	+	+	+	+
GA-M-3-3	+	+	+	+
GA-M-4-1	+	+	+	+
GA-M-7-2	+	+	+	+
GA-M-9-1	+	+	+	+
GA-M-10-1	+	+	+	+
GA-M-11-1				

**Вегетативная несовместимость** – это соматическая несовместимость между генетически различными штаммами одного вида.

Дикарион ≠ Дикарион



Гетерокариотические индивиды



Реакция антагонизма в зоне контакта мицелиев

Типы антагонистических ответов при сращивании природных дикариотических изолятов



**Compatible**  
(GA-M-7-1 x GA-M-7-2)



**Weak**  
(GA-M-1-2 x GA-M-2-1)



**Medium**  
(GA-M-4-1 x GA-M-10-1)



**Strong**  
(GA-M-2-1 x GA-M-7-2)

# Типы реакций вегетативной несовместимости между природными штаммами

Штаммы	1-1	1-2	2-1	3-1	3-2	3-3	3-4	4-1	5-1	7-1	7-2	8-1	9-1	9-2	10-1	11-1
1-1	C	C	W	W	W	W	W	M	S	S	S	W	M	M	S	W
1-2		C	W	W	W	W	W	M	S	S	S	W	M	M	S	W
2-1			C	M	M	M	M	M	S	S	S	S	S	S	M	S
3-1				C	C	C	C	W	S	S	S	M	S	S	S	M
3-2					C	C	C	W	S	S	S	M	S	S	S	M
3-3						C	C	W	S	S	S	M	S	S	S	M
3-4							C	W	S	S	S	M	S	S	S	M
4-1								C	M	S	S	W	M	M	M	M
5-1									C	S	S	S	S	S	S	M
7-1										C	C	M	S	S	S	S
7-2											C	M	S	S	S	S
8-1												C	W	W	M	M
9-1													C	C	M	M
9-2														C	M	M
10-1															C	M
11-1																C

Вегетативно совместимые штаммы (соматические клоны):

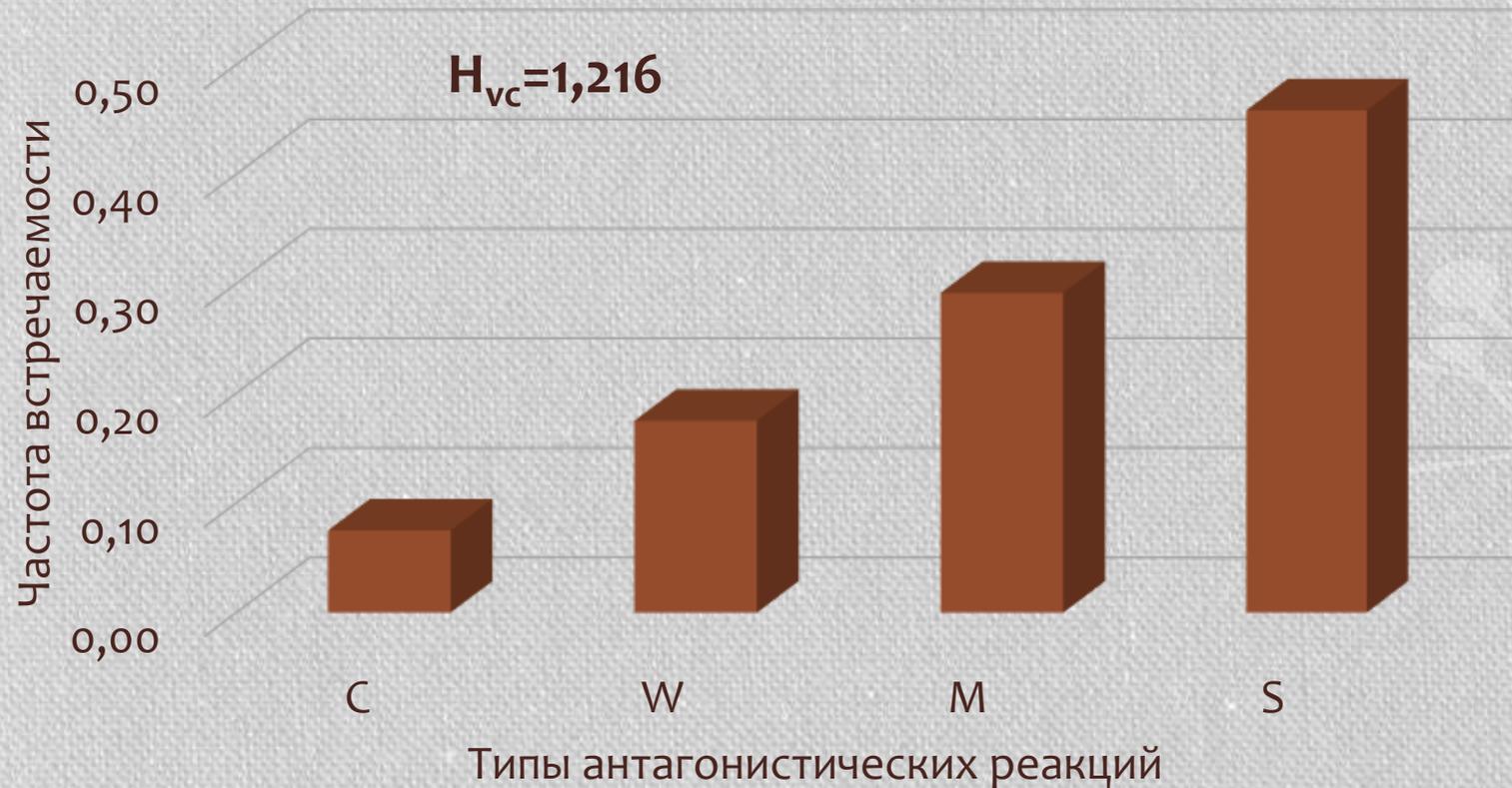
- 1-1, 1-2
- 3-1, 3-2, 3-3, 3-4
- 7-1, 7-2
- 9-1, 9-2

**Вегетативно совместимые** штаммы-клоны обнаружены только в пределах одного субстрата.

Все остальные природные изоляты являются **генетически различными** индивидами.



## Частоты встречаемости групп вегетативной несовместимости



**C** - вегетативная совместимость;  
**W**- слабый антагонизм;  
**M**- антагонизм средней степени;  
**S** – сильный антагонизм.

Индекс разнообразия Шеннона  $H_{vc} = -\sum p_i \times \ln p_i$ , где  $p_i$  – частота встречаемости  $i$ -того типа реакции

Разнообразие реакций антагонизма при сращивании **дикариотических** природных штаммов с преобладанием антагонистических ответов сильной степени, а также относительно высокое значение индекса генетического разнообразия ( $H_{vc} = 1,216$ ) свидетельствуют о высоком генотипическом разнообразии природных изолятов *G. applanatum* и о вероятной мультиаллельности het-локусов соматической несовместимости.

# Молекулярно-генетический анализ

Выделение ДНК из мицелия с помощью набора «NucleoSpin® Plant II»

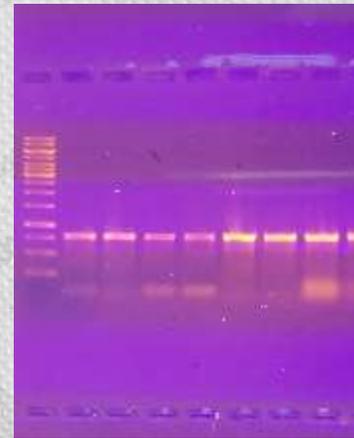
ПЦР со специфичными праймерами (ITS1, ITS4, ITS4B)

Электрофорез в 1% агарозном геле для оценки результата амплификации и размера ПЦР-продукта

Очистка ПЦР-продуктов прямым осаждением этанолом или методом элюции из агарозного геля на магнитных частицах (SileksM), определение концентрации ДНК на флуориметре Qubit™

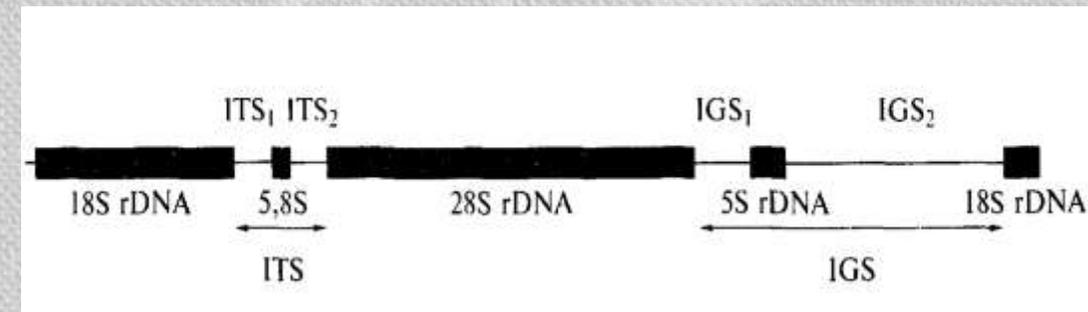
Секвенирование на автоматическом секвенаторе ABI PRISM® 3730 Applied Biosystems в компании ЦКП "Геном"

Анализ результатов секвенирования с помощью программ Chromas, BLAST и MEGA X



Для анализа внутривидового полиморфизма часто используют минисателлитные последовательности и переменные ITS-участки кластера генов рДНК.

**ITS** (internal transcribed spacer, или внутренний транскрибируемый спейсер) - это участок между генами большой (28S) и малой (18S) субъединиц рибосом, прерываемый последовательностью гена 5,8S РНК.





# Выводы

1. Было собрано 23 плодовых тела *G. applanatum* в лесопарках и парках Москвы и Московской области. Чистые культуры были выделены из 16 штаммов, для 10 из них получены отсекуеннированные ITS участки ДНК. Для всех подтверждена видовая принадлежность виду *G. applanatum*.
2. Предложенная методика получения стерильных споровых отпечатков из гимения в чистой культуре позволила получить монокариотические тестерные штаммы половой совместимости для двух природных изолятов GA-M-5-1 и GA-M-8-1.
3. С помощью мон-мон и ди-мон скрещиваний было подтверждено, что все штаммы анализируемой коллекции относятся к одному биологическому виду – *G. applanatum*. Мон-мон скрещивания тестеров от двух разных штаммов показали наличие разных аллелей в двух несцепленных *matA* и *matB* локусах.

# Выводы

4. Вегетативно совместимые штаммы были обнаружены только в пределах одного субстрата; все остальные штаммы были вегетативно несовместимы с преобладанием реакции сильного антагонизма (с частотой встречаемости  $p=0,46$ ). Однако, не было отмечено зависимости между типом антагонизма и расположением места сбора изолятов. Индекс генетического разнообразия Шеннона был относительно высоким –  $H_{vc}=1,216$ .
5. Сходство ITS последовательностей между штаммами коллекции составило 99-100%; наиболее отличающимися от остальной выборки оказались два штамма, собранные в разных округах г. Москвы, и попавшие в отдельный кластер. В целом, уровень внутривидового генетического разнообразия по ITS региону оказался невысоким, но достаточным для четкого разделения сходных по морфологии видов *G. applanatum* и *G. australe* и может быть предложен для использования в качестве первичного бар-кодинга для идентификации/верификации видов рода *Ganoderma*.

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**



# Благодарности

Хочу выразить искреннюю благодарность своему научному руководителю, Шныревой Алле Викторовне, за руководство и помощь на всех этапах работы и за получение новых знаний и навыков; Сиволаповой Анастасии Борисовне за дополнительное мнение, рецензию на работу; а также всему коллективу кафедры микологии и альгологии за содействие и поддержку.