

УДК 575.18: 582.287.238

## АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ *MAT A* ЛОКУСА ПОЛОВОЙ СОВМЕСТИМОСТИ У СЪЕДОБНОГО БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS*

© 2023 г. А. В. Шнырева<sup>1,\*</sup>, А. А. Шнырева<sup>1,\*\*</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

\*e-mail: ashn@mail.ru

\*\*e-mail: shnirevaa@mail.ru

Поступила в редакцию 10.02.2022 г.

После доработки 25.08.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Съедобный гриб вешенка устричная (*Pleurotus ostreatus*) широко культивируется по всему миру. Морфогенез, связанный с образованием плодовых тел, находится под генетическим контролем двух несцепленных локусов половой совместимости *matA* и *matB* со множественными аллелями (тетраполярная система половой совместимости). Генетический анализ встречаемости аллелей локусов половой совместимости у 17 природных изолятов, собранных в Московской обл., показал мультиаллельность обоих локусов — 10 аллелей *matA* локуса и 8 аллелей *matB* локуса. Анализ *in silico* структурной организации локуса *matA* у монокариотических штаммов *P. ostreatus* PC9 и PC15 на основе данных полногеномного секвенирования (DOE Joint Genome Institute) показал чрезвычайно дивергентную его структуру: *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* (класс HD1 белков) и одну копию *hd2* (класс HD2 белков). Анализ аминокислотных последовательностей гомеодоменных белков HD1 и HD2 показал, что белки обладают глобулярной структурой, характеризуются ядерной локализацией и содержат варибельный N-конец и более консервативный ДНК-связывающий домен с характерным консервативным мотивом WFXNXXR в третьей  $\alpha$ -спирали. Полученные результаты позволяют утверждать, что мультиаллельность *matA* локуса половой совместимости достигается как за счет копийности кодирующих генов в пределах локуса, так и за счет варибельности кодирующих генных последовательностей.

**Ключевые слова:** базидиомицеты, гомеодоменные факторы транскрипции, локусы половой совместимости, половая совместимость

DOI: 10.31857/S0026364823020101, EDN: NJGWOQ

### ВВЕДЕНИЕ

Для большинства гомобазидиальных грибов характерен гаплоидно-дикариотический жизненный цикл, который представлен двумя чередующимися фазами — монокариотической (гаплоидной) и дикариотической (функционально диплоидной). Плодовые тела могут образовываться исключительно на дикариотическом мицелии. В фертильной части плодовых тел на базидиях формируются гаплоидные базидиоспоры, которые прорастают гаплоидным монокариотическим мицелием, который не способен образовывать плодовые тела. Для образования фертильного (плодоносящего) дикариотического мицелия должно произойти слияние двух совместимых по полу гаплоидных мицелиев, которые гетероаллельны по двум несцепленным локусам (*matA* и *matB*) с множественными аллелями (AxVx, AyVy) (Zervakis, Balis, 1996; Shnyreva et al, 2012). Ранее нами в природных популяциях грибов вешенок рода *Pleurotus* в Московской и Воронежской областях было обнаруже-

но 37 аллелей *matA* локуса и 35 аллелей *matB* локуса для вида *P. pulmonarius* и 24 аллеля *matA* и 21 аллель *matB* локуса для *P. ostreatus* (Shnyreva et al., 1998; Shnyreva, Shtaer, 2006). Мультиаллельность A и B локусов отмечена и для других видов: *P. djamor* (58 *matA* и 231 *matB*), *P. populinus* (126 *matA* и 354 *matB*) (Anderson et al., 1991; James et al, 2004). Локусы *matA* и *matB* отличаются по структуре и обладают разными регуляторными функциями. Из исследований, проведенных на модельных базидиальных грибах *Coprinopsis cinerea* и *Schizophyllum commune*, известно, что локус *matA* кодирует два типа гомеодоменных транскрипционных факторов (HD1 и HD2), а локус *matB* кодирует гены феромонов и рецепторов феромонов (Raudaskoski, Kothe, 2010). Наиболее хорошо изученным является *matB* локус в силу того, что закодированные в нем гены феромонов и рецепторов феромонов обладают консервативной структурой. Гены локуса *matA*, в отличие от *matB*, очень варибельны по нуклеотидным последовательностям, вследствие чего их изучение затруднено. Структурная орга-

низация локуса *matA* была детально изучена на модельном объекте *Coprinosia cinerea*, у которого в пределах локуса имеется три пары генов; при этом каждая пара генов (кассета) кодирует два типа гомодоменных транскрипционных факторов (HD1 и HD2) (Casselton, Kues, 2007). Однако у изученных видов базидиальных грибов редко можно встретить структуру *matA* локуса с полным набором всех трех пар генов (кассет). В пределах кассет локуса часто встречаются делеции одного из *hd* генов или же, наоборот, в одном локусе *matA* могут быть закодированы от одной копии *hd1* или *hd2* генов до нескольких, например, как у гомобазидиальных грибов *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Fomitiporia mediterranea*, *Schizophyllum commune*, *Hypsizygos marmoreus* (James et al., 2013; Raudaskoski, 2015; Wang et al., 2016; Wang et al., 2021). В результате димеризации двух совместимых HD1-HD2 белков от разных половых партнеров (монокарионов) образуется активный гетеродимерный транскрипционный фактор, который запускает экспрессию специфических для развития дикариона генов, а также подавляет специфические “монокариотические” гены, функционирующие в гаплоидном мицелии.

Целью исследования было провести количественную оценку аллелей локусов половой совместимости у природных изолятов вешенки, собранных на ограниченной территории, и оценить общее аллельное разнообразие, а также провести анализ *in silico* структуры *matA* локуса половой совместимости *Pleurotus ostreatus* на основе данных полногеномного секвенирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Сбор и культивирование природных изолятов *Pleurotus ostreatus*

Плодовые тела вешенки устричной (*P. ostreatus*) собирали на территории Звенигородской биостанции МГУ Московской обл. в августе 2018 г. с различных субстратов – осины, березы, рябины. Из плодовых тел было получено 17 мицелиальных дикариотических изолятов, которые были депонированы в коллекцию кафедры микологии и альгологии МГУ. Культивирование штаммов и проведение скрещиваний осуществляли на чашках Петри с сусло-агаром (150 мл пивного сусла, 850 мл воды, 20 г агара) при 25°C в темноте.

### Генетический анализ разнообразия аллелей локусов половой совместимости у природных штаммов *Pleurotus ostreatus*

**Получение стерильных базидиоспоровых отпечатков.** Для проведения генетического анализа половой совместимости была отработана методика получения плодовых тел и стерильных споровых отпечатков непосредственно на чашках Петри.

Для этого мицелий инокулировали в центре чашки Петри и инкубировали в темноте при 25°C до полного зарастания мицелием поверхности чашки Петри (приблизительно 7–8 сут). После этого чашки Петри помещали в холодильник при температуре 4°C на двое сут для стимуляции плодобразования холодом, после чего продолжали инкубировать перевернутыми при комнатной температуре (23–25°C) и естественном освещении со сменой “день – ночь”. В среднем на 10–14-е сут отмечали появление на поверхности мицелия миниатюрных плодовых тел и споровых отпечатков базидиоспор на крышке чашки Петри.

**Получение гаплоидных тестеров половой совместимости и количественная оценка аллельного разнообразия локусов.** Для проведения генетического анализа встречаемости аллелей локусов половой совместимости у природных штаммов *P. ostreatus* получали гаплоидные тестеры половой совместимости (типов спаривания) согласно стандартной методике с использованием базидиоспоровых расщепов, полученных из стерильных споровых отпечатков на чашках Петри (Shnyreva et al., 1998). Количественную оценку аллелей факторов половой совместимости осуществляли с использованием полученных монобазидиоспоровых гаплоидных тестерных штаммов, гетероаллельных по А и В факторам половой совместимости в мон-мон и ди-мон скрещиваниях (Shnyreva et al., 1998). Мон-мон скрещивания проводили между монокариотическими тестерами (по четыре тестерных штамма АхВх, АуВу, АхВу, АуВх для каждого природного изолята). Ди-мон скрещивания осуществляли между дикариотическими природными штаммами и четырьмя тестерами вида *P. ostreatus* (штамм М-38) из нашей коллекции.

### Анализ *in silico* структуры *matA* локуса половой совместимости

**Анализ структуры *matA* локуса у видов рода *Pleurotus*.** Для проведения структурного анализа *matA* локуса *in silico* были взяты последовательности из электронных баз: последовательности *matA* локуса монокариотических штаммов PC9 и PC15 *P. ostreatus* (Joint Genome Institute, <http://jgi.doe.gov/>); последовательности монокариотических штаммов RV95/134.104 и RV95/957.30 *P. djamor* (номера в ГенБанке AY462112, AY462111); последовательности монокариотических штаммов CCMSSC00488 и CCMSSC00489 *P. eryngii* (номера в ГенБанке HQ595186, HQ595187). Для проведения множественных выравниваний и поиска гомологий между последовательностями использовали программу Dialign 2.2.1 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign>) (Morgenstern, 2004).

**Анализ структуры *matA* локуса *Pleurotus ostreatus*.** Структурные и функциональные особенности HD белков изучали на основе аминокислотных после-

довательностей гомеодоменных белков *matA* локуса штаммов PC9 и PC15 *P. ostreatus*, геномы которых полностью отсеквенированы и опубликованы на сайте DOE JGI (Joint Genome Institute, <http://genome.jgi.doe.gov/>). Для предсказания наличия сигнальных последовательностей использовали программы SignalP 4.1 ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)) и PSORT (алгоритм k-Nearest Neighbors Classifier) (Petersen et al., 2011). 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 (вторичной структуры) использовали программу SWISS-MODEL Secondary Structure Prediction and Domain Assignment (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php>) (Arnold et al., 2006).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Количественный анализ аллелей локусов половой совместимости у природных штаммов вешенки устричной *Pleurotus ostreatus*

Для пяти дикариотических природных изолятов (М-8, М-9, М-13, М-14 и М-17) были получены монокариотические (гаплоидные) тестерные штаммы (по четыре тестера для каждого природного штамма) и проведены мон-мон скрещивания с тестерами половой совместимости (штамм М-38) вида *P. ostreatus* (табл. 1). Во всех проведенных мон-мон скрещиваниях была продемонстрирована половая совместимость монокариотических тестерных штаммов, полученных из природных дикариотических штаммов, с тестерами М-38 *P. ostreatus*. Половую совместимость определяли по наличию характерных пряжек на мицелии в месте контакта монокариотических (гаплоидных) мицелиев, что свидетельствовало о дикариотизации монокарионов. Формирование пряжек в области септ является хорошим и удобным диагностическим признаком дикариотического мицелия у многих гомобазидиальных грибов, включая представителей рода *Pleurotus*. В нашем эксперименте половая совместимость со всеми четырьмя тестерами штамма М-38 указывала на то, что у скрещиваемых природных штаммов присутствовали различные аллели локусов *A* и *B* половой совместимости (табл. 1). Наличие различных аллелей у пяти природных штаммов (М-8, М-9, М-13, М-14 и М-17) было подтверждено также во взаимных скрещиваниях монокариотических тестеров природных дикариотических штаммов между собой во всех возможных комбинациях (табл. 2, представлены результаты для трех штаммов). При этом штаммы М-8 и М-9 были гетероаллельны по обоим локу-

сам половой совместимости (*matA* и *matB*), в то время как у штаммов М-8 и М-13 были обнаружены одинаковые аллели В-локуса (50% совместимых комбинаций в мон-мон скрещиваниях). Штаммы М-14 и М-17 были взаимно совместимы по полу как между собой, так и со штаммами М-8, М-9 и М-13 (данные в табл. 2 не представлены). Остальные 12 природных дикариотических штаммов были протестированы в ди-мон скрещиваниях, то есть в скрещиваниях дикарионов с монокариотическими тестерами штамма М-38 вида *P. ostreatus* (табл. 1). В случае совместимых по полу комбинаций в ди-мон скрещиваниях происходила дикариотизация монокариотического тестера, сопровождаемая образованием пряжек на монокариотическом мицелии.

Таким образом, при анализе 17 природных изолятов *P. ostreatus* обнаружили, по крайней мере, 10 аллелей *matA* локуса и 8 аллелей *matB* локуса, что согласуется с ранее полученными данными о мультиаллельности локусов половой совместимости в наших исследованиях и в работах других авторов (Anderson et al., 1991; Shnyreva et al., 1998; Larraya et al., 1999). В работе Сиволаповой с соавторами (Sivolapova et al., 20012) *mat* локусы *P. ostreatus* были прокартированы: *matA* локус расположен на III хромосоме, *matB* — на IX хромосоме.

### Анализ структуры *matA* локуса половой совместимости у представителей рода *Pleurotus*

Анализ структуры *matA* локуса половой совместимости провели для трех видов рода *Pleurotus* — *P. ostreatus*, *P. eryngii* и *P. djamor* — на основе данных по частично или полностью отсеквенированным геномам. Ранее при детальном структурном анализе *matA* локуса у модельного гриба *Coprinus cinerea* было показано, что локус кодирует гомеодоменные белки HD1 и HD2, которые являются факторами транскрипции, но при этом белки значительно различаются по структуре и аминокислотным последовательностям (Raudaskoski, Kothe, 2010; Kues et al., 2011). Оба класса гомеодоменных белков содержат три области с  $\alpha$ -спиральной структурой, третья из которых включает консервативный ДНК-связывающий мотив WFXNXXR; при этом последовательности ДНК-связывающего домена также различаются. Так, HD2 тип обладает высокой ДНК-связывающей активностью, в то время как HD1 обладает более слабой активностью, но при этом обладает сигналами ядерной локализации и активационным доменом (Raudaskoski, Kothe, 2010). Белки HD2 класса *C. cinerea* имеют типичную для гомеодоменов протяженность ДНК-связывающего домена в 60 аминокислот (а.к.), в то время как гомеодомены HD1 содержат три дополнительные аминокислоты между первой и второй  $\alpha$ -спиралями. Особо значимыми в структуре гомеодоменных белков HD1 и HD2 являются

**Таблица 1.** Оценка встречаемости аллелей локусов половой совместимости у природных изолятов *Pleurotus ostreatus* в мон-мон и ди-мон скрещиваниях

| Природные штаммы   |                        |    |               | Гаплоидные тестеры М-38 <i>P. ostreatus</i> |             |             |             |
|--|------------------------|----|---------------|---|-------------|-------------|-------------|
|  |                        |    |               | m1*   | m2          | m3          | m4          |
|  |                        |    |               | <i>A1B1</i> **                              | <i>A1B2</i> | <i>A2B1</i> | <i>A2B2</i> |
| Мон-мон скрещивания монокариотических тестерных штаммов природных изолятов | Штамм М-8              | m1 | <i>A3B3</i>   | +***  | +           | +           | +           |
|  |                        | m2 | <i>A3B4</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m3 | <i>A4B3</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m4 | <i>A4B4</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  | Штамм М-9              | m1 | <i>A5B5</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m2 | <i>A5B6</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m3 | <i>A6B5</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m4 | <i>A6B6</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  | Штамм М-13             | m1 | <i>A7B7</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m2 | <i>A7B8</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m3 | <i>A8B7</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m4 | <i>A8B8</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  | Штамм М-14             | m1 | <i>A9B9</i>   | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m2 | <i>A9B10</i>  | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m3 | <i>A10B9</i>  | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m4 | <i>A10B10</i> | +   | +           | +           | +           |
|  | Штамм М-17             | m1 | <i>A11B11</i> | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m2 | <i>A11B12</i> | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m3 | <i>A12B11</i> | +   | +           | +           | +           |
|  |                        | m4 | <i>A12B12</i> | +   | +           | +           | +           |
| Ди-мон скрещивания   | Дикариотические штаммы |    | М-2           | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-3           | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-4           | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-5           | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-7           | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-15          | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-16          | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-18          | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-19          | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-20          | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-21          | +   | +           | +           | +           |
|  |                        |    | М-22          | +   | +           | +           | +           |

Примечание: \*m – монокариотический тестерный штамм; \*\**AxBy* – аллели локусов половой совместимости; \*\*\*+ – половая совместимость (дикариотизация и образование пражек).

N-концы белковых последовательностей, т.к. 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 (Vanham et al., 1995; Kues et al., 2011).

В нашем исследовании участков гомологий на нуклеотидном уровне между последовательностями

ми *hd* генов у гомокариотических (гаплоидных) штаммов трех видов вешенки (*Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii* и *P. djamor*) выявлено не было, что свидетельствует о высокой степени вариабельности последовательностей этих генов. Гомологии между последовательностями гомеодоменных белков удалось выявить исключительно на аминокислотном уровне. В результате выравниваний аминокислотных последовательностей HD1 и HD2 белков были обнаружены высоковариабельные доме-

Таблица 2. Мон-мон скрещивания между тестерными штаммами природных изолятов *Pleurotus ostreatus*

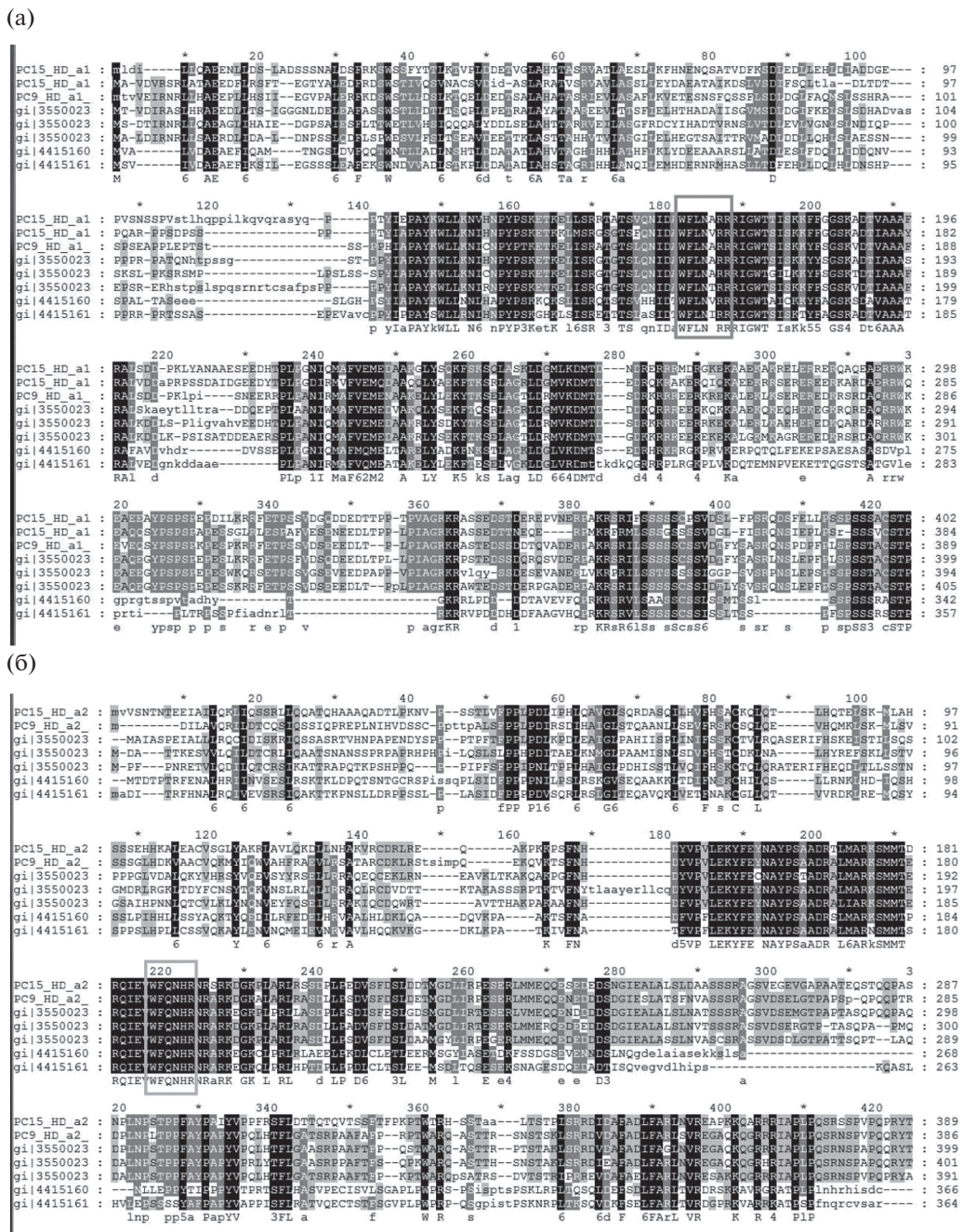
| Монокариотические штаммы-тестеры |    |      | Штамм М-8 |      |      |      | Штамм М-9 |      |      |      | Штамм М-13 |      |      |      |
|----------------------------------|----|------|-----------|------|------|------|-----------|------|------|------|------------|------|------|------|
|                                  |    |      | m1        | m2   | m3   | m4   | m1        | m2   | m3   | m4   | m1         | m2   | m3   | m4   |
|                                  |    |      | A3B3      | A3B4 | A4B3 | A4B4 | A5B5      | A5B6 | A6B5 | A6B6 | A7B3       | A7B4 | A8B3 | A8B4 |
| Штамм М-8                        | m1 | A3B3 | –         | –    | –    | +    | +         | +    | +    |      |            |      |      |      |
|                                  | m2 | A3B4 | –         | –    | +    | –    | +         | +    | +    |      |            |      |      |      |
|                                  | m3 | A4B3 | –         | +    | –    | –    | +         | +    | +    |      |            |      |      |      |
|                                  | m4 | A4B4 | +         | –    | –    | –    | +         | +    | +    |      |            |      |      |      |
| Штамм М-9                        | m1 | A5B5 | +         | +    | +    | +    | –         | –    | –    | +    |            |      |      |      |
|                                  | m2 | A5B6 | +         | +    | +    | +    | –         | –    | +    | –    |            |      |      |      |
|                                  | m3 | A6B5 | +         | +    | +    | +    | –         | +    | –    | –    |            |      |      |      |
|                                  | m4 | A6B6 | +         | +    | +    | +    | +         | –    | –    | –    |            |      |      |      |
| Штамм М-13                       | m1 | A7B3 | –         | +    | –    | +    | +         | +    | +    | +    | –          | –    | –    | +    |
|                                  | m2 | A7B4 | +         | –    | +    | –    | +         | +    | +    | +    | –          | –    | +    | –    |
|                                  | m3 | A8B3 | –         | +    | –    | +    | +         | +    | +    | +    | –          | +    | –    | –    |
|                                  | m4 | A8B4 | +         | –    | +    | –    | +         | +    | +    | +    | +          | –    | –    | –    |

Примечание. \*Половая совместимость (дикариотизация и образование пряжек); \*\*несовместимость. Штаммы М-8 и М-9 гетероаллельны по обоим локусам половой совместимости; у штаммов М-8 и М-13 одинаковые аллели В-локуса.

ны, сконцентрированные на N-конце белковой молекулы, и домены гомологий. При этом два класса транскрипционных факторов HD1 и HD2 отличались не только по аминокислотным последовательностям, но и по длине. Последовательности белков класса HD1 в целом на 40–50 аминокислотных остатков (а.к.) длиннее, чем последовательности белка HD2. Особо варибельные участки у классов HD1 и HD2 белков наблюдали за счет инсерций и делеций. Такие варибельные участки предположительно относятся к петлевым пространственным структурам белка. У обоих классов гомеодоменных последовательностей видов *P. ostreatus*, *P. eryngii* и *P. djamor* присутствовал консервативный мотив WFXNXR: у HD1 белка – в районе 120–190 а.к.; у HD2 белка – в районе 140–195 а.к. (рис. 1). Этот консервативный мотив WFXNXR, как сказано выше, участвует в непосредственном связывании регуляторного гетеродимерного белка HD1/HD2 с молекулой ДНК (DNA binding motif). Интересно также, что у HD1 белков трех видов вешенок помимо мотива WFXNXR был выявлен другой консервативный мотив HNPYPT/S, который отсутствовал у HD2 белков. Таким образом, на основе проведенного анализа *in silico* было показано сходство структуры гомеодоменных белков двух классов (HD1 и HD2) у трех представителей рода *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. eryngii* и *P. djamor*): наличие консервативных мотивов ДНК-связывающих доменов и высоковарибельных димеризационных доменов на N-конце белковых молекул. Важно заметить, что димеризация гомеодоменных белков HD1–HD2 возможна только между белками от разных половых партнеров, то есть при взаимодействии различных аллелей

лей *matA* локуса в скрещивании. Поэтому неудивительно, что N-концы как сайты димеризации значительно различаются по последовательностям между аллельными вариантами белков от разных половых партнеров. Значительная варибельность N-концевых аминокислотных последовательностей гомеодоменных белков, как полагают, обеспечивает наличие множественных аллелей и вариантов аллельных взаимодействий между гаплоидными партнерами в скрещиваниях (James, 2012).

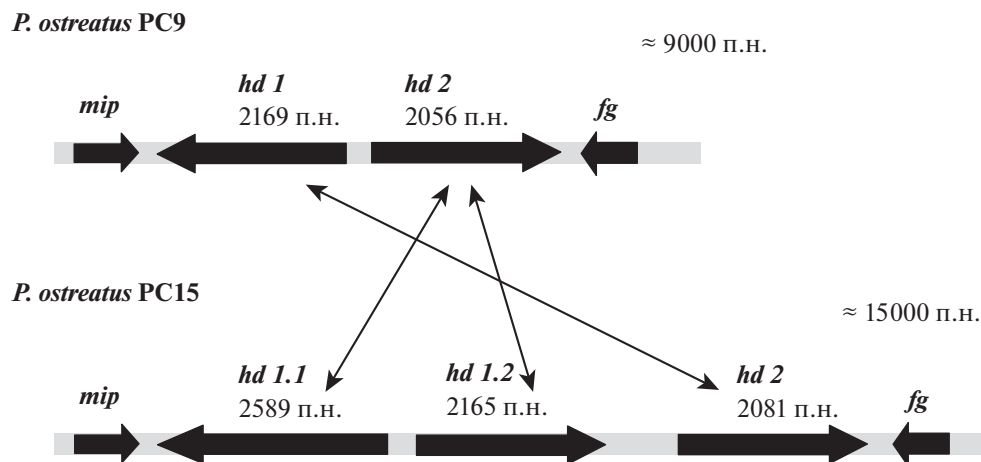
Более детальный анализ структуры *matA* локуса был проведен для двух гомокариотических штаммов *P. ostreatus* – PC9 и PC15. Следует заметить, что штаммы PC9 и PC15 были получены от одного и того же дикариотического родителя – исходного штамма N001 – путем дедикариотизации (разделения дикариона на гомокарионы) в лаборатории Ларрая (Larraza et al., 2001). Несмотря на происхождение от одного и того же исходного родительского дикариотического штамма N001, проведенный нами анализ *in silico* показал чрезвычайно дивергентную структуру *matA* локуса у этих штаммов-гомокарионов: *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* (класс HD1 белков) и одну копию *hd2* (класс HD2 белков) (рис. 2). Иными словами, гомокариотический штамм PC9 характеризуется стандартной (канонической) 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. Подобная структура *matA* локуса была описана для вида *P. djamor*: наличие двух генов *PDa1* и *PDa2*, кодирующих го-



**Рис. 1.** Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей белков класса HD1 (а) и HD2 (б) для штаммов PC15 *Pleurotus ostreatus*, PC9 *P. ostreatus*, штаммов CCMSSC00488 *P. eryngii*, CCMSSC00489 *P. eryngii* и штаммов RV95/134.104 *P. djamor*, RV95/957.30 *P. djamor*. Программа Dialign 2.2.1.; прямоугольниками выделен консервативный мотив WFXNXXR.

меодоменные транскрипционные факторы HD1 и HD2 соответственно (James et al., 2004). Гомокариотический штамм PC15 отличается наличием дополнительной (второй) копии гена, кодирующего белок HD1 класса, в результате чего в *matA* локусе этого штамма имеется три копии *hd* генов – *hd1.1*, *hd1.2* и *hd2* (рис. 2). Какая из копий генов, кодирующих HD1 класс белков, у штамма PC15 является активной, предсказать, основываясь на данных секвенирования, затруднительно, так как

копии генов (*hd1.1* и *hd1.2*) транскрибируются в противоположных направлениях, хотя и имеют общую промоторную область. Можно предположить, что одна из копий гена *hd1* возникла в результате дупликации или инсерции. Вероятность возникновения инсерций и делеций в пределах *matA* локуса базидиальных грибов была уже описана ранее (Hartmann et al., 2021). В целом, высокая вариабельность нуклеотидных последовательностей *hd* генов, которая, как полагают, связана с



**Рис. 2.** Структура *matA* локуса половой совместимости и схема аллельных взаимодействий гомеодоменных белков *Pleurotus ostreatus*. Ген *mip* кодирует пептидазу (mitochondrial intermediate peptidase); ген *fg* (beta-flanking protein) кодирует белок с неизвестной функцией; гены *hd* кодируют соответствующие гомеодоменные белки.

механизмом накопления точковых мутаций, является инструментом достижения большего аллельного разнообразия локусов, а мультиаллельность в итоге направлена на снижение вероятности инбридинга в природных популяциях базидиальных грибов. Как и у других базидиальных грибов, высоковариабельный *matA* локус у изученных штаммов PC9 и PC15 *P. ostreatus* фланкирован более консервативными последовательностями, кодирующими ген *mip* (mitochondrial intermediate peptidase) и ген *fg* с неизвестной функцией (beta-flanking protein) (рис. 2).

#### Анализ аминокислотных последовательностей HD1 и HD2 белков *Pleurotus ostreatus*

При анализе аминокислотных последовательностей HD1 и HD2 белков *P. ostreatus* на основе проведения процедуры множественных выравниваний последовательностей гомеодоменных белков 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 вероятностные 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 обоих классов (HD1 и HD2) была показана вероятностная ядерная локализация. Следует за-

метить, что поиск сигнальных последовательностей ядерной локализации программа проводила по участкам, обогащенным аргинином (R) и лизином (K), или пролином (P) и гистидином (H), которые являются маркерами ядерных сигнальных последовательностей. Еще одна особенность касается того, что у представителей класса HD2 белков обнаружены характерные мотивы ДНК-связывающего гомеобокс-домена (homeobox): MARKSMMTDRQIEVWFQNHNRNSR для HD2 белка штамма PC15 (начиная с 179 а.к.); MARKSMMTERQIEVWFQNHNRNRAR для HD2 белка штамма PC9 (с 177 а.к.) (графические данные в статье не представлены). Однако, в пределах последовательностей HD1 белков мотивы гомеобокс-домена не обнаружены; поэтому можно предположить, что у HD2 класса белков ДНК-связывающий домен более консервативен. Основываясь на оценке гидрофильности/гидрофобности аминокислот HD белков в программе Kyte Doolittle Hydrophathy Plot, 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 (подробные данные в статье не представлены). Глобулярная структура белков и отсутствие сигнальных последовательностей трансмембранной локализации была также подтверждена в программе SignalP 4.1. Характерный ДНК-связывающий домен WFXNXR у белков HD1 класса находится в положении 125–175 а.к., а у белков HD2 класса – в положении 145–200 а.к.; эти области позиционно гомологичны соответствующим последовательностям гомеодоменных белков модельного гриба *Coprinus cinerea* (Shnyreva, 2015). Следует заметить, что в целом белки класса HD2 гриба *Pleurotus ostreatus* обладали более консервативной структурой ДНК-связывающего гомеодомена.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В работе продемонстрирована чрезвычайно дивергентная структура *matA* локуса половой совместимости у двух совместимых по полу гомокариотических 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*. Анализ *in silico* аминокислотных последовательностей гомеодоменных белков HD1 и HD2 показал, что все исследуемые HD белки обладают глобулярной структурой и характеризуются ядерной локализацией. У всех HD последовательностей был обнаружен варибельный N-конец и более консервативный ДНК-связывающий домен с характерным консервативным мотивом WFXNXR (в третьей аспирали. Как было показано ранее (Raudaskoski, Kothe, 2010; Kues et al., 2011), N-концевые последовательности в структуре гомеодоменных белков HD1 и HD2 выполняют роль димеризационных доменов между совместимыми HD1 и HD2 белками-партнерами; и благодаря такой функции, N-конец отличается высокой степенью варибельности аминокислотных последовательностей между разными аллелями локуса половой совместимости. Активный гетеродимер HD1/HD2 может сформироваться исключительно между белками-партнерами HD1 и HD2, которые транскрибируются с разных аллелей *matA* локуса в дикарионе, сформированном между совместимыми по полу гомокариотическими штаммами. Наши результаты анализа структурной организации локуса *matA* и кодируемых локусом гомеодоменных белков *P. ostreatus* подтверждают мнение о том, что HD белки выполняют функцию факторов транскрипции и, следовательно, имеют ядерную локализацию и ДНК-связывающие мотивы. Результаты исследования свидетельствуют о высокой структурной варибельности последовательностей гомеодоменных белков; при этом мультиаллельность *matA* локуса достигается как за счет различной копийности кодирующих генов в пределах локуса, так и за счет варибельности кодирующих генов последовательностей. Еще одна интересная особенность заключается в том, что белки HD1 и HD2 тетраполярных базидиомицетов гомологичны гомеодоменным белкам Mat $\alpha$ 2 и Mat $\alpha$ 1, которые являются основными регуляторными единицами однолокусной (биполярной) системы полового размножения у аскомицетных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Kues et al., 2011; Hartmann et al., 2021). Поэтому исследование возможных механизмов генетической детерминации пола у грибов является актуальным и поможет разобраться в сложных вопросах эволюции систем полового размножения. Во многом все еще нерешенными остаются вопросы перехода от функционального гетероталлизма к гомоталлизму у грибов, от би-

полярной системы половой совместимости к тетраполярной и обратный переход, а также наблюдаемый в некоторых группах грибов возврат к псевдогомоталлизму, который часто обусловлен паразитическим существованием. Однако следует надеяться, что дальнейшее накопление данных по секвенированию геномов грибов, несомненно, прольет свет на эволюцию систем генетической детерминации пола и понимание ключевых механизмов достижения биологического разнообразия, включая аллельное разнообразие.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 15-54-05065 и РФФ № 14-50-00029.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anderson N.A., Furneir G.R., Wang A.S. et al. The number and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sapidus*. Can. J. Bot. 1991. V. 69. P. 2187–2191.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J. et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. Bioinformatics. 2006. V. 22. P. 195–201.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>
- Banham A.H., Asante-Owusu R.N., Gottgens B. et al. A N-terminal dimerization domain permits homeodomain proteins to choose compatible partners and initiate sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. Plant Cell. 1995. V. 7 (6). P. 773–783.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.7.6.773>
- Cassleton L.A., Kues U. The origin of multiple mating types in model mushrooms *Coprinopsis cinerea* and *Schizophyllum commune*. Sex in Fungi. USA: ASM, 2007. P. 142–147.
- Hartmann F.E., Duhamel M., Carpentier F. et al. Recombination suppression and evolutionary strata around mating-type loci in fungi: documenting patterns and understanding evolutionary and mechanistic causes. New Phytol. 2021. V. 229. P. 2470–2491.  
<https://doi.org/10.1111/nph.17039>
- James T.Y. Ancient yet fast: rapid evolution of mating genes and mating systems in fungi. In: Rapidly evolving genes and genetic systems. University Press, Oxford, 2012. P. 187–200.
- 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. V. 41. P. 813–825.  
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.04.005>
- James T.Y., Sun S., Kuo H. et al. Polyporales genomes reveal the genetic architecture underlying tetrapolar and bipolar mating systems. Mycologia. 2013. V. 105 (6). P. 1374–1390.  
<https://doi.org/10.3852/13-162>
- Kües U., James T.Y., Heitman J. Mating type in Basidiomycetes: unipolar, bipolar and tetrapolar patterns of sexuality. In: The Mycota XIV. Springer, 2011. P. 97–160.
- Kyte J., Doolittle R. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. 1982. V. 157. P. 105–132.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Larraya L., Peñas M.M., Pérez G. et al. 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. V. 34. P. 486–493.  
<https://doi.org/10.1007/s002940050424>
- Larraya L.M., Pérez G., Iribarren I. et al. Relationship between monokaryotic growth rate and mating type in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67 (8). P. 3385–3390.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3385-3390.2001>
- Morgenstern B. DIALIGN: multiple DNA and protein sequence alignment at BiBiServ. Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. W33–W36.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh373>
- Petersen T.N., Brunak S., Heijne G. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods. 2011. V. 8. P. 785–786.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Raudaskoski M. Mating-type genes and hyphal fusions in filamentous basidiomycetes. Fungal Biology Reviews. 2015. V. 29 (3–4). P. 179–193.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.04.001>
- Raudaskoski M., Kothe E. Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. Eukaryot. Cell. 2010. V. 9. P. 847–859.  
<https://doi.org/10.1128/EC.00319-09>
- Shnyreva A.A. Fungi of the genus *Pleurotus*: gene typing and analysis of the loci of mating compatibility. Diss. ... Dr. Sci. Moscow, 2015 (in Russ.).
- 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. V. 34 (12). P. 1371–1378.
- Shnyreva A.V., Shtaer O.V. Differentiation of closely related oyster fungi *Pleurotus pulmonarius* and *P. ostreatus* by mating and molecular markers. Rus. J. Genetics. 2006. V. 42 (5). P. 539–545.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795406050115>
- 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. V. 48 (11). P. 1080–1088.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795412110105>
- Sivolapova A., Shnyreva A.V., Sonnenberg A. et al. DNA marking of some quantitative trait loci in the cultivated edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. Rus. J. Genetics. 2012. V. 48 (4). P. 383–389.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795412040114>
- Wang G., Wang Y., Chen L. et al. Genetic structure and evolutionary diversity of mating-type (MAT) loci in *Hypsizygus marmoreus*. IMA Fungus. 2021. V. 12. P. 35–51.  
<https://doi.org/10.1186/s43008-021-00086-8>
- Wang W., Lian L., Xu P. et al. Advances in understanding mating type gene organization in the mushroom forming fungus *Flammulina velutipes*. G3-Gene. Genom. Genet. 2016. V. 6. P. 3635–3645.  
<https://doi.org/10.1534/g3.116.034637>
- 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.
- Шнырева А.А. (Shnyreva) Грибы рода *Pleurotus*: генотипирование и анализ локусов половой совместимости. Дисс. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2015. 129 с.

## Structure Analysis of the *MatA* Locus of Sexual Compatibility in the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*

A. V. Shnyreva<sup>a,#</sup> and A. A. Shnyreva<sup>a,##</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>#</sup>e-mail: ashn@mail.ru

<sup>##</sup>e-mail: shnyreva@mail.ru

The edible oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* is one of the most cultivated species worldwide. Morphogenesis associated with the fruit bodies maturation is controlled by two unlinked loci of sexual compatibility *matA* and *matB* with multiple alleles (tetrapolar system of sexual compatibility). Quantitative analysis of the alleles of mating compatibility loci in 17 natural isolates collected in the Moscow region was performed in mon-mon (monokaryon – monokaryon) and di-mon (dikaryon – monokaryon) crossings. Four monokaryotic testers strains which were heteroallelic at both mating type loci were obtained for each of the five natural mushroom isolates by using original technique of sterile spore prints on Petri dishes and mon-mon crossing. Twelve natural isolates were crossed via di-mon mating with the four monokaryotic testers M-38. Genetic analysis of the alleles of sexual compatibility loci in 17 natural isolates revealed multiple alleles at both loci: at least 10 alleles at *matA* locus and eight alleles at *matB* locus. Structural organization analysis of the *matA* locus was performed *in silico* for homokaryotic strains PC9 and PC15 based on the genome sequencing data available at DOE Joint Genome Institute. The *matA* locus is proved to be of extremely divergent structure: there are one copy of the homeodomain gene *hd1* and one copy of the *hd2* gene in the PC9 strain, whereas the *matA* locus of the PC15 strain is composed by two copies of *hd1.1* and *hd1.2* genes (class HD1 homeodomain proteins) and one copy of *hd2* gene (class HD2 proteins). Comprehensive analysis of amino acid sequences of HD1 and HD2 homeodomain proteins demonstrated that the proteins have a globular structure with the nuclear localization and contain a variable N-terminus and the more conservative DNA-binding domain with a specific conservative motif WFXNXR in the third  $\alpha$ -helix. The results approve the opinion that multiple alleles of the *matA* locus of sexual compatibility in basidiomycete fungi is achieved by different copies' number of the coding *hd* genes within the locus, as well as by the variability of the coding gene sequences.

**Keywords:** basidiomycetes, homeodomain transcription factors, mating type loci, sexual compatibility