

Генетика и грибные геномы. Геносистематика и концепция вида у грибов

Fungal genetics, genomics, genosystematics and species concept in fungi

FUSARIUM LANGSETHIAE НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Гаврилова О. П., Гагкаева Т. Ю.

Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург – Пушкин

Впервые гриб *Fusarium langsethiae* Torp. et Nirenberg на территории РФ был выделен в 2003 году из зерна ячменя, выращенного в Ленинградской области (Gagkaeva et al., 2006). В настоящее время *F. langsethiae* является постоянным компонентом комплекса патогенов зерновых на территории Европы, в том числе и северо-запада РФ. Кроме того, единичные изоляты этого гриба выявлены в 2007 году в центральной части России (Орловская область), а в 2009 году на территории Сибири (Тюменская область). Обнаружение *F. langsethiae* микологическим методом затруднительно вследствие низкой скорости роста колонии гриба и таких морфологических особенностей, как отсутствие обильного воздушного мицелия и пигмента. Гриб *F. langsethiae* продуцирует опасные микотоксины, поэтому является объектом изучения многих европейских исследователей (Torp, Nirenberg, 2004; Infantino et al., 2007; Воиаров–Staniic et al., 2008; Lukanowski et al., 2008; Parrikka et al., 2008; Imathi et al., 2009).

В настоящее время в коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР хранятся 53 штамма *F. langsethiae*. Из них 20 штаммов переданы нам коллегами из различных европейских коллекций. Остальные изоляты выделены из зерна в результате ежегодно проводимого на территории нашей страны мониторинга зараженности зерна грибами рода *Fusarium*. Первоначально видовую принадлежность изолятов грибов оценивали по морфологическим признакам. После получения моноконидиальных изолятов, идентификацию подтверждали с помощью видоспецифичных праймеров FSPO, f/FPOW, r и FlangF3/lanspoR1 (Wilson et al., 2004; Klemsdal et al., 2006).

Вид *F. langsethiae* морфологически сходен с *F. poae*, но по способности к активному токсинообразованию Т-2 токсина близок к другому виду секции *Sporotrichiella* — *F. sporotrichioides*. Токсинопродуцирующая способность штаммов *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* и *F. poae* определена с помощью ИФА сотрудниками ВНИИВСГЭ д. б. н. Кононенко Г. П. и к. б. н. Буркиным А. А. Все штаммы *F. langsethiae* образовывали на картофельно-сахарозной агаризованной среде (КСА) высокие концентрации Т-2 токсина — в среднем 25.6 мкг/мл (пределы варьирования составили от 1.1 до 130.3 мкг/мл). Штаммы *F. langsethiae* продуцировали ДАС в значительно больших количествах, по сравнению с другими видами секции *Sporotrichiella* (Gagkaeva et al., 2007). Уровни образования ДАС штаммами *F. langsethiae* составили 1.5 мкг/мл в среднем (пределы варьирования составили от 0.01 до 5.5 мкг/мл).

Анализ патогенности по реакции отрезков листьев овса сорта Борпус (Imathi et al., 2009) выявил как внутри-, так и межвидовые различия *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*. Образование характерных некрозов вызывали штаммы *F. langsethiae* и *F. poae*, в то время, как штаммы *F. sporotrichioides* приводили к интенсивным хлорозам.

Кроме того, в коллекции лаборатории хранятся 13 штаммов *Fusarium sp.*, выделенных из зерновых культур, выращенных на территории Сибири и Дальнего Востока. По морфологическим признакам эти штаммы сходны с *F. poae* и *F. langsethiae* европейского происхождения и продуцируют высокие уровни Т-2 токсина (Буркин и др., 2008). Однако согласно филогенетическому анализу, основанному на сравнении последовательностей ДНК IGS области, генов фактора элонгации 16 и в-тубулина, штаммы *Fusarium sp.* сгруппированы в отдельный кластер, который имеет большее сходство с *F. sporotrichioides*, чем *F. poae* и *F. langsethiae*, и могут представлять собой новую таксономическую единицу.

ТИП КОНИДИОГЕНЕЗА В ТАКСОНОМИИ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*

Гагкаева Т. Ю.

Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург – Пушкин

Существующие таксономические системы основаны на морфологическом критерии вида, описывающем грибы в анаморфной стадии развития. Наличие, форма и характер образования конидий и хламидоспор активно используются в опи-

саниях грибов рода *Fusarium*. Однако строение конидиогенных структур, впервые введенное в таксономию грибов рода *Fusarium* К. Бусом (Booth, 1971) и неиспользуемое А. И. Райлло (1950) и В. И. Билай (1955, 1977), еще недостаточно активно применяется для диагностики этой группы грибов.

У *Fusarium* описаны два типа конидиогенеза: энтеробластический и голобластический. Энтеробластические конидиеносцы могут быть простые, состоящие из одной конидиогенной клетки, и сложно разветвленные. На вершине конидиеносца образуются конидиогенные клетки – фиалиды, которые формируют конидии в базипетальной последовательности. Фиалидные конидиогенные клетки с одним локусом (монофиалиды) характерны для всех видов рода *Fusarium*, фиалидные конидиогенные клетки с двумя и более локусами (полифиалиды) характерны только для некоторых видов грибов и используются как диагностический признак вида (грибы секции *Sporotrichiella* и комплекса *Gibberella fujikuroi*), но не более высоких таксономических групп. На монофиалидах происходит образование макро- и микроконидий, на полифиалидах образуются только микроконидии.

Макроконидии характеризуются значительным разнообразием элементов их морфологии (изогнутость, длина и форма концевых клеток, количество перегородок). Образованное на разветвленных конидиеносцах скопление макроконидий, объединенных слизью, формирует хорошо заметные на фоне колонии гриба, окрашенные в различные цвета (оттенки кремового, оранжево-красного, сине-фиолетового), спородохии и пионноты. Особенности формирования микроконидий в коротких и/или длинных цепочках, или же в фальшивых головках, а также их форма являются обязательным диагностическим признаком для многих видов грибов.

В результате голобластического конидиогенеза образуются бластоспоры (мезоконидии) веретеновидно-ланцетовидной формы с конечными клетками простой клиновидной формы, обычно с 1 – 3 перегородками. Конидиеносцы одноклеточные и разветвленные многоклеточные несут бластические конидиогенные клетки с одним или несколькими локусами. Однако ветвление многоклеточных конидиеносцев более разреженное, чем в случае энтеробластических конидиеносцев, нет канала и воротничка в зоне апекса, как у фиалид, и споры образуются без слизи (сухие), легко отделяющиеся от материнской клетки. Скопления конидиеносцев различной степени ветвления приводит к появлению эффекта порошистости поверхности колонии гриба. Образование мезоконидий типично для видов *F. incarnatum* (син. *F. semitectum*), *F. camptoceras*, *F. chlamydosporum*, *F. anguoides*, *F. sporotrichioides*, а также некоторое количество подобных конидий можно обнаружить у *F. avenaceum* и *F. subglutinans*.

Широкий диапазон изменчивости морфологических признаков ведет к необходимости привлечения в классификацию всей совокупности характеристик организмов, в том числе особенностей конидиогенеза грибов.

ФИЛОГЕНИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ АЛЬТЕРНАРИОИДНЫХ ГИФОМИЦЕТОВ

Ганнибал Ф. Б.

Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург

Альтернариоидные гифомицеты являются одним из привлекательных объектов для исследования закономерностей эволюции грибов. Эта группа достаточно велика, состоит из 10 родов, включающих около 370 видов, с которых относят к роду *Alternaria*. Среди альтернариоидных гифомицетов имеет место значительная вариативность морфологических, биохимических, физиологических и экологических свойств. В группе представлены сапротрофы и паразиты с некро- и гембиотрофным типами питания и различным уровнем субстратной специализации. Большая часть видов утратила способность к половому размножению. Только у 18 видов обнаружены телеоморфы из семейства Pleosporaceae. Большое разнообразие и относительно хорошая изученность делают альтернариоидные гифомицеты удобной моделью для изучения микроэволюционных процессов.

В целом ряде работ, посвященных реконструкции филогенеза альтернариоидных гифомицетов, с использованием молекулярно-генетических данных было показано, что вся группа в целом монофилетична, хотя её таксономия (деление на роды) не соответствует филогенетическому паттерну.

Для реконструкции филогенеза альтернариоидных гифомицетов нами был проведен анализ всех опубликованных данных, касающихся молекулярной филогении этих грибов. Филогенетические исследования опирались на сиквенсы нескольких топологически и функционально различных участков генома 73 видов 7 родов. Компиляция всех доступных молекулярных данных и филогенетических деревьев позволила выявить графически обособленные кластеры – клады, представляющие собой группы близкородственных видов (таксономический ранг этих групп находится на уровне секций или родов). С уверенностью можно очертить 15 таких филогрупп. Восемь исследованных видов по молекулярным признакам не может быть однозначно причислено к той или иной группе.

После выделения филогрупп нами был сделан сравнительно-морфологический анализ всех видов альтернариоидных гифомицетов. На основании результатов анализа все виды, не попавшие в молекулярно-филогенетические исследования, были распределены по выделенным на предыдущем этапе группам. Большая часть видов, с достаточной степенью уверенности нами была отнесена к какой-либо кладе. Исключение составили около 30 видов, которые мы не смогли связать с той или иной группой, в том числе из-за значительного морфологического своеобразия. Таким образом, суммируя молекулярные и морфологические данные, мы предполагаем, что количество филогрупп альтернариоидных гифомицетов составляет от 17 до 20.

Использованные для сравнения качественные и количественные морфологические признаки были оценены с точки зрения целесообразности их использования для филогенетических исследований. Из более чем 20 доступных для наблюдения и измерения морфологических характеристик в качестве филогенетически информативных нами было выделено 9 независимых друг от друга признаков, имеющих от 2 до 6 состояний. Поляризация состояний признаков и наложение их на «молекулярные» деревья показало, что для генеалогий всех морфоприсказов характерны реверсии и/или параллелизмы.

Установлено, что экологические и генетические особенности (наличие известной сумчатой стадии, система спаривания и субстратная специализация) также характеризуются мозаичным расположением на филограмме. То есть переход от сапротрофного типа питания к паразитическому и обратно очевидно совершался в ходе эволюции альтернариоидных гифомицетов неоднократно, также как и переход от гомо- к гетероталлизму.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-13753.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ ПОДОТДЕЛА *ENTOMOPHTHOROMYCOTINA INSERTAE SEDIS*

Григанский А. Ф.^{1, 3}, Humber, Richard A.², Vilgalys, Rytas¹, Анищенко И. Н.³

1 - Department of Biology, Duke University, Дургам, США

2 - USDA-ARS Biological Integrated Pest Management Research Unit, Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, Нью-Йорк, США

3 - Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

Энтомофторовые грибы, интерес к которым сильно возрос в последнее время, (Hibbett et al. 2007) включает паразитные грибы отдела *Zygomycota*, являющиеся патогенами большого разнообразия членистоногих и сапротрофами на различных органических остатках. Виды, входящие в эту группу, интересны как возможные регуляторы численности экономически важных насекомых-вредителей. Сегодня описано более 300 видов этого подотдела, но несомненно, что количество видов в нем гораздо больше. В этой работе мы представляем результаты предварительного исследования, цель которого - установление филогенетических связей как внутри порядка *Entomophthorales*, так и с другими грибами отдела *Zygomycota*. Предварительные молекулярные исследования показали четкое разделение 30 исследованных видов *Entomophthorales* на 2 группы: род *Basidiobolus* и все оставшиеся таксоны. Традиционные таксономические исследования рассматривают род *Basidiobolus* в составе порядка *Entomophthorales*, хотя наши предварительные данные по rDNA и некоторые публикации показывают, что *Basidiobolus* занимает изолированное место, образуя собственную группу среди основных генеалогических линий грибов (James et al. 2006, White et al. 2006). Род *Conidiobolus* является полифилетическим и, следовательно, формирует несколько характерных групп, которые нуждаются в тщательной ревизии. Основные энтомопатогенные виды, т.е. ядро порядка *Entomophthorales*, образуют ряд различных клад. Однако, есть несколько видов, которые находятся вне традиционного размежевания по родам. Возможно, это происходит из-за нечетко определенных таксономических различий, особенно для родов *Pandora*, *Erynia* и *Entomophthora*. Исследования дополнительных образцов и их мест обитания, а также повторная проверка морфологических признаков даст возможность снять все упомянутые несогласованности.

ОСОБЕННОСТИ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ БИОТЫ АГАРИКОИДНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ ТАЕЖНОЙ ЗОНЫ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Кириллов Д. В.¹, Переведенцева Л. Г.²

1 Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

2 Пермский государственный университет, Пермь

В результате проведенных исследований на территории таежной зоны Кировской области выявлено 302 вида агарикоидных базидиомицетов, которые относятся к 86 родам, 20 семействам и 5 порядкам. В том числе 265 видов грибов были впервые зарегистрированы на рассматриваемой территории и являются новыми для Кировской области.

Анализ таксономической структуры микобиоты региона показал, что в десятку ведущих семейств вошли *Tricholomataceae* (83 вида, 27, 5% от общего количества видов), *Cortinariaceae* (59 видов, 19, 5%), *Russulaceae* (44 вида, 14, 6%), *Strophariaceae* (21 вид, 7, 0%), *Agaricaceae* и *Boletaceae* (по 13 видов, по 4, 3%), *Coprinaceae* (12 видов, 4, 0%), *Amanitaceae* (11 видов, 3, 6%), *Entolomataceae* (8 видов, 2, 6%), *Hygrophoraceae* и *Pluteaceae* (по 6 видов, по 2, 0%). Представители перечисленных таксонов составляют 91, 4% от общего количества выявленных на рассматриваемой территории видов.

На первые три семейства: *Tricholomataceae*, *Cortinariaceae*, *Russulaceae* приходится 61, 6% видов. Этот факт свидетельствует о бореальном характере микобиоты исследуемой территории, поскольку главенствующее положение перечисленных семейств в составе микобиоты характерно для всей лесной зоны Голарктики. Первое место по количеству видов занимает семейство *Tricholomataceae* (83 вида, 27, 5% от общего количества видов), следовательно, микобиота Кировской области может быть классифицирована как южнотаежная.

К числу родов, лидирующих по количеству видов, относятся: *Cortinarius* (31 вид, 10, 3% от общего количества видов), *Lactarius* и *Russula* (по 22 вида, по 7, 3%), *Mycena* (19 видов, 6, 3%), *Tricholoma* (13 видов, 4, 3%), *Amanita* (10 видов, 3, 3%), *Inocybe* (8 видов, 2, 6%), *Pholiota* и *Marasmius* (по 7 видов, по 2, 3%). В совокупности представители 9 родов содержат почти половину всего видового состава биоты агарикоидных базидиомицетов (46, 0%) территории таежной зоны Кировской области. В остальных родах содержится менее 6 видов грибов, кроме того 44 рода являются одновидовыми.

Обилие видов в родах *Cortinarius*, *Lactarius*, *Russula*, *Mycena*, *Tricholoma*, *Amanita*, характерных для лесных микобиот, свидетельствует о бореальных чертах изучаемой биоты. Перечисленные таксоны охватывают 107 видов, или 35, 5% всего видового состава. Значительная доля родов *Lactarius* и *Russula* указывает на связь микобиоты таежной зоны Кировской области с западно-европейскими биотами. В то же время, относительно высокая доля рода *Suillus* (6 видов) свидетельствует о некотором восточно-азиатском влиянии на формирование микобиоты региона.

Таким образом, на территории Кировской области выявлено 302 вида агарикоидных базидиомицетов, относящихся к 5 порядкам, 20 семействам и 86 родам. Соотношение и объем семейств и родов отражает бореальный характер микобиоты с преобладанием южнотаежных черт. В географическом плане рассматриваемая биота грибов носит смешанный характер, с присутствием признаков западно-европейских и восточно-азиатских микобиот.

ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *FUSARIUM OXYSPORUM*, РАСПРОСТРАНЕННОГО В ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКАХ ЮЖНОЙ СИБИРИ

Литовка Ю. А.^{1, 2}, Савицкая А. Г.², Шалаева Т. А.¹

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск

²Сибирский государственный технологический университет, Красноярск

Результаты обследований почвы ризосферы, семян и семян хвойных растений в лесных питомниках Южной Сибири показали, что одними из наиболее распространенных являются представители вида *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hans, которые регулярно выделяются со средней частотой 33, 40 и 17 % соответственно.

Штаммы вида *F. oxysporum* ингибируют энергию прорастания, лабораторную всхожесть и морфометрические параметры проростков листовенницы сибирской и районированных сортов пшеницы, однако степень фитотоксичности неодинакова: 75-80 % штаммов в большей степени замедляют ростовые процессы листовенницы, проявляя среднюю и высокую степень фитотоксичности. В ряде случаев отмечен ростостимулирующий эффект в отношении развития надземной части проростков пшеницы на фоне снижения общего количества проросших семян.

Изучение фитотоксической активности в динамике (при культивировании на токсигенной среде в течение 50-ти суток) позволило установить, что метаболиты 75 % штаммов *F. oxysporum* проявляют максимальную активность на 14 сутки культивирования (80-98 % ингибирования проростков), после чего у 40 % штаммов активность постепенно снижается (до 45 %), у 60 % - остается на достигнутом высоком уровне до окончания срока культивирования. У оставшихся 25 % штаммов фитотоксическая активность стабильна на протяжении всего изучаемого периода в пределах 49-70 %.

Штамм Б1смл *F. oxysporum* представлен монокультурами, различающимися по морфологическим и физиологическим признакам. В пределах штамма выделены монокультуры, относящиеся к трем культурально-морфологическим типам (КМТ), обладающие различным уровнем фитотоксической активности и проявляющие различные типы вегетативных реакций, что свидетельствует о высокой гетерогенности вида по изучаемым признакам.

В ходе работы было получено 25 моноконидиальных культур, сравнительный анализ которых позволил выделить 3 стабильных КМТ в следующем соотношении: I КМТ – 4 %, II – 68 %, III – 28 %. Исходный штамм оказался неоднородным при моноконидиальном расщеплении и способен выщеплять менее токсигенные линии. Наибольшую стабильность по признаку фитотоксичности проявили культуры из III КМТ, показатели которых достоверно не отличались между собой и исходным штаммом; среди монокультур II КМТ у 16 % показатели фитотоксической активности достоверно отличались от исходного штамма и других моноконидиальных культур в пределах КМТ.

При совместном сращивании пар моноконидиальных культур штамма Б1смл обнаружены следующие типы вегетативных реакций: совместимость, несовместимость, нейтральная и смешанная реакции. Реакции вегетативной совместимости смещены в сторону нейтральной реакции (50 %); этот тип встречается при сращивании монокультур из разных КМТ и в пределах одного культурально-морфологического типа. Реакции вегетативной несовместимости представлены ограничением роста (19 %) и более острой реакцией – образованием бордюра (4 %), что свидетельствует о генетической изолированности и невозможности образования гетерокарионов; этот тип реакций не встречался в пределах одного КМТ. Совместимая реакция характерна для 17 % сращиваемых пар, в основном, в пределах II КМТ, реже между монокультурами II и III КМТ; смешанная реакция – у 10 % пар из разных культурально-морфологических типов.

СТАДИЕСПЕЦИФИЧНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ В ОБЛАСТИ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ *PUSCINIA GRAMINIS* – РЕЗУЛЬТАТ РЕКОМБИНАЦИИ И СТАРЕНИЯ?

Малева Ю. В.¹, Лekomцева С. Н.²

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Структура области ядерных рибосомных генов у грибов позволяет выбирать анализируемый участок ДНК в зависимости от таксономического уровня объекта исследования. Это обеспечено сочетанием консервативной нуклеотидной последовательности генов рРНК, кодирующих основные структурные единицы рибосом – белоксинтезирующих «фабрик» живой клетки, и достаточно вариабельных межгенных участков – ITS- и IGS-спейсеров, для регуляторной функции которых наиболее важны особенности вторичной структуры ДНК. Для изучения стадиеспецифичного полиморфизма возбудителя стеблевой ржавчины злаков *Puccinia graminis* наиболее подходящими оказались IGS-спейсеры – межгенные участки между повторами рибосомных генов.

Этот модельный объект отличается сменой растений-хозяев в жизненном цикле, разобщающей во времени и пространстве плазмо- и кариогамии, и длительной (до нескольких лет) дикариотичной стадией на злаках, развивающейся летом и периодически зимующей в природных ценозах.

Ранее нами был показан стадиеспецифичный полиморфизм IGS-1-спектров *P. graminis*, наблюдавшийся как в агро- и биоценозах, так и при искусственном заражении культурных и диких злаков. Например, в образцах с барбариса отмечался преимущественно один мажорный PCR-продукт (1360 п. о.), а при амплификации спор с растений ржи – два (1360 и 725 п. о.). В урединальных образцах со злаков из агро- и биоценозов амплифицировались и достаточно характерные минорные фракции, а при искусственном заражении такие миноры в основном отсутствовали. С чем может быть связан такой стадиеспецифичный полиморфизм *P. graminis*?

Из-за кассетного принципа организации рибосомных повторов блоки рДНК часто вовлекаются в гетерологичный синапс и рекомбинацию. Эктопическая рекомбинация происходит между повторяющимися последовательностями ДНК, в избытке представленными в геноме, особенно у эукариот. Согласованная (concerted) эволюция рибосомных генов идет за счет механизма геной конверсии, с одной стороны, поддерживающей генетической однородности повторов, а с другой, – распространяющей при определенных условиях мутации и обеспечивающей согласованную дивергенцию этих повторов. Особенности структурной организации этого участка области рибосомных генов очень важны для регуляции всего метаболизма клетки. На этих участках генома грибов инициируется и терминируется согласованная транскрипция генов с помощью полимераз трех классов (Pol I, Pol II и Pol III), здесь же находится точка начала репликации ДНК, сайт конъюгации хроматид при митозе, последовательность, контролирующая количество копий повторов рДНК, и участки связывания факторов ремоделирования хроматина. У дрожжей выщепление и накопление кольцевых внехромосомных копий рибосомных повторов в результате репликации и митотической рекомбинации ведет к старению клеток.

На данный момент выявленную запрограммированную нестабильность генома в онтогенезе *P. graminis* можно объяснить за счет:

1. рекомбинации и выщепления внехромосомных копий;
2. рекомбинации и образования шпилек по палиндромам на той же хромосоме;
3. разнойядерности и преимущественного размножения ядер одного из типов.

Необходимы дальнейшие исследования молекулярной структуры и функций этой области генома гриба, столь важной в регуляторном отношении.

ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *ALTERNARIA SOLANI* ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНЫМ МАРКЕРАМ

Орина А. С., Ганнибал Ф. Б.

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Вид *Alternaria solani* является возбудителем ранней сухой пятнистости представителей рода *Solanum* (картофеля, томатов и др.) и встречается на протяжении всего ареала своих растений-хозяев. Как было показано некоторыми исследователями (Иванюк и др., 1979, 1996, 2003; Анненков, 1987), на территории России и Белоруссии этот патоген демонстрирует значительный внутривидовой полиморфизм по морфологическим признакам и патогенности, что позволило выделить несколько биологических рас этого вида: 5 рас на картофеле и 7 – на томатах. Скрупулезное изучение морфологии *A. solani* (в широком понимании) позволило Симмонсу описать еще 8 незначительно отличающихся друг от друга видов патогенных для растений семейства пасленовые: *A. grandis*, *A. tomatophila*, *A. subtropica*, *A. subcylindrica*, *A. cretica*, *A. elegans*, *A. tomato* и *A. africana* (Simmons, 2000, 2007). Однако признаки, по которым была проведена дифференциация этих рас и видов, не всегда очевидны и порой нестабильны, поэтому для анализа внутривидового полиморфизма *A. solani sensu lato* требуется использование иных методов и привлечение новых данных.

Материалом нашего исследования являлись 39 моноспоровых изолятов *A. solani* различного географического происхождения (Северный Кавказ, Западная и Восточная Сибирь), выделенные из разных растений-хозяев:

19 – с томатов, 15 – с культурного картофеля, 5 – с диких видов картофеля (*Solanum papita*, *Sol. kurtzianum*, *Sol. schickii* и *Sol. parrodii*). Анализ микроморфологических признаков: длины и ширины корпуса конидии, длины апикального выроста и степени его ветвления, – позволил выделить группу из 4 изолятов, отличающихся от остальных значительно меньшей длиной корпуса (54–68 мкм). Средняя длина корпуса конидии для большинства изолятов колебалась в диапазоне 83–93 мкм. При этом обе группы содержали изоляты различного географического происхождения и были выделены из разных хозяев.

Дифференциация изолятов *A. solani* также была проведена с применением молекулярно-генетических методов: UP-PCR с праймерами L45, 15/19, AS4 и AS15inv и RAPD с праймером A10. Кластерный анализ проводили с использованием программы Treecon 3.1b. На кладограмме изученные изоляты разделились на 6 кластеров разной величины, причём 4 изолята с более мелкими спорами оказались расположенными в разных группах. В тоже время распределение изолятов по кластерам коррелировало с видами растений, из которых были выделены изоляты. Эти результаты согласуются с данными других авторов (Lourenco et al., 2009), которые указывают на значительное генетическое расстояние между популяциями *A. solani* с картофеля и томатов. Однако изоляты, выделенные из картофеля, способны заражать томаты и наоборот (Дорожкин и др., 1973; Барлюк и др., 1991; Martinez et al., 2004).

Таким образом, все выявленные нами изоляты, несмотря на морфологические различия, вероятнее всего относятся к одному филогенетическому виду. Наблюдается начало процесса дивергенции *A. solani* на два вида, приуроченных к разным экологическим нишам – разным растениям-хозяевам (картофель и томаты).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 09-04-13753-офи_ц).

ГЕНОСИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕНЕТИКА ЦАРСТВА ГРИБОВ: ПОДХОДЫ И РЕШЕНИЯ

Шнырева А. В.

Кафедра микологии и альгологии МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

В настоящее время при изучении биоразнообразия помимо традиционных подходов, основанных на сравнении фенотипов, объектом исследований служат *генотипы* организмов, т. е. весь комплекс генетической информации, передаваемый из поколения в поколение и реализуемый в ходе онтогенеза. *Геносистематика* (molecular phylogenetics) занимается изучением эволюционной истории организмов по отношению к их общим предкам на основе анализа молекулярных признаков. Большинство филогенетических анализов в царстве грибов сделано на основе кластера рибосомальных генов, обнаруженных в ядерных и митохондриальных геномах. Кластер ядерных генов рРНК представлен структурными генами большой и малой субъединиц рРНК (18S и 25S рРНК), внутренними транскрибируемыми спейсерными участками ITS (internal transcribed spacer) и межгенными спейсерами IGS (internal gene spacer). Структурные гены большой и малой субъединиц более консервативны, поэтому их последовательности используют для установления связей между удаленными таксономическими группами, а также для анализа таксонов более высокого ранга. Более вариабельные спейсерные ITS области между генами субъединиц и межгенные спейсеры IGS используют для изучения связей между видами в пределах родов или для анализа внутривидового разнообразия (популяционный уровень).

В качестве молекулярных признаков могут выступать также и другие кодирующие (например, гены ферментов и структурных белков) и некодирующие последовательности в геномах (например, минисателлитные и другие повторяющиеся последовательности), а в эру геномики – и целые геномы. К числу эволюционно значимых ферментов можно отнести гены, кодирующие ДНК-полимеразы, обратные транскриптазы, транспозазы, монооксигеназы, хитинсинтазы, гены типов спаривания, актиновые и тубулиновые гены и др. Однако, проводя филогенетический анализ, всегда стоит помнить, что практически невозможно подобрать какую-нибудь определенную универсальную генную последовательность, которая позволила бы установить все таксономические и эволюционные связи организма, и анализ лучше проводить сразу по нескольким генным локусам. Тем не менее, можно утверждать, что геносистематика на основе рДНК последовательностей стала стандартным методом грибной таксономии.

В филогенетике предложено два основных принципиально отличающихся подхода в оценке родственных связей между организмами: по данным состояния бинарных признаков (присутствие или отсутствие признака) и на основе данных секвенирования нуклеотидных последовательностей. Процедура построения деревьев (филограмм) по данным секвенирования состоит из трех этапов: 1/ *sequence alignment* – последовательности разных организмов анализируют путем многократных сравнений соответствия их нуклеотидов по позициям; 2/ *выравнивание последовательностей* – выявление *позиционной гомологии нуклеотидов* в анализируемом наборе последовательностей, так как принцип филогенетического анализа предполагает сравнение *гомологических* признаков; 3/ собственно построение деревьев. Следует также заметить, что *филогенетически значимыми* считают те изменения в первичных структурах ДНК, которые могут быть учтены при реконструкции филогенеза генотипов организмов. Чтобы систематизировать постоянно растущий массив информации, в Генном банке GenBank созданы и поддерживаются международные публичные базы данных по выровненным последовательностям генов рРНК, ITS последовательностям и другим генам для разных групп живых организмов (ncbi.nih.gov).

Все существующие методы реконструкции филогений можно условно разделить на две основные группы: 1) построения на основе *дистанционно-матричных* методов, в основе которых лежат принципы *нумерической таксономии*, согласно которым родство между организмами определяется по критерию общего сходства, а первичными данными для анализа могут служить данные рестрикционного анализа RFLP, амплификации со случайными праймерами RAPD, AFLP, а также отсекаемые нуклеотидные последовательности; 2) методы, основанные на анализе конкретных *дискретных признаков* на молекулярном уровне, при которых каждая позиция нуклеотида анализируемой последовательности расценивается как индивидуальный *дискретный* признак. В отличие от дистанционных методов анализ дискретных молекулярных признаков дает возможность получить информацию о конкретных эволюционных событиях на молекулярном уровне, а именно в последовательностях ДНК.

Дистанционно-матричные методы создают кладограммы по принципу объединения наименее отличающихся последовательностей или групп последовательностей. К наиболее часто употребляемым дистанционно-матричным методам относят: невзвешенный парно-групповой метод с арифметическим усреднением (*UPGMA*), метод связывания ближайших соседей (*neighbour-joining, NJ-method*) и производный от NJ-метода новейший метод *neighbour-net (NN-method)* (Felsenstein, 1993). К наиболее часто применяемым *дискретным* методам относят: метод максимальной парсимонии (*maximum parsimony, MP-method*), метод максимального правдоподобия (*maximum likelihood, ML-method*) и недавно появившаяся разновидность ML-метода - Байесов метод.

Основопологающим принципом в любой филогенетической реконструкции является положение о том, что эволюционный путь состоит из *минимального* числа шагов. Поэтому принцип максимальной экономии (или парсимонии) постулирует, что эволюционный путь каждого дискретного признака должен сопровождаться наименьшим числом его преобразований, следуя которому, возможно выстроить схемы родственных отношений. Принцип максимальной парсимонии является универсальным *кладистическим методом*, который позволяет анализировать любые сравнительные базы данных - морфологические, физиологические, молекулярные и даже поведенческие (Swofford, Olsen, 1990). Предложены также методы оценки достоверности реконструированных деревьев. Наиболее часто используемым методом является *метод бутстреп-анализа* (bootstrap analysis), который фактически оценивает *надежность* индивидуальных узлов и ветвей на построенном дереве, т. е. статистически оценивает достоверность дерева.

Итак, какие же выводы можно сделать? Сегодня для всех геносистематиков остается очевидным, что длина анализируемого участка ДНК должна измеряться многими тысячами и даже десятками тысяч нуклеотидов, и анализ эволюции одного гена недостаточен для надежных филогенетических построений и выводов. Современные методы геномики уже сейчас позволяют сопоставлять целые ядерные геномы и геномы органелл различных организмов. Однако даже такие сравнения не всегда способны дать однозначный ответ о происхождении и путях эволюции тех или иных групп организмов в силу пока еще ограниченности данных по секвенированию целых геномов и их аннотации.