

МИКОЛОГИЯ СЕГОДНЯ

**Под редакцией
Ю.Т. Дьякова и Ю.В. Сергеева**

Том I

**Москва
Национальная Академия Микологии
2007**

УДК 28.591
ББК

Микология сегодня. Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев (ред.). Том 1. М.: Национальная академия микологии, 2007. – 376 с.

ISBN 978-5-93649-020-0

Настоящее издание является первым выпуском сборника «Микология сегодня», составленного ведущими специалистами-микологами России в форме научных обзоров и лекций по наиболее актуальным вопросам общей и прикладной микологии.

В первый том вошли статьи по происхождению и эволюции грибов, клеточной биологии и генетике, грибной экологии и биотехнологии. Значительную часть книги составляют главы, посвященные различным аспектам медицинской микологии, патогенным и токсигенным грибам и их влиянию на здоровье человека.

Книга предназначена для биологов и генетиков, микологов и экологов, фитопатологов и микробиологов, биотехнологов, врачей разных специальностей, преподавателей, студентов и аспирантов биологических факультетов и медицинских институтов.

Издано в Российской Федерации в рамках Программы и по рекомендации Ученого совета Национальной академии микологии.

УДК 28.591
ББК

ISBN 978-5-93649-020-0

© Национальная академия микологии, 2007
© Коллектив авторов, 2007

Редакция сборника «Микология сегодня»

Главный редактор

Дьяков Ю. Т. (Московский государственный университет)

Заместитель главного редактора

Сергеев Ю. В. (Институт аллергологии и клинической иммунологии, Москва)

Редакционная коллегия

Бибикова М.В. <i>Научный центр по антибиотикам, Москва</i>	антибиотики, биотехнологии
Бондарцева М.А. <i>Ботанический институт РАН, Санкт-Петербург</i>	флора, систематика
Гарибова Л.В. <i>Московский государственный университет</i>	биотехнологии, культивирование
Елинов Н.П. <i>НИИ Медицинской микологии С-Пб МАПО</i>	медицинская микология
Каратыгин И.В. <i>Ботанический институт РАН, Санкт-Петербург</i>	систематика, эволюция
Коваленко А.Е. <i>Ботанический институт РАН, Санкт-Петербург</i>	экология
Левитин М.М. <i>ВНИИ защиты растений РАСХН, Санкт-Петербург</i>	фитопатология
Лекомцева С.Н. <i>Московский государственный университет</i>	фитопатология
Мельник В.А. <i>Ботанический институт РАН, Санкт-Петербург</i>	флора, систематика
Озерская С.М. <i>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Москва</i>	систематика, коллекции
Сергеев А.Ю. <i>Московская медицинская академия</i>	медицинская микология
Сидорова И.И. <i>Московский государственный университет</i>	систематика, экология
Феофилова Е.П. <i>Институт микробиологии РАН, Москва</i>	биохимия, биотехнологии
Чернов И.Ю. <i>Московский государственный университет</i>	биохимия, физиология

Адрес редакции:

Национальная академия микологии
103104, Москва, Малая Бронная ул., д. 20 стр. 1
e-mail: science@mycology.ru
web-сайт: www.mycologytoday.org

Предисловие

Настоящая книга открывает серию периодических изданий обзоров, посвященных различным проблемам общей и прикладной микологии, которые Национальная академия микологии планирует выпускать один раз в два года. Потребность публикации таких обзоров в нашей стране ощущается очень остро по двум причинам. С одной стороны, с каждым годом расширяется сфера изучения грибов и их использования в теоретических и практических исследованиях, как биологических моделей, объектов биотехнологии, возбудителей болезней растений, животных и человека. Вовлечение в работы с грибами новых исследователей, не получивших специального микологического образования, обуславливает полезность для них обзоров новейших данных в разных разделах микологии. С другой стороны, в России остро ощущается нехватка современной биологической литературы. Даже центральные библиотеки Москвы и Санкт-Петербурга не выписывают много чрезвычайно важных научных книг и журналов, в которых публикуются работы в области общей и прикладной микологии. Хотя планируемая серия обзорных книг не может заме-

нить эти книги и журналы, мы надеемся, что хотя бы по тем проблемам, которые будут освещены в обзорах, читатели будут ознакомлены с относительно современными взглядами на рассматриваемые проблемы. Поэтому редакция не ограничивала авторов обзоров в объеме публикаций и просила привести полную библиографию использованных в обзорах публикаций.

Для удобства читателей, помещенные в книге статьи сгруппированы в несколько разделов. Конечно эти разделы не исчерпывают все стороны, связанных с изучением грибов, разделы не постоянны, их число и наименование будет зависеть от спектра поступающих статей.

Авторы обзоров, помещенных в данную книгу, – высококвалифицированные микологи из Москвы, Московской области и Санкт-Петербурга, работающие в МГУ и научно-исследовательских институтах РАН, РАМН и РАСХ. Мы надеемся, что выход книги вызовет широкий к ней интерес со стороны микологов и специалистов смежных специальностей и расширит как географию авторов, так и спектр проблем, связанных с общей и прикладной микологией.

Авторский коллектив

Алехин Александр Иванович

доктор медицинских наук,
Центральная клиническая больница РАН
(Москва),
заместитель главного врача

Белозерская Татьяна Андреевна

доктор биологических наук, профессор,
Институт биохимии имени А.Н.Баха РАН
(Москва),
ведущий научный сотрудник

Воронина Елена Юрьевна

Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, кафедра микологии
и альгологии, научный сотрудник

Гесслер Наталья Николаевна

кандидат биологических наук,
Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН
(Москва),
старший научный сотрудник

Гончаров Николай Гаврилович

доктор медицинских наук, профессор,
Центральная клиническая больница РАН
(Москва),
главный врач

Дулькин Лев Моисеевич

кандидат медицинских наук,
Заслуженный врач РФ
Центральная клиническая больница РАН
(Москва),
заведующий урологическим отделением

Дьяков Юрий Таричанович

доктор биологических наук, профессор,
Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова, кафедра Микологии и
альгологии, заведующий кафедрой

Еланский Сергей Николаевич

кандидат биологических наук,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, кафедра микологии и
альгологии, старший научный сотрудник

Иванушкина Наталия Евгеньевна

кандидат биологических наук,
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН
(Москва), отдел «Всероссийская коллекция
микроорганизмов», старший научный сотрудник

Камзолкина Ольга Владимировна

доктор биологических наук,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, кафедра микологии и
альгологии, доцент

Каратыгин Игорь Васильевич

доктор биологических наук,
Ботанический институт имени В.Л. Комарова
РАН (Санкт-Петербург), лаборатория
систематики и географии грибов,
главный научный сотрудник

Коломбет Любовь Васильевна

доктор биологических наук,
НИЦ токсикологии и гигиенической
регламентации биопрепаратов ФМБА
(Москва), заведующая лабораторией

Кочкина Галина Александровна

кандидат биологических наук,
Институт биохимии и физиологии микроорга-
низмов имени Г.К. Скрыбина РАН (Москва),
отдел «Всероссийская коллекция
микроорганизмов», старший научный сотрудник

Кравченко Лидия Васильевна

доктор медицинских наук, профессор,
НИИ Питания РАМН (Москва), лаборатория
микотоксинов,
заведующая

Марфенина Ольга Евгеньевна

доктор биологических наук,
член-корреспондент РАЕН,
Московский Государственный Университет
имени М.В. Ломоносова,
факультет Почвоведения, кафедра биологии
почв, ведущий научный сотрудник

Матросова Елена Викторовна

Московский университет
имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет,
кафедра Микологии и альгологии,
аспирант

Меморская Анна Сергеевна

Институт микробиологии
имени С.Н. Виноградского
РАН (Москва),
инженер

Озерская Светлана Михайловна

кандидат биологических наук,
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов
имени Г.К. Скрыбина РАН (Москва),
старший научный сотрудник,
сектор мицелиальных грибов отдела
«Всероссийская коллекция микроорганизмов»,
заведующая

Сергеев Алексей Юрьевич

доктор медицинских наук,
Московская медицинская академия
имени И.М. Сеченова, кафедра клинической
иммунологии и аллергологии, профессор

Сергеев Юрий Валентинович

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАЕН,
Заслуженный врач РФ
Институт аллергологии и клинической
иммунологии (Москва), директор

Терешина Вера Михайловна

доктор биологических наук
Институт микробиологии
имени С.Н. Виноградского
РАН (Москва),
старший научный сотрудник

Тутельян Виктор Александрович

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН,
Заслуженный деятель науки РФ
НИИ Питания РАМН (Москва),
директор

Феофилова Елена Петровна

доктор биологических наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ
Институт микробиологии
имени С.Н. Виноградского РАН (Москва),
заведующая лабораторией

Фомичева Галина Михайловна

Московский Государственный Университет
имени М.В. Ломоносова,
кафедра биологии почв,
аспирант

Шнырева Алла Викторовна

доктор биологических наук,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, кафедра микологии
и альгологии,
ведущий научный сотрудник

Содержание

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ГРИБОВ

И.В. Каратыгин МИКОФОССИЛИИ ГРИБОВ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ.....	10
--	----

КЛЕТочНАЯ БИОЛОГИЯ ГРИБОВ

Т.А. Белозерская, Н.Н. Гесслер ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА У ГРИБОВ.....	30
--	----

О.В. Камзолкина, Е.В. Матросова МИТОХОНДРИИ ГРИБОВ.....	55
--	----

ГЕНЕТИКА ГРИБОВ

А.В. Шнырева ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА ГРИБОВ.....	76
--	----

Ю.Т. Дьяков, С.Н. Еланский ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА <i>Phytophthora infestans</i>	107
--	-----

ЭКОЛОГИЯ ГРИБОВ

Е.Ю. Воронина МИКОРИЗЫ В НАЗЕМНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МИКОРИЗНЫХ СИМБИОЗОВ.....	142
---	-----

О.Е. Марфенина, Г.М. Фомичева ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ В СРЕДЕ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА; СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ.....	235
--	-----

МЕДИЦИНСКАЯ МИКОЛОГИЯ

С.М. Озерская, Н.Е. Иванушкина, Г.А. Кочкина ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ.....	268
---	-----

В.А. Тутельян, Л.В. Кравченко, А.Ю. Сергеев МИКОТОКСИНЫ.....	283
---	-----

Ю.В. Сергеев СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ.....	305
---	-----

ГРИБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

Е.П. Феофилова, В.М. Терешина, А.С. Меморская, Н.Г. Гончаров, А.И. Алехин, Л.М. Дулькин СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИКОПИНА ИЗ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ И ЕГО МЕДИЦИНСКОМ ПРИМЕНЕНИИ.....	314
---	-----

Л.В. Коломбет ГРИБЫ РОДА <i>Trichoderma</i> – ПРОДУЦЕНТЫ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА.....	323
---	-----

Происхождение и эволюция грибов

И.В. Каратыгин

МИКОФОССИЛИИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Цель настоящей статьи заключается в том, чтобы в известной мере подытожить палеомикологические данные, накопленные за последнее время, и акцентировать внимание на материалах, которые имеют отношение, главным образом, к происхождению таксономических групп грибов и их роли в экосистемах прошлого. Первые сведения о грибах в палеонтологических материалах носили отрывочный, фрагментарный характер (см. Meschinelli 1892; 1898; Pia, 1927; Ячевский, 1933; Криштофович, 1957; Попов, 1962, 1967; Шварцман, 1968). Большинство атрибуций этих организмов, известных из работ середины и конца XIX века неубедительны, плохо документированы и нуждаются в ревизии. В то же время не вызывал сомнений сам факт наличия грибов в историческом прошлом и их значительная роль в наземных экосистемах. В свое время прорывом в палеомикологических исследованиях, послужили исследования английских палеоботаников Р. Кидстона и У. Лэнга (Kidston, Lang, 1921), которые в течение ряда лет, обрабатывали коллекцию палеонтологического материала из окаменевшего болота в окрестностях Райни (Шотландия). Ими был описан комплекс девонских вымерших растений, в тканях которых были обнаружены грибы, а также следы их деятельности. Всего в тканях протостелических подземных осей этими авторами было выяв-

лено и описано около 15 грибных форм, включенных в состав сборного рода *Palaeomyces*. Из этих форм в качестве видов было признано только шесть (*Palaeomyces agglomeratus*, *P. asteroxyli*, *P. gordonii*, *P. horneae*, *P. simpsonii*, *P. vestitus*). Кидстон и Лэнг первыми обратили внимание на близость этих грибов по ряду морфологических признаков (ценоцитные гифы, везикулы, споры) современным эндомикоризным грибам, обитающим, например, на современных представителях *Psilotum* и *Tmesipteris*, наиболее близких древним риниофитам. По-видимому, большая часть из этих видов, судя по иллюстрациям, относится к представителям отдела *Glomeromycota* в современном его таксономическом объеме. По сути, в исследованиях Кидстона и Лэнга, помимо таксономических, были впервые представлены также данные о ценоцитарных связях, существовавших между организмами в экосистемах девона. Исследования материалов из Райниевых чэртов, проводимые вплоть до настоящего времени, дали и продолжают давать ценнейшие материалы, основополагающие для понимания как макроэволюции грибов, так и для взаимоотношений грибов с наземными организмами, первую очередь с растениями.

С тех пор данные об ископаемых остатках грибов продолжали постоянно накапливаться, и

геологическая история макроэволюции грибов и их отношений с высшими растениями становилась все более ясной. Из работ сравнительно недавнего времени можно отметить ряд особо крупных обобщений, касающихся таксономического и экологического анализа палеоботанического материала (Tiffney, Barghoorn, 1974; Pirozynski, 1976; Мейен, 1987; Stubblefield, Taylor, 1988; Taylor, 1993; Каратыгин, Снигиревская, 2004; Taylor et al., 2005).

Сравнительно-морфологические исследования для целей макросистематики грибов имеют собственные преимущества и ограничения. Главным достоинством «классических», морфологических исследований является то обстоятельство, что они приложимы к огромному массиву гербарного, палеонтологического материала, в связи с чем значительная часть организмов изучается и будет продолжать изучаться исключительно морфологическими методами. Вместе с тем реконструкция последовательностей филогенетических событий только по морфологическим признакам микофоссилий имеет свои ограничения. Можно отметить несколько причин, препятствующих использованию палеомикологических данных для реконструкции происхождения грибов и их эволюции. Во-первых, половые структуры у микофоссилий, которые необходимы для точного определения таксономической принадлежности грибов, как правило, малы и эфемерны по сравнению с их вегетативными структурами. Вегетативные же структуры грибов (обычно это мицелий или хламидоспоры), наиболее обычные в ископаемых остатках, зачастую недостаточны для точных определений. Идентификацию грибов также затрудняет то обстоятельство, что многие организмы из других таксономических групп (главным образом, это водоросли и протисты) образуют структуры, сходные с грибными. Наконец, приходится учитывать, что споры современных грибов

обычны в воздухе или воде, в силу чего они нередко внедряются в отложения растений из ранних эпох, затрудняя тем самым точную атрибуцию ископаемых остатков.

Реконструкция роли грибов и взаимоотношений с другими организмами в экосистемах прошлого представляет собою довольно сложную самостоятельную задачу. Это вызвано тем обстоятельством, что сведений о роли и грибов в древних экосистемах имеется очень мало, и они зачастую отрывочны и фрагментарны. Тем не менее доказано, что во все геологические эпохи грибы в качестве симбиотрофов и паразитов оказывали влияние на развитие, рост и распространение высших растений, а в качестве сапротрофов участвовали в их разложении. За последние годы увеличилось число научных публикаций, посвященных попыткам реконструкции роли грибов в функционировании первых наземных экосистем и их роли в коэволюционных процессах (Pirozynski, Malloch, 1975; Malloch et al., 1980; Gray, 1985; Каратыгин, 1993, 1994; Taylor, Osborn, 1996; Taylor, 1988, 1990; Selosse, Le Tacon, 1998 и др.). Для понимания развития трофо-ценотических отношений в ходе коэволюции грибов и растений важен анализ связей между ними в экосистемах прошлого. К первым наземным экосистемам приложим известный афоризм Г. А. Заварзина «прошлое отбирает будущее» (Заварзин, 2004). Это высказывание надо понимать в том смысле, что в первых наземных девонских экосистемах уже были заложены важнейшие формы и механизмы отношений между организмами автотрофного и гетеротрофного блоков, определившие в дальнейшем все многообразие последующих наземных экосистем. В частности, выход растений на сушу, и ее освоение осуществлялось в рамках общего трофо-ценотического контура, в котором существенное значение имели организмы гетеротрофного блока, в том числе сапротрофные и симбиотрофные грибы

Сапротрофы

Ascomycota

Аскомицеты – крупнейший филум в царстве грибов. Долгое время достоверные палеозойские ископаемые аскомицетных плодовых тел не обнаруживались, по-видимому, из-за технических трудностей выявления их мелких репродуктивных структур. В то же время асексуальные споры мицелиальных аскомицетов часто фиксировались в отложениях мела (Pirozynski, 1976; Pirozynski, Weresub, 1979). Эти авторы, сообщавшие о нахождении различных аскомицетных бесполок пропагул из нижнего мела, полагали, что аскомицетные линии возникли не ранее мезозоя.

Однако уже в 70 и 80-х годах имелись некоторые палеомикологические свидетельства и о более раннем происхождении этой группы грибов. В частности, определенное противоречие со шкалой М. Берби и Дж. Тейлора в оценке сроков происхождения мицелиальных аскомицетов представляет нахождение структур (спор и мицелиальных фрагментов), сходных с пропагулами рецентных мицелиальных аскомицетов, из силурийских осадков возрастом более 400 млн. лет (Pratt et al., 1978; Sherwood-Pike, Gray, 1985). Эти структуры, обнаруженные в среднем силуре в Швеции (Готланд), почти на 120 млн. лет старше, вычисленных по шкале М. Берби и Дж. Тейлора сроков происхождения мицелиальных аскомицетов. Силурийские споры варьируют в способах их септирования и очертаниях. Наиболее значительные из них (55 x 25 мкм) имеют округло-цилиндрическую форму с 1–9 поперечными септами. Некоторым основанием для предположения о том, что эти споры относятся именно к аскомицетам, служит наличие рубцов на их апексах, подобных тем, которые имеются на спорах ряда групп современных аскомицетов. Против атрибуции описанных выше силурийских спор как аскомицетных свидетельствует отсутствие спор аскомицетного родства из отложений в сроки между силуром и нижним мелом. Объяснить подобное исчезновение аскомицетных спор среди микофоссилий в последующие после силура 280 млн. лет крайне трудно, если признавать силурийское происхождение аскомицетов (Pirozynski, Weresub, 1979).

Обсуждая противоречие этих фактов с данными, полученными в соответствии с концепцией молекулярных часов, М. Берби и Дж. Тейлор (Berbee, Taylor, 1993, 1995) полагают, что силу-

рийские грибные споры либо могли быть просто современными грибными инфекциями силурийских образцов, либо могли представлять вымершую гипотетическую группу грибов («преаскомицетов»), значительно отстоящую от мицелиальных аскомицетов.

Однако о присутствии аскомицетов в нижнем девоне, помимо силурийских спор, в определенной степени свидетельствует также нахождение в отложениях Сибири неких округло-эллиптических структур на кутикуле энigmatических наземных растений *Orestovia devonica* (Krassilov, 1981). Эти структуры, содержавшие угловатые клетки, рассматриваемые как сумки, расценивались В.А. Красиловым как аскомицетные плодовые тела (тириотеции). Некоторые из таких сумок имели гифы с крючками, интерпретированными как аскогенные крючки, свойственные современным аскомицетам. Предполагалось, что данный ископаемый гриб имеет ближайшее родство с представителями рецентных *Microthyriales*. Еще ранее В. А. Красиловым (1967) в раннемеловой флоре южного Приморья были обнаружены и описаны 11 видов из 5 родов аскомицетов (*Notothyrites*, *Ussurithyrites*, *Trichopeltinites*, *Thallites*), отнесенных к порядкам *Hemisphaeriales* (10 видов) и *Perisporiales* (1 вид – *Perisporiacites zamiophylli*). Однако во всех этих случаях не были выявлены какие-либо репродуктивные структуры, которые позволили бы безоговорочно идентифицировать их как аскомицеты.

В целом можно констатировать, что долгое время существовала определенная временная лакуна, между находками силурийских аскомицетных спор и находками репродуктивных структур аскомицетов, достоверно обнаруживаемых только с середины мела. Это противоречие удалось преодолеть, после того, когда в матриксе Райниевых чёрт был выявлен аскомицет, имевший облик современных аскомицетов с развитыми репродуктивными структурами (Taylor et al., 1999; Taylor et al., 2005). Эта палеонтологическая находка оказалась примерно на 100 миллионов лет старше срока происхождения аскомицетов, ранее вычисленного на основе молекулярных исследований М. Берби и Дж. Тейлора. Обнаружение этого «самого раннего аскомицета» из нижнего девона (т.е. возрастом более 400 млн. лет) оказалось крайне важным для понимания эволюции аскомицетов, поскольку в этом случае были ил-

люстрированы в деталях важнейшие структуры, характеризующие половую стадию (перитеции, сумки и споры). На стеблях и ризомах под эпидермисом одного из ранних наземных растений рода *Asteroxylon* обнаружены плодовые тела (перитеции) примерно 400 мкм в диам. Каждый шаровидный перитеций образует строматовидную камеру под парой замыкающих клеток устьичного аппарата. Стенка перитеция состоит из двух отчетливых слоев переплетенных гиф. При созревании перитеция споры высвобождаются через удлиненную шейку перитеция. Образующиеся из внутреннего слоя перитециев многочисленные, тесно расположенные сумки имеют длину до 50 мкм и однослойную оболочку. Между сумками различимы стерильные нитеподобные гифальные структуры. В каждой сумке располагаются 16 или 32 продолговатые аскоспоры; каждая аскоспора примерно 5 мкм длины, причем многие из них двуклеточные. Описанная выше палеомикологическая находка крайне важна для более точного определения срока происхождения аскомицетов, а также для характеристики паразито-хозяйственных отношений в этот период освоения суши эукариотами. Указанная находка первых аскомицетов совпала по времени с появлением в наземных экосистемах первых насекомых (Engel, Grimaldi, 2004). В последующие, более поздние сроки аскомицеты довольно редко обнаруживаются в палеоматериалах. Например, на листьях триасового *Pterophyllum* иллюстрированы апотеции и сумки аскомицета неустановленного таксономического положения (Schaarschmidt, 1966).

Лишь в третичных отложениях янтарей Европы и Америки выявлены хорошо сохранившиеся ископаемые остатки аскомицетов. В Балтийском янтаре (ранний эоцен – ранний олигоцен, 35–55 млн. лет) фиксированы представители современных порядков *Carpodiales* (род *Metacarpodium*) (Rikkinen et al., 2003) и *Graphidales* (род *Graphis*) (Garty et al., 1982). В более молодом, по сравнению с балтийским, доминиканском янтаре возрастом 15–45 млн. лет обнаружены аскомицеты порядков *Clavicipitales* (с анаморфным родом *Beauveria* на муравье) (Poinar, Thomas, 1984) и *Eurotiales* (*Aspergillus*) (Thomas, Poinar, 1988). Многочисленные аскокарпы (тириотеции) представителей *Microthyriales* выявлены также в айсбергах формаций нижнего третичного периода Канады. При этом было описано два новых рода этого порядка (*Dicellaesporites*, *Jansoniisporites*) и 19 новых видов. Обнаружение в третичных углях Малайзии дискомицета *Ascodesmites malayensis*

(Trivedi et al., 1973) позднее было оспорено в связи с отсутствием доказательств наличия сумок в образцах. Однако последнее обстоятельство является необходимым аргументом для атрибуции палеогрибов в качестве аскомицетов (Korf, 1977).

Basidiomycota

По косвенным палеомикологическим свидетельствам, признаки существования базидиомицетов восходят к верхнему девону. Подобное заключение базируется на обнаружении пряжек, свойственных базидиомицетам, на мицелии в древесине археоптериса *Callixylon* (Stubblefield et al., 1985). Такие признаки, как наличие пряжек на мицелиальных филаментах (Dennis, 1970; Osborn et al., 1989), развитие септированных гиф и наличие признаков гниения древесины, свойственных деятельности современных базидиомицетов – возбудителей гнили (Stubblefield et al., 1985; Stubblefield, Taylor, 1986), косвенно подтверждают заключение о том, что эта группа высших грибов имела значительное развитие в течение всего палеозоя. Имеются палеоботанические свидетельства наличия белой гнили, обычно вызываемой деятельностью базидиальных грибов, из перми, т. е. примерно 290 млн. лет назад (Stubblefield, Taylor, 1986). Однако во всех случаях более убедительными выглядят признаки гниения древесины в углях мела и третичного периода, чем таковые в более древних углях карбона (Robinson, 1990).

Из каменноугольного периода наиболее полно описан образец *Palaeancistrus*, обнаруженный в трахеидах папоротника *Zygopteris* (Dennis, 1970). Фоссилии представлены септированными гифами 5.0 мкм в диам., причем некоторые из гиф имеют как терминальные, так и интеркалярные хламидоспоры. Структуры, сходные с пряжками, косвенно подтверждают базидиомицетное родство этого гриба, хотя возможно, что эти структуры могли быть и так называемыми «псевдопряжками», поскольку прохождения ядер дикариона через них не было выявлено. Плодовые тела базидиальных грибов обнаруживаются в значительно более поздних отложениях.

Aphylophorales. Плодовое тело базидиомицета (предположительно трутового) *Eopolyporoides kuklei* описано из среднего триаса отложений Австралии (Truswell, 1966). В этом случае каких-либо анатомических деталей плодового тела гриба и гимения описано не было, в связи с чем эта находка нуждается в переисследовании. Два

других трутовика *Polyporites stevensonii* (Brown, 1936) и *P. browni* (Wieland, 1934) (оба из мелового периода) к грибам не относятся (Brown, 1938; Tiffney, Barghoorn, 1974). Долгое время предполагалось, что наиболее древним афиллофоровым (трутовым) грибом является *Phellinites digiustoi*, описанный на основе образцов многолетних плодовых тел, обнаруженных в юре, в осадках Патагонии (Аргентина) (Singer, Archangelsky, 1958). Именно сроки появления этого гомобазидиомицета в юре (около 160 млн. лет назад), как наиболее достоверные, были использованы при вычислении временной шкалы происхождения макротаксонов грибов по методике т. н. «молекулярных часов» (Berbee, Taylor, 1993). Однако при последующем анатомическом анализе образцов голотипа было установлено, что идентификация образцов была произведена ошибочно. Образцы оказались окремненными кусками коры хвойного дерева, предположительно из рода *Araucaria*, не содержащими гиф, спор или каких-либо других грибных структур (Hibbett et al., 1997a). В связи с этим минимальный возраст голобазидиомицетов, исходя из достоверных микофоссилийных материалов, был отнесен к середине мела. К этому же периоду относится достоверное обнаружение фрагмента плодового тела (поридного гименофора) трутовика *Quatsinoporites cranhamii* (Smith et al., 2004). В этом случае на гимении были выявлены цистиды до 54 мкм длины, но ни базидий, ни базидиоспор обнаружено не было. Указанные сроки минимального возраста голомицетов подтверждаются также нахождением трутового гриба из меловых маастрихтских слоев Индии (Kar et al., 2003).

Вызывает интерес находка в верхнем мелу гриба *Palaeosclerotium pusillum*, совмещающего морфологические признаки как базидиомицетов, так и аскомицетов (Rothwell, 1972). Этот гриб имеет вид сферических клейстотециев около 1 мм в диам., содержащих округлые тельца, трактуемые как сумки и аскоспоры (Dennis, 1976). Сумки имеют размеры около 35 мкм в диам., в которых располагаются аскоспоры 12 мкм дл. Наличие на мицелии пряжек, а также септ, сходных с долипорами, дало повод для обширных дискуссий относительно таксономической принадлежности данного гриба. В частности, предполагалось, что указанный гриб является сумчатым грибом, на котором паразитирует базидиомицет (McLaughlin, 1976). Р. Зингер (Singer, 1977) полагает, что гриб скорее относится к аскомицетам, близким современным представителям Eurotiales. Наконец, высказывалось

предположение, что данный гриб нельзя относить ни к аско- ни к базидиомицетам. Скорее, он является дикариотическим представителем, связывающим базидиомицеты с группой вымерших лишайникоподобных форм (Pirozynski, Weresub, 1979). Наконец, обращалось внимание также на то, что плодовые тела этого гриба весьма сходны с концептакулами силур-девонских нематофитов, тело которых сложено гифоподобными структурами, например, с уже упомянутыми нематофитами *Prototaxites* (Мейен 1987, с. 50).

В меловых отложениях янтаря Бирмы (Мьянмы) найдены мицелий и плодовые тела представителя *Clavariaceae* (Poinar, Brown, 2003). Мелкие плодовые тела этого вида 0.3–3.7 мм выс. и 0.4–2.0 мм шир., произраставшие небольшими группами, были полностью покрыты гимением, содержащим цистиды и базидии со стеригмами; в мицелии выявлены простые пряжки. По обнаруженным материалам авторы описали новое семейство *Palaeoclavariaceae*, род *Palaeoclavaria* и вид *Palaeoclavaria burmitis*. Данную находку можно расценивать как первую, наиболее раннюю (примерно 100 млн. лет назад) и достоверную находку плодовых тел представителей *Aphyllophorales*.

Agaricales. Наиболее ранним из достоверных фоссилий плодовых тел шляпочных грибов является нахождение агарикового гриба *Archaeomarasmium legetti*. Окремненные остатки этого гриба, сходного с современными представителями родов *Marasmius* и *Marasmiellus* (*Tricholomataceae*), были обнаружены в среднем мелу (90–94 млн. лет назад) в шт. Нью-Джерси, США (Hibbett et al., 1995, 1997c). Этими же авторами (Hibbett et al., 1997b) из отложений янтаря миоцена (15–30 млн. лет назад) описан вид *Protomycena electra*, представленный хорошо сохранившимся плодовым телом гриба (базидионом). Оно состоит из шляпки и ножки; базидиоспоры гладкие с отчетливым хиларным придатком, свойственным этой группе базидиомицетов. Данный вид аналогичен современным представителям рода *Мусена*. В отложениях янтаря из миоцена возрастом примерно 15–30 млн. лет обнаружен *Coprinites domesticana* (Poinar, Singer, 1990). Все три представителя *Agaricales* (*Archaeomarasmium*, *Protomycena*, *Coprinites*) хорошо сохранились в янтаре, и их атрибуция не вызывает сомнений. Очевидно, что шляпочные грибы (порядок *Agaricales* s. l.) произошли значительно ранее этих находок, поскольку следует

иметь в виду, что их плодовые тела эфемерны и разрушаются раньше, чем фоссилизуются.

Gasteromycetales. Наиболее ранняя находка представителя Gasteromycetales происходит из меловых маастрихтских слоев бассейна реки Нэмэгэт, южная Гоби, Монголия (Красилов, Макулбеков, 2003). На ожелезненной поверхности слоя светло-серой глины с обильным растительным детритом была выявлена небольшая группа грибных плодовых тел. Ископаемое плодовое тело обнаруживает такие характерные признаки гастеромицетов, как ангиокарпное плодовое тело с двухслойным покровом, при этом внешний слой (экзоперидий), раскрывается лопастями, окружены валиком — перистомом. Споры эллипсоидальные, гладкие различного размера до 10 мкм дл. Обнаруженный вид по общему габитусу весьма отдаленно напоминает современных представителей гастеромицетов из рода *Geastrum* Pers., но, по мнению авторов, отлича-

ется от них нерегулярными разрывами экзоперидия, а также более крупными спорами. На основании этих отличий был описан новый род *Geastroidea* Krassilov и вид *G. lobata* Krassilov. Из миоцена Мексики известен вид *Geastrum texensis*, плодовые тела которого раскрываются десятию симметрично расположенными лопастями с головкой около 13 мм в диам. (Magallón-Puebla, Cevallos-Ferris, 1993).

Современная палеомикология располагает фактами существования в прошлые времена грибных форм, значительно отличающихся от форм современных грибов. Эти отличия подчас столь значительны, что точно определить таксономическое положение таких форм крайне затруднительно. Примером этому может служить выявленное в лесах верхнего девона на почве сапротрофного грибообразного организма 5 см. выс. (Снигиревский, 1996). Среди современных таксономических групп грибов близкий аналог для этого организма отсутствует.

Паразиты

Грибные паразиты являются неизменными спутниками высших растений, начиная формирования первых наземных экосистем.

Chytridiomycota

Несколько примеров микопаразитизма известно из Райниевых чёртов нижнего девона. В этих случаях отмечено образование толстостенных хламидоспор и везикул не идентифицированных грибов, в которые эпибионтные грибы-паразиты были прикреплены к их внешней поверхности. У других хламидоспор микопаразиты располагались между слоями спорных оболочек или внутри полостей хламидоспор. Подобные клеточные реакции идентичны реакциям, вызываемым паразитическими хитридиомицетами, в современных эндомикоризах (Taylor et al., 1992; Nass et al., 1994; Taylor et al., 2004). Примеры паразитирования грибов из отделов Chytridiomycota или Oomycota на пыльцевых зернах известны с каменноугольного периода (Millay et Taylor, 1978). В осадках верхнего пенсильвания (карбон) внутри трехлучевых спор *Horneophyton ligneri* обнаружены спорангии, содержащие зооспоры хитридиомицета (Illman, 1984). Внутри семени *Nucellangium* описан грибной паразит, сходный с современным облигатным паразитом

рода *Albugo*. В этом случае паразито-хозяйинные взаимоотношения также характерны при инфекции современными грибами этой группы грибоподобных организмов (Stidd, Consentino, 1975).

Ascomycota

Многие раневые реакции тканей (обычно это формирование перидермы) на вегетативных органах девонских растений по анатомическим признакам сопоставимы с таковыми, наблюдаемыми у современных растений, вызываемых воздействием паразитных грибов (Banks, 1981; Banks Colhart, 1993). Сообщается о раневых тканевых реакциях в перидерме *Psilophyton* с образованием слоя феллемы и клеток феллодермы (Banks, 1981; Trant, Gensel, 1985). Также в раннем девоне обнаруживаются признаки микопаразитизма, проявляющиеся в образовании специфических вздутий (*callosities*) на внутренней оболочке грибных хламидоспор. Подобные вздутия рассматриваются как реакция на воздействие паразитических грибов и свидетельствуют, что клетки хозяина были живыми в момент их взаимодействия с грибом (Nass et al., 1994). Наиболее раннее нахождение представителя (*Microthyriales*) — *Stomiopeltites cretacea* Alvin et Miur., вызывающего черную пятнистость побегов и листьев

хвойного дерева, известно из отложений нижнего мела Великобритании (Alvin et Miur, 1970). Однако в этом случае сумки и аскоспоры выявлены не были. Как отмечалось выше, в отложениях триаса найдены и иллюстрированы сумки и апотеции гриба, возможно паразитирующего на листьях беннетита *Pterophyllum* (Schaarschmidt, 1966).

Glomeromycota

Признаки паразитизма обнаруживаются уже у первых видов *Glomites* в тканях видов *Rhynia* и *Aglaophyton*, которые обычно традиционно рассматриваются как симбиотрофы.

Вместе с тем четко выраженной грани между патогенными и мутуалистическими свойствами возбудителей эндомикориз у ранних наземных растений проследить не удастся. В частности, характерными особенностями вида *Glomites sporogarpoides* являются хорошо выраженные у него патогенные свойства. Эти свойства гриба проявляются в активном заселении растения мицелием осевых органов, в образовании обширных некротических зон в тканях, а также в замещении везикулами и формирующимися спорокарпами ассимиляционных тканей растения. Объем замещенной ткани растения развивающимися спорокарпами гриба может быть весьма значительным, особенно на заключительных стадиях развития. В нижнем девоне ткани *Rhynia* несут следы раневых реакций. Патологические признаки этих поражений проявляются в виде некрозов и следов гипертрофии клеток, примыкающих к зонам повреждений. Хотя чаще предполагается, что эти поражения являются реакциями растений на атаки фитофагов (Kevan et al., 1975; Scott et al., 1992), но не исключена возможность участия в такого рода поражениях и грибов.

Basidiomycota

Ustilaginales и Uredinales. Сообщения о происхождении спор ржавчинных и головневых грибов довольно многочисленны начиная с третичного периода (Ramanujam, Ramachar, 1980). Все споры из отложений этого времени идентичны по морфологии спорам современных грибов. В частности, телиоспоры ржавчинных грибов рода *Puccinia* обнаружены в отложениях третичного периода шт. Кентукки, США (Wolf, 1969). Из палеоцен-эоценовых отложений сапропелевых углей Енисейского кряжа отмечены хорошо сохранившиеся телиоспоры *Phragmidium rubi-ide-*

ae (Попов, 1967). В глинах третичного периода (сарматская флора Армении) регулярно встречаются споры ржавчинных грибов (*Phragmidites*, *Puccinites*, *Uredites*, *Uromycites*, *Ustilagites*, *Urocystites*) (Тетеревникова-Бабаян, Таслахчян, 1970).

В чёртах Принцетон (Британская Колумбия, Канада) среднего эоцена третичного периода (возраст 100 млн. лет) на листьях и плодах растений хорошо сохранились разнообразные грибные сообщества. В пыльниках цветков не идентифицированного представителя сем. *Aronogetonaceae* выявлены грибные споры 6–8 мкм в диам. с ямчатым экзоспорием. Споры в пыльцевых камерах полностью замещают пыльцу растений. Данный вид гриба наиболее близок по строению спор и характеру поражения современному виду головневых *Microbotryum violaceum* (Pers: Pers.) Deml et Oberwinkler (Currah, Stockey, 1991; Lepage et al., 1994), чьи сорусы замещают пыльцевые камеры современных представителей сем. *Caryophyllaceae*.

М. Берби и Дж. Тейлор (Berbee, Taylor, 1993) на основе молекулярных данных предполагают, что дивергенция порядка *Uredinales* от основного ствола базидиомицетов осуществилась 310 млн. лет назад, что совпадает с заключением (Savile, 1955), о том, что ржавчинные возникли как паразиты ранних сосудистых растений. Порядки *Ustilaginales* *Tilletiales* сформировались примерно 230 млн. лет назад на ранних однодольных. Однако все эти предположения пока не нашли подтверждения палеомикологическими материалами в эти сроки.

Из представителей других таксономических групп следует упомянуть вид *Stigmatomyces succini* (порядок *Laboulbeniales*, класс *Laboulbeniomycetes*), недавно выявленный на мухе в балтийском янтаре ((Rossi et al., 2005). Еще ранее в балтийском же янтаре обнаружен паразитирующий на мухе гифомицет *Sporotrichites heterospermus* (Goepfert, Berendt, 1845), что является старейшей ископаемой находкой в этой ассоциации. Однако не исключена возможность и того, что данный гриб являлся сапротрофом.

Симбиотрофы

Glomeromycota

Эндомикориза. В упоминавшейся классической работе по исследованию матрикса из Райниевых чёртов (ранний девон, примерно 380 млн. лет назад) (Kidston, Lang, 1921) в тканях подземных частей (ризомоидах) наиболее древних наземных растений (*Rhynia*, *Asteroxylon*, *Норнеофитон*), были обнаружены грибные структуры. Всего в тканях протостелических подземных осей этими авторами было выявлено и описано около 15 грибных форм (7 видов), включенных в состав сборного рода *Palaeomyces*. Кидстон и Лэнг обратили внимание на близость этих грибов по ряду морфологических признаков (ценоцитные гифы, везикулы, споры) современным эндомикоризным грибам, обитающим, например, на современных *Psilotum* и *Tmesipteris*, наиболее близких древним риниофитам. Позднее в этих же матриксах в подземных частях *Rhynia gwynne-vaughanii* были выявлены различные по морфологии споры эндофитных грибов или их скопления, часто заключенные в общую оболочку – спорокарпы (Boullard, Lemoigne, 1971; Sharma et al., 1993; Lemoigne, Zdebska, 1980). Эти структуры также свойственны современным микобионтам эндомикоризы. Последующие авторы неоднократно подчеркивали сходство этих ископаемых грибов с современными эндомикоризными грибами рода *Glomus* (порядок Glomales, класс Zygomycetes) (Pirozynski, Malloch, 1975; Pirozynski, Dalpé, 1989; Taylor, 1990; Simon, 1993; Sharma et al., 1993). Позже в соответствии с правилами ботанической номенклатуры этому роду ископаемого возбудителя эндомикоризы было дано название *Glomites* Taylor, Remy, Nass et Kerp (Taylor et al., 1995). Таксономический диагноз этого ископаемого рода основан в значительной мере на морфологии внутритканевого мицелия и арбускул. До настоящего времени в роде *Glomites* было известно два вида. Один из них – типовой для рода эндофитный вид *G. rhyniensis* Taylor, Remy, Nass et Kerp, который развивается на осях вида *Aglaophyton major* (Kidston et Lang) D. Edwards. Позже в корнях *Antarcticycas* из среднего триаса Антарктиды описан второй вид рода *Glomites* – *G. cycestris* (Phipps, Taylor, 1996). Признаки морфологии арбускул и внутритканевого мицелия были позже использованы для дифференциации рода *Glomites* от рода *Gigasporites* – другого эндомикоризного гриба из триаса (Phipps, Taylor, 1996).

Наиболее характерной морфофункциональной чертой современных эндомикориз являются арбускулы. Долгое время в палеоботаническом материале из девона у эндомикориз арбускулы выявлены не были, что препятствовало полному функциональному отождествлению древних эндомикориз современным. Однако позже эти структуры были обнаружены у эндомикоризы в корнях цикадовых из отложений Антарктиды (середина триаса) (Stubblefield et al., 1987). Затем арбускулы были обнаружены и в раннем девоне в подземных осях растения *Aglaophyton major* в Райниевых чёртах (Remy et al., 1994; Taylor et al., 1995). Несептированные гифы и арбускулы имели сходство с таковыми современной эндомикоризы. Были найдены все стадии роста арбускул, начиная от проникновения гриба в клетки растений до образования арбускул и кончая их распадом. Тем самым с определенностью установлено, что полноценная эндомикориза существовала более 400 млн. лет назад и играла важную роль в колонизации суши уже в раннем девоне.

В палеонтологической коллекции БИН РАН также имеются образцы кремнистых сланцев раннедевонского возраста из окрестностей дер. Райни в Шотландии. В образцах представлены многочисленные раннедевонские растения, содержащие различные формы эндофитных грибов, в том числе и представители рода *Glomites*. Нами (Каратыгин и др., 2006 в окремненных тканях осевых органов ряда раннедевонских растений *Rhynia gwynne-vaughanii* и *Aglaophyton major* были выявлены и изучены остатки ископаемых грибов. В частности, был выявлен и детально изучен кобионт везикулярно-арбускулярной эндомикоризы – гриб рода *Glomites*. Это 3-й вид данного рода и первый спорокарпический вид из отложений девона. Спорокарпы гриба были обнаружены как непосредственно в отмирающих тканях растений, так и в дисперсных растительных остатках. Кроме того, были выявлены стадии образования гломоидных спор. На основе полученных данных описан новый вид – *Glomites sporocarpoides* Karatygin, Snigirevskaya, K. Demchenko et Zdebska (Каратыгин и др., 2006, в печати). В ходе исследования развития гриба в тканях инфицированных растений сделан вывод о том, что особенностями вида *Glomites sporocarpoides* являются, наряду с симбиотическими, ярко выраженные патогенные свойства. Сделано заключение, что на ранних стадиях коэволюции

микобионтов и фотобионтов существовало неустойчивое равновесие между мутуалистическими и антагонистическими свойствами. В наших материалах были выявлены хорошо развитые арбускулы, подобные тем, которые были ранее описаны в триацетатных репликах или пленочных отгисках у двух других видов *Glomites* (Taylor et al., 1995). На препаратах поперечных срезов подземных осей *Rhynia* и *Aglaophyton* хорошо заметна концентрическая зона из одного слоя паренхимных клеток, расположенная во втором–третьем наружном слое коры. Большинство этих клеток заполнено зернистым материалом, по-видимому, являющимся продуктом распада арбускул. В отдельных клетках удается различить разветвленные, трехмерные мицелиальные структуры, которые можно рассматривать как арбускулы, находящиеся на различных стадиях развития, включая лизис.

Наличие арбускул, везикул и спорокарпов у всех 3 видов рода *Glomites* свидетельствует о том, что эндомикориза активно функционировала в раннем девоне и имела широкое распространение. Эти грибы уже обладали набором сигнальных механизмов, давшим им возможность длительно сосуществовать с фотобионтами. По-видимому, цитогенетические механизмы, определявшие активность эндомикориз в девоне, аналогичны или крайне близки таковым у эндомикориз современных растений (Taylor, 1990). Сходным образом, механизмы переноса фосфатов и углерода между грибом и растением также имеют древнее происхождение. Это обстоятельство во многом определило их последующую коэволюцию. Как справедливо подчеркивалось, «кардинальная перестройка органического вещества в геологических процессах не приводит к превращению исходных биохимических соединений в однородный геополимер. Напротив, исходные биополимеры, превращаясь в своего рода молекулярные ископаемые», сохраняют структурную индивидуальность, которая не утрачивается даже на высоких стадиях метаморфизма» (Кизильштейн, Шпицглюз, 1999, стр. 33).

В девоне у представителей практически всех предковых групп основных филетических линий сосудистых растений выявлены микобионты, располагавшиеся в нижних частях осевых структур. Независимое существование грибных эндосимбионтов у представителей анцестральных групп нескольких различных филетических линий сосудистых растений в девоне заставляло предположить, что первоначальная микофитная ассоциация могла возникнуть значительно раньше. Ринио-

офиты (отдел *Rhyniophyta*), как известно, является тем первичным филогенетическим узлом, в котором переплетаются начальные звенья эволюции высших растений. Вероятно, что риниофиты и плауновидные имели общие корни, уходящие в самый ранний силур или даже в ордовик.

Действительно, в самые последние годы, исследованные палеомикологические образцы, так же как и молекулярные данные, свидетельствуют о том, что возникновение порядка *Glomales* относится к еще более раннему периоду, к ордовику (460 млн. лет назад), совпадая по времени с освоением суши самыми первыми наземными растениями. Такое заключение было основано на анализе структур фоссилизованных гиф и спор из отложений Гуттенбергской формации штата Висконсин (США). Ордовикский представитель *Glomales* описан как *Palaeoglomus grayi* Redecker, Kodner et Graham (Redecker et al., 2002). При секвенировании рДНК гиф и спор этих образцов этого вида было выявлено значительное генотипическое разнообразие. При этом были установлены две глубоко дивергировавшие линии на уровне семейств, представленные двумя вновь описанными родами *Archaeospora* и *Paraglomus* (Redecker, 2002). Это отодвигает время возникновения порядка *Glomales* в еще более ранние сроки (на 600 млн. лет назад), чем считалось прежде (Pirozynski, Dalpé, 1989; Verbee, Taylor, 1995).

Лишайники. Лишайники являются группой симбиотических организмов, связанных своим происхождением главным образом с аскомицетами. Находки лишайников в ископаемом состоянии крайне малочисленны, несмотря на их несомненно широкое распространение в различные периоды истории растительности. Одной из причин этого является отсутствие убедительных свидетельств взаимодействия кобионтов. Первые сообщения о находках лишайников в ранних геологических отложениях были либо ошибочными, либо неубедительными. Сомнителен и описанный в строматолитах докембрия (Южная Африка) *Thuchomyces lichenoides* (Hallbauer et al., 1977), поскольку признаки, легшие в основу его описания косвенные, абиотические (Klappa, 1979); кроме того, у этого вида признаки наличия фотобионта отсутствуют. Также неубедительна трактовка раннего энгиматика из среднего девона *Spongiophyton* как организма лишайниковой природы (Stein et al., 1993). Подобное заключение основывается лишь на том обстоятельстве, что клетки внешней кутикулы имеют сходство с гифами грибов, но ничего неизвестно о внутренней структуре этого таллоидного организма.

Образцы наиболее древнего и полно описанного цианолишайника, которому дано название *Winfrenatia reticulata*, обнаружены в райниевых чёртах девона Шотландии (Taylor et al., 1995; Taylor et al., 1997). Таллом этого ископаемого лишайника состоит из тонких лентовидных структур приблизительно 1–2 мм толщины, образуемых ценцитными грибными гифами 1–4 мкм толщ. На поверхности подобных образований располагаются многочисленные трехмерные ячейки (nets) из гиф, примерно 25 мкм в диам., варьирующие по форме от округлых до шестиугольных. В центре каждой ячейки расположена клетка фотобионта 15 мкм в диам. или их небольшие скопления. Клетки фотобионта окружены довольно толстой слизистой оболочкой, причем у некоторых клеток в клеточных стенках обнаруживаются слабые инвагинации в местах контакта с гифами. Наличие подобных инвагинаций, а также тот факт, что гифы окружают практически каждую из клеток фотобионта, свидетельствуют о существовании взаимодействий между бионтами. Фотобионт обладает признаками, характерными для коккоидных цианобактерий родов *Gloeosarssa* и *Chroococcidiopsis*. Поскольку у микобионта не было обнаружено каких-либо репродуктивных структур, его точное таксономическое положение определено не было, но отмечена близость микобионта к видам отдела *Glomeromycota*. Размножение лишайника осуществлялось эндоспорами и соредиями (Taylor et al., 1997). Подобные девонские цианолишайники были способны заселять новые экологические ниши в виде скал, способствуя процессам почвообразования.

Неоднократно высказывались суждения, что процессы лишенизации имели место уже в самые ранние сроки наземной эволюции организмов (Church, 1921; Hawksworth, 1982; Eriksson, 1981). Черч (Church, 1921) рассматривал лишайники в качестве первых трансмигрантов, переселившихся на сушу с моря. Цианобактерии, возникшие в самом раннем докембрии (Walsh, Lowe, 1985), могли быть первыми потенциальными фотобионтами, подходящими для освоения их микобионтами. Согласно гипотезе Эрикссона (Eriksson, 2005), крупный субфилум *Pezizomycotina* произошел от гипотетической группы лишенизированных аскомицетов *Protolichenes*, находившихся в ассоциации с цианобактериями и, возможно, с зелеными водорослями. Как полагает Эрикссон, развитие этой лишайниковой ассоциации привело впоследствии к образованию различных групп паразитных и сапротрофных грибов на высших растениях с одновременным

развитием более подвинутого облигатного лишайникового микобионта. Лишайники играли в прошлом ключевую роль в ускорении распада скальных пород, подготавливая этим материал для развития первых наземных растений. Это подтверждается тем обстоятельством, что и современные лишайники—пионеры в растительных сукцессиях. Обнаружение в девоне лишайника *Winfrenatia* подтверждает эту точку зрения.

В палеонтологической коллекции БИН РАН в образцах кремнистых сланцев раннедевонского возраста (райниевые чёрты, Шотландия) нами также выявлен и изучен цианолишайник рода *Winfrenatia*. Новые данные, полученные нами, показали, что боковые стенки этих вместилищ в действительности состоят из слизистых влагалищ нитчатых цианобактерий, в некоторых из которых была обнаружена свободноживущая нитчатая цианобактерия, сходная с отдельными представителями современных *Nostocales*. Авторы же описанного рода не имели данных о строении стенок вместилищ коккоидов, ошибочно предполагая, что они состоят из переплетения грибных гиф.

К сожалению, лишайники из отложений перми, триаса и карбона пока не обнаружены, хотя нет сомнений, что они существовали в эти геологические периоды. Лишь из палеозоя (живет Центрального Казахстана) описан вид листоватого лишайника *Flabellitha elinae* Krassilov et Jurina (Юрина, Красилов, 2002). Вывод о предполагаемой принадлежности исследованных остатков к вымершим лишайникам был сделан на основе сравнения их микроструктуры с современными листоватыми лишайниками родов *Parmelia* или *Peltigera*. Однако у этого организма не были выявлены апоотеции микобионта или какие-либо признаки взаимоотношений между бионтами, что мешает безоговорочно признать в этом организме лишайник.

Только из третичного периода описываются лишайники хорошей сохранности. К их числу относится, например, лишайник рода *Alectoria* (порядок *Lecanorales*) (Mägdefrau, 1957). Эпифитный лишайник рода *Strigula* (Sherwood-Pike, 1985b) первоначально был описан из эоцена Теннеси как аскомицет рода *Pelicothallo* семейства *Microthyriaceae* (Dilcher, 1965). Строение микофоссилий этих видов, обитавших на стволах хвойных деревьев, показывает, что их морфологические особенности, по крайней мере, десятки миллионов лет оставались практически неизменными. Также в янтаре возрастом 20 млн. лет на основе образцов хорошей сохранности описан лишайник *Chaenothecopsis bitterfeldensis* Rikkinen

et Poinar (сем. *Mycocaliciaceae*) (Rikkinen, Poinar, 2000), а в янтаре возрастом 40 млн. лет обнаружен представитель рода *Anzia* (*Lecanorales*), (Rikkinen, Poinar, 2002). В балтийском янтаре возрастом 55-35 млн. лет обнаружены два вида калициоидных лишайников, сходных по морфологии с современными представителями родов *Calicium* и *Chaenotheca*. Видовую принадлежность этих лишайников определить не удалось, вследствие того, что не были идентифицированы фитобионты (Rikkinen, 2003.) Также в балтийском янтаре найдены представители *Lecanorales* (род *Parmelia*) (Poinar et al., 2000) и *Xylariales* (род *Xylaria*) (Poinar, Poinar, 1999).

Предложена новая интерпретация закономерностей захоронения (тафономии) бесскелетных вендских организмов, структура тел которых ранее рассматривалась как студенистая и мягкая, наподобие структур тел червей или медуз. Лишайники с их структурированным хитином представляют собою более жизнеспособную модель, позволяющую в известной мере объяснить хорошую консервацию организмов вендобиоты, так же как и ряд других черт, которые теперь могут быть пересмотрены с этой новой точки зрения. В частности, микроскопические трубчатые структуры и темноокрашенные клетки в поздних докембрийских остатках захоронений вендобиоты из Намибии и Китая (600 млн. лет) были интерпретированы как составные элементы лишайников (Retallack, 1994). Еще ранее постулировалось, что грибы вместе с метазоа, актиномицетами и первичными споровыми растениями могли занимать определенное место в биоте венда (Соколов, Федонкин, 1988). Выдвинута гипотеза, согласно которой, по крайней мере, отдельные фоссилии эдикария Ньюфаундленда, включая представителей *Aspidella*, *Charnia* и *Charniodiscus*, по биологическим свойствам могут быть отнесены к представителям царства грибов (Peterson et al., 2003). Эти организмы были многоклеточными или многоядерными, обитали ниже световой зоны, были лишены подвижности и обнаруживали закономерности роста, характерные для грибных организмов. Тот факт, что организмы вендобиоты обитали в морях, не препятствует интерпретации этих организмов как грибных, поскольку многие современные представители грибного царства также произрастают в морях.

Интригующей для палеомикологии выглядит также современная интерпретация растений рода *Prototaxites*, имевших широкое географическое распространение и часто обнаруживаемых в отложениях девона. Эти растения были крупней-

шими наземными организмами раннего и среднего девона (400-350 млн. лет назад), достигая 2-8 м высоты и более 1 м в диаметре. Виды *Prototaxites* часто относили к бурым водорослям (Мейен, 1987), и обычно рассматривали как одни из первооселенцев суши и в качестве связующего звена между водорослями и высшими сосудистыми растениями. Современная симбиогенная гипотеза о природе представителей рода *Prototaxites* (и, по-видимому, близкородственных ему родов – *Nematothallus*, *Nematatasketum* и др.) заключается в предположении, что организм *Prototaxites* представляет собою огромный многолетний спорофор гомобазидиомицета с сапротрофным способом питания и развитым наземным мицелием (Hueber, 1999, 2001). Спорофоры, по-видимому, обеспечивались питанием от гниющих растений с помощью крупных ризоморф. Еще ранее Чёрч (Church, 1919) отмечал сходство этого растения с грибами. Известна также его попытка вывести из грибного кобионта *Prototaxites* все наземные свободноживущие грибы. Основанием для такого смелого предположения явилось микроскопическое строение таллома *Prototaxites*, которое было первоначально исследовано Шмидом (Schmid, 1976) и позднее более детально Хюбером (Hueber, 1999, 2001). Таллом *Prototaxites* состоит из двух типов перемежающихся филаментов. Первый тип представляют неветвящиеся, лишенные септ трубочки 20–50 мкм диам. и с толщиной клеточных стенок 2–6 мкм. Этот тип трубочек Хюбер интерпретировал как микосклерейды базидиомицетов. Второй тип представлен обильно ветвящимися филаментами 5–10 мкм в диам., анастомозирующими между собой, несущими пряжки и составляющих основной матрикс растения. Эти филаменты имеют септы, несущие мелкие споры с окаймлениями, сходными с долипоровыми септами базидиальных грибов. Между септами второго типа различимы более короткие и тонкие гифы, не анастомозирующие между собой и не имеющие септ и пряжек. В целом консистенция тканей *Prototaxites* соответствует тримитической системе современных афиллофоровых грибов, состоящей, как известно, из скелетных, связывающих и генеративных гиф. Отметим, что еще ранее у близкого к роду *Prototaxites* рода *Protosalvinia* отмечены репродуктивные структуры, весьма напоминающие спорокарпы грибов, а также гифоподобный таллом, сходный с псевдопаренхимой грибов (Arnold, 1954). Основные возражения против гипотезы Хюбера сводятся к следующему. Во-первых, в палеонтологическом материале не выявлены какие-либо половые структуры (бази-

дии, базидиоспоры, стеригмы), которые неоспоримо подтверждали бы базидиальную природу Prototaxites. Второе возражение состоит в том, что, трудно объяснить возникновение и поддержание в ценозе столь значительной биомассы сапротрофов с их крупными спорофорами, возвышающимися над мелкими и слабо развитыми фотосинтезирующими травами и кустарничками при слабо развитом почвенном покрове. Чтобы преодолеть эти несоответствия, было выдвинуто предположение, что данное растение, помимо сапротрофного способа питания, обладало также и фотосинтетическими функциями (Selosse, 2002), т. е. имеет как бы лишайниковую природу. Такое предположение соответствовало бы трофо-ценозному сценарию освоения суши и подчеркивало ключевое значение процесса коэволюции грибов и растений в освоении суши и их дальнейшей совместной эволюционной судьбе.

Эктомикориза, формирование которой обычно вызывается агариковыми базидиальными грибами, получила первоначальное развитие в триасе одновременно с голосеменными. Развитие эктомикоризы получила в середине мела, оказывая влияние в основном на эволюцию растительных сообществ (филоценогенез). Для образования эктомикоризы требуются развитые почвы, которые в девоне еще не были сформированы, поэтому девонские леса были свободны от эктомикоризных грибов. Современные эктомикоризы характерны для мулллей и модеров, однако такие почвы сформировались лишь в карбоне (Wright, 1985). Обоснованным выглядит предположение о сравнительно позднем гетерохронном и политоппном развитии эктомикоризы от сапро- и некротрофии (Lewis, 1973). Анализ филогенетического древа *Basidiomycota* свидетельствует, что различные таксономические группы базидиомицетов в течение своей истории неоднократно приобретали или утрачивали эктомикоризные свойства (Halling, 2001; Wilkinson, 2001). Оцен-

ка времени возникновения эктотрофной микоризы на основе существующих достоверных палеомикологических находок оценивается либо примерно в 130 млн. лет назад (Taylor, 1990), либо в 200 млн. для эктомикоризы и 100 млн. лет назад для эрикоидной микоризы (Cairney, 2000). Вместе с тем утверждение, что позднедевонские леса были лишены эктомикориз, подвергалось сомнению (Stubblefield, Taylor, 1988). В частности, в палеопочвах нижнего карбона отмечена деятельность эктомикориз, выражающаяся в образовании специфических, так называемых иглистых кальцитов. Формирование подобных почвенных структур связано с жизнедеятельностью эктомикоризных грибов вокруг корней растений (Wright, 1986), что согласуется с явлением кальцификации гиф базидиомицетов с образованием иглистых кальцитов и в современных почвах (Callot et al., 1985). Это первое и, по-видимому, единственное косвенное свидетельство присутствия эктомикориз в карбоне. Имеются сообщения о формировании специфических для эктомикоризы узелковых структур на латеральных корешках или резком укорочении таких корешков у хвойных в мелу (Cantrill, Douglas, 1988) или в среднем миоцене на корнях *Metasequoia milleri* (Basinger, 1981). В обоих случаях мицелий развивался в коре корней, но образования сети Гартига отмечено не было. Это заставляет предположить, что скорее в этих случаях имело место внедрение в корни мицелия сапротрофных грибов (Taylor, Osborn, 1996). Более достоверное сообщение о нахождении ископаемой эктомикоризы в корнях сосны относится к эоцену. В этом случае имелись достоверные свидетельства присутствия в корнях развитой сети Гартига. Ископаемый возбудитель микоризы по характеру развития мицелия наиболее близок современным представителям *Rhizopogon* или *Suillus* (LePage et al., 1997).

Эпифиты

Deuteromycota. Достоверные признаки существования дейтеромицетов, большинство из которых описывались в качестве эпифитов, известны в геологических стратах с мезозоя, кайнозоя, и третичного периода. Хотя филоплана существует уже с середины девона, однако материалов, свидетельствующих о наличии эпифильных грибов на листьях ранее мела немного. Это, возможно, объясняется тем, что домеловые

растения обладали прочной кутикулой, которую грибы проникать были не способны (Taylor, Osborn, 1996). Чаще всего обнаруживаются одно- и многоклеточные споры, характерные для этой группы (Чигуряева, 1953, 1956; Бенеш, 1960; Попов, 1962, 1967 и др.). В частности, В. А. Поповым (1959, 1962) в образцах мезо-кайнозойских и третичных осадочных пород на территории юго-восточной части Западно-Сибирской низменности

и Енисейского кряжа выявлены ископаемые грибы более 100 форм (видов), среди которых удалось идентифицировать споры как аскомицетов, так и несовершенных грибов из родов *Diplodia*, *Hendersonia*, *Septonema*, *Cladosporium*, *Coryneum* и других. В глинах третичного периода сарматской флоры Армении обнаружены споры около 20 родов дейтеромицетов (Тетеревникова-Бабаян, Таслахчян, 1977).

В чётрах Принцетона на остатках растений обнаружены и иллюстрированы, кроме представителей сумчатых грибов порядка *Dothideales*, также разнообразные представители *Deuteromycetes*, близкие современным видам родов *Ascochyta*, *Cercospora*, *Alternaria* и других (Lepage et al., 1994). Из отложений верхнего мела (штаты Айдахо и Орегон, США) выявлены многочисленные крупные геликоидные споры, подобные спорам современных водных гифомицетов родов *Helicoon* и *Helicodendron* (Sherwood-Pike, 1988). Из отложений верхнего мела Индии (Маастрихт) описан несовершенный гриб *Diplodites sweetii* (Kalgutkar et al., 1993). Несколько новых родов и видов дейтеромицетов в отложениях с возрастом от маастрихта до олигоцена описано из Канады и Индии (Kalgutkar, Sigler, 1995). Гриб, близкий к р. *Helminthosporium*, обнаружен в угольных отложениях третичного периода Малайзии (Trivedi, Srivastava, 1985). Грибные колонии дейтеромицетов описаны и иллюстрированы

в отложениях янтаря возрастом 15–45 млн. лет в Доминиканской республике. У гриба, по морфологии предположительно относящегося к роду *Geotrichum*, отмечены характерные цилиндрические артроконидии (Rikkinen, Poinar, 2001), хотя тип конидиогенеза с определенностью определить не удалось.

В мелу на двуполых шишках представителя цикадовых *Cycadeoidella japonica* Ogura идентифицированы три вида *Coelomycetes* с отчетливыми признаками формирования конидий, характерными для этой группы дейтеромицетов (Watanabe et al., 1999). Каждый из Зцеломицетов описан как новый род: *Archephoma*, *Palaeodiplodites* и *Meniscoideisporites*. Отмечены также многочисленные другие формы грибов, которые относятся к представителям *Deuteromycetes*. Их более точная идентификация затруднена из-за недостатка достоверных морфологических признаков.

Следует иметь в виду, что некоторые из представителей дейтеромицетов, трактуемые здесь как эпифиты, могут обладать паразитическими свойствами или быть чистыми сапротрофами. Что касается эндофитных грибов, то грибы в органах и тканях растений различных таксономических групп (как правило, их точная идентификация не проводилась) регулярно встречаются во все геологические периоды, начиная с девона.

Заключение

Палеонтологические материалы свидетельствуют о сложившемся к девону развитому морфолону грибов различных трофических групп. Одновременно с наземными растениями совершалась наземная адаптивная радиация грибов, которая происходила ускоренными темпами с середины ордовика (460 млн. лет назад). В этот период существовали основные макротаксоны грибов (аскомицеты, базидиомицеты, зигомицеты, трихомицеты) и грибоподобных организмов (оомицеты, хитридиомицеты) со сложившимися весьма разнообразными отношениями с растениями и животным (симбиоз, мутуализм, паразитизм, комменсализм). Очевидно, что непосредственное время возникновения грибов и их предковых форм следует отнести к более ранним временам. Именно в девонских экосистемах уже были заложены важнейшие формы и механизмы отношений между организмами автотрофного и гетеротрофного блоков, определившие в даль-

нейшем многообразии наземных экосистем. Не вызывает сомнений, что грибные организмы играли важную роль в освоении грибами наземных пространств и оказывали влияние на эволюционную судьбу высших растений.

Если принять как справедливое суждение о том, что главные линии грибов дивергировали примерно 1 млрд. лет назад (Knoll, 1992), то неудивительно, что различные трофические группы грибов в палеозое уже были весьма разнообразными. Древнейшая датировка эволюции эукариотов, по данным геносистематики, оценивает отделение грибов от линий животных и растений в 1.6 млрд. лет (Heckman et al., 2001). Существуют и более ранние датировки происхождения грибов (возможно правильное говорить об их предковых формах) в 2.4 млрд. лет (Schopf, 1993; Розанов, 2003). Точное время колонизация суши эукариотами до сих пор остается предметом дискуссий. Первые фоссилии на-

земных растений и грибов известны из отложенных возрастом 480–460 млн. лет. В то же время при анализе секвенсов из Банка генов с использованием концепции «молекулярных часов» получены свидетельства о значительно более раннем заселении суши эукариотами в докембрии, примерно 700 млн. лет назад (Neckman, 2001). Однако последующие оценки времени возникновения наземной растительности с использованием пластидных генов совпадают с палеоботаническими данными (425–490 млн лет) (Sanderson, 2003).

Происхождение и расхождение анцестральных групп для *Glomeromycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota* могло осуществиться в докембрии, так что эти главные линии грибов, скорее всего, заселяли землю независимо друг от друга, что не исключает возможности появления крупных макротаксонов грибов или грибоподобных организмов в более поздние сроки. В частности, по палеомикологическим данным, миксомицеты известны только с эоцена (50–35 млн. лет), так что возникновения этой группы организмов не имело место в палеозое. Самая ранняя находка миксомицета, определенного как *Arcyria sulcata* Dörfelt et Schmidt (Мухогастеромыцетиде) в балтийском янтаре (Германия), подтверждает эту точку зрения (Dörfelt et al., 2003).

В последнее время в палеомикологии отчетливо наблюдается тенденция на основе новых фактов относить время возникновения конкретных таксономических групп ко все более ранним срокам. Сходные тенденции отмечаются также в палеоботанике, палеозоологии и палеомикробиологии (Федонкин, 2003; Розанов, 2003 и др.). Можно предположить, что в последующем подобная тенденция сохранится.

Геологическая шкала происхождения грибов, разработанная М. Берби и Дж. Тейлором (Berbee, Taylor, 1993) констатирует значительно (на 100–120 млн лет) заниженные сроки происхождения макротаксонов грибов. Кроме аскомицетов, оценка времени возникновения оказалась заниженной и в отношении других групп грибов (базидиомицетов, и несовершенных грибов). Очевидно, что временная шкала этих авторов требует корректировки с учетом новейших достоверных палеомикологических находок и использования их в качестве дополнительных точек отсчета.

Следует заметить, что при сопоставлении данных по происхождению высших растений, получаемых на основе молекулярных и палеоботанических данных, картина прямо противоположна тому, что констатировано выше в отношении грибных макротаксонов. А именно, в первом случае молекулярные данные обычно свидетельствуют о более древнем происхождении таксонов высших растений, чем об этом указывают известные палеоботанические данные. Например, по данным геносистематики, происхождение покрытосеменных произошло примерно 360 млн. лет назад (Goremykin et al., 1996; Антонов, 2000), тогда как наиболее ранняя из сравнительно достоверных находок покрытосеменного растения рода *Archaeofructus* известна из отложений верхней юры Китая (Sun et al., 1998), т. е. 130 млн. лет назад.

Несмотря на многие несовершенства в существующей палеомикологической летописи, исследования микофоссилий продолжают оставаться единственным надежным методом, способным подтвердить или скорректировать эволюционные и крупные экологические заключения, основанные как на сравнительно морфологическом анализе современных форм, так и на данных геносистематики. Ключи к решению вопросов о происхождении крупных таксонов грибов продолжают находиться в руках палеоботаников и палеомикологов. Существующие противоречия между палеоботаническими и молекулярными данными начнут разрешаться только через несколько лет, когда как гербарные (и культуральные), так и ископаемые образцы грибов станут объектами молекулярной биологии. Данные палеоботаники и палеомикологии все более проясняют значение грибов в переломные моменты эволюции органического мира: в происхождении наземных растений, освоении ими суши, стабилизации и дифференциации растительных сообществ, в динамике атмосферного состава, а также в формировании палеопочв. Сравнительно недавно было обращено внимание также на планетарное значение грибов в биосферных процессах (Perkins, Halsey, 1971; Sterflinger, 2000; Burford et al., 2003). Все больше работ, в которых грибы оцениваются как существенная геологическая сила, подчеркивается их значение в процессах седиментации, выветривании пород, разрушении минералов.

Список литературы

- Антонов А. С. Растения и животные — «живые ископаемые» // Природа. 2000. Т. 10. С. 73-78.
- Бенеш К. Палеомикология — новое направление микроскопических исследований углей // Изв. АН РАН, сер. геолог. 1960. Т. 11.
- Заварзин Г. А. Прошлое отбирает будущее // Вестн. РАН. 2004. т. 74, вып. 9. С. 813-822.
- Каратыгин И. В. Коэволюция грибов и растений. Санкт-Петербург, (Труды БИН РАН, вып. 9): Гидрометеиздат. 1993. 118 с.
- Каратыгин И. В. Грибные организмы и их роль в эволюции экосистем // Ботанический журнал. 1994. Т. 79. № 2. С. 13 — 20.
- Каратыгин И. В., Снизиревская Н. С. Палеонтологические свидетельства о происхождении основных таксономических групп грибов // Микол. и фитопатол. 2004 Т.38, вып. 5. С. 15-31.
- Каратыгин И. В., Снизиревская Н. С., Демченко К. Н. Виды рода *Glomites* как микобионты растений экосистем раннего девона // Палеонтол. журн. 2006 Т.5, С.1–9.
- Кизильштейн Л. Я., Штицглиз А. Л. Анатомический атлас растений–углеобразователей палеозоя. Ростов-на-Дону, Изд. СКНЦ ВШ. 1999. С. 1–57.
- Красилов В. А. Раннемеловая флора Южного Приморья и ее значение для стратиграфии. М.: Наука. 1967. 265 с. + 93 табл.
- Красилов В. А., Макулбеков Н. М. Первая находка грибов гастеромицетов (*Gasteromycetes*) в меловых отложениях Монголии // Палеонтол. журн. 2003. Т. 37. № 4. С. 103-106.
- Криштофович А. Н. Палеоботаника. Л.: АН СССР, 1957. 650 с.
- Мейен С. В. Основы палеоботаники. М.: Недра, 1987. 404 с.
- Попов П. А. Ископаемые грибы в третичных отложениях Енисейского края // ДАН СССР. 1959. Т. 128. № 4. С. 827-829.
- Попов П. А. Ископаемые грибы Западно-Сибирской низменности и Енисейского края // Ботан. журн. 1962. Т. 47. № 11. С. 1596-1610.
- Попов П. А. Микроскопические грибы как объект палеонтологических исследований // Микол. и фитопатол. 1967. Т. 1, вып. 2. С. 158-164.
- Розанов А. Ю. Ископаемые бактерии, седиментогенез и ранние эволюции биосферы // Палеонтол. журн. 2003. Т. 37. N. 6. С. 41-49.
- Снизиревский С. М. Загадочный представитель первых наземных лесных биоценозов // Всесоюзн. симпозиум «Загадочные организмы в эволюции и филогении». Москва, 1996. Тез. докл. С. 83-84.
- Соколов Б. С., Федонкин М. А. Ранние этапы развития жизни на Земле // Современная палеонтология. Методы, направления, практическое приложение. М. 1988. С. 118-141.
- Тетеревникова-Бабаян Д. Н., Таслахчян М. Г. Новые данные об ископаемых грибных спорах в Армении // Микол. и фитопатол. 1970. Т.4, вып. 2. С. 159-164.
- Тетеревникова-Бабаян Д. Н., Таслахчян М. Г. О новых видах ископаемых грибов из Армянской ССР // Новости сист. низших раст. 1977. Т. 14. С. 119-122.
- Федонкин М. А. Сужение геохимического базиса жизни и эвкарриотизация биосферы: причинная связь // Палеонтол. журн. 2003. Т. 37. N. 6. С. 33-40.
- Чигуряева А. А. Материалы по микроскопическим остаткам ископаемых грибов из третичных отложений СССР // Бот. матер. отд. спор. раст. БИНа АН СССР. 1953. Т. 9.
- Чигуряева А. А. Атлас микроспор из третичных отложений СССР. Харьков. 1956.
- Шварцман С. Р. Материалы к истории микофлоры Казахстана. Алма-Ата, 1968. 184 с.
- Юрина А. Л., Красилов В. А. Лишайниковоподобные остатки из живета Центрального Казахстана // Палеонтол. журн. 2002. Vol. 36. № 5. P. 100-108.
- Ячевский А. А. Основы микологии. М., Л: Гос. изд-во колхозной и совхозной лит. 1933. 1036 с.
- Alvin K. L., Muir M. D. An epiphyllous fungus from the Lower Cretaceous // Biol. Journ. Linn. Soc. 1970. Vol. 2. P. 55-59.
- Arnold C. A. Fossil sporocarps of the genus *Protosalvinia* Dawson, with special reference to *P. furcata* (Dawson) comb. nov. // Svensk Bot. Tidskr. 1954. Vol. 48. № 2. P. 292-300.
- Banks H. P. Peridermal activity (wound repair) in the Early Devonian (Emsian) trimerophyte from the Gaspé Peninsula, Canada // Palaeobotanist. 1981. Vol. 28-29. P. 20-25.
- Banks H. P., Colthart B. J. Plant-animal-fungal interaction in the Early Devonian trimerophytes from Gaspé Canada // Amer. Journ. Bot. 1993. Vol. 80. № 9. P. 992-1001.
- Basinger J. F. The vegetative body of *Metasequoia milleri* from Middle Eocene of southern British Columbia // Can. Journ. Bot. 1981. Vol. 59. P. 2379-2410.
- Berbee M. L., Taylor J. W. Dating the evolutionary radiations of the true fungi // Can. Journ. Bot. 1993. Vol. 71. № 6. P. 1114-1127.
- Berbee M. L., Taylor J. W. From 18S ribosomal sequence date to evolution of morphology among the fungi // Can. Journ. Bot. 1995. Vol. 73, suppl.1. P. S677-S683.
- Berbee M. L., Taylor J. W. Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time // Systematics and Evolution. Part B. *Mycota*. A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Ap-

plied Res. (eds. Esser K., P. A. Lemke). Berlin: Springer, 2001. Vol. 7B. P. 229-245.

Boullard B., Lemoigne Y. Les champignons endophytes du *Rhynia gwynne-vaughanii*: étude morphologique et de deductions sur leur biologie // *Le Botaniste*. 1971. Vol. 5., fasc. 1-6. P. 49-89.

Burford E. P., Kierans M., Gadd G. M. Geomycology: fungi in mineral substrats // *Mycologist*. 2003. Vol. 17, pt. 3. P. 98-107.

Cairney J. W. G. Evolution of mycorrhiza systems [Review] // *Naturwissenschaften*. 2000. Bd. 87. H. 11. S. 467-475.

Callot G., Guyon A., Mousain D. Interrelations entre aiquilles de calcite et hyphes mycelines // *Agronomie*. 1985. Vol. 5. № 3. P. 209-216.

Cantrill D. J., Douglas J. G. Mycorrhizal conifer roots from the Lower Cretaceous of the Otway Basin Victoria // *Austral. Journ. Bot.* 1988. Vol. 36. № 3. P. 252-272.

Church A. H. Thallasiophyta and the subaerial transmigrant // *Botan. memor. (Oxford)*. 1919. Vol. 3. P. 1-95.

Church A. H. The lichen as transmigrant // *Journal of Botany*. 1921. Vol. 559. P. 7-13, 40-46.

Currah R. S., Stockey R. A. A fossil smut fungus from the anthers of an Eocene angiosperms // *Nature*. 1991. Vol. 350. № 6320. P. 698-699.

Brown R. W. A fossil shelf-fungus from North Dakota // *Journ. of the Washington Acad. of Sci.* 1936. Vol. 26. P. 460-462.

Brown R. W. A fossil misidentified as shelf-fungi // *Journ. of the Washington Acad. of Sci.* 1938. Vol. 28. P. 130-131.

Dennis R. L. A middle Pennsylvanian basidiomycete mycelium with clamp connections // *Mycologia*. 1970. Vol. 62. № 3. P. 578-584.

Dennis R. L. Palaeosclerotium, a Pennsylvanian age fungus combining features of modern ascomycetes and basidiomycetes // *Science*. 1976. Vol. 192. № 424. P. 66-68.

Dilcher D. L. Epiphyllous fungi from Eocene deposits in western Tennessee, USA // *Palaeontographica*. 1965. Abt. B. Vol. 116. P. 1-54.

Dorfelt H., Schmidt A. R., Ullmann P., Wunderlich J. The oldest myxogastroid slime mould // *Mycol. Res*. 2003. Vol. 107. № 1. P. 123-126.

Dorfelt H., Schmidt A. R. A fossil *Aspergillus* from Baltic amber // *Mycological Research*. 2005. Vol. 109. pt. 8. P. 956-960.

Engel M. S., Grimaldi D. A New light shed in the oldest insect // *Nature*. 2004. Vol. 427. P. 627-630.

Eriksson O. E. Ascomyceterna ursprung och evolution — Protolichenes-hypotesen // *Svensk Mykologisk Tidskrift*. 2005. Vol. 26. P. 22-29.

Garty J., Giele C., Krumbein W. E. On occurrence of pyrite in a lichen-like inclusion in Eocene amber

(Baltic) // *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*. 1982. Vol. 39. P. 139-147.

Goeppert H. R., Berendt G. C. Der Bernstein und die in ihm befindlichen Pflanzenreste de Vorwelt // *Organische Reste der Vorwelt*. Berlin: Verlag Nicolai, 1845. Bd 1, H. 1. S. 6-126.

Goremykin V., Bobrova V., Pahnke J., Troitsky A., Antonov A., Martin W. Noncoding sequences from slowly evolving chloroplast inverted repeat in addition to rbcL data do not support gnatalean affinities of angiosperms // *Molecular Biol. Evol.* 1996. Vol. 13. P. 383-396.

Gray J. The microfossil record of early land plants: Advances in understanding of early terrestrialization, 1970-1984 // *Philos. Trans. R. Soc. London*. 1985. Vol. B, 309. P. 167-195.

Hallbauer D. K., Jahns H. M., Beltmann H. A. Morphological and anatomical observations on some Precambrian plants from the Witwatersrand, South Africa // *Geol. Rundsch*. 1977. Vol. 66. P. 477-491.

Halling R. E. Ectomycorrhizae: Co-evolution, significance, and biogeography // *Ann. Missouri Bot. Gard*. 2001. Vol. 88. № 1. P. 5-13.

Hass H., Taylor T. N., Remy W. Fungi from the Lower Devonian Rhynie Chert: mycoparasitism // *Amer. Journ. Bot.* 1994. Vol. 81. № 1. P. 29-37.

Hawksworth D. L. The origin of Ascomycetes: the Proteolichenes Hypothesis // *Mycol. Res*. 2005. Vol. 109. № 9. P. 963-963.

Heckman D. S., Geiser D. M., Eidell B. R., Stauffer R. L., Kardos N. L., Hedges S. B. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants // *Science*. 2001. Vol. 293. № 5532. P. 1129-1133.

Hibbett D. S., Grimaldi D., Donoghue M. J. Cretaceous mushrooms in amber // *Nature*. 1995. Vol. 377. № 6549. P. 487.

Hibbett D. S., Donoghue M. J., Tomlinson P. B. Is *Phellinites diguistoi* the oldest Homobasidiomycete? // *Amer. Journ. Bot.* 1997a. Vol. 84. № 7. P. 1005-1011.

Hibbett D. S., Grimaldi D., Donoghue M. J. Fossil mushrooms from Miocene and Cretaceous ambers and the evolution of Homobasidiomycetes // *Amer. Journ. Bot.* 1997b. Vol. 84. № 7. P. 981-991.

Hibbett D. S., Pine E. M., Langer E., Langer G., Donoghue M. J. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences // *Proc. Nati. Acad. Sci. U. S. A.* 1997c. Vol. 94(22). P. 12002-12006.

Hueber F. M. Rotted wood-alga-fungus: history and life of *Prototaxites* // *Abstr. XVI Intern. Bot. Congr.* 1999. N. 2844.

Hueber F. M. Rotted wood-alga-fungus: the history and life of *Prototaxites* Dawson 1859 // *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2001. Vol. 116. P. 123-158.

Illman W. I. Zoosporic fungal bodies in the spores of the Devonian fossil plant *Horneophyton* // *Mycologia*. 1984. Vol. 76. P. 545-547.

- Kalgutkar R. M., Nambudiri E. M., V., Tidwell W. D.* *Diplodites sweetii* sp. nov. from the Late Cretaceous (Maastrichtian) Deccan Intertrappean Beds of India // *Rev. Palaeobot. Palynol.* 1993. Vol. 77. P. 107-118.
- Kalgutkar R. M., Sigler L.* Some fossil fungal form-taxa from Maastrichtian and Palaeogene age // *Mycol. Res.* 1995. Vol. 99. № 5. P. 513-522.
- Kar R. K., Sharma N., Agarwal A., Kar R.* Occurrence of fossil-wood rotters (Polyporales) from the Lameta Formation (Maastrichtian), India // *Curr. Sci.* 2003. Vol. 85. № 1. P. 37-40.
- Kevan P. G., Chaloner W. G., Savile D. B. O.* Interrelationships of early terrestrial arthropods and plants // *Palaeontology.* 1975. Vol. 18. P. 391-407.
- Kidston R., Lang W. H.* On old red Sandstone plants showing structure from the Rhynie chert bed (Aberdeenshire). Part 5 // *Trans. Roy. Soc. Edinburgh.* 1921. Vol. 52 (33). P. 855-902.
- Klappa C. F.* Lichen stromatolites: criterion for subaerial exposure and a mechanism for the formation of laminar calcretes (caliche) // *Sediment. Petrol.* 1979. Vol. 49. P. 387-400.
- Knoll A. H.* The early evolution of eukaryotes: a geological perspective // *Science.* 1992. Vol. 256. № 5057. P. 622-627.
- Korf R. P.* A purported fossil discomycete: *Ascodesmites* // *Mycotaxon.* 1977. Vol. 6. № 1. P. 193-194.
- Krassilov V. A.* *Orestovia* and the origin of vascular plants // *Lethaia.* 1981. Vol. 14. № 3. P. 235-250.
- Lemoigne Y., Zdebska D.* Structures problematiques observées dans des axes provenant du chert devonien de Rhynie // *Acta Palaeobot.* 1980. Vol. 21. № 1. P. 3-8.
- Lepage B. A., Currah R. S., Stockey R. A.* The fossil fungi of the Princeton chert // *Inern. Journ. Plant Sci.* 1994. Vol. 155. № 6. P. 828-836.
- Lepage B. A., Currah R. S., Stockey R. A., Rothwell G. W.* Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene // *Amer. Journ. Bot.* 1997. Vol. 84. № 3. P. 410-412.
- Lewis D. H.* Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy // *Biol. Rev.* 1973. Vol. 48. № 2. P. 261-278.
- Magallón-Puebla S., Cevallos-Ferris S. R. S.* A fossil eartstar (*Geastraceae, Gasteromycetes*) from the Late Cenozoic of Puebla, Mexico // *Amer. Journ. Bot.* 1993. Vol. 80. № 10. P. 1162-1167.
- Mägdefrau K.* Flechten und Moose im baltischen Bernstein // *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.* 1957. Bd. 70. N. S. 433-435.
- Malloch D. W., Pirozynski K. A., Raven P. H.* Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1980. Vol. 77. № 4. P. 2113-2118.
- Meschinelli A.* Fungi fossiles. Sylloge fungorum husuque cognitorum // In: Saccardo: Sylloge fungorum omnium. Padua: 1892. Vol. 10. P. 741-808.
- Meschinelli A.* Fungorum fossilium omnium iconographica. Vicenza, 1898. XX + 144 S
- Mclaughlin D. J.* On Palaeoesclerotium as a link between Ascomycetes and Basidiomycetes // *Science.* 1976. Vol. 193. P. 602.
- Millay M. A., Taylor T. N.* Chytrid-Like Fossils of Pennsylvanian Age // *Science.* 1978. Vol. 200. P. 1147-1149.
- Osborn J. M., Taylor T. N., White J. F.* *Palaeofibulus* gen. nov., a clamp-bearing fungus from the Triassic of Antarctica // *Mycologia.* 1989. Vol. 81, N.4 P. 622-626.
- Perkins R. D., Halsey S. D.* Geological significance of microboring fungi and algae in Carolina shelf sediments // *Journ. Sedimentol.* 1971. Vol. 41. N. P. 843-853.
- Peterson K. J., Waggoner B., Hagadorn J. W.* A fungal analog for Newfoundland Ediacaran fossils? // *Integrat. Compar. Biol.* 2003. Vol. 43. № 1. P. 127-136.
- Phipps C. J., Taylor T. N.* Mixed arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica // *Mycologia.* 1996. Vol.88. № 5. P. 707-714.
- Pia J.* *Fungi* // In: Hirmer M.(ed.) *Handbuch der Paläobotanik.* München. 1927. Bd. 1. S. 112-130.
- Pirozynski K. A.* Fossil fungi // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1976. Vol. 14. P. 237-246.
- Pirozynski K. A., Dalpè Y.* Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis // *Symbiosis.* 1989. Vol. 7. P. 1-36.
- Pirozynski K. A., Malloch D. W.* The origin of land plants: a matter of mycotrophism // *BioSystems.* 1975. Vol. 6. N. 3. P. 153-164.
- Pirozynski K. A., Weresub K. A.* A biogeographic view of the history of *Ascomycetes* and the development of their pleomorphism // *The Whole Fungus.* Ottawa: 1979. P. 93-129.
- Poinar G. O., Brown A. E.* A non-gilled hymenomycete in Cretaceous amber // *Mycol. Res.* 2003. Vol. 107. № 6. P. 763-768.
- Poinar G. O., Peterson E. B., Platt J. L.* Fossil *Parmelia* in New World amber // *Lichenologist.* 2000. Vol. 32. P. 263-269.
- Poinar G. O., Poinar R.* The amber forest: a reconstruction of vanished world. 1999. Princeton, New Jersey,
- Poinar G. O., Singer R.* Upper Eocene gilled mushroom from the Dominican Republic // *Science.* 1990. Vol. 248. № 4959. P. 1099-1101.
- Poinar G. O., Thomas G. M.* An entomophthoralean fungus from Dominican amber // *Mycologia.* 1982. Vol. 74. P. 332-334.
- Poinar G. O., Thomas G. M.* A fossil entomogenous fungus from Dominican amber // *Experientia.* 1984. Vol. 40. N. P. 578-579.

- Pratt L. M., Phillips T. L., Dennison J. M. Evidence of non-vascular land plants from the early Silurian (Llandoveryan) of Virginia // *Rev. Palaeobot. Palynol.* 1978. Vol. 25. P. 121-149.
- Redecker D. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi // *Plant and Soil.* 2002. Vol. 244, № 1-2. P. 67-73.
- Redecker D., Kodner R., Graham L. E. Palaeogmus grayi from the Ordovician // *Mycotaxon.* 2002. Vol. 84, oct. — dec. P. 33-37.
- Ramanujam C. G. K., Ramachar P. Recognizable spores of rust fungi (Uredinales) from Neyveli lignite, Tamil Nadu // *Records of the Geological Survey of India.* 1980. Vol. 113. № 5. P. 80-85.
- Remy W., Taylor T. N., Hass H., Kerp H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. № 25. P. 11841-11843.
- Retallack G. J. Were the Ediacaran fossil lichen? // *Paleobiology.* 1994. Vol. 20, № 4. P. 523-544.
- Rikkinen J. Calicioid lichens from European Tertiary amber // *Mycologia.* 2003. Vol. 95. № 6. P. 1032-1036.
- Rikkinen J., Poinar G. O. A new species of resinicolous Chaenothecopsis) from 20 million year old Bitterfeld amber, with remarks on the biology of resinicolous fungi // *Mycol. Res.* 2000. Vol. 104, part 1. P. 7-15.
- Rikkinen J., Poinar G. O. Fossilised fungal mycelium from Tertiary Dominican amber // *Mycol. Res.* 2001. Vol. 105. № 7. P. 890-896.
- Rikkinen J., Poinar G. O. Fossilised Anzia (Lecanorales, lichen-forming Ascomycota) from European Tertiary amber // *Mycol. Res.* 2002. Vol. 106, part 8. P. 984-990.
- Robinson J. M. Lignin, land plants, and fungi: biological evolution affecting Phanerozoic oxygen balance // *Geology.* 1990. Vol. 15. P. 607-610.
- Rossi W., Kotrba M., Triebel D. A new species of *Sterigmatomyces* from Baltic amber, the first fossil record of *Laboulbeinomyces* // *Mycol. Res.* 2005. Vol. 109. № 3. P. 271-274.
- Rothwell G. W. *Palaeosclerotium pussilum* gen. et sp. nov., a fossil eumycete from the Pennsylvanian of Illinois // *Can. Journ. Bot.* 1972. Vol. 50. № 11. P. 2353-2356.
- Sanderson M. J. Molecular data from 27 proteins do not support a Precambrian origin of land plants // *Amer. Journ. Bot.* 2003. Vol. 90. № 6. P. 954-956.
- Savile D. B. O. A phylogeny of the Basidiomycetes // *Can. Journ. Bot.* 1955. Vol. 33. № 1. P. 60-104.
- Schaarschmidt F. Die Keuperflora von Neuwelt bei Basel. V. Ein Ascomycete in Pterophyllum // *Schweiz. Palaontol.* 1966. Bd 84. S. 65-79.
- Schmid R. Septal pores in Prototaxites, an enigmatic Devonian plant // *Science.* 1976. Vol. 191. № 4224 P. 287-288.
- Schopf J. W. Microfossils of the early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life // *Science.* 1993. Vol. 260. № 5180. P. 640-646.
- Scott A. C., Taylor T. N. Plant/Animal interactions during the Upper Carboniferous // *Bot. Rev.* 1983. Vol. 49. P. 259-307.
- Selosse M. — A. Prototaxites: a 400 myr old giant fossil, a saprophytic holobasidiomycete, or a lichen? // *Mycol. Res.* 2002. Vol. 106, pt 6. P. 642-644.
- Selosse M. — A., Le Tacon F. The land flora: a phototroph-fungus partnership? // *Trends in Ecol. Evol.* 1998. Vol. 13. № 1. P. 15-20.
- Sharma B. D., Bohra D. R., Harsh R. Vesicular arbuscular mycorrhizae association in lower Devonian plants of the Rhynie chert // *Phytomorphology.* 1993. Vol. 43. № 2. P. 105-110.
- Sherwood-Pike M. A., Gray J. Silurian fungal remains: probable records of the class *Ascomycetes* // *Lethaia.* 1985 a. Vol. 18. № 1. P. 1-20.
- Sherwood-Pike M. A. Pelicothallos Dilcher, an overlooked fossil lichen // *Lichenologist.* 1985 b. Vol. 17, pt. 1. P. 114-115.
- Sherwood-Pike M. A. Freshwater fungi: fossil record and paleoecological potential // *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 1988. Vol. 62. P. 271-285.
- Smith S. Y., Currah R. S., Stockey R. A. Cretaceous and Eocene period hymenophores from Vancouver Island, British Columbia // *Mycologia.* 2004. Vol. 96. № 1. P. 180-186.
- Simon L. Phylogeny of the *Glomales* — deciphering the past to understand the present // *New Phytologist.* 1996. Vol. 133. № 1. P. 95-101.
- Singer R. An interpretation on *Palaeosclerotium* // *Mycologia.* 1977. Vol. 67. N. 4. P. 850-854.
- Singer R., Archangelsky S. A petrified basidiomycete from Patagonia // *Amer. Journ. Bot.* 1958. Vol. 45. № 3. P. 194-198.
- Stein W. E., Harmon G. D., Hueber F. M. Spongiophyton from the Lower Devonian of North America reinterpreted as a lichen // *Amer. Journ. Bot.* 1993. Vol. 80. P. 93.
- Sterflinger K. Fungi as geologic agents [Review] // *Geomicrobiol. Journ.* 2000. Vol. 17. № 2. P. 97-124.
- Stidd B. M., Cosentino K. Albugo-like oogonia from the American Carboniferous // *Science.* 1975. Vol. 190. № 4219. P. 1092-1093.
- Stubblefield S. P., Taylor T. N. Wood decay in silicified gymnosperms from Antarctica // *Bot. Gaz.* 1986. Vol. 147. P. 116-125.
- Stubblefield S. P., Taylor D. L. Recent advances in palaeomycology // *New Phytologist.* 1988. Vol. 108. P. 3-25.
- Stubblefield S. P., Taylor T. N., Beck C. B. Studies of Paleozoic fungi. V. Wood-decaying fungi in *Calixylon newberryi* from the Upper Devonian // *Amer. Journ. Bot.* 1985. Vol. 72. № 11. P. 1765-1774.

- Stubblefield S. P., Taylor T. N., Trappe J. M.* Vesicular-arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica // Amer. Journ. Bot. 1987. Vol. 74. № 12. P. 1904-1911.
- Sun G., Dilcher D. L., Zheng S., Zhou Z.* In Search of the first flower: a Jurassic angiosperm, *Archaeofructus* from Northeast China // Science. 1998. Vol. 282. № 5394. P. 1653-1654.
- Taylor T. N.* The origin of land plants: some answers, more questions // Taxon. 1988. Vol. 37. N. 4. P. 805-833.
- Taylor T. N.* Fungal associations in the terrestrial palaeoecosystems // TREE. 1990. Vol. 5. N. 1. P. 21-25.
- Taylor T. N.* Fungi // The Fossil Record. L.: Chapman and Hall. Vol. 2. 1993. P. 9-13.
- Taylor T. N., Hass H., Remy W., Kerp H.* The oldest fossil lichen // Nature. 1995. Vol. 378. № 6554. P. 244.
- Taylor T. N., Hass H., Kerp H.* A cyanolichen from the Lower Devonian Rhynie Chert. // Amer. Journ. Bot. 1997. Vol. 84. № 7. P. 992-1004.
- Taylor T. N., Hass H., Kerp H.* The oldest fossil ascomycetes // Nature. 1999. Vol. 399. № 6737. P. 648.
- Taylor T. N., Hass H., Krings M., Klavins S. D., Kerp H.* Fungi in the Rhynie chert: a view from the dark side // Trans. R. Soc. Edinburgh, Earth Sci. 2004. Vol. 94. P. 455-471.
- Taylor T. N., Hass H., Kerp H., Krings M., Hanlin R. T.* Perithecial ascomycetes from the 400 MaBP Rhynie Chert: an example of ancestral polymorphism // Mycologia. 2005. Vol. 97, 1 P. 269-285.
- Taylor T. N., Kerp H., Hass H.* Life history biology of early land plants: Deciphering the gametophyte phase // Proc. Nat. Acad. Sci. U S A. 2005. Vol. 102. № 16. P. 5892-5897.
- Taylor T.N., Krings M., Klavins S.D., Taylor E.L.* Protoascon missouriensis, a complex fossil microfungus revisited // Mycologia. 2005. Vol. 97. N 3. P. 725-729.
- Taylor T. N., Osborn J. M.* The importance of fungi in shaping the paleoecosystems // Rev. Palaeobot. and Palynol. 1996. Vol. 90. № 3-4. P. 249-262.
- Taylor T. N., Remy W., Hass H., Kerp H.* Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian // Mycologia. 1995. Vol. 87. № 4. P. 560-573.
- Thomas G. M., Poinar G. O.* A fossil *Aspergillus* from Eocene Dominican Amber // Journ. of Paleontology. 1988. Vol. 62. P. 141-143.
- Tiffney B. H., Barghoorn E. S.* The fossil record of the fungi // Occas. Pap. Farlow Herb. Cryptogam. Bot. Harv. Univ. 1974. Vol. 7. P. 1-42.
- Trant C. A. and Gensel P. G.* Branching in *Psilophyton*: a new species from the Lower Devonian of New Brunswick, Canada // Amer. Journ. Bot. 1985. Vol. 72. № 8. P. 1256-1273.
- Trivedi B. S., Verma C. L.* Fungal remains from Tertiary coal bed of Malaya // Journ. Palynol. 1970. Vol. 5. P. 68-73.
- Trivedi B. S., Srivastava R. K.* Fungal remains from the Tertiary coal of Malaya // Journ. Indian Bot. Soc. 1985. Vol. 64. № 2-3. P. 281-282.
- Truswell E. M.* The fossil record of the fungi in Australia and the Australasian region // Fungi of Australia. Canberra: Australian Biol. Resources Study. 1996. Vol. 1a. P. 321-340.
- Walsh M. M., Lowe D. R.* Filamentous microfossils from the 3500-Myr-old Onverwacht Group, Barbeton Mountain Land, South Africa // Nature. 1985. Vol. 314. P. 530-532.
- Watanabe K., Nishida H., Kobayashi T.* Cretaceous deuteromycetes on a Cycadeoidalean bisexual cone // Internat. Journ. Plant Sci. 1999. Vol. 160. N. 2. P. 435-443.
- Wieland G. R.* A silicified shelf fungus from the Lower Cretaceous of Montana // Amer. Mus. Novitates. 1934. Vol. 725. P. 1-13.
- Wilkinson D. M.* Mycorrhizal evolution // Trends Ecol. Evol. 2001. Vol. 16. № 2. P. 64-65.
- Wolf F. A.* A rust and an alga in Eocene sediment from western Kentucky // Journ. Elisha Mitchell Soc. 1969. Vol. 85. P. 57-58.
- Wright V. P.* The precursor environment for vascular plant colonization // Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B. 1985. Vol. 309. P. 143-145.
- Wright V. P.* The role of fungal biomineralization in the formation of Early Carboniferous soil fabrics // Sedimentology. 1986. Vol. 33. P. 831-838.

Клеточная биология грибов

Т.А. Белозерская, Н.Н. Гесслер

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА У ГРИБОВ

Введение

Развитие грибных организмов происходит в непосредственном контакте с внешней средой, поэтому они являются постоянными объектами стрессоров физической и химической природы. Такие внешние факторы как субстратное голодание, условия освещения и температуры, ионизирующее излучение, вариации газового состава среды, механические повреждения мицелия ингибируют рост и запускают процессы дифференцировки у грибов. Дифференцировка – это образование новых типов клеток и тканей в процессе развития. Она лежит в основе морфогенеза. Таким образом, факторы внешней среды регулируют рост и развитие грибов, т.е. все физиологические активности грибного организма.

Неизбежно возникающие в клетке под действием внутренних и внешних факторов активные формы кислорода (АФК) вызывают окислительный стресс у грибов. АФК представлены кислородом в его возбужденном синглетном состоянии $^1\text{O}_2$, а также супероксидным радикалом ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гидроксильным радикалом (OH^{\cdot}), пероксидным радикалом ($\text{HO}^{\cdot 2}$), пероксидным ионом (HO_2^-), перекисью водорода (H_2O_2), окисью азота (NO^{\cdot}).

$\text{O}_2^{\cdot-}$, образующийся при одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода не является сильным окислителем. Время жизни

$\text{O}_2^{\cdot-}$ – 10^{-6} сек, при этом он не способен проникать через мембраны и не может окислять липиды. Основное повреждающее действие $\text{O}_2^{\cdot-}$ обусловлено его взаимодействием с ионами металлов переменной валентности, например, ионами железа и меди. Реакция $\text{O}_2^{\cdot-}$ с железом в составе [Fe-S] кластеров приводит к инактивации ферментов, содержащих данные кластеры в активном центре. Высвобождение в ходе этой реакции ионов свободного железа усиливает повреждающее действие $\text{O}_2^{\cdot-}$ за счет образования других АФК, главным образом OH^{\cdot} (рис. 1). Образование H_2O_2 происходит также спонтанно или в результате ферментативной реакции при дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Зенков и др., 2001).

H_2O_2 , образующаяся при трансформации $\text{O}_2^{\cdot-}$, является более сильным окислителем. Молекула H_2O_2 способна легко проникать через мембраны, поэтому она свободно диффундирует в клетку и из нее и, взаимодействуя с органическими соединениями, образует органические перекиси. В малых дозах (1–100 нмоль/л) H_2O_2 всегда присутствует в клетках, что обеспечивается действием каталазы, тиоредоксина, глутатионпероксидазы. H_2O_2 выступает в качестве сигнальной молекулы во внутриклеточной регуляции метаболических процессов и в передаче сигналов межклеточных взаимодействий (Гамалей, Клубин, 1999). H_2O_2 вступает в реакцию с рядом биомолекул, та-

ких как гистидин, аланин, глицин, аспарагиновая кислота, а также с основаниями ДНК (Зенков и др., 2001). Образующиеся органические перекиси исполняют роль переносчиков H_2O_2 и облегчают ее проникновение через мембраны. Этим значительно увеличивается время жизни H_2O_2 и усиливается ее повреждающее действие.

OH^\bullet является сильным окислителем. Он образуется при реакции H_2O_2 с переходными металлами, например Fe^{2+} и Cu^+ (реакция Фентон), а также при действии радиоактивного излучения на H_2O и ультрафиолетового излучения на H_2O_2 . Время жизни OH^\bullet крайне мало (менее 1 нсек.), при этом скорость его действия очень велика. Он реагирует практически со всеми биомолекулами. Многие продукты его действия являются маркерами окислительного стресса, например, при взаимодействии с основаниями ДНК образуются тимингликоль и 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, а при взаимодействии с фенилаланином образуется *o*-тирозин (Зенков и др., 2001, Sigler 1999). Следует отметить, что в клетке нет ферментных систем для детоксикации гидроксильных радикалов, поэтому важно предупреждение его образования.

Образование 1O_2 сопряжено с действием света на фотосенсибилизаторы, присутствующие в клетке (флавины, птерины, порфирины и др.) (Красновский и др., 1998). Время его жизни в воде 2 мсек. 1O_2 реагирует с полиненасыщенными жирными кислотами и гуанидиновыми основаниями ДНК с образованием лабильных перекисей. АФК способны к взаимопревращениям.

Токсичность радикалов и их роль в патологических процессах и старении хорошо известна (Зенков и др., 2001; Dröge, 2002; Longo et al., 2005). Тем не менее, в последнее время накапливается все больше сведений относительно того, что продуцируемые внутриклеточными специфическими ферментами АФК необходимы клетке для иммунного ответа, процессов пролиферации, дифференцировки, передачи внешних сигналов и ионного транспорта (Dröge, 2002).

Высокая реакционная способность АФК и их токсичность создает необходимость присутствия в клетке систем антиоксидантной защиты (АЗ), включающих ферментативные АЗ – СОД, каталазу, гемсодержащие и тиоловые пероксидазы; и неферментативные антиоксиданты, представленные глутатионом, аскорбатом, пигментами (каротиноидами, меланинами и другими), фенольными соединениями, пролином. Большое значение для предотвращения окислительного стресса имеют изменение клеточной поверхнос-

ти в результате агрегации составляющих мицелий гиф, а также синтеза уникальных грибных белков – гидрофобин, вакуолизация клетки, хелаторы металлов, репарационные системы. АЗ обеспечивает безопасный уровень кислородных радикалов в клетке (рис. 2).

Показано, что АФК способны играть роль вторичных мессенжеров в клетках бактерий, животных, растений, грибов, т.е. опосредовать действие внешних факторов на экспрессию генов. Как медиаторы экспрессии генов АФК модулируют активность факторов транскрипции (Dröge, 2002; Moye-Rowley et al., 2003).

В обзоре приведены данные, свидетельствующие о роли АФК в передаче стрессорных сигналов у грибных организмов. Роль АФК и системы их обезвреживания у паразитических форм грибов рассматриваются в данном обзоре лишь фрагментарно. Основное внимание уделяется функционированию и роли отдельных компонентов АЗ, регулирующих баланс между преимуществами и разрушительной деятельностью АФК на разных стадиях развития. Следует подчеркнуть, что состояние АЗ может являться показателем содержания АФК в грибной клетке.

Факторы внешней среды, приводящие к окислительному стрессу (рис. 2)

Ионизирующее излучение, УФ, видимый свет.

Ионизирующее излучение (α -, β -, γ -, рентгеновские лучи), ультрафиолетовое излучение (дальний 200–290 нм, средний 290–320 нм и ближний 320–420 нм), а также свет видимой области спектра оказывают существенное влияние на физиологическую активность микроскопических грибов. В ходе недавних исследований выяснилось, что такие явления, как гибель клеток, мутации, хромосомные aberrации и опухолевая трансформация при действии ионизирующей радиации на организм могут быть не только следствием нарушения первичной структуры ДНК, но и результатом изменения окислительного метаболизма и профиля экспрессии генов, что выражается в усиленной продукции H_2O_2 . Более того, облученные клетки выделяют факторы белковой природы, вызывающие в необлученных клетках повышение содержания АФК – феномен, получивший название «эффекта свидетеля» («bystander effect»). Таким образом, кроме мутагенного эффекта и летального повреждения ДНК, действие радиоактивного и ультрафиолетового излучения приводит к возникновению в клетках кислород-

ных радикалов (Позмогова, 1991; Бурлакова и др., 2001).

Для многих гетеротрофных микроорганизмов, включая грибы, видимый свет является экологическим фактором, регулирующим жизненно важные функции. Хорошо известны такие ответы грибов на освещение, как регуляция скорости и вектора роста, контроль над реализацией генетических программ индивидуального развития (Соколовский, Белозерская, 2000). С другой стороны, свет является мощным стрессорным агентом ввиду наличия в грибных клетках большого количества фотосенсибилизаторов. Возбуждение этих молекул квантом света приводит к формированию в клетках АФК. Именно триплетные молекулы фотосенсибилизаторов, $^1\text{O}_2$, свободные радикалы и перекиси органических соединений служат инициаторами деструктивных фотодинамических процессов.

Температура. Тепловой фактор среды обитания является одним из решающих для роста и развития микроорганизмов. При повышении температуры внешней среды происходит серьезная внутриклеточная перестройка, сопровождаемая разворачиванием белковых структур, агрегацией белков, нарушением структурных и барьерных свойств клеточных мембран. Это состояние носит название теплового шока или теплового стресса и связано с синтезом большого количества специфических белков теплового шока. (Позмогова, 1991; Теофилова, 1994; Piper, 1997). У микроскопических грибов, таких как *Cunninghamella japonica*, *Fusarium oxysporum* и некоторых других, в липидном бислое мембран возрастает содержание фосфатидилхолина, уменьшается степень ненасыщенности фосфолипидов. Таким образом, повышение температуры внешней среды ведет к изменению структуры мембран, формированию кислородных радикалов внутри клетки и развитию окислительного стресса.

Быстрое снижение температуры с 30°C до 10°C вызывает увеличение H_2O_2 в клетке (Zang et al., 2003). Замораживание и размораживание клеток дрожжей также вызывает повышение уровня АФК, по-видимому, в результате повреждения мембран и взаимодействия кислорода с митохондриальными белками-переносчиками электронов. Участие АФК как повреждающего фактора подтверждается повышением толерантности клеток к этой процедуре при ее проведении в анаэробных условиях (Park et al., 1998).

Субстратное голодание. Голодание – наиболее распространенный стресс не только у микроорганизмов, но и у растительных и животных

клеток. Эта форма стресса в большей степени влияет на физиологию клеток, поскольку изменяет их ионно-осмотический гомеостаз. В ответ на длительное голодание происходит остановка клеточного цикла, индуцируется синтез стрессорных белков и включается процесс дифференцировки. Например, у *Neurospora crassa* при недостатке источника азота в условиях глубинного культивирования на вегетативном мицелии формируются конидии. При поверхностном культивировании и недостатке азота в среде происходит формирование органов полового размножения – протоперитециев. А вот недостаток источника углерода вызывает образование конидий при культивировании как в жидкой, так и на твердой среде (Соколовский, Белозерская, 2000). При недостатке углерода, азота или фосфатов в клетке снижается количество субстратов, являющихся источниками восстановительных эквивалентов, возрастает скорость одноэлектронного восстановления кислорода, что приводит к накоплению в ней кислородных радикалов и окислительному стрессу (Hansberg, Aguirre, 1990).

Высушивание. Потеря воды грибными клетками вызывает окисление липидов, влияет на структурное состояние цитоплазматической мембраны, связанное с изменением ее вязкости и ориентации липидов в мембране (Hansberg, Aguirre, 1990). Устойчивость к высушиванию значительно понижена у мутантов *Saccharomyces cerevisiae* по цитоплазматической каталазе (Ctt1), что указывает на АФК как на повреждающий фактор (Franca et al., 2005). Повреждения мембран при высушивании являются одной из причин увеличения их проницаемости и проникновения избытка кислорода внутрь клетки. Механические повреждения также увеличивают доступ кислорода в клетки и повышают образование АФК (Hansberg, Aguirre, 1990).

Окислительный стресс

Хорошо известно, что на полноценной среде скорость восстановления кислорода возрастает настолько, что скорость его диффузии в клетку становится фактором, лимитирующим рост. Наличие окисляющихся субстратов позволяет клетке поддерживать редокс-гомеостаз. Однако при действии нескольких абиогенных стрессорных агентов, таких как субстратное голодание, тепловой шок, механическое повреждение, освещение и др., внутриклеточная концентрация кислорода повышается на 2–3 порядка и перейдя рубеж 10^{-5} М может вызвать окислительный стресс (Скулачев, 1996).

Состояние гиперокисления – окислительный стресс – это нарушение окислительно-восстановительного статуса клетки в результате превышения генерации кислородных радикалов над способностью клетки к их нейтрализации. В отличие от процесса роста и дифференцированного состояния, окислительный стресс – состояние нестабильное и в случае выключения или частичного ингибирования внутриклеточных АЗ может привести к клеточной гибели (Hansberg, Aguirre, 1990).

Изменение концентрации АФК и дифференцировка у грибов

На отдельных этапах дифференцировки макроконидий *N. crassa* (агрегация гиф – 3–4 часа при голодании в воздушной среде, формирование воздушных гиф на агрегированных – 10 часов на воздухе, образование макроконидий на воздушных гифах – 16–18 ч на воздухе) зарегистрирована хемолуминисценция низкого уровня, стимулируемая люцигенином и люминолом и указывающая на повышение внутриклеточного уровня кислородных радикалов. Антиоксиданты снимают хемолуминисценцию и прекращают дифференцировку, что подтверждает формирование АФК перед каждой стадией в ходе развития (Hansberg et al., 1993).

Различные АФК вызывают экспрессию определенных генов, отвечающих за специфичность физиологических ответов грибов. У *A. nidulans* при действии одного из факторов (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ или диамида, вызывающего снижение окислительно-восстановительного потенциала клетки) из 3533 генов изменение экспрессии наблюдались у 2499 генов (Pócsi et al., 2005). Количество генов, избирательно отвечавших на воздействие одного фактора, составляло для $O_2^{\cdot-}$ 7,7%, для H_2O_2 – 32,6%, а для диамида – 13%. АФК ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) у *A. nidulans* изменяли профиль экспрессии генов, которые кодируют белки, связанные с транспортными процессами и синтезом аминокислот, а также принимающие участие в половом воспроизведении и споруляции (Pócsi et al., 2005).

Слияние миксамеб и последующая дифференцировка у миксомицетов *Dictyostellium discoideum* сопровождается увеличением внутриклеточного и внеклеточного $O_2^{\cdot-}$, причем агрегация миксамеб предотвращается как гасителями $O_2^{\cdot-}$, так и повышением экспрессии генов ферментативных антиоксидантных систем (Bloomfield, Pears, 2003).

У грибов H_2O_2 принимает участие в таких процессах, как дифференцировка и пролиферация (Rayner et al., 1999, Hansberg, Aguirre, 1990; Aguirre et al., 2005). Так, у *Schizosaccharomyces pombe* (Chen et al., 2003), *S. cerevisiae* (Gasch et al., 2000) и *Candida albicans* (Brice et al., 2003). H_2O_2 активирует факторы транскрипции, запускающие АЗ. H_2O_2 вызывает глобальные изменения генной транскрипции у *Aspergillus nidulans*, включая гены АЗ (Pócsi et al., 2005), дифференцировку склероциев у *Sclerotium rolfii* (Sidery, Georgiou, 2000), запускает экспрессию генов каротиногенеза у *N. crassa* (Iigusa et al., 2005) и переход к filamentному росту у *Ustilago maydis*, определяющий патогенность этого гриба (Leuthner et al., 2005).

Дифференцировка *S. rolfii* связана с образованием внутриклеточной перекиси, которое усиливается под действием света и ионов железа (Sidery, Georgiou, 2000). H_2O_2 считается одним из наиболее важных и функционально разнообразных метаболитов у всех дышащих клеток. Гасители OH^{\cdot} (образующегося при взаимодействии переходных металлов и H_2O_2), такие как диметилсульфоксид, тиомочевина, паранитрозодиметиланилин, этанол, бензоат ингибируют дифференцировку склероциев у *S. rolfii* (Georgiou et al., 2000). Кроме того, такие антиоксиданты, как аскорбат и β -каротин также ингибируют дифференцировку склероциев (Georgiou et al., 2001a; Georgiou et al., 2003). Показано, что $O_2^{\cdot-}$ запускает дифференцировку клейстотециев у *A. nidulans* (Lara-Ortiz et al., 2003), а NO^{\cdot} стимулирует формирование плодовых тел у *Flammulina velutipes* (Song et al., 2000). Добавление феромона α к дрожжевым клеткам а вызывает образование АФК в клетках *S. cerevisiae* (Severin, Human, 2002). АФК необходимы для полового воспроизведения и у *Volvox* (Nedelcu et al., 2004). Таким образом, АФК необходимы для дифференцировки у грибов, миксомицетов и водорослей.

Внутриклеточные источники АФК

В настоящее время показано, что основным источником $O_2^{\cdot-}$ в клетке является неполное восстановление кислорода до воды в процессе дыхания (Скулачев, 1996; Dröge, 2002).

Как промежуточный продукт $O_2^{\cdot-}$ помимо дыхательной цепи возникает в реакциях с участием ксантиноксидазы, микросомальных монооксигеназ липоксигеназы, циклогексеназы, а также в результате самоокисления тиолов, флавинов, хинонов, катехоламинов, восстановительного цикла ксенобиотиков (Georgiou, 2006).

Другой путь образования $O_2^{\bullet-}$ -восстановление O_2 в реакции с НАДФН, катализируемое оксидазами плазматических мембран. НАДФН-оксидаза (NOX) – сложный ферментативный комплекс, состоящий из мембрансвязанных и цитозольных компонентов (Зенков и др., 2001). Существенно, что в состав NOX входят так называемые малые ГТФазы – Ras и Rac. Это мономерные небольшие цитоплазматические белки. Гомологичные белки Ras в животных клетках передают сигналы АФК, связанные с патологическими процессами, в частности, с образованием злокачественных опухолей (Takai et al., 2001).

В фагоцитах при контакте с патогенами или мессенжерами воспаления каталитический компонент NOX использует НАДФН и O_2 для генерации $O_2^{\bullet-}$ как составляющей окислительного взрыва (Зенков и др., 2001). Хотя специфические функции большинства NOX не определены, для некоторых из них показано участие в процессах развития (Foreman et al., 2003). Недавнее открытие NOX у микроорганизмов – эукариот (Lara-Ortiz et al., 2003) расширяют наши представления о возможных функциях NOX и ставит вопрос об их регуляции, особенно в связи с тем, что в геноме *D. discoideum*, а также грибов и растений четко не показано присутствия гомологов генов регуляторных субъединиц NOX, характерных для клеток животных (Lara-Ortiz et al., 2003).

У дрожжей *S. cerevisiae* и *Sch. pombe*, а также у диморфных грибов – *U. maydis*, *Cryptococcus neoformans*, НАДФН-оксидазы не обнаружены. У *A. nidulans* и *A. fumigatus* присутствует по одному гену *nox*, два – у *Podospora anserina*, *N. crassa*, *Coprinus cinereus*, *Phanerochaete chrisosporium* и три – у *Magnaporthe grisea* и *F. graminearum* (Aguirre et al., 2005).

Присутствие генов *nox* у всех грибов, образующих плодовые тела, заставляет предполагать их участие в половом воспроизведении у грибов (Aguirre et al., 2005). У *A. nidulans* АФК образуются перед образованием клейстотециев. Инактивация гена *noxA* заметно снижает образование АФК и блокирует образование клейстотециев на ранней стадии развития, стимулирует рост мицелия и подавляет бесполое размножение. Дерепрессия *noxA* сопряжена с развитием клейстотециев и их преждевременным созреванием (Lara-Ortiz, et al., 2003). Выключение генов *nox1* и *nox2* *P. anserina* и у *N. crassa* блокирует половое воспроизведение и прорастание аскоспор (Malagnac et al., 2004; Aguirre et al., 2005). Ферменты

NOX, по-видимому, участвуют в генерации АФК и на других стадиях развития. У *D. discoideum* $O_2^{\bullet-}$ генерируется на ранних этапах образования многоклеточного организма (Bloomfield, Pears, 2003). Вовлечение в процесс фермента NOX подтверждается тем, что митохондрии не играют на этой стадии главную роль, а также обнаружением НАДФН-оксидазной активности.

Таким образом, прохождение определенных стадий развития у грибов связано с проявлением НАДФН-оксидазной активности и генерацией $O_2^{\bullet-}$ в клетках.

У фитопатогенного гриба *U. maydis* выявлена продуцирующая перекись глиоксальоксидаза, кодируемая геном *glo1*. Продукт этого гена гомологичен белку из древоразрушителя – *P. chrysosporium*. Гомологи этого фермента найдены у человека, растений и их грибных паразитов, но не обнаружены у дрожжей или других млекопитающих. Белок Glo1 связан с мембраной, окисляет небольшие альдегиды ($C < 4$) и образует H_2O_2 . Предполагается его значимость для филантного роста и проявления паразитизма *U. maydis* (Leuther et al., 2005)

Источником NO^{\bullet} в клетке является NO-синтаза, сложноустроенный фермент, разные молекулярные формы которого функционируют в разных тканях организма (Реутов и др., 1997). Он присоединяет несколько кофакторов – НАДФН, ФАД, ФМН, гемовую группу, кальмодулин и тетрагидриобиптерин – определяющих его каталитические свойства. Фермент превращает L-аргинин в цитруллин с образованием сигнальной молекулы – NO^{\bullet} . Наиболее известная функция NO^{\bullet} – регуляция тонуса кровеносных сосудов в головном мозге (Реутов и др., 1997). Оказалось, что развитие *F. velutipes* связано с функционированием этого вторичного посредника. Увеличение активности NO-синтазы предшествует формированию плодовых тел гриба, а его ингибиторы, такие как аминогуанидин и др. подавляют их формирование. В свою очередь образование плодовых тел стимулировалось обработкой гриба нитропруссидом натрия, формирующим внутриклеточный NO^{\bullet} (Song et al., 2002)

У *Phycomyces blakesleeianus* NO^{\bullet} регулирует, по-видимому, формирование спорангиофоров (Maier et al., 2001), а у *Physarum polycephalum* был обнаружен ген, гомологичный NO-синтазе животных клеток. Экспрессия этого гена увеличивалась во время голодания, предшествующего дифференцировке спорангиев у этого организма (Golderer et al., 2001).

Таким образом, у грибов внутриклеточные ферментные системы продуцируют АФК, необходимые для дифференцировки. Повышение внутриклеточного уровня АФК перед очередным этапом дифференцировки, приводящим к формированию нового типа клеток, показано на представителях разных классов грибов и миксомицетов (*D. discoideum*, *N. crassa*, *S. rolsii*, *F. Velutipes* и др.) [Sidery, Georgiou, 2000; Song et al., 2000; Bloomfield, Piers, 2003; Hansberg et al., 1993].

Показано, что дифференцировка склероциев на мицелии *S. rolsii* сопровождается перекисным окислением липидов (Georgiou, 1997). Свет и двухвалентное железо усиливают как перекисное окисление липидов, так и интенсивность формирования склероциев (Sidery, Georgiou, 2000), а перекиси липидов и альдегидные продукты их распада ингибируют многие ферменты, влияют на клеточную дифференцировку и пролиферацию, могут вызывать апоптоз (Esterbauer et al., 1991). Экспериментальными свидетельствами гипероксидантного состояния на отдельных этапах дифференцировки макрокониций *N. crassa* (см. выше) являются: массовое окисление белков и их последующая деградация (Toledo, Hansberg, 1990), высвобождение свободных ионов железа при окислении [Fe-S] кластеров ферментов, потеря восстановительных эквивалентов – окисление внутриклеточных НАДН и НАДФН, окисление глутатиона – и экскреция во внеклеточную среду глутатиондисульфида (Toledo et al., 1995), синтез антиоксидантных ферментов (Aguirre et al., 2005), зависящая от кислорода хемолюминисценция (Hansberg et al., 1993). Повышение карбонилирования белков под действием АФК в 2,5–4 раза наблюдалось у разных видов мицелиальных грибов: *Mucor racemosus*, *Humicola lutea*, *Fusarium oxisporum*, *Alermaria solani*, *Cladosporium elatum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. claviforme*, *P. roquefortii*, *Aspergillus niger*, *A. argilaceum*, *A. oryzae* (Angelova et al., 2005). Окислительный стресс сопровождается сильными изменениями в метаболизме, направленными на снижение уровня первичных метаболитов (ацетата, глюкозы) и синтеза из них соединений, участвующих в защите клетки, например, каротиноидов, меланинов, пролина, полиолов (Hansberg, Aguirre, 1990). Большое значение для защиты клеток дрожжей от окислительного стресса придается трегалезе (Benaroudj et al., 2001). Повышенная реакционная способность АФК и их непосредственное участие в процессах регуляции развития грибов влечет за собой необходимость наличия систем, контролируемых их уровень в клетках грибов.

Характеристика основных компонентов системы антиоксидантной защиты грибной клетки

В клетке существуют как элементы защиты от внешнего кислорода (лимитирующие вход кислорода в клетку), так и внутриклеточные системы защиты от АФК, что позволяет предупреждать развитие окислительного стресса. В данном обзоре будут рассмотрены наиболее важные компоненты системы АЗ клетки, способные детоксицировать первично возникающие АФК (рис. 1, 2).

Ферментные системы, снижающие уровень $O_2^{\cdot-}$ и возникающей при его каталитическом превращении H_2O_2 , представлены супероксиддисмутазами (СОД) (КФ 1.11.1.6), каталазами (КФ 1.15.1.1), глутатион-зависимыми пероксидазами и трансферазами. Эффективную защиту клетки от образующейся под действием света $O_2^{\cdot-}$ могут обеспечивать каротиноиды. Ферментативные АЗ обладают высокой специфичностью действия по отношению к АФК, различной внутриклеточной локализацией, присутствием в качестве катализаторов металлов, например меди, цинка, марганца, железа, селена. Ферменты АЗ крайне важны для жизнедеятельности клетки. Так, снижение активности глутатионпероксидазы на 21%, а каталазы на 55% летально для клетки; в то же время ингибирование СОД не является для клетки летальным, но делает ее гиперчувствительной к кислороду (Зенков и др., 2001).

Супероксиддисмутазы. СОД катализируют превращение $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 и O_2 (рис. 1) и считаются первым эшелонem защиты от окислительного стресса у эукариотических клеток. Нативные ферменты высокоустойчивы, выдерживают нагревание при $100^\circ - 1$ мин, а также устойчивы к колебаниям pH в широком диапазоне. У грибов, как и у других эукариот, в клетке встречаются два типа СОД – в цитозоле Cu,Zn-СОД, кодируемая геном *sod-1*, и в митохондриях MnСОД, кодируемая геном *sod-2* (Natvig et al., 1996). Характерная особенность MnСОД – высокая устойчивость к H_2O_2 и индуцибельность фермента: под действием ионизирующей радиации в 2 раза повышается скорость транскрипции мРНК фермента и в 3 раза – его стабильность (Зенков и др., 2001; Lee et al, 2001). Дополнительная экспрессия Cu,Zn-СОД и MnСОД происходит у *S. cerevisiae* при окислительном стрессе на стационарной фазе роста (Сурне et al., 2003). Продолжительность жизни и устойчивость к окислительному стрессу также повышается при повышенной экс-

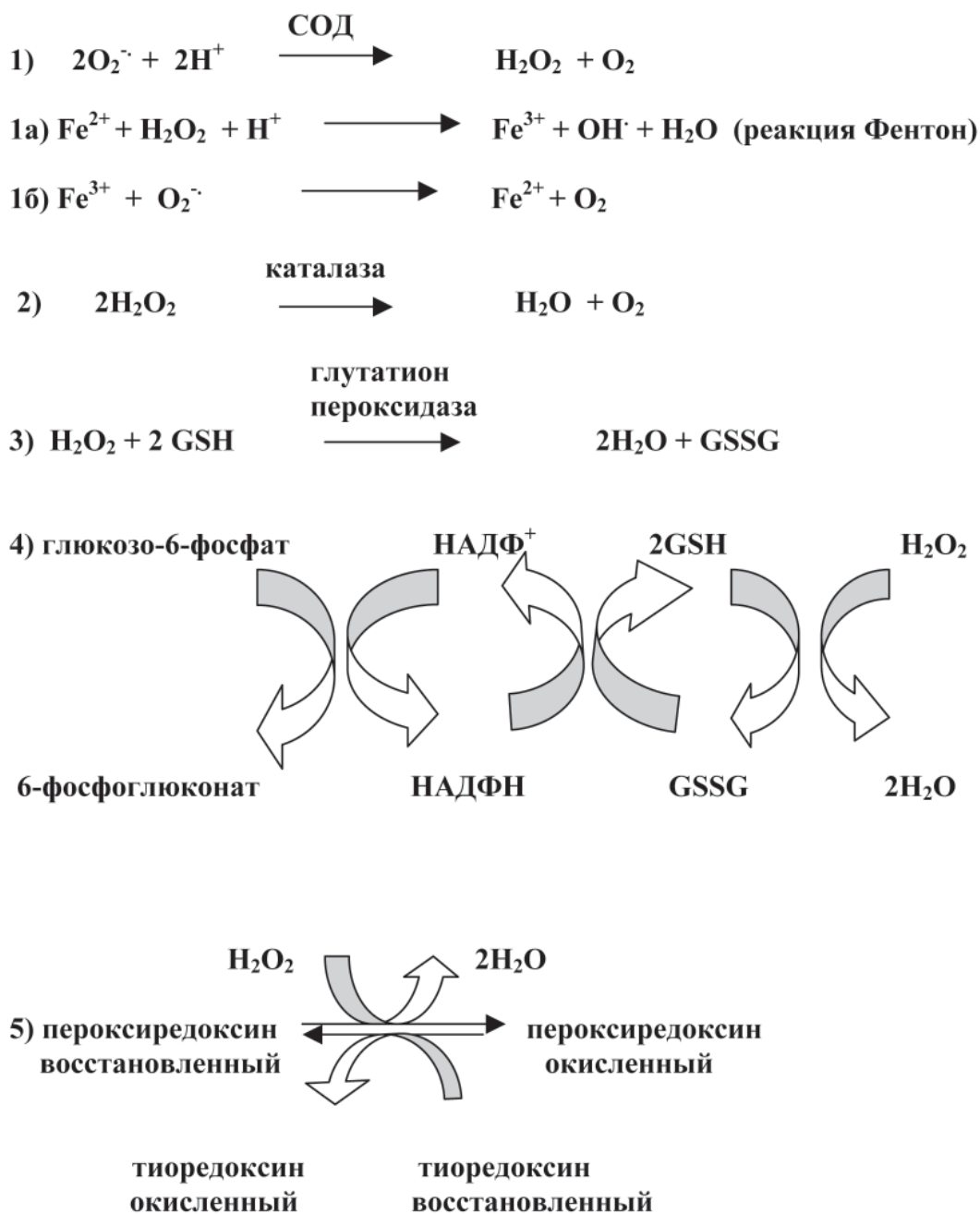


Рис.1. Детоксикация супероксидного анион-радикала (1), возникновение гидроксильного радикала (1а и 1б), разложение перекиси водорода каталазой (2), разложение перекиси водорода под действием глутатионпероксидазы (3), восстановление глутатиондисульфида глутатионредуктазой (4) и разложение перекиси водорода с участием пероксиредоксина (5). Окисленный пероксиредоксин* содержит цистеин, окисленный до сульфеновой кислоты. Его восстановление до сульфеновой кислоты осуществляет сульфидредоксин с участием АТФ, и далее окисленный пероксиредоксин восстанавливается тиоредоксином.

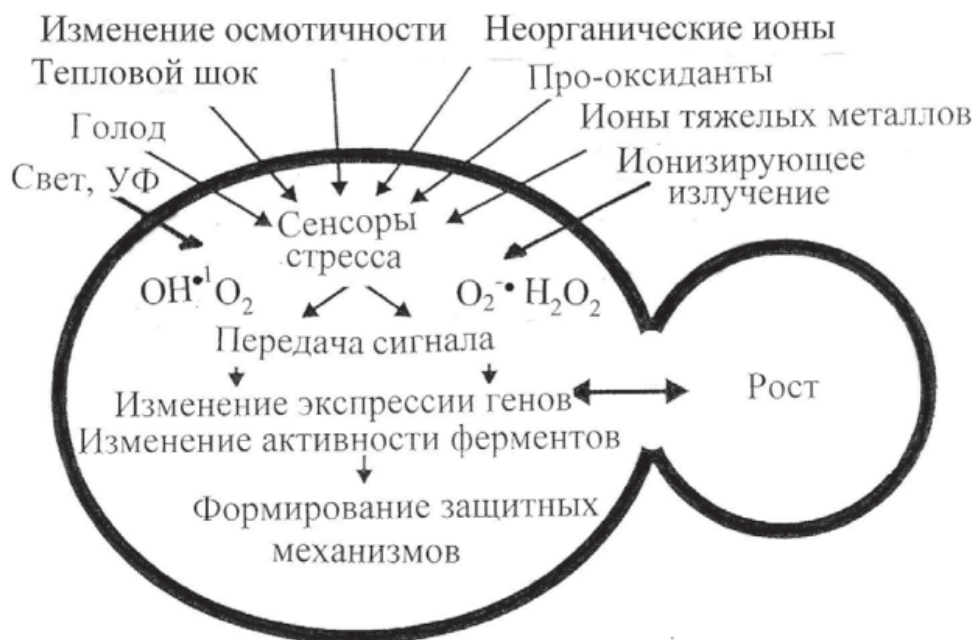


Рис. 2. Формирование антиоксидантных защитных систем под действием стрессорных агентов на клетки грибов.

прессии генов Cu,Zn-СОД и MnСОД в клетках *S. cerevisiae* (Fabrizio et al., 2004). Мутанты *N. crassa* и дрожжей по *sod-1* проявляют гиперчувствительность к редокс-медиаторам (вещества, при внесении которых в клетки происходит формирование АФК) и повышенному давлению кислорода. Однако в отличие от других грибов, *sod-1* мутанты *N. crassa* менее чувствительны к УФ-излучению, тепловому шоку и γ -излучению, при этом в отсутствие Cu,Zn-СОД у них возрастает активность митохондриальной MnСОД (Natvig et al., 1996) и наблюдается ускоренное образование каротиноидов (Yoshida, Hasunuma, 2004). У *N. crassa* общая активность СОД повышается при прорастании конидий и при переходе на стационарную фазу (Гесслер и др., 2006), а у гриба *Fusarium decemcellulare* общая активность СОД возрастает вдвое при переходе к стационарной фазе роста (Меденцев и др., 2001). При действии параквата, увеличивающего внутриклеточную концентрацию $\text{O}_2\cdot^-$ наблюдалось повышение активности СОД в 2–2,3 раза у 12 видов филаментных грибов (Angelova et al., 2005). Мутанты *N. crassa* по СОД характеризуются снижением продолжительности жизни, редукцией полового процесса и пониженной способностью к образованию конидий (Munkers, 1992), что указывает на роль этих ферментов в защите клеток от АФК и их важную роль в регуляции развития.

Показано, что у *S. cerevisiae* Cu,Zn-СОД и MnСОД необходимы на поздней стационарной фазе роста для защиты митохондриальных белков от окислительного стресса (O'Brien et al., 2004). Устойчивость к H_2O_2 и соединениям, повышающим $\text{O}_2\cdot^-$ в клетке, таким как менадион, в значительной степени зависит у *Sch. pombe* от функционирования цитоплазматической Cu,Zn-СОД и глутатион-редуктазы (Lee et al., 2002). У *C. albicans* одна из обнаруженных молекулярных форм СОД необходима для проявления вирулентности (Martchenko et al., 2004), а нестандартная MnСОД цитоплазмы у *C. albicans* обнаруживается при переходе к стационарной фазе роста (Lamarre et al., 2001). Участие $\text{O}_2\cdot^-$ в повреждении ДНК позволяет предположить, что эта форма кислорода является мутагеном, а СОД играет решающую роль в предотвращении вызываемых ей мутаций. Это подтверждается тем, что у дефицитных по СОД мутантов *N. crassa* наблюдается увеличение уровня спонтанных мутаций (Natvig et al., 1996). Таким образом, обе формы фермента – Cu,Zn-СОД и MnСОД – необходимы для прохождения нормального жизненного цикла у грибов и дрожжей.

Каталазы из различных организмов включают группу близких белков. Это металлоферменты, разлагающие H_2O_2 с образованием воды и молекулярного кислорода (рис.1). Как и $\text{O}_2\cdot^-$, H_2O_2 является продуктом аэробного метабо-

лизма клетки, образующимся в результате ряда ферментативных и неферментативных реакций. По структуре каталаза – тетрамер, содержащий по одной прочно связанной гемовой группе на субъединицу. Размер субъединиц варьирует в пределах от 55 кДа у *C.tropicalis* до 80-85 кДа у *N.crassa* и *A.niger* (Natvig et al., 1996). Около 80% каталазной активности локализовано в пероксисомах, 20% – в цитоплазме. В физиологических условиях каталазная активность в 10000 раз выше, чем пероксидазная. Одна молекула каталазы разлагает 4400 молекул H_2O_2 в сек. Однако большая масса каталазы делает ее уязвимой для протеолитических ферментов. Каталаза плохо проникает в клетки (Зенков и др., 2001).

Все ранее изученные каталазы включают гемовую простетическую группу, в центре которой располагается железо, принимающее участие в катализе. У некоторых прокариот обнаружены каталазы, несущие в активном центре марганец вместо железа (Natvig et al., 1996). Для многих организмов характерно наличие более одной формы каталазы, при этом каталазы регулируются по-разному и некоторые из них связаны с циклом развития организма (Зенков и др., 2001; Kawasaki et al., 1997; Michán et al., 2002). У *S.cerevisiae* установлены гены двух каталаз: каталазы А, расположенной в пероксисомах, и цитоплазматической каталазы Т. У *N.crassa* имеется как минимум три различные каталазы, кодируемые тремя различными генами – *cat-1*, *cat-2*, *cat-3* (Chary et al., 1989). *Cat-1* – гомотетрамер. Фермент гликолизирован и очень эффективен. Он не ингибируется молярными концентрациями H_2O_2 . Фермент устойчив к нагреванию и денатурирующим агентам (Michán et al., 2002). *Cat-1* – основная каталаза спор. Ее активность в спорах в 60 раз выше, чем в мицелии *N.crassa* при культивировании в жидкой среде (Michán et al., 2002; Гесслер и др., 2006). Высокая активность связана с синтезом фермента во время созревания и прорастания конидий. Активность другой монофункциональной каталазы – *Cat-3* у *N.crassa* увеличивается в конце экспоненциальной фазы роста и при агрегации гиф (Michán et al., 2002). У мутанта по *Cat-3* выявляется ускоренное образование воздушных гиф и конидий (Michán et al., 2003). У *N.crassa* экспрессия двух основных монофункциональных каталаз по-разному проявляется на стадиях развития и при действии стрессорных факторов (Chary et al., 1989). *Cat-2* обладает пероксидазной активностью и является минорным компонентом общей каталазной активности на стадиях развития, но ее активность значительно

увеличивается в мицелии при тепловом шоке. *Cat-2* имеет молекулярный вес 165 кДа, что намного меньше, чем у *Cat-1* и *Cat-3* (315 кДа и 340 кДа), а также чем молекулярный вес каталаз из других организмов (Chary et al., 1989). У *A.niger* обнаружены гены двух каталаз, имеющие сходство с *cat-1* и *cat-3* генами у *N.crassa* (Kawasaki et al., 1997). У 12 видов мицелиальных грибов показано увеличение активности каталазы в 2-3 раза при обработке H_2O_2 (Angelova et al., 2005).

Другая группа гемовых ферментов, участвующих в разложении H_2O_2 и органических перекисей – пероксидазы (рис.2). Пероксидазы широко распространены в растительных тканях, где они находятся преимущественно в пероксисомах. В небольшом количестве они имеются и в животных тканях (Зенков и др., 2001). В клетках *N.crassa* пероксидазная активность обнаруживается при тепловом шоке, при действии H_2O_2 , мышьяка, этанола и кадмия (Davis, 2000). Выявлено образование транскриптов пероксидазы у *N.crassa* при тепловом шоке (Machwe, Karoor, 1993).

Глутатионзависимые пероксидазы (Gpx). Селен-содержащая глутатионпероксидаза – еще один фермент в клетке, разрушающий органические перекиси и H_2O_2 , локализован в цитозоле (70%) и митохондриях (Зенков и др., 2001). Gpx катализирует реакцию восстановления глутатионом (GSH) нестойких органических перекисей, включая гидроперекиси жирных кислот, в стабильные соединения – спирты, что приводит к образованию глутатиондисульфида – GSSG (рис. 1). Дальнейшее восстановление GSSG происходит с участием глутатионредуктазы и систем, восстанавливающих НАДФ, таких как пентозофосфатный цикл. Так, у фитопатогенного гриба *Fusarium decemcellulare* активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы возрастает в шесть раз при переходе к стационарной фазе роста, а активность глутатионредуктазы – в 5 раз (Меденцев и др., 2002). Gpx – гидрофильный фермент и его проникновение сквозь мембраны затруднено.

В геноме *S.cerevisiae* обнаружено 3 гена Gpx, гомологичных генам млекопитающих. Существенным отличием Gpx дрожжей от ферментов млекопитающих является отсутствие атомов селена в составе каталитических цистеинов (Inoue et al., 1999) Мутанты по *gpx1* и *gpx2* не отличаются по фенотипу от дикого типа, тогда как мутанты по *gpx3* гиперчувствительны к пероксидам. У *S.cerevisiae* Gpx1 экспрессируется в ответ на голодание по углероду, а Gpx2 – при окислительном стрессе (Tanaka et al., 2005). Gpx3 функцио-

нирует как редокс-переносчик для Yap1, фактора транскрипции, запускающего экспрессию генов АЗ в ответ на окислительный стресс у дрожжей (Delaunay et al., 2002).

У патогенного гриба *Cryptococcus neoformans* обнаружены Gpx1 и Gpx2, которые, как и Gpx у дрожжей, не содержат Se в составе цистеинов каталитического центра (Missal et al., 2005).

Глутатионредуктаза (Glr). Ключевая роль GSH как антиоксиданта заключается в снижении уровня АФК в клетке, в первую очередь H_2O_2 и органических перекисей. Глутатионредуктаза восстанавливает GSSG и таким образом поддерживает баланс GSH/GSSG в клетке. Для *S. cerevisiae* был идентифицирован ген, кодирующий глутатионредуктазу – *GLR1*. Мутанты по *GLR1* хотя и жизнеспособны, но содержат избыточное количество GSSG и сверхчувствительны к оксидантам (Jamieson, 1998). Уровень глутатиона у них снижен в 2 раза по сравнению с диким типом (Drakulic et al, 2005), а также нарушено восстановление тиоредоксина митохондрий (Trotter, Grant, 2005). У фитопатогенного гриба *F. decemcellulare* при переходе к стационарной фазе роста активность Glr возрастает в 5 раз, а активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, поставляющей НАДФН, в 6 раз (Меденцев и др., 2002).

При действии солей кадмия на клетки *A. nidulans* возрастает активность СОД, каталазы и Glr. Возрастание активности этих ферментов свидетельствует об окислительном стрессе, сопровождающем действие тяжелых металлов на грибные клетки (Guelfi et al., 2003).

Тиоловые пероксидазы. Как выяснилось в последнее время, особая роль в детоксикации АФК кроме глутатионпероксидазы принадлежит еще нескольким классам пероксидаз, таким как, тиоредоксины, глутаредоксины, пероксиредоксины, сульфиредоксины, обнаруженным как у прокариот, так и у эукариот. Как и Gpx они не содержат металлов, а обладают одним или несколькими цистеиновыми остатками в активном центре, принимающими участие в катализе. Механизм антиоксидантного действия тиолов связан со способностью SH-группы непосредственно вступать в реакцию с $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 , окисляясь до тиильного радикала (-S \cdot), дисульфида (-S-S-), сульфеновой (-SOH), сульфиновой (-SO $_2$ H) и полностью окисленной сульфеновой (-SO $_3$ H) кислот (Poole et al., 2004; Hancock et al., 2006). Недавно выявлено, что высокая реакционная способность, разнообразие и обратимость окислительной модификации позволяют сульфеновой кислоте выступать в качестве сенсора

АФК в ряде ферментов и регуляторов транскрипции (Poole et al., 2004).

Тиоредоксины (Trx) – небольшие (около 12 кДа) термостабильные белки, содержащие в активном центре два консервативных цистеина (Filomeni et al. 2002, Wheller, Grant, 2004). Тиоредоксины играют большую роль в восстановлении дисульфидных групп в белках, в том числе участвующих в трансдукции сигнала АФК. Позднее была выявлена их роль в функционировании белков, формирующих дисульфиды в каталитическом цикле, например, у фактора транскрипции дрожжей *S. cerevisiae* Yap-1 (Wheller, Grant, 2004). *S. cerevisiae* имеет два гена, кодирующих тиоредоксины цитозоля – *TRX1* и *TRX2*, а также ген *TRX3*, кодирующий тиоредоксин митохондрий (Pedrajas J. et al., 1999; Wheller, Grant С.М. 2004). Делеции по одному из генов *TRX1* и *TRX2* не являются летальными для *S. cerevisiae*, однако у мутантов наблюдается увеличение GSH в 2 раза и GSSG в 7 раз, а также выявлена сверхчувствительность к H_2O_2 . Делеции по обоим генам *TRX1* и *TRX2* приводят к затягиванию S-фазы клеточного цикла и укорачивают G1 интервал, а также вызывают повышение уровня GSH в 3,5 раза и GSSG в 70 раз. (Wheller, Grant 2004; Drakulic, 2005). Показано, что глутатионредуктаза, локализованная как в цитоплазме, так и в митохондриях, участвует в восстановлении тиоредоксина митохондрий (Trotter, Grant, 2005). У грибного патогена *Cryptococcus neoformans* выключение гена тиоредоксинредуктазы приводит к потере патогенности. Таким образом, этот фермент рассматривается как потенциальный антигрибковый агент (Missal, Lodge, 2005).

Глутаредоксины (Grx) – структурно и функционально схожие с тиоредоксинами белки, обнаруженные у дрожжей *S. cerevisiae* и *Sch. pombe*. Они содержат как моно-, так и дитиоловые глутаредоксины (Wheller, Grant, 2004, Herrero et al., 2006). Восстановление глутаредоксинов происходит с участием GSH, дальнейшее восстановление которого осуществляется глутатионредуктазой в присутствии НАДФН (Wheller, Grant, 2004). В клетках *S. cerevisiae* присутствуют два гомологичных белкам бактерий и животных дитиоловых глутаредоксина (1 и 2), содержащих в своей структуре активный участок с двумя цистеиновыми остатками (обычно Cys-Pro-Tyr-Cys). Штаммы дрожжей с делециями по генам этих белков жизнеспособны, но теряют термоустойчивость. У них отмечено увеличение как глутатиона (в 2,5 раза), так и дисульфида глутатиона (в 8 раз) по сравнению с диким типом, что ука-

зывает на повышение внутриклеточного уровня АФК [Drakulic, 2005]. Показано, что оба глутаредоксина (1 и 2) локализованы в цитозоле, напрямую восстанавливают H_2O_2 и гидроперекиси (Collinson et al., 2002), а также обладают глутатион-S-трансферазной активностью (Collinson, Grant, 2003). Помимо цитозоля глутаредоксин 2 обнаружен также в митохондриях (Wheller, Grant, 2004).

Три гена, кодирующих монотиоловые глутаредоксины (*GRX3*, *GRX4* и *GRX5*) обнаружены у дрожжей *S. cerevisiae* (Rodriguez-Manzanares et al., 1999; Herrero et al., 2006). Мутанты по всем 3 генам, как и двойной мутант *grx2 grx5* нежизнеспособны. Показана локализация глутаредоксина 5 в митохондриях, а глутаредоксины 3 и 4 локализованы в ядре (Wheller, Grant, 2004; Herrero et al., 2006).

Пероксиредоксины (Prx) – класс антиоксидантных белков, восстанавливающих гидроперекиси до спиртов. Эти белки наряду с каталазами играют важную роль при детоксикации H_2O_2 у дрожжей (Munhoz, Netto, 2004; Bozonet et al., 2005).

Они подразделяются на 1-Cys и 2-Cys Prx, в зависимости от числа цистеиновых остатков, принимающих участие в катализе. Было показано, что 2-Cys Prx участвуют в регуляции сигнальной трансдукции, запускаемой H_2O_2 (Demasi et al., 2006). Кроме того, недавние исследования показали, что 2-Cys Prx могут функционировать и как пероксидазы и как молекулярные шапероны. Их присутствие показано в цитозоле и в митохондриях. Кроме того, обнаружены пероксиредоксины, ассоциированные с ядром и плазматическими мембранами. В клетках эукариот пероксиредоксины присутствуют в значительных количествах и разных изоформах и, несмотря на более низкую эффективность по сравнению с глутаредоксинами и каталазой, по-видимому, вносят определенный вклад в защиту плазматических мембран клеток от перекисного окисления липидов (Wood et al., 2003).

В последнее время показано, что тиолсодержащие пероксидазы в клетках дрожжей участвуют в процессе рецепции и трансдукции сигналов АФК. Их основная функция состоит в стабилизации генома эукариотических клеток и в восстановлении белков, SH-группы которых подвергаются окислению (Biteau et al., 2003; Wong et al., 2004; Vivacos et al., 2005).

Сульфиредоксины – тиолсодержащие АТФ-зависимые уникальные белки (молекулярная масса около 13 кДа), впервые обнаруженные

у дрожжей, а позднее у бактерий и млекопитающих. Сульфиредоксины восстанавливают сульфоновую ($-SO_2H$) группу до сульфеновой ($-SOH$) в каталитических цистеиновых остатках типичных 2-цис-пероксиредоксинов, дальнейшее восстановление которой до тиоловой группы осуществляется тиоредоксинами. Показано участие пероксиредоксинов и сульфиредоксинов в трансдукции сигнала H_2O_2 у дрожжей *S. cerevisiae* и *S. pombe* (Biteau et al., 2003; Bozonet et al., 2005).

Альтернативная оксидаза. Одним из ответов грибов на действие стрессорных факторов является возрастание доли цианидрезистентного дыхания, обусловленное появлением в митохондриях альтернативной оксидазы. Альтернативная оксидаза отвечает за от основной фосфорилирующей дыхательной цепи на уровне убихинона и переносит электроны непосредственно на кислород с образованием воды. Фермент специфически подавляется производными бензгидроксамовой кислоты (Меденцев и др., 2001, 2002). В условиях окислительного стресса альтернативная оксидаза, по-видимому, является единственной терминальной оксидазой, обеспечивающей рост грибов. При исчерпании глюкозы в среде и при переходе к стационарной фазе роста альтернативная оксидаза активизируется в клетках грибов, также как и в стрессовых условиях, снижающих активность цитохромного пути (Меденцев и др., 2001, 2002; Belozerskaya et al., 2003). Повышение активности альтернативной оксидазы в условиях стресса показано для многих грибов-продуцентов биологически активных соединений (Vai et al., 2003; Angelova et al., 2005).

Таким образом, наличие внутриклеточных механизмов, обезвреживающих АФК, дает возможность грибам выживать и репродуцироваться под действием стрессорных факторов даже в экстремальных условиях существования. Существенно, что уровень ферментативных антиоксидантов находится под генетическим контролем.

Неферментативные антиоксиданты. В клетках грибов присутствуют разнообразные антиоксиданты – аскорбиновая кислота и ее производные, глутатион, пролин, трегалоза, полиолы, токоферолы, а также пигменты, например меланины и каротиноиды.

Аскорбиновая кислота. Известно, что аскорбиновая кислота восстанавливает антиоксидантные свойства витамина Е (токоферола), являясь, таким образом, непрямым липидным антиоксидантом (Зенков и др., 2001). Роль этого соединения в дифференцировке у грибов была проде-

монстрирована на *S. rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *S. minor* (Georgiou, Petropoulou, 2001 a,b; Georgiou et al., 2003). В процессе дифференцировки указанных грибов количество восстановленного аскорбата в клетке снижается вдвое. Добавление экзогенного аскорбата понижает перекисное окисление липидов в грибных клетках и ингибирует дифференцировку склероциев.

Внутриклеточные редокс-пары Исследования последнего десятилетия показали, что изменение окислительно-восстановительного статуса клетки регулирует экспрессию генов, включая гены АЗ, вызывает пост-трансляционное изменение ряда белков и активность ферментов, влияет на прохождение белков через митохондриальные мембраны (Winyard et al., 2005; Pósci et al., 2005; Le Moan et al., 2006). Наиболее значимыми внутриклеточными редокс-парами являются система пиридиновых нуклеотидов, тиоредоксина и глутатиона. Редокс-пара 2GSH/GSS вносит наибольший вклад в создание внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала (E_{hc}), поскольку внутриклеточная концентрация глутатиона в 500–1000 раз выше, чем тиоредоксина и НАД(Ф)Н.

Глутатион. Самый распространенный тиол в клетках – трипептид – γ -глутамилцистеинилглицин присутствует в восстановленной форме (GSH) и двух окисленных – глутатиондисульфид (GSSG) и смешанный дисульфид глутатиона с белками (GSSR) (Filomeni et al., 2002). Нарушение биосинтеза глутатиона у дрожжей *S. cerevisiae* снижает их устойчивость к окислительному стрессу (Perrone et al., 2005). GSH выполняет важную антиоксидантную роль в клетках, снижая уровень АФК (Lee et al., 2001). Концентрация внутриклеточного глутатиона в клетках дрожжей от 5 до 20 мМ (Jamieson, 1998). В нормальных физиологических условиях концентрация GSH в 10-100 раз больше, чем GSSG, благодаря чему в цитоплазме тиолы белков присутствуют преимущественно в восстановленном состоянии (Le Moan et al., 2006). Высокий уровень GSH поддерживается НАДФН-зависимой глутатионредуктазой и таким образом тесно связан с наличием окисляющихся субстратов в клетке. Внутриклеточный редокс-статус, сдвинутый в сторону восстановленности, часто способствует выживанию клетки в экстремальных условиях. Защита редокс-чувствительных SH-групп в цистеиновых остатках белков от необратимого окисления при увеличении АФК достигается образованием смешанных дисульфидов с GSH, при этом наблюдается обратимое ингиби-

рование активности ряда ферментов, снимающееся при восстановлении редокс-статуса клетки (Shenton, Grant, 2003; Le Moan et al., 2006). При добавлении H_2O_2 (2 мМ, 30 мин) к дрожжам *S. cerevisiae* образование смешанных дисульфидов GSH с цистеиновыми остатками белков обратимо ингибировало глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, энолазу, алкогольдегидрогеназу и вызывало быстрое обратимое снижение синтеза белка. Наибольшее образование дисульфидных связей при добавлении H_2O_2 , связанное с образованием смешанных дисульфидов, наблюдалось у алкилпероксидредуктазы, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, пируваткиназы, пируватдекарбоксилазы, цистатионин-бета-синтазы, неорганической пирофосфатазы (Le Moan et al., 2006).

У мутантов *S. cerevisiae*, не способных синтезировать GSH, внесение H_2O_2 приводило к необратимому окислению цистеина в составе ряда гликолитических ферментов и ферментов синтеза белка (Shenton, Grant, 2003).

Таким образом, дисульфиды под действием АФК образуются в определенной группе белков (Le Moan et al., 2006). Образование дисульфидов белков при их синтезе *de novo* происходит в определенных компартментах (эндоплазматическом ретикулуме и межмембранном митохондриальном пространстве) под контролем ФАД-содержащих сульфгидрильных оксидаз и протеин-дисульфид изомераз, обеспечивающих точный фолдинг секретлируемых белков (Tokatlidis, 2005). Окислительный статус для образования дисульфидных связей создается высоким уровнем дисульфида глутатиона в эндоплазматическом ретикулуме (Piccirella et al., 2006).

Помимо поддержания внутриклеточного редокс-гомеостаза и непосредственной антиоксидантной защиты GSH участвует в работе антиоксидантных ферментов в качестве кофактора (Giles et al., 2001). Была выявлена еще одна антиоксидантная функция глутатиона – детоксикация и транспорт внутриклеточной меди (Jamieson, 1998; Filomeni et al., 2002). С помощью цистеиновой группы GSH способен поставлять медь апопротеинам медьсодержащих ферментов, в том числе Cu, Zn-СОД. (Filomeni et al., 2002). Эта функция способствует связыванию внутриклеточной меди, таким образом, препятствуя потенциально токсичным реакциям между металлами и кислородом (реакции Фентона). Кроме того, избыток цистеина является токсичным для клетки и его глутатион обеспечивает клетку цистеином в нетоксичной форме (Pósci et al., 2005).

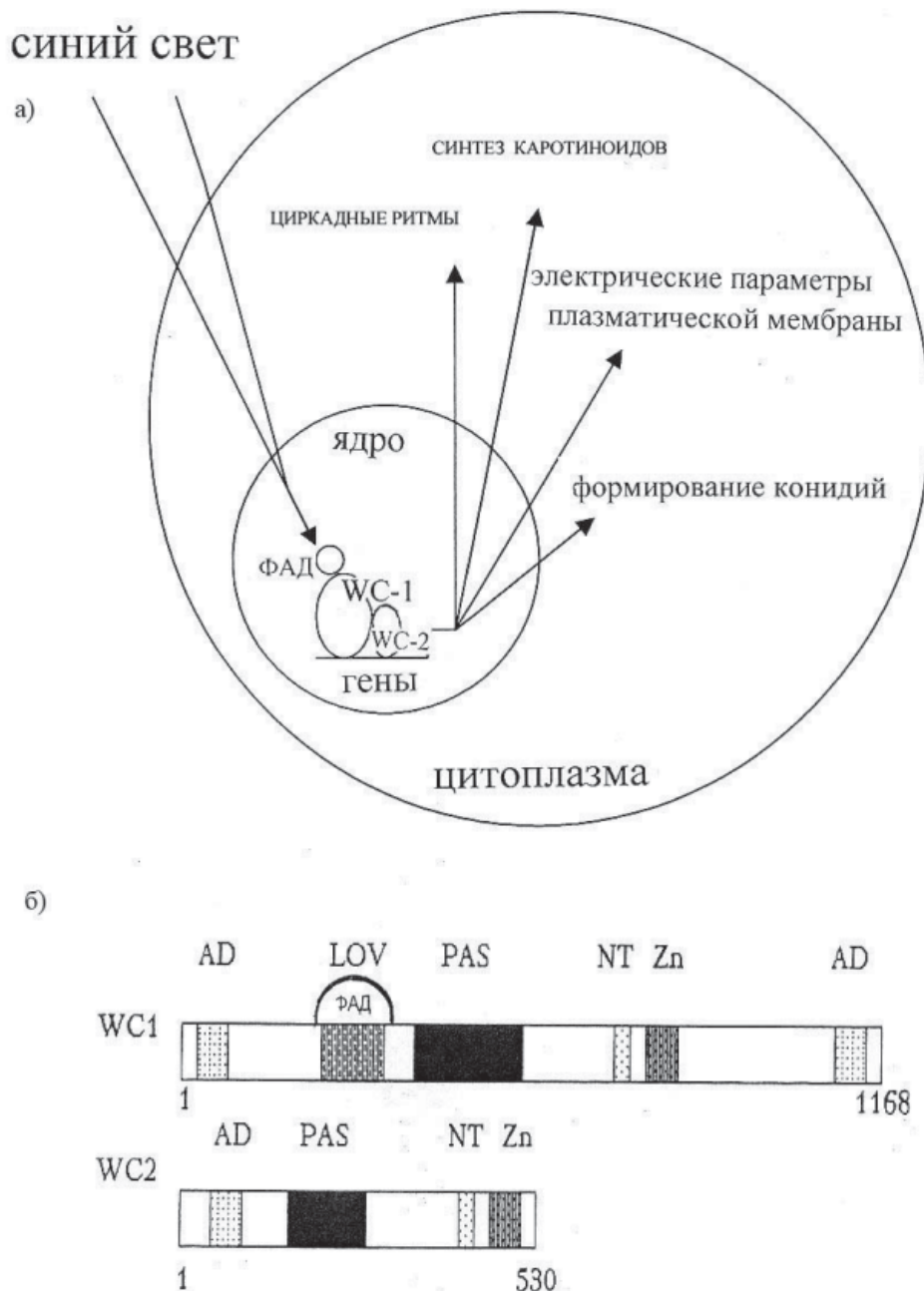


Рис. 4. Рецепция света у *Neurospora crassa* с помощью фактора транскрипции WC-1.

- а) Фактор транскрипции WC-1 формирует гетеродимерный комплекс с фактором транскрипции WC-2, локализованный в ядре. Свет поглощается флавиновым хромофором (ФАД), связанным с LOV-доменом WC-1. Результатом действия света может быть конформационное изменение WC-1/WC-2, чего WCC приобретает способность индуцировать экспрессию светозависимых генов, регулирующих физиологические ответы на действие света. Кроме того, WCC-регулирует, по-видимому, межклеточные взаимодействия в гифах.
- б) Факторы транскрипции WC-1 и WC-2 – мультидоменные белки. Они содержат домен димеризации – PAS; предполагаемые домены активации – AD; ДНК-связывающий домен цинкового пальца (Zn); домен нацеливания в ядро (NLD) и только WC-1 содержит LOV-домен.

Цистеиновые остатки в составе белков также играют большую роль в детоксикации H_2O_2 и в передаче сигнала АФК. У дрожжей окислительная модификация цистеиновых остатков в составе факторов транскрипции показана, например, при трансдукции сигнала H_2O_2 , регулируемого Grx3 (Toledano et al., 2003, Vozonet, 2005). Вызванное АФК окисление аминокислотных (цистеиновых) остатков выявлено также в протеинкиназах и протеинфосфатазах (Duce, 2002). Другие аминокислоты (метионин, гистидин, тирозин и др.) тоже могут выступать сенсорами АФК (Winyard et al., 2005). У дрожжей *S. cerevisiae* показана антиоксидантная роль метионинсульфоксидредуктазы, способной восстанавливать окисленный метионин в составе белков (Moskovitz et al., 1997).

Вероятно, сенсорами H_2O_2 являются также многие чувствительные к действию АФК ферменты, выполняющие в клетке иные функции (Hancock et al., 2006). Как уже отмечалось, окислительный стресс вызывает изменение конформации и активности только определенных белков, в число которых помимо белков, участвующих в трансдукции сигнала, входят и метаболические ферменты, включая ферменты гликолиза и синтеза белка (Le Moan et al., 2006).

Таким образом, редокс-состояние тиолов непосредственно связано с окислительно-восстановительным статусом клетки и определяет конформацию редокс-чувствительных белков. Образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей в присутствии АФК, а также обратимость этих реакций при изменении уровня оксидантов лежит в основе рецепции и трансдукции сигнала АФК, а также пост-трансляционных изменений конформации и активности ферментов, вызывающих изменение физиологического состояния клетки (например, снижение активности ферментов гликолиза и синтеза белка сопряжено с остановкой роста). Следует отметить, что только определенные белки обладают чувствительными к действию АФК SH-группами, что обусловлено их расположением и влиянием ближайших аминокислотных остатков.

Металлотioneины – распространенный класс богатых цистеином (содержат до 30% цистеина) белков небольшого размера – <7 кДа. Они играют важную роль в поддержании гомеостаза металлов в клетке, поскольку, несмотря на важную роль металлов в структурировании каталитической и регуляторной функции внутриклеточных белков, концентрация ионов металлов должна быть четко выверена в клетке для пре-

дупреждения их токсического эффекта. Наряду с регуляцией гомеостаза металлов у металлотioneинов еще несколько физиологических функций. Они детоксификаторы металлов, гасители (scavenger) свободных радикалов, регуляторы клеточного роста и пролиферации (Tucker et al., 2004). Кроме наличия больших количеств цистеина металлотioneины характеризуются повышенным содержанием серина, лизина и ароматических аминокислот, а также высоким сродством к металлам. Эти белки присутствуют как у прокариот, так и у эукариот. Наряду с переносчиками металлов в клетках грибов и дрожжей металлотioneины осуществляют секвестрирование ионов меди, цинка, кадмия, ртути и серебра (Jamieson, 1998). Они кодируются двумя генами – *CUP1* и *CRS5* – и защищают дрожжевую клетку от окисляющих агентов. Их повышенная экспрессия наблюдается в клетках *S. cerevisiae* с мутацией по Cu,Zn-СОД. Ген *CUP1* индуцируется также при действии менадиона на клетки дрожжей (Jamieson, 1998). Недавно была установлена структура металлотioneинов у *N. crassa*. мРНК этого белка индуцируется *in vivo* только ионами меди, однако белок способен связывать *in vitro* и другие металлы переменной валентности – цинк, кадмий, кобальт и никель (Cobine et al., 2004). Кроме того, ген металлотioneина *MMT1* был выявлен у паразитического аскомицета *Magnaporthe grisea*, вызывающего периконияриоз риса. Этот ген обильно экспрессируется в процессе роста и развития паразита и кодирует белок из 22 а-к, включая 6 цистеиновых остатков. У белка высокое сродство к цинку и высокая антиоксидантная активность. У мутанта по этому белку апрессории неспособны проникнуть через кутикулу клеток хозяина. Кроме того, металлотioneины найдены у *Agaricus bisporus* и недавно – у микоризных грибов (Tucker et al., 2004).

У *S. cerevisiae*, *N. crassa* и *C. glabrata* показано присутствие фитохелатинов – пептидов, повышающих толерантность грибов к ионам металлов (Kneer et al., 1992).

В присутствии ионов меди у дрожжей *Candida intermedia* увеличиваются уровни $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , GSH и активности каталазы. Толерантность к обработке культуры дрожжей *C. intermedia* ионами металлов зависела от скорости генерации АФК и эффективности АЗ (Fujs et al., 2005). Добавление ионов магния к среде выращивания *Fusarium acuminatum* и *F. equiseti*, несмотря на увеличение активности MnСОД и каталазы, вызывало возрастание окисления липидов и повышение содержания ионов железа в

клетках, что связано, по-видимому, с образованием АФК через реакцию Фентон (Kayali, Tarhan, 2005). Хелаторы металлов, связывая ионы металлов, оказывают антиоксидантное действие.

Каротиноиды. Целый ряд работ, проведенных на клетках грибов, указывает на связь синтеза каротиноидов с защитой организма от фотодинамического действия АФК, образующихся на свету в присутствии кислорода. Каротиноидные пигменты выявлены примерно у 200 видов грибов, а около 100 видов ими не обладают. Каротиноиды представляют собой тетратерпеноиды с ветвящимся C_{40} -скелетом из восьми C_5 изопреновых единиц. Гидрофобная структура и наличие π -электронной системы с низким уровнем триплетного возбужденного состояния определяют их биологические свойства, связанные с антиоксидантной активностью и гашением свободнорадикальных процессов в фосфолипидах, липопротеидах и белковых структурах (Соколовский, Белозерская, 2000).

Основные каротиноиды грибов – β -каротин, нейроспороксантин и астаксантин. Каротиноиды присутствуют у грибов в основном в сферосомах и липидных тельцах, и гораздо в меньшей степени в мембранах. Синтез происходит в эндоплазматическом ретикулуме, а затем каротиноиды попадают в тесно связанные с ним сферосомы. Показано, что регуляция биосинтеза каротиноидов у грибов осуществляется синим светом, кислородом, температурой культивирования. Было выяснено, что голодание по источникам азота и углерода стимулирует синтез каротиноидов у *N. crassa* (Соколовский, Белозерская, 2000). Отсутствие Cu, Zn -СОД у *Blakeslea trispora*, *Phaffia rodosyza* и *N. crassa* вызывало образование у них повышенного количества каротиноидов, что подтверждает их значение как антиоксидантов. (Schroeder, Johnson, 1993; Гесслер и др., 2002; Yoshida, Hasunuma, 2004). Показано, что АФК регулируют каротиногенез у *P. rhodosyza* и *F. aqueductum* (Соколовский, Белозерская, 2000). Препарат ликопина, полученный из *B. trispora*, используются в медицинской практике как антиоксидант (Феофилова и др., 2005).

Меланины. Черные пигменты – меланины – защищают грибную клетку от разнообразных стрессорных факторов, включая ионизирующее излучение. Не удивительно, что у большинства грибов, обнаруженных в зоне Чернобыля присутствуют меланиновые пигменты. Тип меланинов мицелиальных грибов до сих пор мало изучен, невыясненной остается и природа предшественников синтеза некоторых грибных мела-

нинов. Большинство природных меланиновых полимеров обладают совокупностью свойств, но их выраженность зависит от химического состава меланинов, наличия в них тех или иных функциональных групп и радикалов. Показано, что экзо- и эндомеланины, синтезируемые макромицетами, являются меланопротеидами и незначительно отличаются между собой по физико-химическим свойствам. Пигменты, синтезируемые микромицетами, относятся к дигидронафталиновому типу, макромицетами – к пирокатехиновому (Langfelder et al., 2003). Меланинодержущие грибы отличаются значительной устойчивостью к действию неблагоприятных, вплоть до экстремальных, экологических факторов. Эти пигменты, наряду с другими механизмами адаптации, обеспечивают реализацию определенной жизненной стратегии организма микроскопических грибов Чернобыльской зоны (Жданова, Василевская, 1988).

Изменение клеточной поверхности

Изменение отношения поверхности к объему – один из способов адаптации грибного мицелия к повышенному количеству кислородных радикалов во внешнем окружении. Действительно, при окислительном стрессе происходит слипание микобактерий, плазмодиев у миксомицетов, агрегация мицелия у *N. crassa* и высших грибов. Агрегация гиф – один из начальных этапов дифференцировки грибного организма. Интересно, что обычно стадия агрегации сопровождается биосинтезом пигментных молекул в мицелии (Hansberg, Aguirre, 1990). Подобное «слипание» гиф снижает доступ кислорода в клетки за счет уменьшения поверхности. Способность к агрегации выявлена и у гиф чернобыльских микроскопических грибов в условиях повышенной радиации (Иванова и др., 2005). А у высших грибов результатом такой адгезии является образование плодового тела. Было установлено, что в условиях недостатка углерода и азота также происходит агрегация гиф (Hansberg, Aguirre, 1990). Агрегация гиф часто наблюдаемое явление в условиях промышленного культивирования грибного мицелия. Однако механизмы этого процесса у грибов пока неясны (Bai et al., 2003).

Есть и другие способы блокирования доступа кислорода в клетки, например, увеличение степени вязкости полисахаридов клеточной стенки также снижает доступ в них кислорода (Hansberg, Aguirre, 1990). Наиболее защищенными от доступа кислорода являются покоящиеся грибные спо-

ры, снабженные толстой оболочкой, а также большим количеством низкомолекулярных метаболитов, включающих полиолы, трегалезу, пролин, пигменты и др. Показано, что пролин защищает клетки мицелия *Colletotrichum trifolii* от действия УФ, теплового и солевого стресса, H_2O_2 , предотвращая апоптоз (Chen, Dickman, 2005). Снижение доступа воды в споры вместе с растворенным в ней кислородом приводит к большей защищенности внутриклеточных структур. Уменьшение поверхности соприкосновения с воздухом может стабилизировать систему и поддержать жизнедеятельность организма (Hansberg, Aguirre, 1990).

Гидрофобины. Поверхность спор (конидий) многих видов грибов покрыта слоем тесно упакованных переплетающихся пучков палочек толщиной 5–10 нм, состоящих из гидрофобин (ГФ) – уникальных белков грибных организмов. Эти белки были найдены у большинства видов грибов, хотя для их выделения требовались не совсем типичные методы. Гидрофобины оказались новым классом белков, обладающих своеобразными физико-химическими свойствами (Wessels, 2000; Белозерская, 2001).

Было показано, что молекулы белка-гидрофобина секретируются в среду через апикальный кончик гиф при глубинном культивировании, но собираются в комплексы на разделе фаз клеточная стенка – воздух. Воздушные гифы и конидии, покрытые палочками ГФ, трудно смачиваются из-за присутствия гидрофобных слоев на наружной поверхности, что способствует как росту воздушных гиф, так и распространению спор грибов в окружающей среде (Wessels, 2000). Внутренняя поверхность гидрофобинных слоев, взаимодействующая с клеточной стенкой, гидрофильна. Мицелий мутантов, лишенных палочек ГФ, легко смачивается, что затрудняет их рост в воздушной среде. Мономеры ГФ, выделенные из палочек, могут спонтанно собираться в «палочки» на поверхности между гидрофобной и гидрофильной фазами.

Гены, кодирующие ГФ, обнаружены у представителей разных классов грибов. Они могут экспрессироваться на разных этапах жизненного цикла (Соколовский, Белозерская, 2000). ГФ нет у гиф, ассимилирующих пищу. Они появляются в процессе онтогенеза и формируют характерную пленку на поверхности воздушных гиф при образовании конидий, при адгезии гиф в процессе формирования плодовых тел базидиальных грибов, а также в процессе прикрепления гиф грибов-паразитов к стенке растения-хозяина (Wessels, 2000).

Молекулярные механизмы передачи стрессорных сигналов. Роль АФК

Из всех стрессорных факторов наиболее подробно исследовано действие света на дифференцировку *N. crassa*. К настоящему времени выяснено, что свет сине-фиолетовой области спектра (350–500 нм) у *N. crassa* регулирует интенсивность ветвления гиф, индуцирует каротиногенез, ускоряет процессы бесполого и полового воспроизведения, сдвигает циркадные ритмы конидиирования, а клювики женских органов полового воспроизведения (протоперитециев) проявляют положительный фототропизм (Соколовский, Белозерская, 2000). Выявлено, что в ходе передачи светового сигнала, запускающего процессы дифференцировки *N. crassa*, происходит синхронизация функций отдельных клеток по величине мембранного потенциала, в то время как на первых этапах световой трансдукции проявляется значительная гетерогенность электрофизиологических параметров плазматических мембран (Белозерская, 1997).

Частично охарактеризованы молекулярные механизмы экспрессии генов при дифференцировке *N. crassa*, вызванной стрессорными агентами – голодом по источникам глюкозы, азота и действием света (Соколовский, Белозерская, 2000). Обязательными участниками в списке генов, связанных с развитием *N. crassa*, являются гены, кодирующие компоненты АЗ, в первую очередь, гидрофобин и каротиноидных пигментов. Свет индуцирует в гифах экспрессию генов каротиногенеза и, как следствие, накопление нейроспораксантина и других пигментов, придающих мицелию оранжевую окраску. Клонированы и секвенированы гены, кодирующие фитоиндегидрогеназу (*al-1*), фитоинсинтетазу (*al-2*) и геранилгеранилпирофосфатсинтетазу (*al-3*). Эти гены контролируют три последовательные стадии синтеза каротиноидных пигментов при формировании конидий, хотя синтез каротиноидов можно индуцировать и в мицелии, подвергая его действию света и кислорода (Соколовский, Белозерская, 2000).

Фотоиндукция биосинтеза каротиноидов *N. crassa* является наиболее разработанной моделью для исследования процессов трансдукции светового сигнала. В лаборатории Перкинса выделены мутанты *white collar*. Мутанты *wc-1* и *wc-2* не различаются по фенотипу и, в отличие от дикого типа, образуют пигментированные конидии и белый мицелий (Соколовский, Белозерская, 2000). Мутанты *wc-1* и *wc-2* полностью

«слепы» в отношении ответов *N. crassa* на синий свет. Кроме того, электрофизиологические исследования показали, что у мутанта *wc-1* (мутант *wc-2* не исследовался) выявлены конститутивные изменения входного сопротивления, мембранного потенциала и электрической связи между клетками, а также блокированы изменения электрических реакций плазмалеммы под действием света (Белозерская, 1997). Таким образом, эти мутанты имеют плейотропный «слепой» фенотип. Продукты генов *white collar-1* и *white collar-2* – PAS-домен-содержащие полипептиды WC-1 и WC-2 – формируют гетеродимерный фоторецепторный комплекс White Collar Complex (WCC), который контролирует все светозависимые реакции у *N. crassa*, в том числе экспрессию генов *albino* (Крицкий и др., 2005) – рис. 4. Термин PAS является акронимом названий генов, в белковых продуктах которых впервые идентифицированы эти домены: *PER* (*period*) дрозофилы, *ARNT* (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) клеток млекопитающих и *SIM* (*single-minded regulator*) дрозофилы (Taylor, Zhulin, 1999). PAS-домены состоят из 100 – 120 аминокислотных остатков (а. о.) и их конформационные изменения служат частью регуляторной функции. Домены PAS обеспечивают межмолекулярную агрегацию полипептидов, в том числе с молекулами других белков, содержащих аналогичные домены (например, у *N. crassa* – WC-1 и WC-2). Несмотря на различия аминокислотной последовательности, эти домены отличаются сходством вторичной структуры и пространственной организации. Белки, содержащие домены PAS, участвуют в регистрации изменений интенсивности освещения, окислительно-восстановительного статуса, уровня кислорода и небольших лигандов, а также в оценке энергетического состояния клеток. Домены PAS присутствуют в таких белках как гистидин и серин/треонин-протеинкиназы, хеморецепторы, фоторецепторы таксиса и тропизма, белки циркадных ритмов, белки потенциал-зависимых ионных каналов, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, регуляторы ответов на гипоксию и регуляторы эмбрионального развития нервных клеток. Домены PAS связаны с различными регуляторными модулями в мультидоменных белках (Taylor, Zhulin, 1999). Показано, например, что у дрожжей, PAS-содержащая серин/треонин-протеинкиназа участвует в передаче сигнала глюкозного голода и глобальной перестройке метаболизма при переходе к стационарной фазе роста (Rutter et al., 2002).

Существует разновидность PAS-доменов – LOV-домены (Light, Oxygen, Voltage), связывающие флавиновый кофактор (ФМН или ФАД) и способные претерпевать окислительно-восстановительные превращения (Крицкий и др., 2005). Белок WC-1, содержащий LOV-домен представляет собой полипептид, состоящий из 1168 а.о. является фоторецептором синего света у *N. crassa*, а WC-2 – 530 а.о. – выполняет в этом фоторецепторном комплексе стабилизирующую функцию (Linden, 2002). В белке WC-2 отсутствует LOV-домен и содержится только один PAS-домен. Между первичной структурой белков существует значительное (47%) сходство, и на 26% их последовательности полностью идентичны. Димеризация WC-1 и WC-2 и образование WCC-комплекса не зависит от условий освещения (Linden, 2002).

Таким образом, функционально активный фоторецептор представляет собой комплекс полипептидов WC-1 и WC-2 и хромофора ФАД, нековалентно связанного с WC-1 (рис.4а) При этом непосредственную функцию восприятия фотона осуществляет именно ФАД. Присутствие в белках WC-1 и WC-2 «цинковых пальцев», т.е. мотивов узнавания GATA-последовательностей в составе промотора, например гена *al-3*, фермента биосинтетической цепи каротиногена (Белозерская, Соколовский, 2000), дает основание рассматривать их как вероятные факторы транскрипции (Крицкий и др., 2005).

У *N. crassa* образование каротиноидов сопряжено с действием света на экспрессию генов (*al-1*, *al-2*, *al-3*) и находится под контролем фоторецепторного комплекса WCC. Кислород и H₂O₂ стимулируют каротиногенез у *N. crassa* на свету (Iigusa et al., 2005). Интересно, что у мутантов *N. crassa* по каталазе *cat-3* и супероксиддисмутазе – *sod-1* (Michan et al., 2003; Iigusa et al., 2005) выявлены ускоренная продукция каротиноидов под действием света, а также снижение накопления транскрипта *al-1* при освещении в присутствии антиоксидантов. Циклогексимид не действовал на накопление мРНК генов *albino* в *sod-1*, т. е. для их экспрессии в *sod-1* не требуется новых молекул WC-1. Двойные мутанты *wc-1 sod-1* и *wc-2 sod-1*, как и *wc-1* и *wc-2* не синтезировали каротиноиды при освещении (Yoshida, Hasunuma, 2004), что указывает на регуляцию процесса синтеза каротиноидов у *sod-1* на уровне WCC-комплекса (Iigusa et al., 2005; Yoshida, Hasunuma, 2004). Редокс-состояние белка WC-1 в комплексе WCC может регулировать его ДНК-связывающую активность.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА	ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ЗАЩИТА	<ul style="list-style-type: none"> → СОД (<i>Natvig et al., 1996; O'Brien et al., 2004</i>) → каталазы (<i>Natvig et al., 1996; Michán et al., 2002</i>) → глутатионпероксидаза (<i>Меденцев и др., 2002; Inoue Y., Matsuda T., 1999; Missal et al., 2005;</i>) → гем-содержащие пероксидазы (<i>Davis, 2000</i>) → тиоредоксины (<i>Demasi et al., 2006</i>) → глутаредоксины (<i>Herrero et al., 2006</i>) → пероксиредоксины (<i>Wong et al., 2004; Demasi et al., al., 2006</i>) → сульфиредоксины (<i>Biteau et al., 2003</i>)
	АНТИОКСИДАНТЫ	<ul style="list-style-type: none"> → глутатион (<i>Jamieson, 1998; Perrone et al., 2005</i>) → аскорбат (<i>Georgiou et al., 2001; 2003</i>) → каротиноиды (<i>Белозерская, Соколовский, 2000;</i>) → токоферол (витамин Е) [<i>Munkers, 1992</i>] → меланины (<i>Langfelder et al., 2003</i>) → пролин (<i>Chen C., Dickman, 2005</i>)
	ДРУГИЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ	<ul style="list-style-type: none"> → агрегация гиф (<i>Hansberg, Aguirre, 1990</i>) → гидрофобины (<i>Wessels, 2000</i>) → хелаторы металлов (металлотионеины) фитохелатины, переносчики металлов) [<i>Tucker et al., 2004; Fujs et al., 2005</i>] → трегалоза (<i>Benaroudj et al., 2001</i>) → альтернативная оксидаза (<i>Меденцев и др., 2001, 2002</i>) → транспорт токсических соединений в вакуоли (<i>Jamieson, 1998</i>) → вакуолизация (<i>Jamieson, 1998</i>) → репарационные системы клетки (<i>Jamieson, 1998</i>)

Рис. 3. Компоненты антиоксидантной защиты грибной клетки.

Таким образом, АФК, по-видимому, регулируют светозависимый каротиногенез у *N. crassa* через WCC. Возможность участия АФК в регуляции светозависимого каротиногенеза у грибов рассматривалась еще в 1981 г. в работе Аверьянова и других (Аверьянов и др., 1981).

Факторы транскрипции и передача сигнала АФК у грибов

Факторы транскрипции Yap1, Skn7, Msn2, Msn4 являются основными регуляторами ответа на стресс у *S. cerevisiae*. (Rodrigues-Pousada et al., 2004). У дрожжей *S. cerevisiae* центральный фактор транскрипции из семейства Yap – Yap1 регулирует экспрессию генов антиоксидантных ферментов и компонентов, восстанавливающих клеточные тиолы. Благодаря этому дрожжи сохраняют резистентность к оксидантам типа H₂O₂, t-бутилгидропероксида, диамида, диэтилмалеата и кадмия (Delaunay et al., 2002).

Skn7 вызывает дополнительную к Yap1 экспрессию не менее 15 белков в ответ на действие H₂O₂ и t-бутирил гидропероксида, но не кадмия 97 (Lee et al., 1999). В отличие от Yap1, Skn7 не участвует в регуляции метаболических путей, генерирующих глутатион и НАДФН – основные восстановители клетки (Lee et al., 1999).

Msn2 и Msn4 в ответ на действие определенных стрессоров, включая окислительный стресс, активируют гены, промотор которых содержит элементы STRE (stress response elements, мотив CCCCT). Наряду с наличием общих с Yap1-регулоном генов, кодирующих 8 белков, Msn1/2 регулирует дополнительно небольшое количество антиоксидантных ферментов, несколько белков теплового шока, а также связан с метаболизмом убиквитина и деградацией протеосом (Hasan et al., 2002).

Выделяют два основных механизма, позволяющих контролировать передачу сигнала окислительного стресса на элементы транскрипции. Первый связан с регуляцией перемещения модифицированных под действием АФК факторов транскрипции из цитоплазмы в ядро (ядерная локализация), а второй основан на активации белка-регулятора фосфорилированием (Moye-Rowley, 2003). Как уже отмечалось, наиболее часто встречающиеся конформационные изменения белков связаны с окислительной модификацией цистеиновых остатков, как, например, показано у дрожжей *S. cerevisiae* при трансдукции сигнала H₂O₂ с участием глутатионпероксидазы Gpx3 (Orp1) (Delanay et al., 2002) Другой

способ быстрой регуляции переноса факторов транскрипции из цитоплазмы в ядро связан с каскадным фосфорилированием белков. Наиболее изученным каскадом фосфорилирования является МАП-киназный каскад (митоген-активируемая протеинкиназа). Например, модификация и ядерная локализация Msn2 и Msn4, связывающихся с элементами промоторов генов STRE и осуществляющих таким образом передачу сигнала окислительного стресса, происходит с участием двухкомпонентных гистидинкиназных модулей, МАП-киназных каскадов, протеинкиназы А, и по-видимому, некоторых фосфатаз (Aguirre et al., 2005). У дрожжей *Sch.pombe* сигнал окислительного стресса передается через специфическую активируемую стрессом протеинкиназу Spc1 и фактор транскрипции Atf1, а также через другой фактор транскрипции – Pap1 (аналог Yap1 *S.cerevisiae*) (Nguen et al., 2000).

У *N. crassa* сигнал АФК может передаваться через несколько систем: двухкомпонентную гистидинкиназную систему, сенсорный модуль которой включает PAS-домен, МАП-киназный каскад, G-белок-цАМФ-протеинкиназу А (Borkovich et al., 2004).

Таким образом, в ответ на действие различных оксидантов происходит специфическая АФК-зависимая модификация факторов транскрипции, позволяющая их перемещение в ядро и взаимодействие с промоторами определенных генов. Сигнал окислительного стресса передается через множественные пути трансдукции.

Заключение

Несмотря на существование общих закономерностей в ответных реакциях на стрессорные агенты у дрожжей и филаментных грибов, структура и функции генов у них могут различаться. В геноме у дрожжей *S. cerevisiae* около 6000 генов, а у филаментных грибов больше, например у *N. crassa* около 10000. Такое строение генома определяет целый ряд индивидуальных характеристик филаментных грибов, включающих патогенез, вирулентность, наличие разнообразных вторичных метаболитов, которые не выявляются у почкующихся дрожжевых форм. Все эти различия должны быть учтены при исследовании процессов дифференцировки. Однако, при рассмотрении механизмов передачи стрессорных сигналов живыми организмами, в том числе и стрессорных сигналов, приводящих к синтезу АЗ через определенные факторы транскрипции, обращает на себя внимание консервативность

элементов сигнальных каскадов у дрожжей, filamentных грибов и животных клеток (Lendgeler et al., 2000; Longo, Fabrizio, 2002). Наиболее подробно изучены молекулярные механизмы действия стрессорных агентов внешней среды на клетки дрожжей. Показано, что более половины генома *S. cerevisiae* связано с адаптацией клеток дрожжей к таким стрессам как голодание, изменение температуры, окислительный стресс, изменение pH и осмотичности среды (Causton et al., 2001). Передача стрессорного сигнала факторов внешней среды связана с модификацией и ядерной локализацией факторов транскрипции Msn2 и Msn4, определяющей их способность связываться с элементами промоторов соответствующих генов STRE и запускать экспрессию этих генов или подавлять ее. Модификация и ядерная локализация этих факторов транскрипции зависит от функционирования перечисленных выше консервативных путей трансдукции сигнала: двухкомпонентных гистидинкиназных модулей, МАП-киназных каскадов, функционирования протеинкиназы А, и по-видимому, некоторых фосфатаз (Aguirre et al., 2005). При этом следует учитывать, что при адаптации грибных клеток к действию внешних стрессоров имеется определенная специфичность ответа при действии каждого фактора (Causton et al., 2001). В ответ на действие различных оксидантов происходит специфическое изменение генной экспрессии, в первую очередь, генов определенных антиоксидантных механизмов для защиты клетки в экстремальной ситуации (Thorpe et al., 2004).

Список используемых сокращений

AЗ	– антиоксидантная защитная система
АФК	– активные формы кислорода
ГФ	– гидрофобины
ГТФаза	– гуанозинтрифосфатаза
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
МАПК	– митоген-активируемая протеинкиназа
НАДН	– никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотид-фосфат восстановленный
СОД	– супероксиддисмутаза
ФАД	– флавинадениндинуклеотид
ФМН	– флавинаденинмононуклеотид
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
AD	– домен активации
Cys	– цистеин
Grx	– глутатионпероксидаза
Gtx	– глутаредоксин

GSH	– глутатион
GSSG	– глутатиондисульфид
GSSR	– смешанный дисульфид (белок – глутатион)
LOV	– light, oxygen, voltage – домен, реагирующий на свет, редокс состояние среды и энергетическое состояние клетки
NLD	– домен нацеливания в ядро
NOX	– НАДФН-оксидаза
PAS	– домен димеризации
Pro	– пролин
Prx	– пероксиредоксин
Tyr	– тирозин
Trx	– тиоредоксин
WCC	– White Collar Complex, гетеродимерный комплекс <i>N. crassa</i>

Список литературы

1. Аверьянов А.А., Гужова Н.В., Мочалов В.В. Влияние света на биохимические свойства мицелия *Fusarium oxysporum* Schlecht // Микология и фитопатология. 1981. Т. 15. № 5. С. 361-365.
2. Белозерская Т.А. Гидрофобины грибов: структура и функции // Микология и фитопатология. 2001. Т. 35. № 1. С. 3-11.
3. Белозерская Т.А. Межклеточные взаимодействия в дифференцировке мицелиальных грибов // Биологические мембраны. 1997. Т. 14. № 6. С. 671-678.
4. Бурлакова Е.Б., Михайлов В.Ф., Мазурик В.К. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой стабильности генома. // Радиационная биология, радиэкология. 2001. Т. 41. № 5. С. 489-499.
5. Гамалей И.А., Клюбин И.В. Перекись водорода как сигнальная молекула // Цитология, 1996. Т. 38. № 12. С. 1233-1247.
6. Гесслер Н.Н., Леонович О.А., Рабинович Я.М., Рудченко М.Н., Белозерская Т.А. Сравнительное исследование компонентов антиоксидантной защиты в процессе роста мицелия дикого типа *Neurospora crassa* и мутантов white collar 1 и white collar 2 // Прикл. Биохим. Микробиол. 2006. Т. 42. № 3. С. 354-358.
7. Гесслер Н.Н., Соколов А.В., Быховский В.Я., Белозерская Т.А. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каротиноидсинтезирующих дрожжей *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* // Прикл. Биохим. Микробиол. 2002. Т. 38. № 3. С. 237-242.
8. Жданова Н.Н., Василевская А.И. Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях.

Киев: Наукова думка. 1988. 194 с.

9. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б.* // Окислительный стресс: биохимические и патофизиологические аспекты. М: Маик «Наука/Интерпериодика». 2001. 343 с.
10. *Иванова А.Е., Асланиди К.Б., Карпенко Ю.В., Белозерская Т.А.* Влияние перекиси водорода на рост мицелиальных микроскопических грибов из местообитаний с разным уровнем радиоактивного загрязнения // Микробиология. 2005. Т. 74. № 6. С. 756-765.
11. *Красновский А.А.*, мл. Фосфоресцентный анализ синглетного молекулярного кислорода в фотобиологических системах // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. № 5. С. 530-548.
12. *Крицкий М.С., Белозерская Т.А., Соколовский В.Ю., Филиппович С.Ю.* Фоторецепторный аппарат гриба *Neurospora crassa* // Мол. биол. 2005. Т. 34. № 8. С. 602-617.
13. *Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К.* Адаптация фитопатогенного гриба *Fusarium decemcellulare* к окислительному стрессу // Микробиология. 2001. Т. 70. № 1. С. 34-38.
14. *Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К.* Дыхательная активность и образование нафтохиноновых ферментов у гриба *Fusarium decemcellulare* в условиях окислительного стресса // Микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 176-182.
15. *Позмогова И.Н.* Воздействие физико-химических факторов на микроорганизмы // Итоги науки и техники. М.:ВИНИТИ, 1991. С. 5-70.
11. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С.* Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.- Наука. 1997. 156 с.
12. *Скулачев В.П.* Кислород в живой клетке: добро и зло // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 3. С. 4-10.
13. *Соколовский В.Ю., Белозерская Т.А.* Действие стрессоров на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития *Neurospora crassa* // Успехи биол. химии. 2000. Т. 40. С. 85-152.
14. *Феофилова Е.П.* Биохимическая адаптация грибов к температурному стрессу // Микробиология. 1994. Т. 63. № 5. С. 757-776.
15. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Гончаров Н.Г.* Миколикопин – новое лекарственное средство // Материалы конференции «Фундаментальные науки – медицине». Москва. 2005. С. 180-182.
16. *Aguirre J., Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W.* Reactive oxygen species and development of microbial eukaryotes // Trends in Microbiol. 2005. V. 13. № 3. P. 111-118.
17. *Angelova M.B., Pashova S.B., Spasiva B.K., Vassilev S.V., Slokoska L.S.* Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat // Mycol. Res. 2005. V. 109. № 2. P. 150-158.
18. *Bai Z., Harvey L.M., McNeil B.* Oxidative stress in submerged cultures of fungi // Critical Rev. Biotechnol. 2003. V. 23. № 4. P. 267-302.
19. *Benaroudj N., Lee H.D., Goldberg A.L.* Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 26. P. 2461-2467.
20. *Biteau B., Labarre J., Toledano M.B.* ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin // Nature. 2003. V. 425. № 6961. P. 980-984.
21. *Bloomfield G., Pears K.* Superoxide signaling required for multicellular development of Dictyostelium // J. Cell Sci. 2003. V. 116. № 16. P. 3387-3397.
22. *Borkovich K.A., Alex L.A., Yarden O. et al.* Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 1. P. 1-108.
23. *Brice E., Nantel A., Whiteway M.* Stress-induced Gene Expression in *Candida albicans*: absence of a General Stress Response // Mol Biol Cell. 2003. V. 14 N. 4. P. 1460–1467.
24. *Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L.* Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes // Mol. Biol. Cell 2001. V. 12. № 2. P. 323-337.
25. *Chary P., Natvig D.O.* Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock and development // J. Bacteriol. 1989. V. 171. № 5. P. 2646-2652.
26. *Chen C., Dickman M.B.* Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. V. 102. № 9. P. 3459-3464.
27. *Chen D., Toone W.M., Mata J., Lyne R., Burns G., Kivinen K., Brazma A., Jones N., Bohler J.* Global transcriptional response of fission yeast to environmental stress // Mol. Biol. Cell. 2003. V. 14. № 2. P. 214-229.
28. *Cobine P.A., McKay R.T., Zangger K., Dameron Ch.T., Armitage I.A.* Solution structure of Cu6 metallothionein -4221. from the fungus *Neurospora crassa* // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. № 21. P. 4213-4221.
29. *Cyrne L., Martins L., Fernandes L., Marinho S.* Regulation of antioxidant genes expression in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase // Free Rad. Biol. Med. 2003. V. 34. № 3. P. 385-393.
30. *Davis R.H.* Neurospora. Contributions of the

model organism. Part. 10. Stress. Oxford University Press. 2000. P. 155-169.

31. Delanay A., Pflieger D., Barrault M.-B., Vinh J., Toledano M.B. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox transducer in gene activation // Cell. 2002. V. 111. № 2. P. 471-481.

32. Demasi A.P.D., Pereira G.A.G., Netto L.E.S. Yeast oxidative stress response. Influence of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. FEBS J. 2006. V. 273. N 4. P. 805-816.

33. Drakulic T., Temple M.D., Guido R., Jarolim S., Breitenbach M., Attfield P.V., Dawes I.W. // FEMS Yeast Research. 2005. V. 5. P. № P. 1215-1228.

34. Dröge W. Free radicals and physiological control of cell function // Physiol. Rev. 2002. V. 82. P. 47-95.

35. Esterbauer H., Schaur J.R., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // Free Rad. Biol. Med. 1991. V. 11. № 1. 81-128.

36. Fabrizio P., Battistella L., Vardavas L., Gattazzo C., Liou L. Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Cell Biol. 2004. V. 166. № 7. 1055-1067.

37. Filomeni G., Ratiolo G., Ciriolo M.R. Cell signaling and glutathione redox system. Biochem. Pharmacol. 2002. V. 64. № 5. P. 1057-1064.

38. Foreman J., Demidchick V., Bothwell J.H., Mylona P., Meidema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., Davies J.M., Dolan L., Foreman J. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // Nature. 2003. V. 422. № 6930. P. 442-446.

39. Franca M.B., Panek A.D., Eleutherio E.C. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* // Cell stress chaperones. 2005. V. 10. № 3. P.167-170.

40. Fujs S., Gazdag Z., Polijak B., Stibilj V., Milacic R., Pesti M., Raspor P., Batic M. The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure // J. Basic Microbiol. 2005. V. 45. № 2. P. 125-135.

41. Gasch A.P., Spellman P.T., Kao S.M., Rarmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. // Mol. Biol. Cell 2000. V. 11. № 12. P. 4241-4257.

42. Georgiou D.C. Lipid peroxidation of *Sclerotium rolfsii*. A new look into the mechanism of sclerotial biogenesis in fungi // Mycol. Res. 1997. V. 101. № 3. P. 460-464.

43. Georgiou Ch.D., Tairis N., Sotiropoulou A. Hydroxyl radical scavengers inhibit lateral-

type sclerotial differentiation and growth in phytopathogenic fungi // Mycologia. 2000. V. 92. № 5. P. 825-834.

44. Georgiou Ch.D., Zervoudakis G., Tairis N., Komaros M. β-Carotene production and its role in sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii* // Fungal Gen. Biol. 2001. V. 34. № 1. P. 11-20.

45. Georgiou Ch.D., Petropoulou K.P. The ascorbic acid role in the differentiation of *Sclerotinia minor* // Mycopathologia. 2001. V. 154. № 1. P. 71-77.

46. Georgiou Ch.D., Petropoulou K.P. The role of erythroascorbate and ascorbate in sclerotial differentiation of *Sclerotinia sclerotiorum* // Mycol. Res. 2001. V. 105. № 11. P. 1364-1370.

47. Georgiou Ch.D., Zervoudakis G., Petropoulou K.P. Ascorbic acid might play a role in the sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii* // Mycologia. 2003. V. 95. № 2. P. 308-316.

48. Georgiou Ch.D., Patsoukis N., Papapostolou I., Zervoudakis G. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress // Integrative and Comparative Biol. 2006. V. 46. № 6. P.1-22

49. Gielfi A., Azevedo R., Lea P., Molina S. Growth inhibition of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach // J. Gen. Appl. Microbiol. 2003. V. 49. № 1. P. 63-73.

50. Golderer G, Werner ER, Leitner S, Grobner P, Werner-Felmayer G. Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum* // Genes Dev. 2001. V. 15. № 10. P. 1299-1310.

51. Giles G.I., Tasker K.M., Jacob C. Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. Free Rad. Biol. Chem. V. 31. № 10. P. 1279-1283.

52. Hancock J., Desikan R., Harrison J., Bright J., Hooley R., Neil S. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 8. P. 1711-1718.

53. Hansberg W., Aguirre J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen // J. Theoretical Biology. 1990. V. 142. № 2. P. 287-293.

54. Hansberg W., de Groot H., Sies H. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa* // Free Radic. Biol. Med. 1993. V. 14. № 2. P. 287-293.

55. Hasan R., Leroy C., Isnard A-D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. The control of yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. Mol. Microbiol. 2002. V. 45. № 1. P. 233-241.

56. Igusa H., Yoshida Y., Hasunuma K. Oxygen and hydrogen peroxide enhance light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa* // FEBS Lett. 2005. V. 579. № 18. P. 4012-4016.

57. Inoue Y., Matsuda T., Sugiyama K. Izawa S., Kimyra A. Genetic analysis of glutathione peroxidase

- in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 38. P. 27002-27009.
58. Jamieson D.J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. 1998. V. 14. № 7. P. 1511-1527.
59. Kayali H., Tarhan L. A comparative study of the metal ion uptake and antioxidant enzyme activities of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* as a function of external magnesium concentration // Prepar. Biochem. Biotechnol. 2005. V. 35. № 3. P. 217-230
60. Kawasaki L., Wysong D., Diamond R., Aguirre J. Two divergent catalase genes are differently regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 10. P. 3284-3292.
61. Kneer R., Kutchan T.M., Hochberger A., Zenk M.H. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin // Arch. Microbiol. 1992. V. 157, № 2. P. 305-310.
62. Lamarre C., LeMay J.D., Deslauriers N., Bourbonnais Y. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 23. P. 43784-43791.
63. Lara-Ortiz T., Reveros-Rosas H., Aguirre J. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans* // Mol. Microbiol. 2003. V. 50. № 3. P. 1241-1255.
64. Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G., Brakhage A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi // Fungal Genet. Biol. 2003. V. 38. № 2. P. 143- 58.
65. Lee J., Codon C., Languel G., Spector D., Garm J., Labarre J., Toledano M. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress regulons in yeast // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 23. P. 16040-16046.
66. Lee J.H., Choi I.Y., Kil I.S., Kim S.Y., Yang E.S., Park J.W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast // Biophys. Biochim. Acta. 2001. V. 1526. № 2. P. 191-198.
67. Lee J., Kwon E-S., Kim D-W., Cha J., Roe J.H. Regulation and the role of Cu, Zn-containing superoxide dismutase in cell cycle progression of *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem. Biophys. Res. Com. 2002. V. 297. № 4. P. 854-862.
68. Lengeler K.B., Davidson R.C., D'Sousa C., Harashima T., Shen W.-C., Wang P., Pan X., Waugh M., Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. № 3. P. 746-785.
68. Leuthner A., Ichinder C., Oechmen E., Koopmann E., Müller E., Kahmann R., Bötker M., Schreier P.H. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity of *Ustilago maydis* // Mol. Gen. Genomics. 2005. V. 272. № 6. P. 639-650.
70. Linden H. A. White collar protein senses blue light // Science. 2002. V. 297. № 5582. P. 777-778
71. Longo V.D., Fabrizio P. Regulation of longevity and stress resistance. // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. № 6. P. 903-908.
72. Longo V.D., Mitteldorf J., Skulachev V. Programmed and altruistic ageing // Nature Rev. Genet. 2005. V. 6. № 11. P. 866-872.
73. Machwe A., Kapoor M. Identification of the heat shock protein of *Neurospora crassa* corresponding to the stress-inducible peroxidase // Biochem. Biophys. Res. Com. 1993. V. 196. № 3. P. 692-698.
74. Maier J., Hecker R., Rockel P., Ninnemann H. Role of Nitric Oxide Synthase in the Light-Induced Development of Sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus* // Plant Physiol. 2001. V. 126, № 7. P. 1321-1330.
75. Malagnas F., Lalucque H., Lepère G., Silar P. Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina* // Fungal Genet. Bol. 2004. V. 41. № 11. P. 982-997.
76. Martchenko M., Alarco A.M., Harcus D., Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene // Mol. Biol. Cell. 2004. V. 15. № 2. P. 456-467.
77. Michán Sh., Lledias F., Hansberg W. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases // Free Rad. Biol. Chem. 2002. V. 33. № 4. P. 521-532.
78. Michán Sh., Lledias F., Hansberg W. Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3 null mutant strains // Eukaryotic cell. 2003. V. 2. № 4. P. 798-808.
79. Missal T.A., Cherry Y-Harris J.F., Lodge J.K. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. // Microbiology. 2005. V. 1511. № 8. P. 2573-2581.
80. Moskovitz J., Berlett B., Poston J.M., Stadtman E. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. V. 94. № 6. P. 9585-9589.
81. Moye-Rowley W.S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences // Eukaryotic cell. 2003. V. 2. № 3. P. 381-389.
82. Munkers K.D. Selection and analysis of superoxide dismutase mutants of *Neurospora crassa* // Free Rad. Biol. Chem. 1992. V. 13. № 2. P. 305-318.
83. Munhoz D.C., Netto L.E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast

against organic hydroperoxide insult. Catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 34. P. 35219-35227.

84. *Natvig D.O., Sylvester K., Dvorachek W.N., Baldwin J.L.* Superoxide dismutases and catalases in fungi In: *The Mycota.* / Eds. Brambl R., Marzluf G. Berlin: Springer-Verlag, 1996. P.191-209.

85. *Nedelcu A.M., Marcu O., Michod R.E.* Sex as a response to oxidative stress: a two-fold increase in cellular reactive oxygen species activates sex genes // Proc. Roy. Soc. B. 2004. V. 271. № 1548. P. 1591-1596

86. *O'Brien K.M., Dirmeyer R., Engle M., Poyton R.O.* Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese (MnSOD) or copper- and zinc-containing Superoxide dismutase (CuZnCOD) // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 50. P. 51817-51827.

87. *Park J.I., Grant C.M., Davies M.J., Dawes I.W.* The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. Generation of free radicals during freezing and thawing // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 36. P. 22921-22928.

88. *Perrone G., Grant C.M., Dawes W.* Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 16. № 2. P. 218-230.

89. *Piccirella S., Czegle I., Lizók B., Margittai E., Senesi S., Papp E., Csala M., Fulceri R., Csermely P., Mandl J., Benedetti A., Bánhegyi G.* Uncoupled Redox Systems in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum: Pyridine nucleotides stay reduced in an oxidative environment // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 8. P. 4671-4677.

90. *Piper P.W.* Molecular events associated with the acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol. Rev. 1993. V. 11. № 4. P. 339-355.

91. *Pócsi I., Miskei M., Karanyi Z., Emri T., Ayoubi P., Pusztahelyi T., Balla G., Prade R.A.* Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures – linking transcription changes to cellular physiology // BMC Genomics. 2005. V. 6. P. 182-200.

92. *Poole L.B., Karplus P.A., Claiborne A.* Protein sulfenic acids in redox signalling // Annual Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. V. 44. P. 325-347.

93. *Rayner A.D.M., Watkins Z.R., Beeching J.R.* Self-integration – an emerging concept from the fungal mycelium / The fungal colony. Eds. by N.A.R.Gow, G.D.Robson, G.M. Gadd. Cambridge University press, 1999. P. 1-24.

94. *Rodrigues-Pousada C., Nevitt T., Menezes R.* Role of Yap family of b-ZIP transcription factors // FEBS J. 2005. V. 272. № 11. P. 2639-2647.

95. *Rutter J., Probst B.L., McKnight S.L.* Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase // 2002. Cell. V. 111. № 1. P. 17-28.

96. *Severin F.F., Hyman A.A.* Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae* // Curr. Biol. 2002. V. 12. № 7. P. R233-R235.

97. *Shenton D., Grant C.M.* Protein thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // Biochem. J. 2003. V. 374. № 2. P. 513-519.

98. *Schroeder W.A., Johnson E.A.* Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma* // J. Gen. Microbiol. 1993. V. 139. № 4. P. 907-912.

99. *Sidery M., Georgiou Ch.D.* Differentiation and hydrogen peroxide production in *Sclerotium rolfsii*. are induced by the oxidizing growth factors, light and iron // Mycologia. 2000. V. 92. № 6. P. 1033-1042.

100. *Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Hyfer M.* Oxidative stress in microorganisms. Microbial vs. Higher Cells – Damage and defenses in relation to cell aging and death // Folia microbiol. 1999. V. 44. № 6. P. 587-624.

101. *Song N-K., Jeong Ch-S., Choi H-S.* Identification of nitric oxide synthase in *Flammulina velutipes* // Mycologia. 2000. V. 92. № 6. P. 1027-1032.

102. *Taylor B.L., Zhulin I.B.* PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. V. 63. № 3. P. 479-506.

103. *Takai Y., Sasaki T., Makozaki T.* Small GTP-binding proteins. // Physiol. Rev. 2001. V. 81. P. 153-208.

104. *Tanaka T., Izawa S., Inoue Y.* GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae* // J Biol. Chem. 2005. V. 280. № 23. P. 42078-42087.

105. *Thorpe G.W., Fong C.S., Alic N., Higgins V.J., Dawes I.W.* Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative stress-response genes // Proc. Natl. Acad. Sci. 2004. V. 101. № 17. P. 6564-6569.

106. *Tokatlidis K.* A disulfide relay system in mitochondria // Cell. 2005. V. 121. N 7. P. 965-967.

107. *Toledano M.B., Delaunay A., Monceau L., Tacnet F.* Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules // Trends Biochem. Sci. 2004. V. 29. № 7. P. 351-357.

108. *Toledo I., Hansberg W.* Protein oxidation related to morphogenesis of *Neurospora crassa* // Exp. Mycol. 1990. V. 14. № 1. P. 184-189.

109. *Toledo I., Rangel P., Hansberg W.* Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 319. № 3. P. 519-524.

110. Trotter E., Grant C.M. Overlapping roles of cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Eukariot. Cell. 2005. V. 4. № 2. P. 392-400.
111. Tucker S.L., Thornton Ch.R., Tasker K., Jakob K., Giles G., Egan M., Talbot M. A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea* // The Plant Cell. 2004. № 6. P. 1575-1588.
112. Vivancos A.P., Castillo E.A., Biteau B. et. al. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂ sensing by the antioxidant Pap1 pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. V. 102. № 25. P. 8875-8880.
113. Wessels J.G.H. Hydrophobins, unique fungal proteins // Mycologist. 2000. V. 14. № 4. P. 153-159.
114. Winyard P.J., Mooday Ch.J., Jacob C. Oxidative activation of antioxidant defence. // Trends Biochem. Sci. 2005. V. 30. № 8. P. 452-461.
115. Wong C.M., Siu K.L., Jin D.Y. Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 22. P. 23207-23213
116. Woo H.A., Jeong W., Chang T.S., Park K.J., Park S.J., Yang J. S., Rhee S.G. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. // J.Biol.Chem. 2005. V. 280. № 5. P.3125-3128.
117. Yoshida Y., Hasunuma K. Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 8. P. 6986-6993.
118. Zhang L., Onga K., Imai R., Fukuda R., Ohta A. Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2003. V. 307. №2. P. 308-314.

О.В. Камзолкина, Е.В. Матросова

МИТОХОНДРИИ ГРИБОВ

Введение

Митохондрии (Мтх) – самовоспроизводящиеся полуавтономные двумембранные органоиды клетки, содержащие собственный геном. Митохондриальный геном, в отличие от ядерного, представляет собой одну или несколько кольцевых, редко линейных, молекул ДНК (мт-ДНК). В настоящее время большое внимание уделяется секвенированию нуклеотидных последовательностей при определении монофилетического или полифилетического происхождения тех или иных групп грибов (Bullerwell et al., 2003 a, b).

Митохондрии характерны за малым исключением для всех эукариотических клеток, как аутотрофных (фотосинтезирующие растения), так и гетеротрофных (животные, грибы) организмов. Митохондрий нет у некоторых облигатных анаэробных грибов, обитающих в желудке коров и других травоядных животных (Orpin, 1993; Marvin-Sikkema et al., 1994).

Основная функция митохондрий связана с окислением органических соединений и использованием освобождающейся при распаде этих соединений энергии в синтезе молекул АТФ – основной энергетической единицы всего царства живого, поэтому митохондрии называют энергетическими станциями клетки. Митохондрии

дрожжей выполняют, кроме основной, следующие функции (Feldmann, 2005):

- синтез и десатурацию жирных кислот и липидов;
- биосинтез эргостеролов;
- ответ на стресс и адаптация к нему;
- локализация ферментов синтеза отдельных аминокислот и дикарбоновых кислот, пиримидиновых и пуриновых оснований, порфирина и птерицинов;
- мобилизация гликогена;
- продукция промежуточного метаболизма.

Митохондрии можно наблюдать в живых неокрашенных клетках, так как они обладают достаточно высокой плотностью. Благодаря содержанию дыхательных ферментов, наблюдение митохондрий в основном базируется на гистохимических методах, включающих в себя аккумуляцию красителей (соли тетразолия, которые окисляются с помощью сукцинатдегидрогеназы, фермента митохондрий) или потенциал-зависимых и ДНК-связывающихся флуорохромов (родамины и метатрекеры соответственно).

В живых клетках МТХ могут двигаться, перемещаться, сливаться друг с другом, делиться и распадаться на фрагменты, часть из которых может быть лишена нуклеоида (Polyakov et al., 2003).

Первые наблюдения митохондрий у гриба *Pustularia versispora* (*Peziza vesiculosa* Bull.*) относятся к 1911 году (Guilliermond, 1911), несколько позже описаны митохондрии у дрожжей (Guilliermond, 1913). С 1938 года по 1950 год в печати вышла серия работ русского ученого М.Н. Мейселя по изучению функциональной морфологии дрожжевых организмов, в которых большое внимание было уделено структуре и функциям митохондрий (Мейсель, 1950). Исследования в этом направлении были продолжены и расширены благодаря использованию биохимических и молекулярно биологических методов изучения митохондрий дрожжей в серии работ отечественных ученых Котельниковой и Звягильской (Котельникова, Звягильская, 1973; Звягильская, Котельникова 1991). Исследованию структуры митохондрий дрожжей и некоторых мицелиальных грибов *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge посвящены единичные исследования, проведенные коллегами за рубежом (Alberghina et al., 1974; Beckett et al., 1974; Hawley and Wagner, 1967; Hoffman and Avers, 1973; Moore and McAlear, 1963).

В 1998 году в США были получены гистохимические и ультраструктурные характеристики митохондрий 7 видов грибов, являющихся представителями разных таксонов: Oomycota (*Phytophthora erythroseptica* Pethybr.), Zygomycota (*Basidiobolus ranarum* Eidam, *Mucor mucedo* Fresen.), Ascomycota (*Sordaria fimicola* (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.), Deuteromycota (*Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc.) и Basidiomycota (*Schizophyllum commune* Fr.) (Weber et al., 1998).

За последние 10 лет, благодаря использованию методов молекулярной биологии, получены доказательства участия митохондрий в старении клеток многоклеточных (в том числе мицелиальных грибов) и одноклеточных организмов (простейшие, дрожжи, бактерии) (Osiewacz, 2002; Osiewacz, Borghouts, 2000). Митохондрии являются объектом пристального внимания ученых 21 века. Обнаружено сходство в генной регуляции процессов синтеза митохондриальных белков у мицелиальных грибов и животных, влияющих на продолжительность жизни, это обстоятельство ставит грибы на одно из первых мест как модельной системы в изучении процессов старения.

В настоящем обзоре рассмотрены наиболее значимые проблемы, касающиеся в основном ми-

тохондрий мицелиальных грибов: особенности морфологии и структуры митохондрий, их роль в старении клеток, транспорт, деление, связь с другими органеллами клетки и др. «Мицелиальными» грибами в зарубежной литературе называют сборную группу грибов из разных систематических таксонов, имеющую мицелиальный таллом (одноклеточный или многоклеточный). Грибы из отделов Ascomycota и Basidiomycota имеют септированный многоклеточный мицелий, в котором септы, имеющие поры, ограничивают передвижение крупных органелл в мицелии. Так называемая ценотическая организация таллома грибов предполагает определенную специализацию и дифференциацию клеток в процессе жизненного цикла даже в пределах одной колонии. Мицелиальные грибы представляют собой интересную модель для исследования структуры вообще и митохондрий в частности, так как в пределах мицелиальной колонии присутствуют разновозрастные клетки (молодые, старые и даже мертвые клетки), выполняющие разные функции и имеющие разную структуру. Исследований, посвященных изучению митохондрий мицелиальных грибов, полученных примерно на полутора десятке видов грибов и грибоподобных протистов, ничтожно мало по сравнению с царством грибов, насчитывающем около 1,5 млн. видов. Дрожжи, часто называемые в зарубежной литературе одноклеточными грибами, которые достаточно хорошо изучены в разных аспектах, будут использованы нами для сравнительных характеристик. Мы практически не будем останавливаться на вопросах организации митохондриального генома и биохимии митохондрий, так как этим вопросам посвящены отдельные монографии и обзоры (Дьяков и др. 2005; Звягильская, Котельникова 1991; Lang et al., 1999; Paquin et al., 1997). Мы также не рассматриваем вопросы, связанные с эндосимбиотическим происхождением митохондрий, так как они подробно изложены в следующих обзорах (Logan, 2003, Scheffler, 2000).

Число митохондрий на клетку

Совокупность митохондрий в клетке называют хондриом. В клетках грибов хондриом представлен разрозненными многочисленными митохондриями, причем наблюдается большая концентрация отдельных митохондрий в апикальной клетке гифы. У одноклеточных грибов митохондрии расположены довольно равномерно. Подсчет митохондрий в живых клетках

* здесь и далее приводятся названия грибов по Index Fungorum

грибов затруднен, так как их размеры часто находятся на границе разрешающей способности оптического микроскопа. Использование люминесцентной микроскопии несколько расширяет возможности количественного учета при использовании потенциал зависимых флуорохромов, родаминов, которые накапливаются в матриксе митохондрий, синтезирующих АТФ. Наиболее надежные результаты были получены с использованием плазмиды, которую встраивают в геном митохондрий с последующей экспрессией зеленого флуоресцирующего белка mtGFP. Использование интегрированной в геном митохондрий флуоресцентной метки дало возможность исследовать поведение митохондрий в клетках мицелия *in vivo* и *in vitro* у сумчатого гриба *Neurospora crassa* (Fuchs et al., 2002) и у базидиомицета *Ustilago maydis* (DC.) Corda (Spelling et al., 1996). По данным литературы и нашим наблюдениям, количество митохондрий в клетках мицелиальных грибов достигает нескольких десятков (Weber et al., 1998; Камзолкина, 1996), но не тысячи, как в клетках растений. В клетках *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen – 5–10 трубчатых митохондрий (Stevens, 1977).

Использование серийных ультратонких срезов с последующей реконструкцией хондриома показало, что в ряде случаев многочисленные отдельные митохондриальные профили, выявляемые на одиночных срезах в клетках грибов, представляют собой поперечные сечения одной или нескольких ветвящихся гигантских митохондрий. Так, в клетках диплоидного штамма iso-N *S. cerevisiae* после реконструкции серии ультратонких срезов почкующейся клетки была обнаружена гигантская митохондрия длиной 50–60 мкм и диаметром 0,2–0,6 мкм (Hoffman and Avers, 1973). Гигантские митохондрии найдены в зооспорах хитридиомицета *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang. (Lange, Olson, 1976) и, следовательно, число митохондрий на одну клетку, по-видимому, меньше, чем полагали раньше.

Число митохондрий в клетках дрожжей зависит от фазы роста, стадии клеточного цикла и условий культивирования (Мейсель, 1950; Звягильская, Котельникова 1991). При различных условиях роста в клетках дрожжей присутствует от одной до десятка удлинённых митохондрий на клетку (Hoffman and Avers, 1973). В стационарной фазе роста в гаплоидных клетках *S. cerevisiae* можно наблюдать до 50 отдельных органелл (Stevens, 1977). После слияния гаплоидных клеток (сингамии) наблюдали слияние отдельных митохондрий в одну гигантскую ветвящуюся

структуру, при этом происходило объединение нуклеоидов отдельных митохондрий (Miyakawa et al., 1984). Единая сеть сохранялась до конца второго деления мейоза, далее наблюдали деление хондриома на фрагменты. Четыре наиболее крупных фрагмента в виде колец локализованы в зоне четырех гаплоидных ядер. В процессе формирования аскоспор они распадаются на несколько десятков мелких структур. Таким образом, у *S. cerevisiae* митохондриальный цикл находится в прямой зависимости от клеточного цикла.

Морфология и ультраструктура митохондрий

Митохондрии – изменчивые и пластичные органеллы, их размер и форма могут сильно варьировать в зависимости от специфичности штаммов, фазы жизненного цикла и условий роста гриба.

Размеры митохондрий непостоянны у разных видов. Обычно митохондрии представляют собой мелкие (длина 0,5–3 мкм, редко до 25 мкм и толщина до 0,5 мкм) внутриклеточные гранулярные или нитевидные, иногда ветвящиеся образования, располагающиеся в тех местах клетки, где необходимо использовать энергию для любых жизненных процессов (Weber et al., 1998).

В анаэробных условиях митохондрии присутствуют в виде маленьких органелл, называемых «промитохондриями» (Criddel and Schatz, 1969). В аэробных условиях, когда окислительное фосфорилирование является основным источником АТФ, митохондрии становятся крупнее и длиннее и локализованы по периферии клетки (Hoffman and Avers, 1973). Локализация митохондрий обусловлена близостью к возможным местам нахождения кислорода, а вытянутая форма облегчает быструю передачу энергии по клетке. В процессе мейоза и споруляции, митохондрии сливаются, образуя ветвящуюся сеть, которая окружает делящееся ядро (Zickler and Olson, 1975).

Исследование ультратонких срезов митохондрий различных дрожжевых организмов (Бирюзова, 1993; Lloyd et al., 1974; Stevens, 1977) позволило отметить принципиальное сходство их тонкой структуры с таковой высших организмов. Они отграничены от цитоплазмы двумя триплетными мембранами. В матриксе митохондрий локализованы митохондриальный геном, рибосомы, ферменты цитратного цикла, осуществляющего полное окисление углеродсодержащих соединений, ферменты цикла

мочевины и низкомолекулярные полифосфаты. Последние были впервые обнаружены у дрожжей *S. cerevisiae* (Пестов, 2004) и у мицелиальных базидиомицетов *Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéf. (Камзолкина, 2005).

Наружная мембрана митохондрий сферопластов дрожжей *S. cerevisiae* может быть связана с цитоплазматическими рибосомами или полисомами 80 S (Kellems and Butow, 1972, 1974; Kellems et al., 1974, 1975). Количество рибосом зависит от фазы роста, в стационарной фазе роста их меньше (приблизительно в 4 раза), чем в фазе логарифмического роста. Показано, что эти рибосомы, размер которых 150 Å, участвуют в синтезе митохондриальных белков (Fünfschilling and Rospert, 1999).

Внутренняя митохондриальная мембрана способна в зависимости от напряженности энергетического обмена образовывать большее или меньшее число складок – крист, которые увеличивают ее активную поверхность. Кристы – наиболее лабильная структура дрожжевых митохондрий, точно реагирующая на условия аэрации культуры грибов. Они редуцируются при анаэробном развитии дрожжей (Мейсель, 1950).

Основные отличия в ультраструктуре митохондрий у грибов из разных систематических групп касаются строения крист (Alexopoulos et al., 1996). У отделов Zygomycota, Ascomycota и Basidiomycota кристы пластинчатые, за некоторым исключением (Moore and McAlear, 1963; Beckett et al., 1974). У отдела Oomycota кристы трубчатые (Grove and Bracker, 1970). Такого типа кристы характерны для многих высших растений.

Молекулярные основы морфологии митохондрий

Молекулярно-биологические исследования по изучению морфологии митохондрий проводили в основном на грибах с хорошо изученным отсеквенированным геномом: *Schizosaccharomyces pombe* Lindner, *S. cerevisiae*, *Neurospora crassa* и *Podospora anserina* (*Podospora pauciseta* (Ces.) Traverso).

Эти организмы – часто используемые объекты для изучения клеточных процессов.

Было показано, что морфологию митохондрий у дрожжей определяют белки наружной мембраны митохондрий.

Это Mmm 1 белок (mitochondrial morphology maintenance, Burgess et al., 1994), белок Mdm p

у почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* (mitochondrial distribution and morphology), Mdm 1p (McConnell and Yaffe, 1993), Mdm 10p (Sogo and Yaffe, 1994), Mdm 12p (Berger et al., 1997). Штаммы дрожжей, у которых отсутствует один из этих белков, имеют гигантские митохондрии.

Ген Mmm1 чрезвычайно важен для понимания морфогенеза митохондрий дрожжей и мицелиальных грибов. Мутация по нему приводит к образованию митохондрий с измененной морфологией – огромных сферических митохондрий вместо трубчатых, образующих сеть в периферической части клетки у *S. cerevisiae* (Burgess et al., 1994). Mmm1 белок интегрирован в наружную митохондриальную мембрану, он осуществляет взаимодействие с внутренней мембраной, играет роль в наследовании мтДНК у дрожжей и необходим для поддержания нормальной формы митохондрий. По-видимому, он не связан с актиновыми филаментами, так как изолированные митохондрии из мутантного штамма *mmm1* не показывают связи с актиновыми филаментами *in vitro*.

Родственные динамину белки, зависящие от ГТФ (динамин животных, Takei et al., 1995), которые отвечают за морфологию митохондрий, участвуют в процессах деления и распределения митохондрий в клетке, это – Mgm 1p у *S. cerevisiae* (mitochondrial genome maintenance) и Msp 1p (mitochondrial spindle pole) у делящихся дрожжей *Sch. pombe* (Pelloquin et al., 1998), а также трансмембранная ГТФаза Fzo 1p (fuzzy onions) и Dnm 1p (Otsuga et al., 1998). Клетки, у которых отсутствует Mgm 1p, содержат агрегированные митохондрии (Jones and Fangman 1992). Fzo 1p ГТФаза регулирует слияние митохондрий, и ее утрата вызывает фрагментацию митохондриальной сети (Hermann et al., 1998). Dnm 1p требуется для распределения сети митохондрий в кортикальном слое цитоплазмы (Otsuga et al., 1998).

У мицелиальных грибов обнаружены аналогичные белки.

Мутация *mmm1* гена у *N. crassa* приводит к температурочувствительному медленно растущему фенотипу с измененной морфологией митохондрий и женской стерильностью (Prokisch et al., 2000). По-видимому, нормальная морфология митохондрий является необходимым условием для прохождения процессов дифференциации культуры, формирования крючка и аскоспор. Мутантные клетки имели аномальные гигантские митохондрии на всех стадиях асексуального цикла, при этом вещества, оказывающие действие на деполимеризацию актина, не влияли

на морфологию митохондрий. Белок Mmm1, по мнению исследователей, – фактор, имеющий огромное значение для морфологии митохондрий, независимо от природы цитоскелета, участвующего в их транспорте (Prokisch et al., 2000).

Мутации гена, отвечающего за синтез мембранного рецептора, связанного с импортом белков из цитозоля в митохондрии (ТОМ70), приводят к появлению огромных митохондрий у *P. pauciseta* (Jamet-Vierny et al., 1997) и *N. crassa* (Grad et al., 1999). Возможно, этот рецептор контролирует включение белка МММ1 в наружную мембрану митохондрий, поэтому инактивирование ТОМ70 приводит к снижению уровня МММ1, что отражается на морфологии митохондрий (Prokisch et al., 2000). Сходными функциями у *P. pauciseta* обладает другой белок Mdm10 (Jamet-Vierny et al., 1997). Делеция другого гена Том20 приводила к потере крист в митохондриях у мутанта у *N. crassa* (Perkins et al., 2001).

Таким образом, молекулярные факторы, ответственные за морфологию митохондрий, – многофункциональные белки, локализованные в их наружной мембране, за синтез которых отвечают ядерные гены. Тот факт, что природа этих белков общая у одноклеточных (дрожжи) и многоклеточных организмов (мицелиальные грибы и животные), позволяет говорить о консервативном характере механизмов, поддерживающих морфологию митохондрий и контролирующих процессы деления и слияния.

Геном митохондрий

ДНК в митохондриях представлена циклическими молекулами, не образующими связь с гистонными белками. Митохондриальная ДНК очень однородна, отличия заключается в величине интронов и нетранскрибируемых участков. Все митохондриальные ДНК представлены множественными копиями, собранными в кластеры. В митохондриях имеется стандартный набор генов: гены ферментов дыхательной цепи, участвующие в процессах окислительного фосфорилирования, гены рРНК, тРНК и гены АТФаз. Митохондриальная ДНК собрана в отдельную зону – нуклеоид. В митохондриях грибов может быть от 1 до 10 нуклеоидов. Синтез митохондриальной ДНК не связан с синтезом ДНК в ядре. В клетках дрожжей *S. cerevisiae* – до 22 митохондрий, имеющих по четыре генома. В отличие от позвоночных животных, у растений, грибов и простейших мтДНК содержат до 80% некодирующих последовательностей. У разных видов

организмов порядок генов в геномах митохондрий отличается. Несмотря на то, что в геномах митохондрий млекопитающих и дрожжей содержится приблизительно одинаковое количество генов, размеры дрожжевого генома в 4–5 раз больше – около 80 тыс. пар нуклеотидов, у *P. pauciseta* – 100 тыс. пар нуклеотидов. Хотя кодирующие последовательности мтДНК дрожжей высоко гомологичны соответствующим последовательностям у человека, дрожжевые мРНК дополнительно имеют 5'-лидерную и 3'-некодирующую области, как и большинство ядерных мРНК (Дымшиц, 2002).

Биогенез митохондрий

Биогенез митохондрий требует координированных действий ядерного и митохондриального геномов (Grivell, 1989). Гены, кодирующие структурные белковые компоненты митохондрий, локализованы в ядре. Импорт белков в митохондрии является комплексным процессом, требующим два отдельных механизма, локализованных на наружной и внутренней мембранах и состоящих из большого количества компонентов (Pfanter and Neupert, 1990). Механизм транслокации наружной митохондриальной мембраны состоит, по крайней мере, из 6 компонентов, организованных в комплекс (Moczko et al., 1993). Белки MOM19 и MOM72 митохондрий *N. crassa*, как было показано ранее, вовлечены в начальный этап узнавания и связывания предшественников белков в митохондриальном пространстве (Sölner et al., 1989; 1990). Было показано, что белок MOM22 обеспечивает проникновение этих предшественников белков и их включение в наружную мембрану митохондрий (Kiebler et al., 1993). По крайней мере часть этого сайта «general insertion pore» (GIP) состоит из белков MOM38 и MOM7/MOM8 (Sölner et al., 1992). Недавно было показано на мутанте *N. crassa*, что дефицит по MOM19 приводит к ограничениям роста клеток при сохранении жизнеспособности. Количество митохондриальных профилей явно не меняется, но митохондрии мутанта имели дефицит по кристам, цитохромам и активности синтеза белка (Harkness et al., 1994). При этом наблюдали снижение импорта большинства белков из суборганелловых компартментов в изолированные митохондрии мутантов. Кроме этого, была выяснена функциональная связь MOM19 и MOM22. Так как истощение MOM19 у мутанта *N. crassa* вызывало снижение уровня MOM22. Таким образом, была показана роль рецептора MOM19 в

биогенезе митохондрий и особенно в формировании компетентности митохондрий в дыхании и фосфорилировании (Harkness et al., 1994).

Дыхательная цепь митохондрий

Освободившиеся в процессе окисления в цикле Кребса электроны, акцептированные на коферментах, переносятся затем в дыхательную цепь, локализованную на внутренней мембране митохондрий, где они соединяются с молекулярным кислородом, образуя молекулы воды. Электрон-транспортная дыхательная цепь митохондрий грибов не отличается от таковой у высших растений. В ее состав входят три белковых комплекса, встроенных во внутреннюю мембрану (1, 3 и 4), и две подвижные молекулы-переносчики: убихинон (кофермент Q) и цитохром с.

Для большинства организмов во внутренней мембране митохондрий идентифицировано пять белковых комплексов, обеспечивающих транспорт электронов на кислород (Kennell, 2005):

- 1 – НАДН-дегидрогеназа
- 2 – сукцинатдегидрогеназа
- 3 – убихинол-цитохром с-редуктаза
- 4 – цитохром с-оксидаза
- 5 – H⁺-транспортирующая АТФ-синтаза.

Несмотря на то, что большинство грибов имеют подобную систему переносчиков электронов, у некоторых дрожжей (*S. cerevisiae*, *Sch. pombe*) отсутствует комплекс 1. При этом у грибов могут быть дополнительные компоненты: альтернативная НАДН-дегидрогеназа и альтернативная оксидаза (Joseph-Horne et al., 2001).

Активированные формы кислорода (АФК) и их связь с дыханием грибов

Известно, что у аэробных организмов под действием УФ радиации или ряда ферментативных систем (оксидазы, пероксидазы) может происходить образование активированных форм кислорода. Часто АФК образуются в электрон-транспортных цепях митохондрий. Это вызывает появление свободных радикалов, инактивацию ферментов и белков, перекисное окисление липидов, нарушение целостности мембран. В конце концов, подобные процессы приводят к клеточной смерти. Количество оксидов и перекисное окисление липидов увеличивается в ходе апоптоза (Bredesen, 1995). В результате происходит активация каспаз и убийство клетки.

У гриба *P. pauciseta* АФК, вызывающие окислительный стресс, вносят наиболее весомый вклад в старение клеток мицелия.

В процессе старения природных штаммов *P. pauciseta* происходит утечка электронов в дыхательной цепи и образование АФК. В первую очередь они влияют на стабильность митохондриального генома (Osiewacz and Borghouts, 2000). Поскольку митохондрии являются полуавтономными органеллами и тесно связаны с ядром, то нарушения функций митохондрий представляют опасность для целостности ядерной ДНК.

В ответ на разрушение природных АФК у аэробно растущих организмов существует определенная система защиты: прежде всего это протекторные белки, которые удаляют АФК или ионы металлов. Затем включаются ферменты, которые удаляют поврежденные компоненты (Moradas-Ferreira et al., 1996). Антиокислительные ферменты – цитохром с пероксидаза, каталаза и супероксид дисмутаза. Последний фермент вовлечен в конверсию супероксид аниона до пероксид аниона и перекиси водорода, которые разрушаются далее каталазами и пероксидазами (Jamieson, 1998). У дрожжей описаны две изоформы цитоплазматической Cu/Zn и митохондриальная Mn супероксиддисмутаза, которые играют важную роль в защите клеток от окислительного стресса (Gralla and Valentine, 1991).

Митохондрии и тепловой шок

Окислительный стресс и антиокислительные ферменты играют главную роль в гибели клеток дрожжей при высоких температурах (Rikhvanov et al., 2003). Мутации в генах, ответственных за синтез антиокислительных ферментов у *S. cerevisiae*, повышают чувствительность клеток к высокой температуре. Более интенсивная экспрессия генов каталазы и супероксиддисмутаза повышают термоустойчивость. Анаэробные условия в 500–20000 раз повышают термотолерантность, что связано с мгновенным исчезновением активированных форм кислорода.

Известно, что в ответ на повышение температуры клетка отвечает синтезом белков теплового шока – hsp белков, шаперонов (Parsell, Lindquist, 1993). Они образуются в матриксе митохондрий. Для их освобождения необходима энергия АТФ (Parsell, Lindquist, 1993). Дефицит АТФ в клетках представляет настоящую опасность при действии температурного шока (Nguyen, Bensaude, 1993).

Влияние ингибиторов цитохром с оксидазы (азид, цианид) на термотолерантность разных видов дрожжей показало преимущество клеток, способных к ферментации при росте на глюко-

зе и получении энергии за счет этого процесса, а не за счет окислительного фосфорилирования (*S. cerevisiae*, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhou; Rikhvanov et al., 2003). Причем дыхательные яды ингибируют, кроме того, активность антиокислительных ферментов (каталазы (Brown and Peterson, Salin, 1995), пероксидазы (Takeda et al., 1998) и супероксиддисмутазы (Lee et al., 1981)). Вероятно, влияние теплового шока на неферментативные дрожжи объясняется еще снижением активности этих ферментов (Rikhvanov et al., 2003).

Наследование митохондрий

Сохранение целостности митохондриального генома в процессе наследования очень важно для дыхательной функции. Факторы, контролирующие сегрегацию митохондриального генома, мало изучены. Для большинства высших эукариотических организмов характерно однопородительское наследование мтДНК (McAlpine et al., 2001). У мицелиальных грибов из класса Ascomycota *Neurospora tetrasperma* Shear & B.O. Dodge и *N. crassa* показано однопородительское наследование митохондрий (Lee and Taylor, 1993, Mannella et al., 1979). Как в случае слияния специализированных половых клеток (трихогины и конидии), так и при слиянии гомокариотических клеток вегетативного мицелия, отличающихся по ядрам с разными mat-локусами, сохраняются митохондрии клеток акцепторов ядер. В то же время для почкующихся дрожжей характерно двуродительское наследование (Berger and Yaffe, 2000; Okamoto et al., 1998).

Старение мицелия и реорганизация митохондрий

Соматические клетки высших эукариот, как правило, имеют ограниченную способность к пролиферации. Постепенное снижение скорости пролиферации клеток *in vitro*, приводящее, в конечном счете, к остановке размножения, называют клеточным или репликативным старением.

Некоторые мицелиальные грибы, так же как и другие организмы, имеют ограниченный вегетативный рост. Прежде всего, это штаммы амфиталлических видов: гомо- и гетерокариотические штаммы базидиальных грибов из рода *Agaricus* (*A. bisporus*, Камзолкина, 2005; *A. abruptibulbus* Peck; *A. bitorquis* (Qoél.) Sacc.; *A. silvaticus* Schaeff.: Secr., не опубли.) и сумчатого гриба *P. pauciseta*.

Нами было показано, что морфология крист митохондрий зависела от условий культивирования штаммов шампиньона (*p. Agaricus*). Наружная мембрана митохондрий в клетках мицелия разных штаммов, в большей степени у гомокариотических и клеток погруженного в жидкую среду мицелия, была тесно ассоциирована с рибосомами, размер которых 24–29 нм. Единичные рибосомы на наружной мембране митохондрий имели место во многих случаях у гетерокариотических поверхностно растущих клеток, что может быть случайным событием или признаком, проявляющимся при возрастных изменениях в клетках мицелия. Природа РНК-содержащих структур (рибосом) было нами показана в экспериментах с предварительной обработкой мицелия РНК-азой и последующим окрашиванием РНК по Бернару.

Многочисленные наблюдения, сделанные на ультратонких срезах фрагментов клеток поверхностного и глубинного мицелия, позволили выявить возрастные изменения, происходящие в митохондриях. Эти изменения были четко выражены, прежде всего, у клеток гомокариотических штаммов *A. bisporus* и глубинного мицелия разных штаммов *p. Agaricus*. Митохондрии гомокариотических штаммов в поверхностной культуре на продольных или косых срезах имели палочковидную или гантелевидную и овальную форму с сетчатыми кристами. Наружная мембрана митохондрий, как правило, была тесно ассоциирована с рибосомами (рис. 1). Обращают на себя внимание массовые скопления митохондрий на ультратонких срезах фрагментов клеток поверхностного мицелия гомокариотического штамма *A. bisporus* (рис. 1).

В более старых фрагментах клеток мицелия наблюдали изменение формы митохондрий от удлиненной до шаровидной, деградацию крист и повышенную конденсацию нуклеоида.

Аналогичные изменения наблюдали и в клетках глубинного мицелия разных гетеро- и гомокариотических штаммов. Митохондрии в клетках глубинного мицелия были в основном овальные и шарообразные на электронно-микроскопических срезах (рис. 2). Количество митохондрий на срез увеличивалось в 2–3 раза по сравнению с молодым поверхностным мицелием, наружная поверхность митохондрий несла рибосомы. Рибосомы наблюдали не только на наружной мембране митохондрий, но и между двумя мембранами. Среди популяции митохондрий наблюдали разные стадии митоптоза митохондрий (гибели митохондрий) (рис. 2):

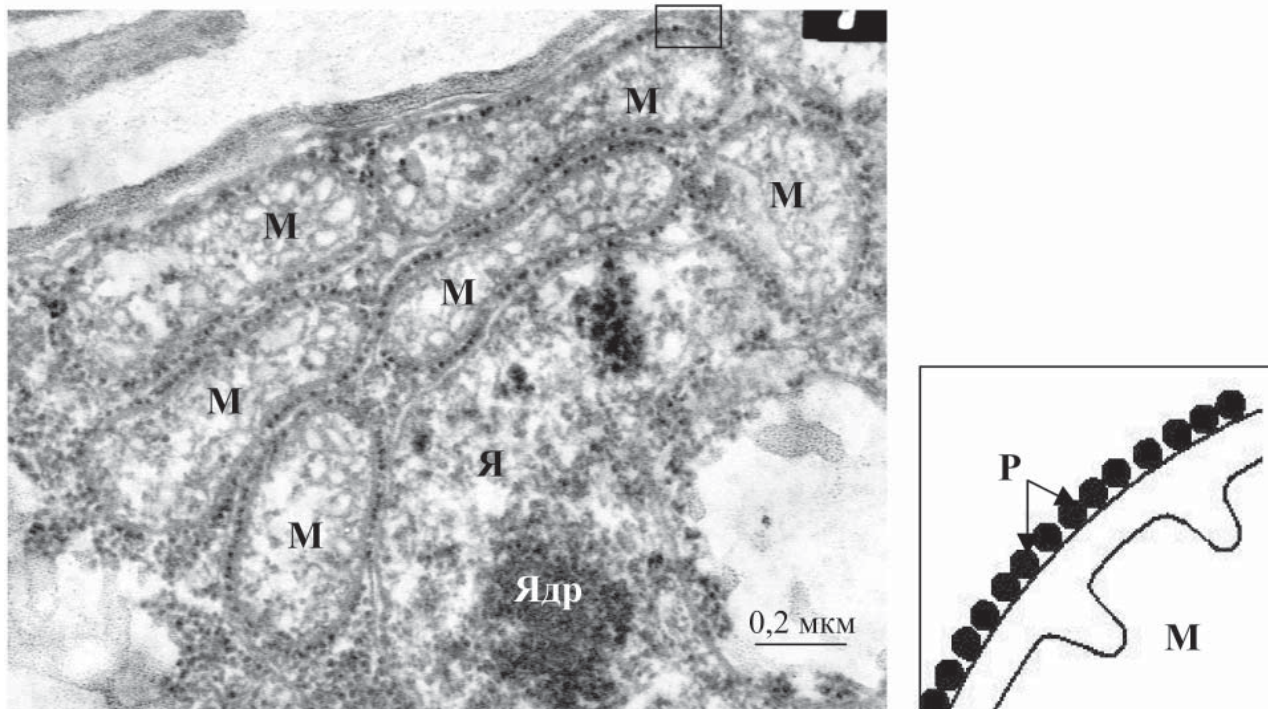


Рис.1. Скопление митохондрий в непосредственной близости от ядра. *A. bisporus* 1-1/U3 и схема фрагмента митохондрии.

– ассоциация рибосом с наружной мембраной митохондрий без изменения морфологии пластинчатых крист (начальная стадия) (M_1),

– локализация рибосом между наружной и внутренней мембранами митохондрий, деформация крист митохондрий и повышение конденсации нуклеоида (нуклеоид выглядит электронно-плотным, в отличие от сетчатого электронно-прозрачного нуклеоида, характерного для митохондрий в клетках поверхностного мицелия гетерокариотических штаммов) (M_2),

– локализация рибосом как в M_2 , отсутствие крист, нуклеоид выглядит еще более плотным (M_3).

Для фрагментов клеток с деградирующими митохондриями характерны черты апоптоза: фрагментация ядрышка, снижение количества рибосом в цитоплазме, вакуолизация цитоплазмы, лизис различных органелл клетки (рис. 3). Таким образом, гибель митохондрий приводит к гибели всей клетки мицелия.

Изучение ультраструктуры мицелия шампиньона у разных штаммов позволило выявить особенности старения и апоптоза. В экспериментах было показано, что первым признаком старения вегетативного мицелия на ультраструктурном уровне является тесный контакт рибосом

с наружной мембраной митохондрий. Процесс старения развивается далее следующим образом. Фрагментация, а затем гибель митохондрий (митоптоз), фрагментация ядрышка и других внутренних структур, вакуолизация цитоплазмы и апоптоз. Ускоренное старение клеток мицелия наблюдали у глубинной культуры видов рода *Agaricus*, которые плохо растут в этих условиях.

В отличие от *A. bisporus*, у которого возрастные изменения в клетках мицелия описаны только на структурном уровне, *P. pauciseta* является на протяжении 50 лет объектом пристального изучения вопросов старения клеток мицелия для генетиков и молекулярных биологов. Синдром старения мицелия был детально изучен на примере *P. pauciseta*. Он был впервые описан как материнское наследование неблагоприятного процесса, кульминацией которого является остановка роста мицелия после 7–30 см прироста мицелия, полученного из проросшей аскоспоры (Rizet, 1953). Состояние старения по некоторым данным было вызвано увеличением концентрации цитоплазматического фактора (Marcou, 1961; Jamet-Viorny et al, 1999).

Было показано, что старение всегда ассоциируется с реорганизацией митохондриального генома: амплификацией экстрахромосомальной

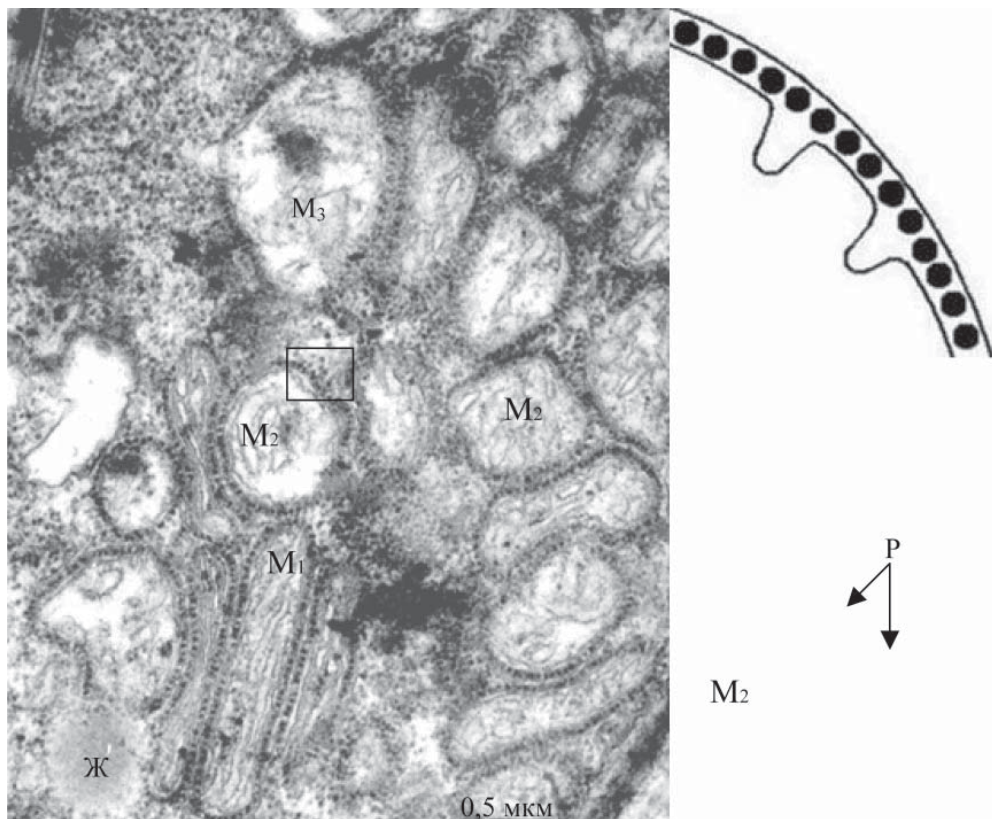


Рис. 2. Фрагмент клетки глубинного мицелия *A. bisporus*, Bs94 и схема фрагмента митохондрии (справа).

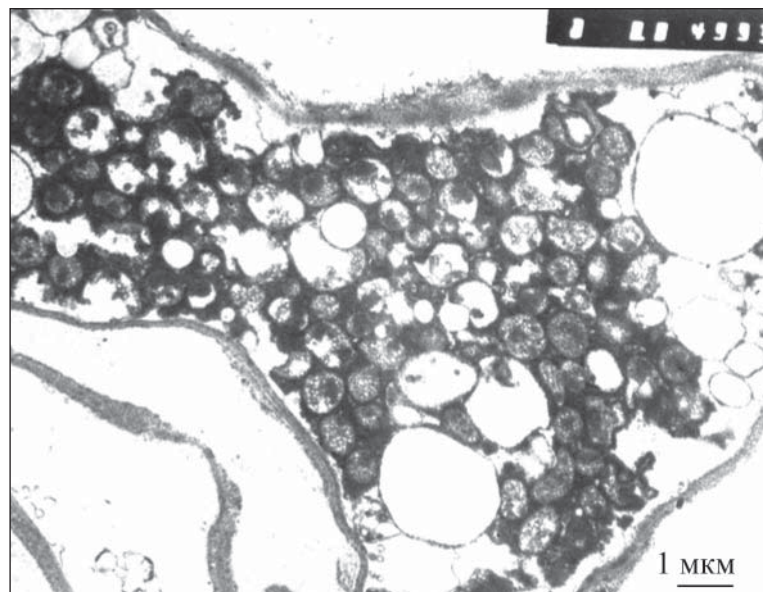


Рис. 3. Фрагмент проэпителиальной клетки глубинного мицелия *A. bisporus*, Bs94

митохондриальной ДНК (senDNA, Belcour et al., 1981; Cummings et al., 1979; Stahl et al., 1978) и модификацией митохондриальной хромосомы (Belcour et al., 1981; Borghouts et al., 1997; Jamet-Vierny et al., 1980; Kurk et al., 1981). Корреляция между модификациями митохондрий и старением хорошо изучены, но все еще не понятно, являются ли эти модификации причиной состояния старения мицелия (Sellem, 2002). В настоящее время известно, что:

- senDNA не приносит вред митохондриальной хромосоме,
- модификации митохондриальной хромосомы заключаются в утрате специфических участков митохондриальной хромосомы, которые и дают начало амплифицированной senDNA,
- утрата участков митохондриальной хромосомы является скорее результатом деградации, чем специфической делецией,
- увеличение пропорции дефектных хромосом (укороченных) в клетках мицелия за несколько сантиметров до остановки роста может объяснять различные старческие фенотипы: потеря фертильности, снижение скорости роста и, наконец, смерть апикального мицелия (Sellem, 2002). Выдвигаются предположения о вовлечении в процессы старения митохондриальных белков, контролирующих транскрипцию модулирующих агентов (Silar et al., 1997). Недавно было показано, что срок жизни клеток определяется дыхательной активностью и, вероятно, содержанием активированных форм кислорода (Borghouts et al., 2001).

Утрата функции цитохром с оксидазы значительно продлевает срок жизни у *P. anserina* (Dufour et al., 2000). Отсутствие части дыхательной цепи не летально для клеток гриба, так как начинает функционировать боковая ветвь дыхательной цепи на уровне убихинона – альтернативная оксидаза (Vanlerberghe and McIntosh, 1997). Функционирование альтернативного пути приводит к потере двух или трех сайтов соединения компонентов дыхательной цепи, что приводит к снижению эффективности синтеза АТФ. Причем конститутивная экспрессия альтернативного пути у долгоживущих дыхательных мутантов приводит к увеличению как активированных форм кислорода, так и продукции АТФ, что коррелирует с уменьшением продолжительности жизни (Lorin et al., 2001). Все эти исследования говорят о ключевой роли митохондрий в продолжительности жизни, но они не отвечают на вопрос, какие критические параметры митохондрий контролируют ее.

Некоторый свет на эту проблему проливают исследования роли ядерного гена *oxa1*. OXA1 – митохондриальный мембранный белок, переданный в качестве наследства от предка – бактерии хлоропластам и митохондриям (Kuhn et al., 2003).

Он является ключевым компонентом, включающим аппарат мембранных белков (Herrmann and Neupert, 2003). У *S. cerevisiae* отсутствие Oxa1p активности приводят к утрате дыхания (повреждения компонентов 1Y и Y дыхательного комплекса), жизнеспособность при этом сохраняется (Hamel et al., 1998). У делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* отсутствие белка OXA1 приводит к нежизнеспособному фенотипу (Bonnefoey et al., 2000). У них нет компонента 1 дыхательного комплекса. Недавно было показано, что OXA1 необходим для биогенеза комплекса 1 у *N. crassa* и что инактивирование гена *oxa1* приводит к летальности (Nargang et al., 2002). Было продемонстрировано, что *oxa1* – особый ген у аэробного гриба *P. pauciseta* и OXA1 белок играют ключевую роль в биогенезе комплексов 1 и 1Y. Мутант по *oxa1* гену имеет дефекты в дыхательных комплексах 1 и 1Y, что коррелирует с увеличением времени жизни, индукцией альтернативной оксидазы и снижением уровня активированных форм кислорода. Однако нет очевидной связи между уровнем альтернативной оксидазы и продолжительностью жизни (Sellem et al., 2005). Показана взаимосвязь *oxa1* и *rmp1* генов, последний ген контролирует время смерти у штаммов несущих специфические мутации в ядерном гене AS1, который кодирует цитоплазматический рибосомальный белок (Dequard-Chablat, Sellem, 1994). У мутанта по *oxa1* гену степень повреждения комплексов 1 и 1Y и продолжительность жизни зависит от особого гена *rmp1* (Sellem et al., 2005).

rmp1 – особый ген, которому соответствует RMP1 белок, чьи функции еще до конца не исследованы, но он оказывает влияние на продолжительность жизни *P. pauciseta* и может быть локализован в митохондриальном или цитоплазматическом компартменте в зависимости от стадии развития (Contamine et al., 2004). У штаммов мутантных по OXA1 белку, происходит активирование альтернативного участка дыхательной системы, увеличение времени жизни, что коррелирует со снижением активированных форм кислорода, таким образом, уровень последнего – основная причина старения (Sellem et al., 2005). Исследования в этом направлении продолжаются. Авто-

ры полагают, что понимание взаимоотношений между *oxa1* и *mp1* генами может быть ключевым для выяснения роли RMP1 белка в контроле стабильности mtDNA у мицелиальных грибов.

Были исследованы дегенеративные процессы у гриба *P. pauciseta*, которые связаны с накоплением митохондриальных генов, несущих специфические делеции (делеции mtDNA, Belcour et al., 1991). Эти делеции мтДНК накапливаются только у штаммов, несущих ядерный ген AS1, который отвечает за синтез цитоплазматического рибосомального белка.

Амплификация митохондриальной плазмиды была показана и для других аскомицетов. У *Podospora curvicolla* (G. Winter) Niessl описан синдром старения с амплификацией senDNA (Böckelmann and Esser, 1986), но митохондриальная хромосома не была изучена. У другого сумчатого гриба, *Neurospora*, было показано, что две линейные плазмиды у двух видов *Neurospora intermedia* F.L.Tai (kalDNA) и *N. crassa* (marDNA) вызывают смерть хозяина после внедрения в митохондриальный геном и нарушения работы митохондрий (Griffiths, 1992). В клетках природных изолятов рода *Neurospora* обнаружены ретроплазмиды – мобильные генетические элементы, которые вызывают старение без интеграции в геном митохондрий (Stevenson et al., 2000). Участие плазмиды в старении клеток показано у гриба *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier (Charter et al., 1993).

Связь митохондрий с органеллами клетки

Проблема ядерно-митохондриальных взаимоотношений возникла с самого начала развития генетики митохондрий. Возможность передачи потомству мутаций дыхательной недостаточности у дрожжей как по менделевской схеме (ядерные мутации), так и через элементы цитоплазмы (цитоплазматические petite-мутации или ρ^- мутации) сразу показала, что дыхательная функция клетки имеет ядерное и митохондриальное кодирование. Изучение мутаций дыхательной недостаточности возможно только в пределах ограниченного числа организмов, среди которых *S. cerevisiae* занимает лидирующее положение. Преимущества дрожжей связаны прежде всего с тем, что они являются факультативными аэробами и их митохондрии могут быть генетически или физиологически инактивированы. Утрата активности митохондрий не влечет за собой гибели

клеток (например, у ρ -мутантов). Мутанты дыхательной недостаточности делятся на две группы. Одни сохраняли ρ -фактор (ρ -фактор по современным представлениям эквивалентен мтДНК) в последующих скрещиваниях, но были неспособны к его экспрессии. Другие были лишены этого фактора.

То обстоятельство, что мтДНК может присутствовать, но не функционировать, и может полностью отсутствовать, демонстрировало не только контроль ядра над сборкой и функционированием митохондрий, но и контроль над способностью клетки поддерживать активно функционирующую мтДНК. В диком типе дыхательно – компетентных клеток (ρ^+), экспрессия гена CIT2 (см выше) находится на относительно низком уровне, в то время как у мутантов ρ^0 (отсутствие мтДНК) экспрессия CIT2 связана с функционированием CIT1 (Нейфах, 1977).

Так как митохондрии – полуавтономные органеллы, их нормальное функционирование зависит от других органоидов клетки. Уже было сказано, что некоторые полипептидные комплексы синтезируются в цитоплазме, т.е. кодируются ядром. Например, цитохром с оксидаза – центральный ферментной комплекс дыхательной системы представлен несколькими пептидными субъединицами. Было показано на *Botryodiplodia theobromae* Pat. (= *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.), что этот комплекс состоит из 7 белков, три из них наиболее крупные являются продуктом митохондриальных рибосом, а четыре поменьше синтезируются на цитоплазматических рибосомах (Brambl, 1980).

Была продемонстрирована тесная связь между митохондриями, пероксисомами и ядром у дрожжей (Chelstowska, 1995). Эта связь заключается в регуляции работы органелл, так называемой ретроградной регуляции. Авторы полагают, что такая регуляция играет важную роль в гомеостазе и биогенезе митохондрий. Так, например, фермент пероксисом, цитрат синтаза 2 (CS2), кодируемый CIT2 геном, вызывает дисфункцию митохондрий. В клетках дрожжей существуют 2 типа цитрат синтазы – CS2, которая участвует в глиоксилатном цикле, и CS1, кодируемая CIT1 геном, участвующая в цикле Кребса. Было найдено 2 гена RTG1 и RTG2. Они кодируют факторы транскрипции. Эти факторы образуют комплекс, необходимый для экспрессии CIT.

Движение митохондрий

Функционирование митохондрий происходит в условиях его непрерывной подвижности, сопровождающейся изменением размеров и формы. В процессе движения митохондрии могут собираться в крупные агрегаты или, наоборот, распадаться на более мелкие образования.

Характерная ориентация и направленное движение митохондрий, сопровождающееся агрегацией, происходит при делении клеток, например дрожжевых.

Ранее полагали, что движение митохондрий, а также изменение конформации в зависимости от энергетического состояния, пассивно регулируется содержанием ионов и воды в матриксе (Ernster and Schatz, 1981). Однако, обнаружение актина в митохондриях дрожжей (Hermann and Shaw, 1998) дает основание полагать, что некоторые функции подвижности митохондрий могут контролироваться эндогенными (собственными) Ca^{2+} зависимыми системами.

Актин-зависимый и тубулин-зависимый транспорт митохондрий.

В мицелиальных грибах митохондрии представляют собой органеллы, распределенные по всему цитозолю и ориентированные по направлению роста гифы (например, в живых клетках *Neurospora crassa*) (Fuchs et al., 2002).

Как микротрубочки, так и микрофиламенты влияют на движение митохондрий и их расположение в клетке. Но разным группам грибов присуще в разной степени использовать ту или иную систему цитоскелета.

Так, в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, как и в клетках *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans* (Eidam) Vuill.), в транспорте митохондрий большую роль играют актиновые микрофиламенты (Hermann and Shaw, 1998, Suelman and Fischer, 2000). У дрожжей, *Schizosaccharomyces pombe* (Yaffe et al., 1996), и в клетках млекопитающих (Heggeness et al., 1978), наоборот, в распределении митохондрий задействованы, в основном, микротрубочки.

Работы по изучению цитоскелета показали, что тубулин-зависимое расположение и движение митохондрий различно у разных видов грибов. Среди аскомицетов опыты проводились на *Fusarium acuminatum* (*Gibberella acuminata* C. Booth) (Howard and Aist, 1980), *Nectria haematococca* Berk. & Broome (Aist and Bayles, 1991), *N. crassa* (Steinberg and Schliwa, 1993), базидеомицетов – *Uromyces phaseoli* (*Uromyces appendiculatus* F. Strauss) (Herr and

Heath, 1982) и хитридеомицетов – на *Allomyces macrogynus* (R. Emers.) R. Emers. & C.M. Wilson (McDaniel and Roberson, 2000).

Микротрубочко-зависимый транспорт митохондрий был подробно изучен в клетках *N. crassa* (Steinberg and Schliwa, 1993, Westermann and Prokisch, 2002). Исследователи наблюдали движение органелл со скоростью 1,4 мкм/с в гифах, протопласте, клеточных фрагментах и мутантах, лишенных клеточной стенки. Разрушение микротрубочек с помощью нокадазола уменьшало подвижность митохондрий, в то время как разрушение микрофиламентов цитохалазином D не оказывало такого влияния.

Было выяснено, что связывание митохондрий с микротрубочками осуществляют периферические белки этих органелл. К таким белкам относятся белки из семейства кинезинов или родственного динеину белка. Роль связанных с кинезином белков в движении митохондрий была изучена на клетках животных (Fuchs et al., 2002). Биохимические исследования показали, что посредником, осуществляющим связывание митохондрий с микротрубочками, является адеин нуклеотид-зависимые белки, находящиеся на поверхности органеллы.

Один из таких белков K1F1 помещали с митохондриями *in vivo* и наблюдали транспорт митохондрий вдоль микротрубочек *in vitro* (Nangaku et al., 1994). В результате мутации гена, кодирующего тяжелую цепь кинезина у мышей, происходит образование скоплений митохондрий в перинуклеарном пространстве. Легкие цепи кинезина были ассоциированы с митохондриями в культуре клеток. Таким образом, кинезин-связанные белки по аналогии с клетками животных могут быть вовлечены в процесс движения митохондрий у грибов.

Деление и фрагментация митохондрий

По современным представлениям деление митохондрий – это процесс, управляемый многокомпонентным белковым аппаратом. Деление митохондрий следует отличать от сегрегации или фрагментации этих органелл. Деление – более длительный процесс, при котором происходит регулярное распределение материала митохондриальной ДНК. Сегрегация или фрагментация характеризуется двумя чертами, отличающими ее от деления: высокая скорость протекания и нерегулярное распределение генетической материи (Polyakov et al., 2003). По-видимому, имеются отличия в молекулярных механизмах, включа-

ющих деление и фрагментацию, и в то же время сходство в механизме самого деления.

Деление, сегрегация и рост митохондрий эукариотических организмов, по мнению некоторых ученых, являются независимыми процессами от деления клетки (Osteryoung and Nunnari, 2003).

Обнаружено, что белки из группы динаминов – DRPs белки (одним из них у грибов является Dnm1), но не FtsZs белки являются медиатором деления митохондрий у грибов, растений и животных. О происхождении белков родственных динамину мало что известно. Все DRPs белки содержат три домена: GTPазу, средний и GTPазный эффектор (GED). Филогенетический анализ белков из этого семейства показал, что отличительными чертами их являются: участие в процессе эндоцитоза, в транспорте мембран, делении хлоропластов, слиянии митохондрий, образовании клеточной пластинки у растений, устойчивости к вирусной инфекции (van der Bliek, 1999; Miyagishima et al., 2003).

Фрагментация

В англоязычной литературе часто используют термин «fission», который обозначает деление, при описании процесса сегрегации/фрагментации митохондрий.

Основным объектом изучения процесса фрагментации митохондрий являются дрожжи. Показано, что в процессе экспоненциальной фазы роста *Saccharomyces cerevisiae* большая часть клеток содержит около 10 митохондрий, одна из них, как правило, более крупная содержит около половины объема хондриома и имеет сложную ретикулярную структуру. В некоторых клетках хондриом состоит из одной гигантской ретикулярной митохондрии. В стационарную фазу роста хондриом фрагментируется и состоит из 30–50 органелл на клетку. Время, необходимое для слияния и фрагментации, составляет 2 минуты. Оба процесса строго сбалансированы в клетке дрожжей (Nunnari et al., 1997). Но до сих пор практически ничего неизвестно о поведении генетического аппарата в процессе фрагментации и слияния митохондрий. Было продемонстрировано на клетках животных, что от 6 до 60% митохондрий могут не иметь ДНК (Bereiter-Hahn, Voth, 1996). Это означает, что фрагментация приводит к образованию генетически несовершенных митохондрий (Polyakov et al., 2003).

Продемонстрировано, что фрагментация митохондрий в клетках животных, происходящая

под действием АФК (обработка перекисью водорода) не является следствием смерти клетки, а результат деэнергизации митохондрий, процесса, связанного с освобождением цитохрома с в цитозоль (Скулачев, 2001).

Недавно было показано, что сегрегация митохондрий наблюдается при апоптозе и этот процесс необходим для освобождения цитохрома с из митохондрии, что запускает последовательность событий в клетке, приводящие к апоптозу (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Цитологическое изучение показало, что проапоптотический, связанный с митохондриями белок Вах ассоциирует с Dcp 1 структурами на митохондриальной мембране, что указывает на взаимодействие Вах с машиной деления, способствуя апоптозу (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Функциональное значение фрагментации и слияния митохондрий в интерфазе все еще неизвестно. Одним из возможных вариантов объяснения слияния митохондрий может быть рекомбинация митохондриальной ДНК (Polyakov et al., 2003).

Существует предположение, основанное на большом экспериментальном материале, что трансформация хондриома – механизм, позволяющий создавать мобильную форму и размер во время фрагментации или изолирование поврежденных участков митохондрий (Skulachev, 2001).

Деление

Процесс деления митохондрий всегда ассоциируется с онтогенезом, занимает больше времени и связан с делением и сегрегацией митохондриального генома.

Изучение процесса деления митохондрий началось еще 40 лет назад на *N. crassa* (Luck, 1965). С помощью введения в среду радиоактивного холина, входящего в состав мембран митохондрий, было показано, что популяция митохондрий увеличивается за счет деления.

Ранее было продемонстрировано, что деление дрожжевых митохондрий начинается примерно к 1/5 клеточного цикла после начала ядерного деления и заканчивается за 1/5 до конца цикла (Котельникова с сотр., 1973). Такая периодичность предполагает существование тесной связи между ядерным и митохондриальным делениями. Наблюдения показали, что в лаг-фазе, когда дрожжи готовятся к интенсивному размножению и происходят существенные перестройки цитоплазмы клеток, митохондрии приступают к многократному делению, предварительно увели-

чиваясь в размерах (Бирюзова, 1993). Бирюзова описывает даже лаг-фазу митохондрий, во время которой никаких существенных изменений, кроме увеличения размера этих структур и упорядочения (или разупорядочения) в расположении крист, не происходит (1993). Деление митохондрий нередко наблюдается во время митоза и в процессе роста клеток, когда идут активно процессы синтеза, нуждающиеся в энергии. Когда рост клеток прекращается, количество митохондрий в клетках уменьшается, и деления наблюдаются крайне редко. Максимальное количество митохондрий в клетках мицелия базидиальных грибов наблюдали в апикальных клетках (Камзолкина, 2006; не опубликовано).

Слияние и деление митохондрий наблюдали в процессе конъюгации некоторых дрожжей. Эти процессы завершаются после мейоза и спорогенеза формированием четырех митохондрий, которые окружают ядро в каждой споре (Miyakawa et al., 1984).

Ассоциация митоза с делением митохондрий позволяют предположить, что деление клеток и митохондрий регулируются общими сигнальными механизмами.

Молекулярные механизмы деления и фрагментации митохондрий

Аппарат деления митохондрий весьма консервативен. Имеются определенные черты сходства у животных и дрожжей (Polyakov et al., 2003).

Во фрагментации и делении митохондрий грибов существенную роль играют динамины – белки из семейства GTF-связанных протеинов.

- Dnm1 белок (Otsuga et al., 1998),
- Mdv1 (mitochondrial division) или Fis2 (fission) белок (Cervený et al., 2001; Fekkes et al., 2000; Tieu and Nunnari, 2000),
- белки наружной мембраны- Fis1 (или Mdv2p) (Mozdy et al., 2000) и Fzo (Hales and Fuller, 1997).

В клетках дикого типа Dnm1 локализован в цитозоле дрожжевой клетки и в зоне перетяжки фрагментирующихся митохондрий.

Недавно была предложена модель деления митохондрий у дрожжей (Osteryoung and Nunnari, 2003), согласно которой Dnm1 белок может быть локализован в цитозоле или ассоциирован с наружной мембраной митохондрий опосредованно через Mdv1 и Fis1 (Shaw and Nunnari, 2002; Cervený et al., 2001; Tieu et al., 2002). В последнем случае комплекс белков на наружной мембране митохондрий активизируют аппа-

рат деления. Предположительно, взаимодействие между Mdv1 и Fis1 является триггером деления.

Мутации в гене, кодирующем Dnm1, нарушают баланс между слиянием и фрагментацией в митохондриях, способствуя тем самым ингибированию фрагментации.

Другой ген кодирует трансмембранный белок наружной мембраны митохондрий – Fis1 (или Mdv2). В отличие от Mdv1 белка, который локализован в месте перетяжки, этот белок встречается на всей поверхности наружной мембраны. Он необходим для иммобилизации Mdv1 белка, но не вовлечен во фрагментацию митохондриальных мембран. Пока не ясно, может ли этот аппарат контролировать фрагментацию и внутренней мембраны митохондрий?

Недавно было показано на клетках *S. cerevisiae*, что деление митохондрий у здоровых клеток отличается от деления умирающих клеток. Отличие заключается в поведении белка Fis1 (Fannjiang et al., 2004). Белок Fis1 ограничивает процесс фрагментации и цистеин-протеазо-зависимую смерть клеток путем связывания с Dnm1. Было обнаружено, что белок Dnm1, гомологичный белку Dgr1 у животных, способствует фрагментации/деградации митохондрий при обработке стимуляторами апоптоза, при этом Fis1 не способен связываться с Dnm1. Авторы публикации высказывают предположение о том, что Fis1 может ограничивать деление митохондрий у клеток, растущих в нормальных условиях.

У дрожжей недавно описан митохондриальный ген MGM1, который поддерживает митохондриальный геном, мутации по которому изменяют морфологию митохондрий и приводят к утрате митохондриального генома в клетках (Jones and Fangman, 1992; Shepard and Yaffe, 1999). Этот ген кодирует динамин-подобный белок Mgm1, который имеет сигнальную последовательность, отвечающую за внедрение в межмембранное пространство митохондрий (Wong et al., 2000). Мутационный анализ показал, что Mgm1 функционально связан с Dnm1, локализованном на наружной мембране митохондрий: делеция гена MGM1 стимулирует Dnm1-зависимую фрагментацию митохондриальных мембран. Таким образом, фрагментацию митохондрий контролируют различные молекулярные механизмы, специфичные для наружной и внутренней мембран.

Выдвинутое предположение о том, что аппарат деления митохондрий регулирует программируемую смерть у дрожжей, нашло подтверждение в экспериментах зарубежных коллег (Fannjiang et al., 2004). В них было показано, что у Fis1-дефи-

цитных дрожжевых клеток снижена жизнеспособность по сравнению с клетками дикого фенотипа при обработке перекисью водорода, что говорит о возможной роли Fis1 как ингибитора протеазозависимой программируемой смерти у дрожжей.

В заключении необходимо отметить, что молекулярные механизмы, регулирующие поведение митохондрий, лидирующей органеллы эукариотических клеток, чрезвычайно сложны. Несмотря на значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов деления и фрагментации митохондрий, многое еще остается неясным. Например, какие сигнальные молекулы определяют деление митохондрий, а какие их сегрегацию/фрагментацию и слияние? Как осуществляется ядерный контроль над этими процессами? Дальнейшие исследования прольют свет на эти и другие вопросы.

Список литературы

1. Бирюзова В.И. Ультраструктурная организация дрожжевой клетки. Атлас. Наука. 1993. 224 с.
2. Дымищ Г.М. Сюрпризы митохондриального генома. Природа. 2002, №6. с. 54-61.
3. Дьяков Ю.Т., Шнырева А.В., Сергеев А.Ю. Введение в генетику грибов. Москва. АСАДЕМА. 2005. 304 с.
4. Звягильская Р.А., Котельникова А.В. Структура и функциональная активность дрожжевых митохондрий //Итоги науки и техники, Серия Биологическая химия, 1991,Т.36, М:1991
5. Камзолкина О.В. Цитологические исследования гомокариотических и гетерокариотических штаммов *Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach // Микробиология. 1996. Т. 2. № 65. С. 228-234
6. Камзолкина О.В. Микроморфология и ультраструктура агарикоидных грибов на разных стадиях жизненных циклов. Диссертация на соискание уч.ст.докт.биол.наук. МГУ. Москва.2005. 251 с.
7. Котельникова А.В., Звягильская З.А. Биохимия дрожжевых митохондрий. Москва. «Наука» 1973. С. 240.
8. Мейсель М.Н. Функциональная морфология дрожжевых организмов. Москва. 1950. Ан СССР. 368 с.
9. Нейфах С.А. Особенности наследования множественной устойчивости к антибиотикам у *Saccharomyces cerevisiae* // в сб: Молекулярная генетика митохондрий.1977 с.31-38.
10. Пестов Н.А. Полифосфаты и экзополифосфатазы митохондрий дрожжей. Автореф. дис. на соискание уч.ст. канд. биол. наук. Пушино 2004. с.20.
11. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т.7.№6. С. 4-10.
12. Aist J.R., Bayles C.J. Organelle motility within mitotic asters of the fungus *Nectria haematococca* // J. Cell Biol.,No.56, pp. 358-363.
13. Alberghina F.A.M., Trezzi F., Signorini R.C. The biogenesis of mitochondria in *Neurospora crassa* : ultrastructural changes induced by nutrients // Cell Differentiation, 1974, No. 2, pp. 307-317.
14. Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. Introductory Mycology. 1996. New York. John Wiley & Sons, INC. 869 p.
15. Beckett A, Heath I.B., McLaughlin D.I. An atlas of fungal ultrastructure. London: Longman. 1974
16. Belcour L. Mitochondrial DNA and senescence in *Podospora anserina* // Curr. Genet. 1981. V. 4: pp.81-82.
17. Belcour L., Begel O., Picard M. A site-specific deletion in mitochondrial DNA of *Podospora anserina* // Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 1991. V. 88: pp.3579-3583.
18. Bereiter-Hahn J., Vöth M. Distribution and dynamics of mitochondrial nucleoids in animal cells in culture // Exp. Biol. Online 1996 V 1: pp. 4-11.
19. Berger K.H., Sogo L.F., Yaffe M. Mdm 12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast // J. Cell Biol. 1997. V. 136: pp. 545-553.
20. Berger K.H., Yaffe M. Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae* // Trends Microb., 2000, No.8, pp. 508-513.
21. van der Bliek A.M. Functional diversity in the dynamin family // Trends Cell Biol. 1999. V. 9: pp. 96-102.
22. Böckelmann B. and Esser K. Plasmids of mitochondrial origin in senescent mycelia of *Podospora anserina* // Curr. Genet. 1986. V.10:pp. 803-810.
23. Bonnefoy N., Kermorgant M., Groudinsky O., Dujardin G. The respiratory gene OXA1 has two fission yeast orthologues which together encode a function essential for cellular viability // Mol. Microbiol. 2000. V. 35:pp. 1135-1145.
24. Borghouts C., Kimpel E., Osiewacz H.D. Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospora anserina* are under the control of the nuclear gene *grisea* // Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94:pp. 10768-10773.
25. Borghouts C., Werner A., Elton T., Osiewacz H.D. Coppermodulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina* // Mol. Cell Biol.2001: pp. 21390-21399.
26. Brambl R. Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination //The Journal of Biological Chemistry, 1980, Vol. 255, No. 16, pp. 7673-7680.
27. Bredesen D.E. Neural apoptosis // Ann. Neurol. 1995. V. 38: pp. 839-851.

28. *Brown-Peterson N.J., Salin M.L.* Purification and characterization of a mesohalic catalase from the halophilic bacterium *Halobacterium halobium* // *J. Bacteriol.* 1995. 177 №2. P. 378-384.
29. *Bullerwell C.F., Forget L., Lang B.F.* (a) Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences // *Nucleic Acids Research*, 2003, V. 31, No. 6, pp. 1614-1623.
30. *Bullerwell C.E., Leigh J., Forget C., Lang B.F.* (b) A comparison of three fision yeast mitochondrial genomes // *Nucleic Acids Research*, 2003, V. 31, No.2, pp. 759-768.
31. *Burgess S.M., Delannoy M., Jensen R.E.* *Mmm1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria // *J. Cell Biol.* 1994.V. 126: pp. 1375-1391.
32. *Cervený K.L., McCaffery J.M., Jensen R.E.* Division of mitochondria requires a novel DNM1-interacting protein, Net2p // *Mol. Biol. Cell.*, 2001, No.12, pp. 309-321.
33. *Charter N.W., Buch K.W., Brasier C.M.* De-novo generation of mitochondrial DNA plasmids following cytoplasmic transmission of a degenerative disease in *Ophiostoma novo-ulmi* // *Curr.Genet* 1993. V. 24: pp. 505-514.
34. *Chelstowska A., Jia Y., Rothermel B., Butow R.A.* Retrograde regulation: novel path of communication between mitochondria, the nucleus, and peroxisomes in yeast. // *Can.J. Bot.*, 1995, V. 73 (Suppl.1), pp. 205-207.
35. *Contamine V., Zickler D., Picard M.* The *Podospora rmp1* gene implicated in nucleus-mitochondria cross-talk encodes an essential protein whose succellular location is developmentally regulated // *Genetics*. 2004. V. 166: pp. 135-150.
36. *Criddel R.S., Schatz G.* Promitochondria of anaerobically grown yeast. 1. Isolation and biochemical properties // *Biochemistry*. 1969 V. 8: pp. 322-334.
37. *Cummings D.J., Belcour L., Grandchamp C.* Mitochondrial DNA from *Podospora anserina* II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures // *Mol. Gen.Genet.* 1979. V. 171: pp. 239-250.
38. *Dequard-Chablat M., Sellem C.H.* The S12 ribosomal protein of *Podospora anserina* belong to the S19 bacterial family and controls the mitochondrial genome integrity through cytoplasmic translation // *J.Biol.Chem.* 1994. V. 269: pp. 14951-14956.
39. *Dufour E., Boulay J., Rincheval V., Sainsard-Chanet A.* A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina* // *Proc. Natl. Sci. USA*. 2000. V. 97: pp. 4138-4143.
40. *Ernster L., Schatz G.* Mitochondria: A historical review // *J. Cell Biol.* 1981. V. 91 (3), pp. 225-227s.
41. *Fannjiang Y., Cheng W.-C., Lee S.J., Qi B., Pevsner J., McCaffery J.M., Hill R.B., Basañez G., Hardwick J.M.* Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell in yeast // *Genes and Development*. 2004. V. 18: pp. 2785-2797.
42. *Fekkes P., Shepard K.A., Yaffe M.P.* Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules // *J. Cell Biol.*, 2000, V. 151, pp. 333-340.
43. *Feldmann H.* 2. Yeast cell architecture and function // In: *Yeast molecular biology*. Pp. 2005.
44. *Fuchs F., Prokisch H., Neupert W., Westermann B.* Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa* // *J. Cell Sci.* 2002. V. 115. № 10. pp. 1931-1937.
45. *Fünfschilling U., Rospert S.* Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria // *Mol. Biol. Cell*. 1999. V. 10. P. 3289-3299.
46. *Grad L.I., Descheneau A. T., Neupert W., Lill R., Nargang F.E.* Inactivation of the *Neurospora crassa* mitochondrial outer membrane protein TOM70 by repeat-induced point mutation (RIP) causes defects in mitochondrial protein import and morphology // *Curr. Genet.*, 1999, No. 36, pp. 137-146.
47. *Gralla E.B., Valentine J.S.* Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu/Zn-superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates // *J.bacteriol* 1991, V. 173: pp. 5918-5920.
48. *Griffiths A.* Fungal senescence // *Annu. Rev.* 1992. V.26: pp. 351-544.
49. *Grivell L.A.* Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis // *Eur.J.Biochem.* 1989. V. 182: pp. 477-493.
50. *Grove S.N., Bracker C.E.* Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper // *Journal of Bacteriology*, 1970, V. 104: pp. 989-1009.
51. *Guilliermond A.* Sur les mitochondries des cellules vegetales // *Compt. rend. Acad. Bulg.Sci. Paris*. 1911. V. 153. pp. 199.
52. *Guilliermond A.* Sur les mitochondries des champignons // *Compt. rend Acad. Bulg.Sci. Paris* 1913 V.174. pp. 618.
53. *Hales K.G., Fuller M.T.* Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase // *Cell*, 1997, No. 90, pp. 121-129.
54. *Hamel P., Lemaire C., Bonnefoy N., Brivet-Chevillotte P., Dujardin G.* Mutations in the membrane anchor of yeast cytochrom c1 compensate for the absence of Oxa1p and generate carbonate-extractable forms of cytochrom c1 // *Genetics*. 1998 V. 150: pp. 601-611.
55. *Harkness T.A., Nargang F.E., Neupert W., Lill R.* A crucial role of the mitochondrial protein import

receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria // J. Cell Biol., 1994, V. 124, pp. 637-648.

56. *Hawley E.S., Wagner R.P.* Synchronous mitochondrial division in *Neurospora crassa* // J. Cell Biol., 1967, No.35, pp. 489-499.

57. *Heggeness M.N., Simon M., Singer S.J.* Association of mitochondria with microtubules in cultured cells // Proc. Natl. Acad. Sci USA 1978. V. 75: pp. 3864-3866.

58. *Herr F.B., Heath M.C.* The effects of antimicrotubule agents on organelle positioning in the cowpea rust fungus, *Uromyces phaseoli* var. *vignae* // Exp. Mycol., 1982, No. 6, pp.15-24.

59. *Hermann G.J., Shaw J.M.* Mitochondrial dynamic in yeast // Cell Biol., 1998, No.14, pp. 265-303.

60. *Herrmann J.M., Neupert W.* Protein insertion into the inner membrane of mitochondria // IUBMB Life. 2003. V. 56: pp. 219-225.

61. *Hoffman H.-P., Avers C.J.* Mitochondrion of yeast; ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell // Science. 1973. V. 181. pp. 749-751.

62. *Howard R.J., Aist J.R.* Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cell // J. Cell Biol., 1980, No.87, pp. 55-64.

63. *Jamet-Vierny C., Begel O., Belcour L.* Senescence in *Podospira anserina*: amplification of a mitochondrial DNA sequence // Cell. 1980. V.21:pp. 189-194.

64. *Jamet-Vierny C., Boulay J., Begel O., Silar P.* Contribution of various classes of defective mitochondrial DNA molecules to senescence in *Podospira anserina* // Curr. Genet. 1999. V. 27: pp. 26-35.

65. *Jamet-Vierny C., Contamine V., Boulay J., Zickler D., Picard M.* Mutations in genes encoding the mitochondrial outer membrane protein TOM70 of *Podospira anserina* modify the spectrum of mitochondrial DNA rearrangements associated with cellular death // Molecular and cellular biology, 1997, V. 17, No.11, pp. 6359-6366.

66. *Jamieson D.J.* Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast 1998 V. 14: pp. 1511-1527.

67. *Jones B.A., Fangman W.L.* Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin // Genes Dev. 1992. V. 6: pp. 380-389.

68. *Joseph-Horne T., Hollomon D.W., Wood P.M.* Fungal respiration: a fusion of standard and alternative component // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1545: pp. 179-195.

69. *Kellems R.E., Allison V.F., Butow R.A.* Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with

yeast mitochondria. II. Evidence for the association of cytoplasmic ribosomes with the outer mitochondrial membrane *in situ* // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. pp. 3297-3303.

70. *Kellems R.E., Allison V.F., Butow R.A.* Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IY. Attachment of ribosome to the outer membrane of isolated mitochondria // J. Cell Biol. 1975. V. 65. pp. 1-14.

71. *Kellems R.E., Butow R.A.* Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. I. Evidence for ribosomes binding sites on yeast mitochondria // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. pp. 8043-8050.

72. *Kellems R.E., Butow R.A.* Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. III. Changes in the amount of bound ribosomes in response to changes in metabolic state // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. pp. 3304-3310.

73. *Kennell J.* <http://pages.slu.edu/faculty/kennellj>. 2005

74. *Kiebler M., Keil P., Schneider H., van der Klei, Pfanner N., Neupert W.* The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating transfer of preproteins from receptors to the general insertion pore // Cell. 1993. V. 74: pp. 483-492.

75. *Kuhn A., Stuart R., Henry R., Dalbey R.E.* The Alb3/Oxa1/YidC protein family: Membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? // Trends Cell Biol. 2003. V. 13: pp. 510-516.

76. *Kürk U., Stahl U., Esser K.* Plasmid-like DNA is part of the mitochondrial DNA in *Podospira anserina* // 1981 Curr. Genet. V. 3: pp. 151-156.

77. *Lang B.F., Gray M.W., Burger G.* Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes // Ann. Rev. Gen. 1999. V. 33: pp. 351-397.

78. *Lange L., Olson L.W.* The zoospore of *Olpidium brassicae* // Protoplasma. 1976. V. 90: pp. 33-45.

79. *Lee S.B., Taylor J.W.* Uniparental inheritance and replacement of mitochondrial DNA in *Neurospora tetrasperma* // Genetics, 1993, V. 134, pp. 1063-1075.

80. *Lee Y.M., Ayala F.J., Misra H.P.* Purification and properties of superoxide dismutase from *Drosophila melanogaster* // J. Biol. Chem. 1981. V.256. № 16. pp. 8506-8509.

81. *Lloyd.* The mitochondria of microorganisms. // London. Ac Pr, 1974. 553p.

82. *Logan D.C.* Mitochondrial dynamics // New Phytologist. 2003. V. 160: pp. 463-478.

83. *Lorin S., Dufour E., Boulay J., Begel O., Marsy S.* Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospira anserina* // Mol. Microb. 2001. V. 42: pp. 1259-1267.

84. *Luch D.J.L.* Formation of mitochondria in *Neurospora crassa* // The Journal of Cell Biology. 1965. V. 24. pp. 461-470.

85. *Mannella C.A., Pittenger T.H., Lambowitz A.M.* Transmission of mitochondrial deoxyribonucleic acid in *Neurospora crassa* sexual crosses // J. Bacteriol. 1979, No. V. 137, pp. 1449-1451.
86. *Marcou D.* Notion de longéité et nature cytoplasmique du déterminant de la sénescence chez quelques champignons // Ann. Sci. Nat. Bot. 1961. V. 12:pp. 653-764.
87. *Marvin-Sikkema F.D., Driessen A.J., Gottschal J.C., Prins R.A.* Metabolic energy generation in hydrogenosomes of the anaerobic fungus *Neocallimastix*: evidence for a functional relationship with mitochondria // Mycological Research. 1994. V.98: pp. 205-212.
88. *McAlpine D.M., Kolesar J., Okamoto K., Butow R.A., Perlman P.S.* Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA // EMBO J. 2001. April 2; V. 20(7): pp. 1807-1817.
89. *McConnell S.J., Yaffe M.P.* Intermediate filament formation by a yeast protein essential for organelle inheritance // Science. 1993. V.260. pp. 687-689.
90. *McDaniel D.P., Roberson R.W.* Microtubules are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cell of *Allomyces macrogynus* // Fungal Genet. Biol., 2000, No.31, pp. 233-244.
91. *Miyagishima K., Nishida T., Kuroiwa T.* An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings // Trends Plant Sci 2003. V.8: pp. 432-438.
92. *Miyakawa I., Aoi H., Sando N., Kuroiwa T.* Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast // J. Cell Sci. 1984 V. 66: pp. 21-38.
93. *Moczko M., Garther F., Pfanner N.* The protein import receptor MOM19 of yeast mitochondria // FEBS. 1993. V. 326:pp. 251-254.
94. *Moore R.T., McAlear J.H.* Fine structure of mycota. 9. Fungal mitochondria // Journal of Ultrastructure Research. 1963. V.8: pp. 144-153.
95. *Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W.* The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast // Mol. Microbiol. 1996. V.19:pp. 651-658.
96. *Mozdy A, McCaffery J.M., Shaw J.M.* Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fusion is a multi-step requiring the novel integral membrane component Fis1p // J. Cell Biol, 2000, No. 151, pp. 367-379.
97. *Nangaku M., Sato-Yoshitake R., Okada Y., Noda Y., Takemura R., Yamazaki H, Hirokawa N.* K1F1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria // Cell, 1994, No.79, pp.1209-1220.
98. *Nargang F.E., Preuss M., Neupert W., Herrmann J.M.* The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277:pp. 12846-12853.
99. *Newmeyer D.D., Ferson-Miller S.* Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death // Cell. 2003. V. 112: pp. 481-490.
100. *Nguyen V.T., Bensaude O.* Increased thermal aggregation of proteins in ATP-depleted mammalian cells // Eur. J. Biochem. 1993. V.220. № 1. pp. 239-246.
101. *Nunnari J., Marshall W.F., Straight A., Murray A., Edat J.W., Walter P.* Mitochondrial transmission during mating in *S. cerevisiae* determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mtDNA // Mol. Biol. Cell. 1997. V.8. pp. 1233-1242.
102. *Okamoto K., Perlman P.S., Butow R.A.* The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud // J. Cell Biol., 1998, V.142, pp. 613-623.
103. *Orpin C.G.* Anaerobic fungi. In Stress Tolerance of fungi, 1993, pp.257-273.
104. *Osiewacz H.D.* Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina* // Mech. Ageing Dev. 2002. V.123: pp.755-764.
105. *Osiewacz H.D., Borghouts C.* Mitochondrial oxidative stress and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000. V. 908:pp. 31-39.
106. *Osteryoung W., Nunnari J.* The division of endosymbiotic organelles // Science. 2003. V. 302. 5 December. pp. 1698-1704.
107. *Otsuga D., Keegan B.R., Brisch E., Thatcher J.W., Hermann G.J., Bleazard W., Shaw J.M.* The dynamic-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast // J. Cell. Biol, 1998, V.143, pp. 333-349.
108. *Parsell D.A., Lindquist S.* The Function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins // Annu. Rev. Genet. 1993 V.27: pp. 437-496.
109. *Pelloquin L., Belenguer P., Menon Y., Ducommun B.* Identification of a fission yeast dynamic-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, V. 251, pp. 720-726.
110. *Perkins G.A., Renken C.W., Ellisman M.H., Neupert W., Frey T.G.* Electron tomography of mitochondria after the arrest of protein import associated with Tom19 depletion // Eur. Cell Biol. 2001. V. 80 (2), pp.139-150.
111. *Pfanner N., Neupert W.* The mitochondrial protein import apparatus // Ann. Rev. Biochem. 1990. V. 59: pp. 331-353.

112. Polyakov V.Yu., Yu M., Soukhomlinova M.Yu., Fais D. Fusion, fragmentation, and fission of mitochondria // Biochemistry (Moscow). 2003. V. 68. № 8. pp.1026-1039.
113. Prokisch H., Neupert W., Westermann B. Role of *Mmm1* in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa* // Mol. Biol. Cell, 2000, No.11, pp. 2961-2971
114. Rikhvanov E.G., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Rachenko E.I., Voinikov V.K. The effect of cytochrome oxidase inhibitors on the thermotolerance of yeasts // Microbiology 2003. V.72.№ 2. pp.144-148.
115. Rizet D. Sur la longevite des souches de *Podospora anserina* // CR. Acad. Sci. 1953. V. 237. pp. 1106-1109.
116. Scheffler I.E. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives // Mitochondrion. 2000. V. 1:pp. 3-31.
117. Sellem C.H. Dynamics of the mitochondrial genome during *Podospora anserina* aging // Curr. Genet. 2002 V. 40: pp. 365-373.
118. Sellem C.H., Lemaire C., Lorin S., Dujardin G., Sainsard-Chanet A. Interaction between the *oxa1* and *rmp1* genes modulates respiratory complex assembly and life span in *Podospora anserina* // Genetics. 2005. V. 169:pp. 1379-1389.
119. Shaw J.M., Nunnari J. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast // Trends Cell Biol. 2002 V. 12:pp. 178-184.
120. Shepard K.A., Yaffe M.P. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance // J.Cell Biol. 1999. V. 144: pp. 711-720.
121. Silar P., Koll F., Rossingnol M. Cytosolic ribosomal mutations that accumulations of circular intron in the mitochondria without preventing senescence of *Podospora anserina* // Genetics. 1997. V. 145: pp. 697-705.
122. Skulachev V.P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables // Trends Biochem. Sci 2001 V. 26, pp. 23-29.
123. Sogo L.F., Yaffe M.P. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of mitochondrial outer membrane // J. Cell Biol. 1994. V. 126:pp. 1361-1373.
124. Sölner T., Griffith G., Pfaller R., Pfanner N., Neupert W. MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins // Cell. 1989. V. 59: pp. 1061-1070.
125. Sölner T., Pfaller R., Griffith G., Pfanner N., Neupert W. A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier // Cell. 1990. V. 62: pp. 107-115.
126. Sölner Rassow J., Wiedmann M., Schlossmann J., Keil P., Neupert W., Pfanner N. Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates // Nature (Lond.). 1992. V. 355: pp. 84-87.
127. Spelling T., Bottin A., Kahmann R. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* // Mol. Gen. Genet. 1996. V. 252. pp.503-509.
128. Stahl U., Lemke P.A., Tudzynski P., Kürk U, Esser K. Evidence for plasmid like DNA in filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina* // Mol. Gen. Genet. 1978. V. 162: pp. 341-343.
129. Steinberg G., Schliwa M. Organelle movements in the wild type and wall-less fz: os-1 mutants *Neurospora crassa* are mediated by cytoplasmic microtubules // J. Cell Sci.,1993, V. 106, pp. 555-564.
130. Stevens B.J. Variation in number and Volume of the mitochondria in yeast according to growth conditions. A study based on serial sectioning and computer graphics reconstruction // Biol. Cell. 1977, V. 28, pp. 37-56.
131. Stevenson C.B., Fox A.N., Kennell J.C. Senescence associated with the over-replication of a mitochondrial retroplasmid in *Neurospora crassa* // Mol. Gen. Genet. 2000. V.263: pp. 433-444.
132. Suelman R., Fischer R. Mitochondrial movement and morphology are dependent on an actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans* // Cell Motil. Cytoskeleton, 2000, No. 45, pp. 42 – 50.
133. Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris* // Biochim. 1998. V. 80. № 4. pp. 295-301.
134. Takei K., McPherson P.S., Schmid S.L., Camilli P.De. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTPγS in nerve terminals // Nature 1995 V. 374: pp. 186-190.
135. Tieu Q., Nunnari J. Mdv 1p is a WD repeat protein that interacts with the dinamin- related GTPase. Dnm 1p, to trigger mitochondrial division // J. Cell Biol., 2000, V. 151, pp. 353-365.
136. Tieu Q., Okreglak V., Naylor K., Nunnari J. The WD repeat protein, Mdv 1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm 1p and Fis 1p during mitochondrial fission // J. Cell Biol. 2002. V. 158: pp. 445-452.
137. Vanlerberghe G.C., McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V 48: pp. 703-734.
138. Weber R., Wakley G., Pitt D. Histochemical and Ultrastructural Characterization of Fungal Mitochondria // Mycologist. 1998. V.12. Part 4. P.174-179.
139. Westermann B., Prokisch H. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi // Fungal genetics and biology. 2002, No. 36, pp. 91-97.
140. Wong E.D., Wagner J.A., Gorsich S.W., McCaffery

J.M., Shaw J.M., Numari J. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria // *J. Cell. Biol.* 2000. V. 151(2): pp. 341-352.

141. *Yaffe M.P., Harata D., Verde F., Eddison M., Toda T., Nurse P.* Microtubules mediate mitochondrial distribution in fussion yeast// *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, pp.11664-11668.

142. *Zickler D., Olson W.* The synaptonemal complex and the spindle plaque during meiosis in yeast // *Chromosoma.* 1975 V. 50: pp. 1-23.

Генетика грибов

А.В. Шнырева

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА ГРИБОВ

Грибы, будучи симбионтами, паразитами, древоразрушителями, образуют популяции, описание которых чаще всего не подходит под классические модели популяционной генетики. Зачастую сложно разграничить не только популяции, но и отдельные индивидуумы в природе, и это прежде всего связано со сложными и разнообразными системами воспроизведения и рекомбинаций, встречающимися у грибов в природе. Для грибов характерно как бесполое, так и половое размножение, а иногда и смешанный тип воспроизводства. У целого ряда грибов половое воспроизводство происходит нерегулярно или вовсе отсутствует, как, например, у большой группы митоспоровых грибов. Грибы способны производить разнообразные пропагулы вследствие как мейотического, так и митотического деления ядер. Многие из этих пропагул могут длительное время находиться в покоящемся состоянии и прорасти только в подходящих условиях. К тому же генетические обмены и рекомбинации у грибов не лимитированы только половым воспроизводством. Парасексуальный цикл также сопровождается генетическими обменами и рекомбинациями между индивидуумами.

Другая проблема, с которой сталкиваются исследователи, изучающие грибные популяции,

связана с определением понятия «грибной индивидуум». Иногда бывает затруднительно дать определение грибного индивидуума в особенности для грибов, живущих в субстратах, или грибов, размножающихся исключительно клонально. Например, базидиомицет *Armillaria gallica* можно рассматривать как один из самых больших организмов или, наоборот, самых маленьких в зависимости от того, что считать единицей (индивидуумом) – *генету* или *рамету*. Под *генетой* понимают индивидуум, берущий начало от одного и того же мейотического продукта. *Рамета* – это также дискретный индивидуум, но он может представлять собой субклон генеты, т.е. это индивидуум, воспроизведенный бесполом путем (Leslie, Klein, 1996).

Все эти вышеописанные особенности размножения, присущие грибам, вызывают дискуссию и при определении понятия «грибные популяции». По Добжанскому, *популяция* – это совокупность свободно скрещивающихся особей с общим генным фондом (Dobzhansky, Wright, 1941). *Грибные популяции* можно определить как группу сходных индивидуумов, занимающих определенную территорию в определенный момент времени (Anderson, Kohn, 1998). Согласно современным представлениям, популяция является

структурной частью биоценозов, составляющих биосферу, и одновременно – единицей эволюционного процесса.

По классическому определению, принятому популяционными генетиками, *вид* состоит из группы интербредных природных популяций, репродуктивно изолированных от других таких групп, занимающих определенное место в биоценозах и обладающих общей эволюционной судьбой. Чтобы определить границы вида, нужно оценить уровень генетического разнообразия среди индивидуумов в пределах популяций, а также динамику распределения этого генетического разнообразия в пространстве и во времени. В свою очередь, уровень генетической вариабельности популяции зависит от способа размножения гриба (системы скрещивания), мутационных и рекомбинационных процессов, протекающих в популяциях, а также от потока генов между популяциями и географического распределения изучаемой генетической изменчивости. Определенные трудности в использовании этих критериев возникают для видов, воспроизводимых исключительно бесполом путем. Наличие или отсутствие полового размножения часто непосредственно сопряжено с общим количеством генетической вариабельности и способностью популяции изменяться.

Итак, в зависимости от реализации той или иной программы размножения в пространстве грибные популяции могут быть как полностью *клональными* (бесполоыми), так и *панмиктическими*, или свободно скрещивающимися, а иногда и смешанными. Например, большинство микромицетов осуществляет функцию размножения и распространения в бесполой фазе – анаморфе, и, следовательно, их популяции будут представлены отдельными клонами. Половая стадия (телеоморфа) у некоторых из них служит для сохранения в неблагоприятных условиях и для увеличения потенциала изменчивости вследствие генетической рекомбинации. Бесполое размножение неизбежно приведет к формированию *клональных* популяций с редкими случайными генетическими обменов между их членами. Отдельные индивидуумы в клональных популяциях могут быть морфологически сходными, но генетически различными и, наоборот, они могут демонстрировать высокую степень генетического сходства с малой долей вариабельности (Kohn, 1995). Половое воспроизведение, сопровождаемое часто происходящими рекомбинациями, приводит к популяционной структуре, характеризующейся высоким уровнем генотипического

разнообразия (по сравнению с клональными популяциями) и случайной комбинацией аллелей различных локусов. Однако, не только популяции агамных видов, но и высших базидиальных грибов, регулярно формирующих половые структуры, могут быть представлены в природе генетически сходными клонами; при этом размер клонов может варьировать от чрезвычайно малых до гигантских, распространяющихся на целые континенты, например, у опенка *Armillaria bulbosa* (Smith et al., 1992; Anderson, Kohn, 1995), *Sclerotinia sclerotiorum* (Kohli et al., 1992; 1995).

Половой цикл обеспечивает постоянно протекающие генетические обмены, и грибы, размножающиеся половым путем, формируют *панмиксные* популяции, в которых скрещивания между особями *регулярны* и *случайны*. Однако даже в панмиксных грибных популяциях с преобладанием полового воспроизводства, как, например, у базидиальных грибов, для которых характерен мультиаллельный гетероталлизм (диафоромиксис), может присутствовать некоторая доля инбридинга (межсисбовых скрещиваний) в зависимости от системы генетической регуляции полового процесса – *биполярной* (однофакторной) или *тетраполярной* (бифакторной). Максимум инбредности (совместимых скрещиваний между сисбами – спорами из одного плодового тела) в случае биполярного гетероталлизма теоретически составляет 50%, так как все потомки имеют два различных аллельных состояния по одному фактору (локусу) полового совместимости (*Ax* или *Ay*). При тетраполярном гетероталлизме доля инбредных комбинаций не превысит 25%, так как базидиоспоры одного плодового тела различаются аллелями по двум факторам полового совместимости – *AxBx*, *AxBy*, *AyBx* и *AyBy* (Дьяков и др., 2005).

Таким образом, собственно система полового размножения, характерная для данного вида (гомоталлизм, биполярный или тетраполярный гетероталлизм), определяет соотношение инбридинга и аутбридинга в природных популяциях. Нетрудно понять, что гомоталлизм дает 100%-ную вероятность инбридинга, и у гаплоидных видов приведет неизбежно к снижению внутрипопуляционного полиморфизма. Гетероталлизм, наоборот, обеспечивает генетический дрейф и поток генов в популяциях, а сложные системы генетического контроля, как, например, у тетраполярных базидиомицетов, способствуют панмиксии.

Важным источником новых генотипов у панмиктических видов, размножающихся исключи-

тельно или почти исключительно половым способом (например, дереворазрушающие базидиомицеты), являются *рекомбинации*, возникающие при половом размножении. Однако, ряд авторов полагают, что половое воспроизводство более важно для элиминирования вредных мутаций в стабильных условиях среды обитания, чем для появления новых сочетаний генов и скорости адаптации вида в новых экологических нишах. Это предположение было продемонстрировано на экспериментальных популяциях аксомицетных дрожжей *Saccharomyces* (Zeyl, Bell, 1997). В условиях стабилизирующего отбора и необходимости высокой адаптации может происходить отбор на снижение рекомбинации, в то время как в нестабильных условиях обитания необходима высокая варибельность (адаптабельность) тех или иных генотипов, и тогда отбор, наоборот, может идти на усиление рекомбинационных механизмов. У грибов существуют широкие возможности развиваться в том и другом направлении (Дьяков, 1999). Так, у большинства фитопатогенных грибов, имеющих в жизненном цикле одну половую генерацию и несколько бесполов, роль половой рекомбинации менее значительна. Однако и в этом случае половая рекомбинация влияет на генетическую структуру популяций, увеличивая генетическое разнообразие, как это показано для ржавчинных грибов при наличии промежуточных хозяев (Burdon, Roelfs, 1985).

Факторы, влияющие на формирование популяционной структуры вида

Популяционная биология грибов строится на основных подходах и принципах классической популяционной генетики. Однако имеются и некоторые особенности, связанные с характером размножения грибов в природных экотопах. Прежде чем приступить к популяционному анализу, нужно четко сформулировать задачи исследования и, исходя из поставленных задач, должным образом провести сбор полевого материала. Прежде всего, выборки должны быть репрезентативны и случайны, т.е. на ограниченной рамками данного исследования территории сбор образцов (природных изолятов) должен осуществляться случайно и равномерно. Для популяций фитопатогенных грибов это условие легко выполнимо, и сбор материала можно проводить по периметру и диагоналям выбранного поля (или участка поля). Сложнее сформировать *случайную* выборку для грибов, приуроченных к

определенным субстратам, например, для дереворазрушающих базидиомицетов. В этом случае можно рекомендовать охватить как можно более широкую территорию. Размер выборки должен быть таковым, чтобы можно было обнаружить редкие генотипы. Ограниченность численности выборки в популяционном анализе может быть компенсирована увеличением числа изучаемых полиморфных локусов индивидуумов. В целом, чем большее количество независимых локусов будет проанализировано, тем более точную картину генетических связей и закономерностей мы получим.

Собственно *цель* анализа популяционной структуры вида заключается в понимании относительной роли происходящих в популяции микроэволюционных процессов, основными из которых являются *рекомбинация*, *поток генов* и *генный дрейф*. Изучение структуры популяций данного вида фактически сводится к оценке происходящих в природе процессов накопления генетической изменчивости, ее последующей дифференциации и связи с вышеназванными микроэволюционными процессами (Lewontin, 2000). Общее разнообразие генотипов в популяциях значительно увеличивается за счет свободной *рекомбинации*, которая обеспечивает гораздо более широкий набор приспособительных возможностей, чем другие процессы. *Генный дрейф* проявляется в случайных изменениях генных частот в последовательных поколениях в силу ограниченной численности фактически любой реальной популяции. Дрейф генов – процесс совершенно случайный, который, с точки зрения популяционных биологов, в большей степени обусловлен размерами изучаемых выборок (Айала, 1984). Эффекты случайного дрейфа генов компенсируются процессами *миграции* некоторой интенсивности, определяемой как *поток генов* (обмен генов между популяциями), т.е. природные популяции одновременно испытывают воздействие и случайного дрейфа, и миграции генов, взаимно уравновешивающих друг друга. Поток генов оказывает огромное влияние на генотипическую структуру популяций, так как обеспечивает обмен генами между популяциями. Поток генов не изменяет частот аллелей у вида в целом, однако они могут изменяться в локальных популяциях, если аллельные частоты у «старожилов» и «пришельцев» различны. Обмен мигрантами приводит к снижению генетической дифференциации между популяциями. Среди существующего разнообразия путей миграции наиболее эффективно осуществляется миграция аэроген-

ных грибов. Генетический дрейф приводит к генетической дифференциации (и подразделению на субпопуляции) и соответственно оказывает противоположный потоку генов эффект. Однако в популяциях, в которых активно происходят рекомбинационные процессы, генетическая дифференциация популяций в результате генного дрейфа может быстро нивелироваться. С другой стороны, если поток генов между популяциями одного вида по каким-либо причинам полностью или почти полностью прерывается (например, в случае географической изоляции), и каждая из популяций начинает приспосабливаться к местным условиям обитания, то в условиях действия генного дрейфа это приведет к генетической дифференциации между популяциями. По мере накопления генетических различий между популяциями могут возникнуть репродуктивно изолирующие механизмы в результате того, что различные генофонды оказываются взаимно неадаптированными (Алтухов, 2003). Примером могут служить репродуктивно изолированные виды-двойники у опенка, вешенки, которые часто неразличимы по морфологическим признакам.

Такие процессы как *мутации* и *отбор* также оказывают влияние на изменение аллельных частот генов. Мутации играют особенно важную роль в инициации (генерации) начальной генетической вариабельности (Ohta, 1974). *Спонтанный мутационный процесс* в популяциях особей, как полагают, является одним из главных источников новых аллелей, приводящих к увеличению общего генетического разнообразия. В агамных гаплоидных популяциях летальные мутации сразу же элиминируются, а в гетерозиготных диплоидах (или дикарионах) могут быть скрыты, и в последнем случае являются «сырьем» для естественного отбора. Уровень генетического разнообразия в популяции поддерживается также за счет какой-то доли селективно нейтральных мутаций (аллелей). *Естественный отбор* рассматривается в теории популяционной генетики как важнейший фактор эволюции, вызывающий *адаптивные изменения* в генетической структуре популяции. Отбор – это процесс, когда *различные генотипы*, или правильней сказать, *генетически обусловленные фенотипические варианты* в пределах данного вида различаются по их вкладу в каждое последующее поколение в силу их дифференциального воспроизведения или выживаемости (Endler, 1986; Singh, 2003). Движущий отбор приводит к сдвигу частот генотипов в популяциях в связи с изменением их относительной приспособленности в новых условиях. Диз-

руптивный отбор поддерживает расхождение двух или большего числа независимо эволюционирующих популяций, что в условиях возникновения репродуктивной или географической изоляции может привести к аллопатрическому видообразованию. Стабилизирующий отбор поддерживает численность наиболее приспособленных к данным условиям особей в популяции. Например, *эффективность отбора по растениям-хозяевам*, приводящего к дифференциации специализированных форм, в популяциях фитопатогенных грибов будет зависеть от типа размножения грибной популяции. В половых популяциях каждый цикл полового воспроизводства может дать большое число рекомбинантов, в то время как в клональных популяциях основным источником изменчивости будут мутации, и отбором будут закрепляться коадаптивные генные комплексы. Таким образом, естественный отбор представляет собой процесс, способствующий повышению приспособленности организмов и предотвращающий разрушительные последствия всех остальных процессов.

Популяционно-генетические признаки (генетические маркеры)

В качестве генетических маркеров (признаков) в популяционном анализе может быть использован любой просто наследуемый фенотипический вариант, который можно обнаружить среди индивидуумов в пределах изучаемого вида. Однако при этом следует помнить, что генетические маркеры могут быть гетерогенными (неоднозначными) по их влиянию на общую приспособленность (fitness) данного индивидуума. Поистине революционный шаг вперед был сделан с применением в популяционно-генетических исследованиях генных маркеров, основанных на методах биохимической и молекулярной генетики. Эти подходы позволили проводить широкий популяционный анализ, охватывающий большое количество особей по большому числу локусов (Banks et al., 2003).

Группы признаков, наиболее часто используемые в популяционном анализе популяций грибов, можно подразделить на несколько категорий:

1. Культурально-морфологические:
 - окраска и скорость роста колоний,
 - размеры конидий, спор и другие.
2. Физиолого-биохимические:
 - чувствительность к фунгицидам, антибиотикам,

- ауксотрофность,
 - тест на патогенность,
 - гены вирулентности.
3. Молекулярно-генетические:

- изозимы (или аллозимы),
- ДНК-полиморфизмы (RFLP, AFLP, RAPD, SCARs, ПЦР-фингепринтинг).

4. Группы вегетативной несовместимости.

5. Факторы типов спаривания (для грибов, имеющих в жизненном цикле половую стадию).

Культурально-морфологические признаки, пригодные для анализа популяций данного вида, должны быть, прежде всего, дискретными, т.е. качественно различными, что позволило бы выделить *морфотипы* и проанализировать частоты их встречаемости в популяциях. Требование дискретности должно соблюдаться и при выборе физиолого-биохимических признаков и, в частности, устойчивости к фунгицидам в популяциях фитопатогенных грибов. Популяции фитопатогенных грибов можно также характеризовать по степени патогенности природных изолятов и характеру распределения частот генов вирулентности, например, в популяциях ржавчинных грибов. Однако общим недостатком большинства морфолого-культуральных признаков является их слабовыраженная (недостаточная) генетическая обусловленность и существенная зависимость от условий окружающей среды, а такие признаки как устойчивость к фунгицидам, вирулентность значительно влияют на общую приспособленность индивидуумов.

Для анализа же процессов, происходящих в популяциях микроорганизмов, необходимо располагать *селективно нейтральными* признаками, непосредственно отражающими генотипические различия особей и не зависящими от условий среды обитания. Данным требованиям удовлетворяют аллозимы и разнообразные ДНК-признаки. Анализ *аллозимных спектров* (множественных молекулярных форм ферментов) широко используется в популяционном анализе, так как эти признаки информативны, и многие из них представляют собой множественные аллели моногенно наследуемых локусов, что позволяет изучать сегрегацию менделирующих признаков (Burdon, Roelfs, 1985; Ennos, Swales, 1987; Royse, May, 1990; Leung et al., 1993; Kerrigan et al., 1999). Методики выявления ферментативных активностей в нативных гелях (крахмальных или полиакриламидных) в деталях представлены в руководстве Г. Манченко (Manchenko, 1984).

Возможности применения *ДНК-признаков* практически не ограничены, так как в анализе

ДНК-полиморфизмов можно применять различные локусы и последовательности генома; анализ можно значительно расширить за счет набора различных праймеров, ферментов рестрикции и т.д. Более того, можно подобрать такие признаки (например, AFLP, RFLP и мтДНК-зонды), которые будут демонстрировать независимую Менделевскую сегрегацию признаков в потомстве, т.е. сегрегировать не сцеплено (Foster et al., 1993; Hintz et al., 1993; Leung et al., 1993). *RFLP-маркеры* получают при гибридизации гомологичных селективно нейтральных ядерных локусов с ДНК-зондом; при этом можно подобрать полиморфные доминантные маркеры подобно изозимам, как это было сделано для грибов *Septoria tritici*, *Agaricus subfloccocus*, *Laccaria bicolor* (McDonald et al., 1995; Kerrigan et al., 1999; Martin et al., 1999). Широко используемые AFLP-маркеры получают в реакциях амплификации со специфическими праймерами, причем возможности подбора подобных локусов не ограничены, как это было показано в анализе северо-американских популяций *Gibberella zeae* (Zeller et al., 2004). *ДНК-фингепринты* получают при гибридизации с ДНК-зондом семейств повторяющихся последовательностей ДНК, диспергированных по всему геному, например, для фитопатогенных грибов *Magnaporthe grisea* и *Fusarium oxysporum* (Levy et al., 1991; Edel et al., 1995). *МтДНК-гаплотипы* также могут быть использованы в качестве селективно нейтральных молекулярных признаков в популяционном анализе грибных популяций (Smith et al., 1990; McDonald et al., 1995; Saville et al., 1998; Xu et al., 1998). *Электрофоретические кариотипы*, получаемые с помощью электрофореза в пульсирующем поле (pulsed field gel electrophoresis), позволяют картировать положение RFLP-локусов на тех или иных хромосомах, как, например, это было сделано для *Septoria tritici* (McDonald et al., 1995). Для возбудителя голландской болезни вязов *Cryphonectria parasitica* были подобраны мтДНК-зонды и ДНК-фингепринты с 12 рестрикционными фрагментами, локализованными на шести из семи имеющихся в геноме гриба хромосомах; а полученные гибридизационные профили с мтДНК-зондами, названные мтДНК-гаплотипами, продемонстрировали материнское наследование и высокий уровень полиморфизма в популяциях гриба (Milgroom, Lipari, 1993; Milgroom, 1995). Широко используемые *RAPD-маркеры*, получаемые в реакциях амплификации ДНК со случайными праймерами, также

позволяют охарактеризовать уровень полиморфизма в популяциях и степень сходства между отдельными особями или группами особей, например, в популяциях возбудителей ржавчины *Uromyces appendiculatus* (MacClean et al., 1995), *Cronartium ribicola* (Hamelin et al., 1998), возбудителя рака ели *Gremmeniella abietina* (Wang, 1997).

Факторы типов спаривания (или локусы половой совместимости) и факторы вегетативной (гетерогенной) несовместимости, позволяющие очертить границы отдельных индивидуумов в природе, несмотря на их четко выраженную генетическую обусловленность, не являются селективно нейтральными. Группы вегетативной несовместимости (*vc*, *vegetative incompatibility*) – это обычно фенотипические признаки, которые контролируются несколькими *vc*-локусами, например, шестью у *Cryphonectria parasitica* (Milgroom, Cortesi, 1999). Однако *VC* фенотипы не являются идеальными признаками для изучения таких процессов в популяциях как поток генов, генный дрейф и рекомбинация, так как практически невозможно изучать расщепление и наследование этих признаков в потомстве. С точки зрения популяционной структуры и динамики, можно охарактеризовать *частоты встречаемости* групп вегетативной несовместимости, причем как в популяциях базидиальных и сумчатых грибов, размножающихся преимущественно половым путем, так и в популяциях агамных видов, например, фитопатогенных грибов. Анализ частот встречаемости аллелей локусов половой совместимости возможен только для видов, в жизненном цикле которых представлена четко выраженная половая генерация, например, для базидиальных и сумчатых грибов.

Как показано, популяции многих грибов, имеющих различные способы размножения (гомо- и гетероталлические, аутбредные и агамные) распадаются на большое число вегетативно несовместимых *vc*-групп, что практически изолирует находящиеся по соседству колонии друг от друга (Дьяков, Долгова, 1995). Вероятно, имеются какие-то факторы, селекционирующие гены вегетативной несовместимости и обуславливающие их отбор в популяциях. Вегетативная несовместимость представляет собой механизм, позволяющий разграничить индивидуумы в пределах свободно скрещивающихся популяций. У аскомицетов и дейтеромицетов вегетативно несовместимые штаммы обычно не формируют гетерокарионов, и парасексуальный цикл, таким образом, не происходит. У базидиомицетов ве-

гетативно несовместимые штаммы в популяции являются отдельными генетическими индивидуумами (Worrall, 1997). Группы вегетативной несовместимости в лаборатории определяют по антагонистическим ответам как подавление роста или формирование барража. Генетика локусов вегетативной несовместимости сложна и недостаточно изучена. В то же время гены вегетативной (гетерогенной) несовместимости, с точки зрения популяционной генетики, можно рассматривать как *ассортативные гены спаривания*, т.е. гены, повышающие вероятность спаривания сходных индивидуумов (Jacobson et al., 1993; Wu et al., 1998). Кроме того, они обеспечивают отличие «своего» клона от «не своего».

Генетический контроль половой и вегетативной несовместимости осуществляется независимо друг от друга. Однако, у ряда грибов (*Ophiostoma ulmi*, *Phytophthora infestans*) описана отрицательная корреляция между половой и вегетативной несовместимостью. Было показано, что при наивысшей степени несовместимости между штаммами *O. ulmi* образуется в 10 раз больше перитециев, чем при взаимодействии между совместимыми штаммами (Brasier, 1988; Дьяков, Долгова, 1995). Свободная рекомбинация *vc*-локусов при половом размножении дает большое число несовместимых типов в популяции. Таким образом, ограничение инбридинга может быть главным результатом вегетативной несовместимости у регулярно аутбредных грибов.

Определение *факторов типов спаривания* (локусов половой совместимости) и их распределение в популяциях базидиальных грибов можно проводить с помощью мон-мон (монокарион-монокарион) и ди-мон (дикарион-монокарион) скрещиваний (Шнырева и др., 1998). Если мон-мон гибридизация является обязательным условием прохождения полового процесса в популяциях большинства базидиальных грибов, то ди-мон скрещивания чаще описаны лишь в лабораторных опытах. Однако для некоторых грибов ди-мон скрещивания, хотя и не регулярно, могут происходить и в природных условиях, как, например, это было показано для грибов *Laccaria bicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus blazei* (Doudrick R.L. et al., 1995; Di Baptista et al., 1996; Carvalho et al., 1995; Shnyreva, 2002). Ди-мон скрещивания можно наблюдать также у грибов, в природных популяциях которых постоянно присутствуют как гомокариотические, так и гетерокариотические особи, например, у гриба *Rhizoctonia solani* (цит. по Дьяков, Долгова, 1995).

Популяционно-генетические параметры

Теперь разберем более подробно *показатели* (параметры), по которым можно охарактеризовать *структуру* популяций и *динамику* процессов, происходящих в популяциях и влияющих на их дифференциацию. Поскольку общее число сегрегирующих локусов генома достаточно велико, то понятны трудности при попытке описать совокупную наследственную информацию, которой обладает данный вид или популяция. Имеется только один очевидный путь такого рода описания – *через определение частот (концентраций) аллельных генов* каждого отдельного локуса. Частота гена – это основной популяционно-генетический параметр (Алтухов, 2003). Существует несколько методов оценки аллельных частот в популяциях; наиболее легко интерпретируемым и часто используемым случаем для грибных популяций является анализ локусов с *кодминантным* наследованием, например, димерных белков, характеризующихся строгой субстратной специфичностью (Шнырева и др., 2004а). У инбредных видов влияние соотношения числа родителей и потомков слабо сказывается на увеличении точности определения аллельных частот, в то время как у аутбредных видов это влияние существенно.

Полиморфизм и гетерогенность грибных популяций. Ключом к изучению генетических процессов в популяциях является анализ полиморфных признаков и оценка уровня полиморфизма. Точную оценку генетической изменчивости популяций можно провести посредством оценки *доли полиморфных* (вариабельных) локусов и доли *гетерозиготных* локусов у типичной для популяции особи (Айала, 1984). Собственно *полиморфизм* как проявление индивидуальной прерывистой изменчивости живых организмов подразумевает «наличие в популяции двух или более аллелей одного локуса, встречающихся с ощутимой частотой» (Алтухов, 2003). Полиморфизм в популяциях, во-первых, имеет очевидное приспособительное значение, во-вторых, поддерживается в сбалансированной форме за счет адаптивного преимущества гетерозигот (в популяциях диплоидных организмов), в-третьих, служит свидетельством происходящих в природе процессов дивергенции популяций, и, наконец, отражает запас их экологической пластичности за счет постоянного выщепления и комбинаций различных генотипов. Локус принято считать полиморфным, если частота гетерозигот по данному локусу составляет не менее 5%.

Генетическое (генотипическое) разнообразие является важным показателем, характеризующим полиморфность вида, и является функцией числа аллелей по каждому изучаемому локусу и их частот. Оценка генетического разнообразия можно проводить как для агамных, так и панмиксных видов. Однако в случае панмиксных популяций мы фактически будем оценивать генотипическое разнообразие, которое может быть выше генетического, так как возможны различные комбинации генотипов в диплоидах. *Генотипическое* разнообразие в панмиксных популяциях с большой вероятностью будет выше, чем в клональных, также за счет имеющихся рекомбинантных генотипов.

Генотипическое разнообразие является функцией числа и частот комбинаций аллелей по множественным локусам:

$G' = 1/\sum p_i^2$, где p_i – наблюдаемая частота i -того мультилокусного генотипа.

Оценку *генного (генетического) разнообразия*, характеризующего число и частоты аллелей по каждому изучаемому локусу, проводят на основе *индекса разнообразия по Шеннону*:

$H' = -\sum p_i \ln p_i$, где p_i – частота встречаемости i -того фенотипа;

$H' = n/(n-1)(1 - \sum x_i^2)$ – для малых выборок с учетом гаплотипов.

Другой информативной оценкой гетерогенности популяций является гетерозиготность на локус, которую рассчитывают:

$H = \sum h_i/n$, где n – число изученных локусов, включая мономорфные,

h_i – гетерозиготность по i -тому локусу.

С помощью индекса разнообразия H' и G' можно оценить состояние любого признака в любой популяции, в то время как оценку *гетерозиготности* можно провести лишь для скрещиваемых (панмиксных) видов и невозможно оценить у гаплоидных и самофертильных видов. *Гетерозиготность* – это средняя частота особей, гетерозиготных по выбранным локусам. Этот показатель является более совершенной мерой оценки генетической изменчивости в популяции, достоверность которой повышается при анализе как можно большего набора локусов (лучше более четырех). Гетерозиготность на локус H легко рассчитать для аллозимных и ДНК-локусов с кодминантным наследованием.

Гетерозиготность популяции рассчитывается в два приема: сначала определяют частоты особей, гетерозиготных по каждому локусу, в популяции, а затем полученные значения ус-

редняют по всем локусам (Айала, 1984; Ayala, 1975). В популяциях со случайными скрещиваниями число гетерозигот будет выше, чем в популяциях, в которых присутствует доля клонального воспроизводства. В агамных популяциях, размножающихся клонально, большинство особей с большой вероятностью будут гомозиготными. Если наблюдаемое значение гетерозиготности меньше ожидаемого ($H_o < H_e$), то это свидетельствует о нехватке (дефиците) гетерозигот в данной популяции, и, следовательно, об отклонении от панмиксии, что может быть следствием клонального воспроизводства или инбридинга (об инбридинге более подробно см. далее). Однако значительное снижение уровня генетического разнообразия или гетерозиготности можно наблюдать и в панмиксных популяциях малой численности с низким коэффициентом роста – так называемый, эффект «горлышка бутылки» (bottleneck), при котором численность популяции резко сокращается в силу изменений климатических или каких-либо других условий существования (Nei, 2005). После того, как популяция прошла через «горлышко бутылки», несмотря на восстановление ее изначальной численности, прежний уровень гетерозиготности популяции восстанавливается не сразу и остается низким еще несколько поколений. На математических моделях было показано, что, в популяциях, испытывающих эффект «горлышка бутылки», снижение числа аллелей на локус происходит быстрее снижения гетерозиготности, и, наоборот, при росте численности популяции число аллелей на локус возрастает (восстанавливается) гораздо быстрее уровня гетерозиготности (Nei, 2005). Поэтому в популяциях большой численности средняя гетерозиготность всегда будет выше и в меньшей степени будет подвержена колебаниям. Именно с фактором численности популяций и связан тот факт, что средняя гетерозиготность особей в популяциях разных видов колеблется в широких пределах (Lewontin, 1974; Nei, 1975; Nei, Graur, 1984). Существует также мнение о том, что в популяциях малой численности процессы видообразования и дивергенции протекают быстрее, так как фиксация аллелей различных комплексов несовместимости в разных популяциях будет усиливаться действием эффекта «горлышка бутылки» (Nei et al., 1983; Nei, 2005). Однако эффективное видообразование может происходить и в отсутствие этого эффекта в силу действия других репродуктивно изолирующих механизмов (о механизмах см. далее).

Следует также обратить внимание на то, что значения генного разнообразия могут быть значительно выше значений гетерозиготности, так как популяции грибов в целом высоко полиморфны, и этот полиморфизм обусловлен наличием разных гомозигот. Половое воспроизводство обычно приводит к структуре популяций, характеризующихся высоким уровнем генотипического разнообразия по сравнению с клональными популяциями, так как генотипическое разнообразие в панмиксных популяциях повышается еще и за счет *случайной комбинации аллелей* различных локусов у диплоидов. Однако и в бесполой популяции может наблюдаться уровень генетического разнообразия, сопоставимый или даже превышающий таковой для панмиксных видов, но это обеспечивается другими механизмами, например, высоким уровнем спонтанных мутаций, как это было показано в нашей и других лабораториях для популяций возбудителя пирикулярноза риса *Pyricularia oryzae* (Дарага-Шнырева, 1986).

Генотипическая структура популяций. Популяционная генетика фактически исследует закономерности сохранения и преобразования генотипической структуры популяций в пространстве и во времени. Состояние неизменности генотипического состава в свободно скрещивающихся (панмиктических) популяциях описывает закон Харди-Вайнберга. Фактически равновесие Харди-Вайнберга выражает стабильность генетического состава популяции во времени, так как свободное скрещивание (панмиксия) означает случайное равновероятное объединение гамет. Среди основных процессов, приводящих к изменению частот аллелей и генотипов в популяциях, можно назвать рекомбинационный и мутационный процессы, а также миграцию и дрейф генов. Принцип Харди-Вайнберга подразумевает, что при отсутствии элементарных эволюционных процессов (мутаций, отбора, миграции и дрейфа генов) частоты генотипов остаются неизменными из поколения в поколение. При случайных скрещиваниях равновесные частоты генотипов в любом локусе достигаются за одно поколение в том случае, если частоты аллелей у противоположных полов исходно одинаковы. Однако такие идеальные популяции практически не встречаются в природе в виду действия многочисленных факторов (таких как случайный генный дрейф, мутации, миграции и отбор), смещающих популяции с точки равновесия. Равновесие Харди-Вайнберга в природе поддерживается, если изолированная панмиктическая

(свободно скрещивающаяся) популяция *диплоидных* организмов имеет бесконечную численность и не испытывает дифференциального отбора генотипов; частоты аллелей локусов, например А и а, в такой идеальной популяции будут соответствовать соотношению $p^2 : 2pq : q^2$ (соответствующие генотипам *Aa, Aa, aa*), а частоты аллелей $p + q = 1$. Таким образом, равновесие Харди-Вайнберга фактически оценивает характер распределения аллельных частот во времени, т.е. теоретически ожидаемые частоты генотипов/аллелей сравнивают с фактическими для данной популяции (по χ^2). Оценку можно проводить только для свободно скрещивающихся популяций, так как отсутствие скрещиваемости изолятов не позволяет идентифицировать отдельные фракции на белковых гелях и паттернах ДНК как аллели одного или разных локусов.

Итак, принцип Харди-Вайнберга действует, когда скрещивания в популяции случайны, т.е. когда вероятность скрещивания между двумя генотипами равна произведению их частот (Айала, 1984). В случае неслучайных, например, *ассортативных (предпочтительных) скрещиваний*, частоты генотипов неизбежно будут изменяться. Ассортативное скрещивание само по себе не изменяет частот генов, но изменяет частоты *генотипов*. Как одну из форм проявления ассортативных скрещиваний можно рассматривать *инбридинг*, при котором в силу ряда причин скрещивания между родственными организмами (сibsами) происходят чаще, что неизбежно приведет к повышению частоты гомозигот и снижению частоты гетерозигот. Оценить этот процесс можно по *коэффициенту инбридинга F*. Коэффициент инбридинга фактически отражает избыток в популяции особей, гомозиготных по какому-либо локусу. При отсутствии инбридинга ($F=0$) частоты генотипов удовлетворяют закону Харди-Вайнберга. В панмиксных популяциях вероятность спариваний носителей тех или иных генотипов пропорциональна долям, в которых эти генотипы представлены в популяции. Очевидно, что случайный дрейф генов будет увеличивать общее генетическое разнообразие и гетерозиготность в популяции. Возрастание же гомозиготности популяции при условии действия случайного дрейфа генов будет указывать на прямую связь между генным дрейфом и *инбридингом*, т.е. будет свидетельствовать о возрастании во времени *неслучайной ассоциации* гамет в ограниченной по численности популяции, и, таким образом, отклонение от панмиксии в каждой последующей генерации будет становиться все более существенным.

Эффективная численность популяции также является критическим фактором для поддержания равновесия аллельных частот (равновесия Харди-Вайнберга). Эффективная численность популяции определяется по числу особей, дающих начало следующему поколению. Однако определить истинные размеры грибных популяций часто бывает затруднительно (Ohta, 1974). Так, показатель *эффективной численности популяций* (N_e) дает возможность оценить размер популяции только для свободно скрещивающихся панмиксных популяций. Однако даже в панмиксных популяциях скрещивания не всегда случайны, так как не все особи в популяции способны дать одинаковое количество потомков. Иными словами, репродуктивная стратегия оказывает существенное влияние на показатель эффективной численности популяции. Например, популяция гетероталличных аскомицетов достигнет *максимально эффективного размера* при условии соотношения аллелей типов спаривания, равного 1:1, и в случае, если все штаммы будут самостерильными.

Для гетероталличных аскомицетов оценку этого показателя можно провести, используя следующие уравнения (Leslie, Klein, 1996):

$$N_{e(mt)} = (4N_+ \times N_-) / (N_+ + N_-),$$

где $N_{e(mt)}$ – эффективная численность популяций, оцененная по типам спаривания, N_+ , N_- – число штаммов типов спаривания + и – соответственно.

Для гаплоидных и диплоидных популяций

$$N_{e(f)} = (4N^2 N_h) / (N + N_h)2, \text{ где } N_{e(f)} \text{ – эффективная численность популяций с учетом инбридинга, } N \text{ – общее число индивидуумов, } N_h \text{ – число гермафродитов.}$$

Наглядным примером являются популяции возбудителя рака сосны *Fusarium subglutinans f.sp. pini*, в которых особи противоположных типов спаривания потенциально могут скрещиваться, давая фертильные перитеции с жизнеспособными аскоспорами. При этом лимитирующим фактором, влияющим на *эффективную численность* популяций гриба, будет число штаммов, функционирующих как женские особи (Britz et al., 1998). Было показано, что в природных популяциях гриба *F. subglutinans f.sp. pini* численность изолятов, функционирующих как мужские особи выше, чем число женских особей. Это связано с тем, что в популяциях с преобладанием полового воспроизводства женские стерильные штаммы, которые могут функционировать только как мужские, быстро элиминируются в виду

их очевидных недостатков по сравнению с самостерильными гермафродитными штаммами. Если в течение жизненного цикла популяция размножается преимущественно бесполом путем, то в этом случае женские стерильные штаммы будут сохранять свою численность и могут даже доминировать в популяции. Однако, когда такая популяция начнет воспроизводиться половым путем, то недостаток женских фертильных особей как раз и будет лимитировать *эффективную численность (эффективный размер)* популяции. Экспериментально было рассчитано, что если популяции стабильны и не испытывают значительного влияния со стороны мутаций и отбора, то одно половое воспроизводство необходимо на каждые 26–133 бесполой генераций в жизненном цикле, чтобы поддерживать уровень эффективной численности популяции $N_{e(f)}=42-46\%$. Если же показатель $N_{e(mt)}$ приближается к 99%, то это свидетельствует о том, частоты различных типов спаривания не являются лимитирующим фактором, снижающим эффективный размер (численность) популяции гриба. Однако, как показано, популяции возбудителя рака сосны *F. subglutinans f.sp. pini* еще не достигли своего равновесия, и в будущем не исключено снижение численности гермафродитных штаммов вплоть до полной их элиминации (Britz et al., 1998; 1999). Подобная ситуация в целом может привести к тому, что популяции патогена станут полностью бесполоыми.

Отбор в грибных популяциях. Для оценки действующего в природных популяциях отбора могут быть использованы разнообразные генетические маркеры. Но для того, чтобы провести адекватную оценку действия отбора, популяция должна находиться в *гаметическом равновесии (gametic equilibrium)*, т.е. исследуемые аллели, по которым характеризуется данная популяция, должны быть случайно ассоциированы друг с другом. Очевидно, что гаметическое равновесие вероятней всего можно обнаружить в случайно скрещивающихся популяциях грибов, в которых частоты генотипов не нарушены дифференцированной бесполой репродукцией отдельных клонов. В таких панмиксных популяциях расщепление аллелей в последующих поколениях не будет нарушено (так называемое, отсутствие нарушений в расщеплении аллелей, *alleles distortion*) (Burdon, Roelfs, 1985). *Неравновесность по сцеплению*, или гаметический дисбаланс, при котором аллели различных локусов в одних комбинациях встречаются чаще, чем в других, может быть

результатом действия естественного отбора и генного дрейфа в ситуации, когда одни комбинации аллелей обеспечивают более высокую приспособленность, чем другие (Barton et al., 2005). Отклонение от гаметического равновесия, или *гаметический дисбаланс (gametic disequilibrium)*, можно обнаружить, изучая ассоциации различных генетических маркеров (признаков) в данной популяции. Если гаметический дисбаланс отсутствует или уровень его незначителен, то значит, данные популяции демонстрируют высокий уровень половой рекомбинации. В грибных популяциях, которые состоят из ограниченного числа клонов, воспроизводимых бесполом путем, можно непосредственно наблюдать изменения частот генетических маркеров и получать информацию о действии отбора, особенно в популяциях гаплоидных грибов, например, фитопатогенов (Ennos, McConnell, 1995).

Оценка гаметического дисбаланса. Одним из методов тестирования панмиксии является мультилокусная оценка *гаметического дисбаланса*, или неравновесия по сцеплению, которая для гаплоидных грибов относительно проста, т.к. гаметические частоты можно определять в вегетативной фазе (Brown, Wier, 1983). Для большинства же диплоидных (дикариотических) грибов оценить частоты гаплоидных гамет оказывается затруднительным, и более доступным является сравнение генотипических частот согласно уравнению Харди-Вайнберга (Nei, Li, 1973).

Для оценки гаметического дисбаланса применяют индекс ассоциации I_A :
$$I_A = S_k^2 / \sigma_k^2 - 1$$
, где S_k^2 и σ_k^2 – наблюдаемые и ожидаемые варианты по числу гетерозиготных локусов k (для которых сравниваемые пары индивидумов имеют различные аллели).

Индекс ассоциации I_A фактически является мультилокусной оценкой гаметического дисбаланса; это проверка гипотезы о существовании неслучайных ассоциаций аллелей по различным локусам. Оценку гаметического дисбаланса можно проводить как для панмиксных, так и агамных и смешанных популяций грибов. Отсутствие гаметического дисбаланса, или *неравновесия по сцеплению (linkage disequilibrium)*, свидетельствует о часто происходящих рекомбинациях. И, наоборот, обнаруженный в популяциях гаметический дисбаланс будет свидетельствовать о присутствии клонального воспроизведения, связанного с преимущественным размножением отдельных клонов в данной популяции. Однако не только происходящие в популяциях рекомбинационные процессы, но и высокий уровень

мутаций также может привести к отсутствию ассоциаций аллелей (allelic association) различных локусов, как в клональных, так и в смешанных популяциях, т.е. к состоянию *гаметического баланса*. В таком случае говорят, что *популяция равновесна по сцеплению*.

В условиях равновесия по сцеплению (а фактически при случайных ассоциациях гамет и отсутствии сцепления) коэффициент инбридинга F можно рассчитать по формуле:

$$F = \varepsilon/pq, \text{ где } p \text{ и } q - \text{ частоты аллелей.}$$

В панмиксных популяциях отклонение значений ожидаемой (теоретической) гетерозиготности от наблюдаемой (фактической), т.е. преобладание гомозигот над гетерозиготами, может быть обусловлено некоторой долей инбридинга в популяции. В данной ситуации также будет наблюдаться некоторый гаметический дисбаланс. Коэффициент инбридинга в этом случае можно оценить в относительных единицах по формуле:

$$F = \frac{h - g}{h}$$

где h – ожидаемая гетерозиготность,
 g – наблюдаемая гетерозиготность.

Таким образом, оценка *гаметического дисбаланса* представляет собой *фактическую статистическую оценку ассоциаций аллелей* по различным локусам, которая обеспечивает исследователя информацией, во-первых, об относительном вкладе половой и бесполой репродукции в популяционную структуру данного вида и, во-вторых, о соотношении инбридинга и аутбридинга в свободно скрещивающихся популяциях. Генетически сходные клоны, обнаруживаемые в популяциях грибов, могут быть результатом как бесполого размножения, так и инбридинга при половых скрещиваниях. В случае преобладания полового воспроизводства (например, у аскомицетов, вегетативный мицелий которых гаплоиден, и у базидиомицетов, вегетативный мицелий которых дикариотичен) независимая пересортировка (assortment) несцепленных локусов во время мейоза приводит к тому, что данные локусы становятся случайно ассоциированными (randomly associated), т.е. достигают так называемого статуса *гаметического равновесия*. Скорость, с которой сцепленные локусы достигают состояния *равновесия*, обратно пропорциональна генетической дистанции между ними. Понятно, что тесно сцепленные локусы достигнут состояния равновесия (linkage equilibrium) за более длительный промежуток времени (т.е. за боль-

шее число половых генераций), чем локусы, находящиеся на большом расстоянии друг от друга в группе сцепления или на разных хромосомах. У организмов, воспроизводимых бесполом путем, все локусы в последующих бесполом генерациях фактически будут полностью ассоциированы, даже если они находятся в различных группах сцепления; это состояние как раз и определяют как *гаметический дисбаланс*, или *неравновесие по сцеплению* (gametic disequilibrium). Для *гаплоидных* в вегетативной фазе грибов, например, аскомицетов, к числу которых принадлежит большое количество фитопатогенов, достоверность оценки гаметического дисбаланса будет значительно повышаться при применении как можно большего числа анализируемых локусов, а собственно отсутствие гаметического дисбаланса будет подтверждать наличие случайных скрещиваний и панмиксность (Weir, 1990). Для *диплоидных* грибов (например, базидиомицетов) наличие отклонения от *равновесия Харди-Вайнберга* по *каждому индивидуальному локусу* может быть достаточным условием, чтобы определить, происходят ли случайные скрещивания (random mating) в популяции или нет.

Итак, если в исследуемой популяции обнаруживают гаметический дисбаланс, то изучение *действия отбора* представляется затруднительным. В этом случае для дальнейшей оценки действия отбора необходимо специально подбирать признаки, находящиеся друг по отношению к другу в гаметическом равновесии. Однако в этом случае общая картина распределения генетической вариабельности в природных популяциях данного вида будет несколько искажена. В таких ситуациях для изучения действия отбора следует рассматривать не отдельные индивидуумы в популяциях, а какие-либо генетические группы, сформированные, например, по территориальному принципу, или субпопуляции, или подвиды (Weir, 1990). В этом случае генетические маркеры фактически используются для мониторинга численности индивидуумов, принадлежащих каждой генетической группе в пределах смешанной популяции. Такой дифференцированный подход позволяет выявить различия между группами особей, являющимися результатом действующего отбора. Причем одним из условий такого подхода является выполнение следующих требований: подобные генетические группы должны быть репродуктивно изолированными, воспроизводимыми бесполом путем, или быть исследованы за период времени меньший, чем одна половая генерация (Ennos, McConnell, 1995).

Таким образом, во время полового воспроизведения мейоз приводит к независимой пересортировке хромосом и рекомбинациям в пределах хромосом, в результате чего в панмиксных популяциях будем наблюдать: а) относительно высокий уровень генотипического разнообразия и б) случайную ассоциацию аллелей по различным локусам. Это две основные характеристики, которые позволяют отличить панмиксные популяции от клональных. Гаметический дисбаланс помимо того, что зависит от репродуктивной стратегии вида в природных популяциях, может быть также следствием других процессов, например, генного дрейфа и потока генов. Генный поток может вызвать гаметический дисбаланс (смещение равновесия по сцеплению локусов) в результате миграции большого числа индивидуумов из популяций, в которых наблюдаются различные частоты аллелей. Генетический дрейф, в свою очередь, может вызвать дисбаланс в популяциях с малой численностью особей. Но этот дисбаланс будет существовать временно (если только он не закрепится действующим отбором) и рано или поздно будет разрушен рекомбинациям.

Генетическая дифференциация популяций. Оценив генетическое разнообразие в популяциях, логично перейти к оценке степени генетической дифференциации между изучаемыми популяциями (или субпопуляциями). В качестве показателей меры генетической дифференциации популяций Райт предложил несколько способов расчета *F-коэффициентов* (Wright, 1951). *F-статистика* Райта фактически оценивает степень локальной дифференциации частот генов в подразделенных популяциях (Weir, Cockerham, 1984; Weir, 1990):

$$F_{IT} = F_{ST} + (1 - F_{ST}) F_{IS}, \text{ где}$$

F_{IT} – коэффициент инбридинга особи относительно целой (Т) популяции;

F_{IS} – коэффициент инбридинга особи относительно субпопуляции (S), к которой она принадлежит;

F_{ST} – коэффициент инбридинга, или оценка генетической дифференциации субпопуляции относительно всей подразделенной популяции вследствие неслучайных скрещиваний.

Иными словами, F_{IS} оценивает снижение гетерозиготности вследствие неслучайных скрещиваний в пределах субпопуляций; F_{IT} – снижение гетерозиготности вследствие неслучайных скрещиваний в пределах общей популяции (вида); F_{ST} оценивает дифференциацию (генетическую подразделенность) между популяциями.

Ввиду того, что в основе расчета *F-коэффициентов* лежит оценка гетерозиготности особей, то соответственно генетическую дифференциацию по *F-коэффициентам* возможно оценить только для *диплоидных* свободно скрещивающихся видов. Чтобы оценить степень генетической дифференциации в популяциях *гаплоидных* и агамных видов прибегают к другому коэффициенту *генетической дифференциации* G_{ST} :

$$G_{ST} = 1 - (H_S / H_T), \text{ где}$$

H_S – среднее разнообразие гаплотипов в субпопуляциях,

H_T – разнообразие гаплотипов во всей популяции.

Так, основываясь на сравнении аллельных частот генов (локусов) с применением *F-статистики*, можно охарактеризовать как популяционную структуру и способы размножения данного вида в природе, так и степень внутривидовой дифференциации. Следует еще раз заметить, что некоторые ограничения накладываются при анализе *гаплоидных* данных, при котором можно охарактеризовать только степень генетической дифференциации и гаметический дисбаланс, который оценивает соотношение полового и бесполого воспроизведения, в то время как анализ *диплоидных* данных дает возможность оценить степень инбридинга внутри популяций.

Анализируя генетические данные по нескольким популяциям, логично задать вопрос, насколько эти популяции *генетически сходны*. *Генетическое расстояние* как раз и является мерой оценки генетических различий между популяциями (выборками) и фактически может служить основой для построения эволюционной истории (путей микроэволюции) данных популяций (Maclean et al., 1993).

Генетические расстояния (дистанции) между выборками штаммов рассчитывают по формулам, предложенным Ней (Nei, 1978):

$$I = I_{xy} / (I_x I_y)^{1/2}, D = - \ln I, \text{ где } x \text{ и } y - \text{ частоты аллелей в популяциях } X \text{ и } Y;$$

I – генетическое сходство, оценивающее долю идентичных локусов в обеих популяциях;

D – генетическое расстояние.

Фактически проводят попарное сравнение популяций по частотам аллелей выбранного числа генетических локусов. D – это фактическая оценка среднего числа замен аллелей в каждом локусе, которые произошли за время отдельной эволюции двух популяций.

В основе построения дендрограмм сходства/различий лежит расчет генетических дистанций. Полученные первичные данные по ана-

лизу молекулярных признаков (изозимных и ДНК-спектров) обрабатывают с применением различных компьютерных программ. Вводимыми для обсчета матрицами могут служить: а) индексы генетического сходства при попарном сравнении изолятов (Dice-коэффициент); б) генетические дистанции, рассчитанные по Nei; в) матрицы состояния бинарных признаков (присутствие/или отсутствие полосы на геле, 1/0). Анализ молекулярных признаков сопровождается кластеризацией штаммов, например, с применением UPGMA-алгоритма – метода попарного сравнения невзвешенных признаков со средним арифметическим. При внутривидовых и популяционных сравнениях прибегают к построению *неукорененных дендрограмм* в отличие от задач геносистематики, которые подразумевают построение *укорененных дендрограмм*, основанных на выборе какого-нибудь типичного вида.

Если генетическая дифференциация между популяциями незначительна, то это означает, что между ними происходит постоянный поток генов (миграции), и популяции не изолированы. Наоборот, географически изолированные популяции под действием естественного отбора могут приспосабливаться к местным условиям, и в дальнейшем будет происходить их генетическая дифференциация за счет, например, генного дрейфа, в особенности, если численность популяций мала. Если популяции остаются географически разделенными достаточно долго, то могут появиться зачатки репродуктивной изоляции между ними, что впоследствии приведет к аллопатрическому видообразованию (Ayala, 1975).

Под *репродуктивно изолирующими механизмами* подразумевают биологические особенности организмов, предотвращающие скрещивания между ними. Они могут быть презиготическими и постзиготическими (Айала, 1984). Презиготические препятствуют гибридизации между особями различных популяций и могут быть связаны: а) с *экологической изоляцией*, когда популяции занимают одну и ту же территорию, но различные места обитания и поэтому не контактируют; б) с *временной изоляцией*, когда половые скрещивания в различных группах происходят в разное время года (например, осенние и летние интерстерильные группы вешенки). Постзиготические механизмы связаны со снижением жизнеспособности, а иногда и полной стерильностью гибридов. И те и другие механизмы приводят к одному результату – препятствуют обмену генами между популяциями.

Примеры популяционно-генетического анализа видов грибов

Как было сказано выше, в популяциях, в которых половая рекомбинация наблюдается регулярно, происходит пересортировка генов в новые комбинации, в то время как в популяциях со строго бесполом воспроизведением существует ограниченное число комбинаций генов, в результате чего может наблюдаться тенденция доминирования некоторых клонов. Кроме того, популяции агамных видов при более или менее равномерном заселении определенной территории фактически лишены важнейшего интегрирующего фактора – потока генов между индивидуумами. Разобщенность единого генного потока и наличие сложной генетической системы вегетативной несовместимости приводят к тому, что такие популяции фактически представлены множеством не смешивающихся друг с другом клонов. Клон (генетически однородное потомство отдельной особи) может достигать огромной численности и занимать огромные территории вследствие чрезвычайно высоких темпов размножения и миграционных способностей, особенно присущих многим фитопатогенным грибам. Генетическое разнообразие в таких популяциях поддерживается не за счет скрещиваний, а вследствие мутаций и миграции разных клонов.

В панмиксных популяциях присутствие генетически сходных клонов обеспечивается несколькими иными механизмами. Теоретически в идеальных панмиксных популяциях соотношение гомо- и гетерозигот должно быть постоянным. В инбредных популяциях с долей инбридинга гетерозиготы будут постепенно утрачиваться, и их частоты достоверно будут ниже рассчитанных по уравнению Харди-Вайнберга. Наличие неравновесия по сцеплению между аллелями разных (генетически не сцепленных) локусов приведет к сдвигу частот аллелей этих генов, что будет свидетельствовать о частично клональной структуре. В полностью клональных популяциях практически будут отсутствовать рекомбинантные генотипы, а преобладающими будут некоторые сходные генотипы; при этом будут наблюдаться корреляции между независимыми наборами генетических маркеров (неслучайные ассоциации аллелей), или гаметический дисбаланс. Независимая пересортировка и рекомбинация локусов во время мейоза у панмиктических видов, наоборот, обеспечивает относительно высокое генотипическое разнообразие и случайные ассоциации аллелей различных локусов.

Исходя из вышеизложенного, понятно, что в популяциях, представленных небольшим количеством бесполом путем воспроизводимых клонов, непосредственное изучение изменений в частотах генетических маркеров может воссоздать исчерпывающую картину действующего в природе отбора и механизмов дифференциации популяций. Например, популяции гриба *Gibberella fujikuroi* со смешанным типом воспроизводства могут служить наглядным примером. *G. fujikuroi* – комплексный вид из класса аскомицетов, включающий 7 различных скрещивающихся популяций (биологических видов) с анаморфой из рода *Fusarium* (Leslie, 1995; Britz et al., 1999). Генетические обмены происходят как в ходе половой, так и бесполой репродукции в пределах свободно скрещивающихся популяций гриба. Половое воспроизведение и рекомбинация регулируются локусами типов спаривания (MAT-1 и MAT-2). Бесполое рекомбинация требует формирования стабильного гетерокариона с последующей рекомбинацией в парасексуальном цикле и сегрегацией генотипов. Формирование стабильного гетерокариона у гриба контролируется набором локусов вегетативной несовместимости, или *vs*-локусов: чем больше идентичных аллелей по этим локусам, тем более стабильным будет сформированный гетерокарион. *vs*-локусы определяют степень стабильности сформированного гетерокариона, а не способность гиф сливаться. При этом аллельные взаимодействия происходят между аллелями одного и того же локуса, а не между аллелями различных локусов. Штаммы, имеющие идентичные аллели по всем локусам и способные формировать устойчивые гетерокарионы, определяют как *вегетативно совместимые* и принадлежащие одной группе вегетативной совместимости (VCG, *vegetative compatibility group*). VC-группы могут быть использованы в популяционном анализе как мультилокусные признаки, при этом будет проводиться *оценка вариабельности по мультилокусным признакам*. Однако данный подход имеет недостаток, связанный с тем, что в случае вегетативно несовместимых штаммов оценить степень родства между данными штаммами невозможно. Можно лишь говорить об идентичности и принадлежности штаммов тем или иным VC-группам. Совершенно очевидно, что в свободно скрещивающихся популяциях обнаружить вегетативно совместимые штаммы, принадлежащие одной и той же VC-группе, в природе можно крайне редко. И эти штаммы будут либо клонами, либо состоять в тесном родстве. Следо-

вательно, в свободно скрещивающихся популяциях такие VC-группы будут незначительны по численности. Если половые скрещивания и миграции в популяциях гриба происходят крайне редко, то в этом случае большинство VC-групп будут представлены локальными клонами, занимающими определенную территорию. Однако в природных популяциях *G. fujikuroi* были обнаружены также и штаммы, не способные сливаться и формировать гетерокарионы, и они были названы *гетерокарион-самонесовместимые мутанты* (*heterokaryon self-incompatibility mutants, HSI*). В виду того, что эти мутанты характеризовались женской стерильностью, провести скрещивания с применением комплементационных тестов с целью определения числа локусов, участвующих в формировании HSI-фенотипа, было невозможно. В природных популяциях такие мутанты встречались с частотой не более 1–2%. Эти мутанты были способны формировать гетерокарионы с дикими штаммами, с которыми они были вегетативно совместимы. Таким образом, было показано, что в природных популяциях аскомицетного гриба *G. fujikuroi* существует несколько способов обмена генетической информацией между индивидуумами (Leslie, 1995; Lepoint et al., 2005).

Другой пример популяций со смешанным типом воспроизводства – популяции возбудителя септориоза пшеницы *Septoria tritici* (телеоморфа *Mycosphaerella graminicola*) (McDonald et al., 1995). Это аскомицет с гаплоидным вегетативным мицелием, размножающийся спорами бесполого происхождения (конидиями), которые формируются в пикнидах; аскоспоры полового происхождения созревают в псевдотециях. Аскоспоры способны разноситься ветром на значительные расстояния, в то время как конидии распространяются на ограниченных территориях и освобождаются в дождливую погоду. С помощью четырех различных категорий ДНК-маркеров (RFLP, mtДНК-гаплотипы, ДНК-фингепринты и электрофоретические кариотипы) было показано, что в формировании популяционной структуры вида основную роль играет половая стадия, несмотря на присутствие некоторой доли клонального воспроизводства в природных популяциях гриба. А незначительный генетический дрейф обеспечивает стабильность популяций во времени.

В смешанных популяциях другого аскомицетного гриба *Gremmeniella abietina*, вызывающего рак хвойных пород, была обнаружена значительная доля клонального воспроизводства (32,5%)

на некоторых территориях при оценке гаметического дисбаланса – ассоциации аллелей по 32 нейтральным RAPD-локусам (Wang, 1997). При этом было показано, что почти 80% генетически идентичных клонов образуется в результате не бесполого размножения пикнидиоспорами, а полового процесса, сопровождаемого формированием 8-споровых сумок. Следовательно, существенная доля обнаруженных клонов в популяциях с высоким уровнем генотипического разнообразия есть результат инбридинга самофертильных особей.

Однако, даже имея представление о жизненном цикле того или иного гриба, не всегда возможно предсказать тип его популяционной структуры (клональная или панмиктическая). Например, у патогена многих растений *Sclerotinia sclerotiorum* половой процесс и мейоз происходит каждый сезон, но структура его популяций в значительной степени клональна (Kohli et al., 1995). Причина заключается в том, что имеется бесполое воспроизводство, а слияние гаплоидных мицелиев с последующим мейозом не дает генетической сегрегации. У базидиального гриба *Armillaria gallica*, у которого обнаружены долгоживущие клоны, распространяющиеся на километры, происходит половая рекомбинация, но при этом совершенно отсутствует географическая подразделенность популяций на территории Канады (Saville et al., 1996).

В лабораториях Швейцарии, Италии и США на протяжении уже более десяти лет проводится детальный анализ популяций возбудителя голландской болезни вязов – гриба *Cryphonectria parasitica* (Milgroom, 1995; Liu et al., 1996; Bissegger et al., 1997; Mara et al., 2004; Kubisiak, Milgroom, 2006). Некоторые результаты исследований представлены в таблице 1. Аскомицет *C. parasitica* является интересным объектом для популяционного анализа, во-первых, потому что характеризуется смешанным типом воспроизводства (в природных популяциях происходит как половое аскоспорами, так и бесполое пикнидиоспорами размножение); во-вторых, у этого гриба исследованы системы генетического контроля вегетативной и половой совместимости. Более того, гриб гомоталличен и способен к самооплодотворению (самофертилен) в природных условиях (Milgroom, 1995).

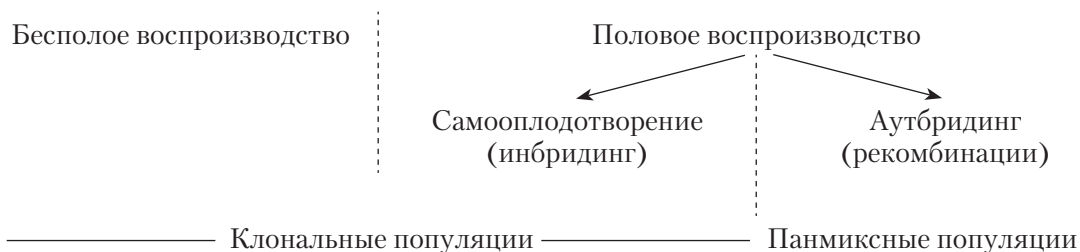
Система вегетативной несовместимости гриба контролируется шестью несцепленными *vic*-локусами (Milgroom, Cortesi, 1999). Вегетативно совместимые штаммы гриба, как и у большинс-

тва других исследованных аскомицетов, имеют идентичные аллели по всем локусам вегетативной совместимости и принадлежат одной вегетативной группе (VC). Половая совместимость у гриба контролируется двумя аллелями единственного локуса половой совместимости (*MAT-1* и *MAT-2*). В популяциях патогена, в которых преимущество получает половое размножение, соотношение полов (типов спаривания) будет приближаться 1:1. Если соотношение аллелей типов спаривания отличается от расщепления 1:1, то это свидетельствует о преимуществе бесполого размножения в данной популяции патогена и формировании клональных популяций. Согласно данным таблицы 1, популяции гриба, в которых преобладает половое воспроизводство, характеризуются высоким уровнем генотипического разнообразия по сравнению с популяциями, размножающимися клонально: в популяциях Гноска, в которых преобладает половое воспроизводство, индекс разнообразия выше ($H' = 2,18$), чем в популяциях со смешанным типом воспроизводства. Популяции Finzel состоят из случайно скрещивающихся изолятов, популяции в Теано частично воспроизводятся клонально с некоторой долей происходящих рекомбинаций. Однако даже в тех популяциях, в которых преобладает половое размножение аскоспорами, исследователи наблюдали отклонение от панмиксии в силу значительной доли инбридинга, обеспечиваемого самофертильностью и ограниченной миграцией мужских гамет. В целом, как было показано, в природных популяциях гриба повсеместно на территориях США, Швейцарии, Италии и Японии присутствует как аутбредная, так и самофертильная генерации; причем наименьшая доля аутбридинга, а, следовательно, и снижение рекомбинационных процессов, было обнаружено в популяциях на американском континенте (доля аутбридинга, оцененная по расщеплению *vic* локусов и ДНК-фингепринтов, составила 0,74–0,78) (Mara et al., 2004). Вероятно, как и у некоторых растений, аутбридинг в популяциях *C. parasitica* связан с действием экологических, демографических и собственно генетических факторов. Самофертильность в популяционной биологии рассматривают как экстремальный случай инбридинга. Фактически самооплодотворение у гаплоидных организмов эквивалентно клональному (бесполому) воспроизведению, поэтому в популяциях гаплоидного аскомицета и наблюдается отклонение от случайных скрещиваний. Был отмечен также ограниченный поток генов в панмиксных популяциях

Таблица 1
Генотипическое разнообразие и встречаемость типов спаривания в популяциях патогена *Cryphonectria parasitica*

Популяции	Число генотипов			Генотип.разнообразие (по Шеннону)			Соотношение типов спаривания (MAT-1 : MAT-2)
	VC-группы	RFLP-гаплотипы	MtDNA-гаплотипы	H'vc	H'RFLP	H'mt	
Lumino, Швейцария	14			1,94			44:27 – отличное от 1:1 → преобладание бесп/р.
Gnosca, Швейцария	16			2,18			21:24 – близкое 1:1 → половое размножение
County line, штат Мичиган	1	6	1	0	0,41	0	9:7 – близкое 1:1 → пол/р.
Frankfort, штат Мичиган	2	3	7	0,07	0,41	0,48	16:3 – отличное от 1:1 → пол/р. + бесп/р.
Teano, Италия	3	36	13	0,16	0,86	0,57	35:15 – отличное от 1:1 → пол/р. + бесп/р.
Finzel, штат Мэриленд	31	53	20	0,79	0,97	0,83	25:32 – близкое 1:1 → пол/р

Репродуктивная стратегия гриба *C. parasitica* (Milgroom, 1995):



гриба, приводящий совместно с действующим генетическим дрейфом к значительной генетической дифференциации между субпопуляциями. Интересен факт обнаружения высоковариабельного участка ДНК, прилегающего к MAT-локусу; этот участок был более вариабелен по сравнению с локусами, сцепленными с *vic*-генами (Kubisiak, Milgroom, 2006). Однако маркеры, находящиеся в пределах этой гетерогенной MAT-области, даже в панмиксных популяциях находились в гаметическом дисбалансе, свидетельствующем о подавлении рекомбинации в этой области.

Информация о характере воспроизводства в природных популяциях *C. parasitica* имеет определенное практическое значение, так как позволяет выработать стратегию борьбы с данным фитопатогеном в естественных условиях. Известно, что гиповирулентные штаммы гриба содержат dsRNA-содержащие вирусы, которые могут передаваться между вегетативно совместимым штаммам (клонами) при формировании анасто-

мозов и не способны передаваться аскоспорам. Поэтому в популяциях, демонстрирующих преимущество бесполого воспроизведения, вирус гиповирулентности будет распространяться более эффективно между вегетативно совместимыми клонами, чем в половых популяциях.

В таблице 2 представлены результаты некоторых исследований популяций фитопатогенных грибов, проведенные на кафедре микологии и альгологии МГУ.

Популяции возбудителя пирикулярриоза риса *Pyricularia oryzae* были дифференцированными по культурально-морфологическим типам в большей степени в пределах региона – Краснодарского края (мера сходства $r=0,629$), чем между регионами – Краснодарским и Приморским краем ($r=0,744$). Однако по селективно нейтральным признакам (изоферментам) различия между приморскими популяциями были выше, чем между краснодарскими ($D=0,062$). Значительные различия по культурально-морфоло-

Таблица 2

Оценка фенотипического разнообразия популяций фитопатогенных грибов и генетического сходства между ними

Популяции	Генет. разнообразие Н'МКТ	Средн. число морф, m	Показатель сходства, r	Генет. идентичность, I	Генет. дистанция, D
<i>Pyricularia oryzae</i> (поля риса, 1983)					
Приморская	1,426	4,37	0,744	0,80	0,219
Краснодарская	1,409	4,49			
Динская	0,787	2,83	0,629	0,94	0,062
Красноармейская	1,366	4,44			
<i>Fusarium oxysporum</i> (поля ржи в Башкирии, 1996)					
Почва	1,64	6,28	0,556		
Стебли	1,52	4,76	0,502		
Колосья	1,41	4,49	0,441		
Почва-стебли			0,718		
Почва-колосья			0,666		
Стебли-колос			0,697		
<i>Thielaviopsis basicola</i> (1987)					
Туркмения	0,949	2,75	0,882 0,766 0,876	0,682	
Краснодар. край	0,914	3,30			
Московская обл.	0,927	4,86			

гическим признакам в краснодарских популяциях можно объяснить внутрирегиональной дифференциацией генотипов в силу различных природных условий (Шнырева-Дарага, 1985). Кроме того, в отличие от Приморья в Краснодарском крае рис поражается не регулярно, что вызывает уменьшение интенсивности межпопуляционных обменов, в то время как в постоянно функционирующих приморских популяциях распространение редких морф идет быстрее, что сказывается на повышении общего уровня гетерогенности приморских популяций патогена. Для возбудителя вилта *Fusarium oxysporum* отмечено отсутствие субстратной специфичности штаммов: сходство между штаммами, выделенными из разных субстратов выше, чем между штаммами с одного субстрата. Для гриба *F. oxysporum* характерна клональная популяционная структура с низким уровнем миграций и генетических обменов между клонами. Подобная популяционная структура обеспечивается отсутствием полового процесса и наличием системы вегетативной несовместимости, препятствующей формированию гетерокарионов между вегетативно изолированными клонами, что и

приводит к быстрой внутривидовой дифференциации популяций патогена (цит. по Дьяков, Долгова, 1995).

Как показано в наших исследованиях, возбудитель пирикулярриоза риса *P. oryzae* в природных условиях также размножается спорами бесполого происхождения (одноядерными конидиями), и его природные популяции представлены фактически клонами. Сумчатая стадия – *Magnaporthe grisea* – описана только на дикорастущих злаках. В общую изменчивость гриба в природе потенциально может вносить вклад парасексуальный процесс, обеспечивающий формирование гетерокарионов в результате слияния вегетативных гиф: генотипически различные ядра гетерокарионов случайно сливаются с образованием диплоидных ядер, при гаплоидизации и митотической рекомбинации которых происходит обмен и пересортировка целых хромосом. В виду гаплоидного состояния вегетативного мицелия, в массе продуцирующего гаплоидные конидии, и отсутствия половой стадии у *P. oryzae*, можно было бы ожидать незначительный уровень варибельности и полиморфизма в природных популяциях. Однако, для *P. oryzae* был продемонстри-

рован необычайно высокий потенциал изменчивости как нами, так и другими авторами (Chen et al., 1995; George et al., 1998). В агамных популяциях гриба миграции клонов и спонтанный мутационный процесс обеспечили значительное генетическое разнообразие (НМКТ=1,426 и 1,409 в приморской и краснодарской популяциях соответственно), а дрейф генов привел к генетической дифференциации, особенно очевидной в локальных популяциях Краснодарского края (табл. 2). Сейчас также становится очевидной связь столь высокой изменчивости фитопатогена, формирующего агамные популяции, с наличием и активными транспозициями разнообразных мобильных генетических элементов, которыми буквально «нашпигован» геном данного гриба (Kachroo et al., 1995; Nakayashiki et al., 1999; Ikeda et al., 2001). В популяциях *P. ryzae* на Филиппинах наибольшая генетическая дифференциация между популяциями патогена отмечена по растениям-хозяевам (GST=0,39), что свидетельствует о главенствующем влиянии отбора по растениям-хозяевам на генетическую структуру популяций гриба. Популяционная структура гриба в регионе была охарактеризована как состоящая из дифференцированных субпопуляций с варибельными гаплотипами, причем поток генов между субпопуляциями был ограничен (Chen et al., 1995).

Интересный анализ был проведен для популяций аскомицетного гриба *Phomopsis subordinaria* (табл. 3) (Mejer et al., 1994). Популяции в Лимбурге и Средней Голландии характеризовались значительной полиморфностью и высоким уровнем генетического разнообразия, в то время как в популяциях Гелдерленда, в которых преобладало бесполое воспроизведение, обнаружено меньше *vc*-групп (всего три по сравнению с 15 и 18 в других популяциях). Популяции гриба в Гелдерленде были относительно гомогенными, генетическое разнообразие по RAPD-локусам и *vc*-группам было более чем в пять раз ниже, чем в других популяциях; и такие популяции были представлены в основном вегетативными клонами.

Результаты собственных исследований популяций вешенки *Pleurotus pulmonarius* и *P. ostreatus*

В нашей лаборатории был проведен детальный анализ популяций базидиальных грибов – вешенки легочной, *Pleurotus pulmonarius*, и вешенки устричной, *P. ostreatus*. Эти близкородственные виды широко распространены в лесных биоценозах средней полосы России с умеренно-континентальным климатом, встречаются в природе в одних и тех же экотопах и на одних и тех же субстратах. Вешенка является хорошим модельным объектом для популяционного анализа и имеет ряд преимуществ перед другими видами. Во-первых, данный вид имеет четко выраженную смену двух фаз – гаплоидной и диплоидной – в жизненном цикле (гапло-дикариотический жизненный цикл), во-вторых, вешенка в природе размножается преимущественно половым путем и, следовательно, потенциально способна формировать панмиксные популяции. В-третьих, генетический контроль половой совместимости (тетраполярный гетеротализм) достаточно хорошо изучен.

Как следует из предыдущей главы, существует целый ряд *тестов*, позволяющих охарактеризовать способы размножения и типы рекомбинаций грибов в природе, и оценить наличие случайных скрещиваний, т.е. *панмиксность*.

В панмиксных популяциях должны наблюдаться:

- 1) наличие половых структур и встречаемость типов спаривания приблизительно в одинаковых пропорциях;
- 2) высокое генотипическое разнообразие будет свидетельствовать об активно происходящих рекомбинационных процессах;
- 3) должно соблюдаться равновесие Харди-Вайнберга, рассчитанное по генотипическим частотам (оценку можно проводить для диплоидных и дикариотических видов);
- 4) оценка гаметического дисбаланса (или неравновесия по сцеплению) дает представление о преобладании полового или бесполого воспроизводства в популяции, а также позволяет оценить долю инбридинга.

Чтобы грамотно построить схему популяционно-генетического анализа *P. ostreatus*, следует еще раз обратить внимание на системы совместимостей, обеспечивающие генетические обмены у базидиомицетов (рис. 1 и 2). Генетические обмены у базидиальных грибов могут

Генетическое разнообразие в популяциях аскомицета *Phomopsis subordinaria* в Нидерландах

Популяция	Число изолятов	Генетическое разнообразие			
		Число <i>vc</i> -групп	H' <i>vc</i>	Число RAPD-локусов	H' <i>RAPD</i>
Limburg	19	15	2,63	7	1,40
Gelderland	13	3	0,54	2	0,27
Middle Holland	29	18	2,73	8	1,98

происходить как при слиянии монокариотических (гаплоидных), так и дикариотических мицелиев, и даже при слиянии дикариотических и монокариотических (ди-мон) мицелиев. При этом если сливаются монокариотические гаплоидные мицелии, различающиеся аллелями локусов спаривания, происходит формирование фертильного дикариотического мицелия, способного формировать плодовые тела. Дикариотические мицелии способны сливаться, если они имеют идентичные аллели локусов вегетативной совместимости (*vc*-локусы); однако в силу мультиаллельности *vc*-локусов подобная ситуация наблюдается в природе крайне редко. Гораздо чаще при слиянии вегетативных дикариотических мицелиев у вешенки происходит формирование барража, что указывает на гетероаллельность по *vc*-локусам и, следовательно, на генетический индивидуализм (генетически различные индивидуумы). При этом если и происходят генетические обмены, то они локальны и ограничены зоной формирования барража. Если при слиянии двух монокариотических гаплоидных мицелиев, различающихся аллелями локусов половой совместимости, не происходит формирования фертильного дикариона, то это свидетельствует о наличии репродуктивных барьеров (рис. 2). Репродуктивная изоляция приводит к возникновению интерстерильных групп (биологических видов), а в терминах популяционной генетики – к внутривидовой дифференциации и последующему аллопатрическому видообразованию.

В мон-мон скрещиваниях и в скрещиваниях с тестерными (для видов *P. ostreatus* и *P. pulmonarius*) штаммами, выделенными в нашей лаборатории, было показано существование полного репродуктивного барьера (неспособности формировать фертильные дикарионы) между видами *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*, хотя морфология плодовых тел видов не всегда была четко выражена (дифференцирована) (Шнырева и др., 1998). Типичными для вида *P. pulmonarius* морфологическими признаками

были светлоокрашенные плодовые тела мягкой консистенции, 4–9 см в диаметре. Плодовые тела вида *P. ostreatus* более крупные (шляпки до 17 см в диаметре), темно-бурой окраски с мощными ножками.

Плодовые тела вешенки собирали в Московской (1996, 1998, 2000 гг.), Воронежской (2001 г.) и Тверской (2002 г.) областях. Чтобы адекватно оценить действие различных факторов и механизмов в природных популяциях вешенки, в сборе природного материала использовали предложенный нами четырехуровневый подход: выделяли изоляты из плодовых тел в пределах сростка, из разных сростков в пределах субстрата (бревна), из плодовых тел на ограниченной территории леса (отдельного региона) и из плодовых тел, собранных из разных регионов. Нами было показано, что вид *P. pulmonarius* встречается на территории Московской и Тверской областей преимущественно летом, и для прорастания (появления) плодовых тел необходимы влажность и среднесуточные температуры в пределах 18 – 25°C (Шнырева и др., 1998). Вид *P. ostreatus* преобладает на данных территориях в основном осенью, хотя может прорасти и летом, когда наблюдаются колебания суточных температур и понижение ночных до 10–12°C. Иными словами, инициация плодообразования у вида *P. ostreatus* в природе стимулируется холодным шоком. С другой стороны, нами было обнаружено, что на территории Воронежской области в конце сентября преобладали массивные плодовые тела вешенки с морфологическими признаками, характерными для вида *P. ostreatus*, но анализ половой совместимости данных природных изолятов с тестерными штаммами в скрещиваниях убедительно показал их принадлежность виду *P. pulmonarius*. И это не удивительно, так как климатические условия в Воронежской области ранней осенью (среднесуточная температура – 22–25°C, а ночная – не ниже 16–18°C) соответствуют температурному режиму летнего периода в Московской области. Поэтому был сделан вывод о роли эколого-гео-

графической изоляции в процессах видообразования и, в частности, в процессах дивергенции между двумя близкородственными видами *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*.

Генетическое разнообразие в природных популяциях *P. pulmonarius* было охарактеризовано по частотам встречаемости групп вегетативной несовместимости, аллозимным локусам и RAPD-признакам. Были охарактеризованы также типы репродукции в природных популяциях вешенки с анализом встречаемости аллелей локусов половой совместимости. Схема популяционно-генетического анализа представлена на рис. 3.

В изоферментном анализе использовали моногенно наследуемые локусы, что позволило изучить сегрегацию менделирующих признаков в потомстве. С нашей точки зрения, наиболее удобными для популяционно-генетического анализа являются димерные белки с кодоминантным наследованием, характеризующиеся строгой субстратной специфичностью (например, кислая фосфатаза АСР, алкогольдегидрогеназа АДН, глюкозофосфатдегидрогеназа GDH, фосфоглюкоизомераза PGI). Чтобы выделить кодоминантные локусы и «прочитать» аллели, нагель одновременно наносили ди- и монокариотические штаммы (Шнырева и др., 2004а). Расчет популяционных показателей и построение дендрограмм проводили с помощью пакетов компьютерных программ POPGENE версия 1,32 (Yen et al., 1999) и TREECON for Windows (Van de Peer, De Wachter, 1994).

Генетическое разнообразие было значительным во всех выборках и для вида в целом составило $I=0,824$ (табл. 4). При благоприятных для развития гриба погодных условиях (влажное, умеренно теплое лето) в популяциях Подмоскovie в 1998 г. наблюдали повышение общего уровня генетического разнообразия ($I=0,632$) и снижение уровня гомозиготности (значение наблюдаемой гетерозиготности в звенигородской выборке было наивысшим по сравнению с другими – $H_o=0,398$). В 1996 и 2000 годах в условиях жаркого засушливого лета в популяциях Подмоскovie, наоборот, наблюдали возрастание доли редких аллелей ($h\mu=0,22$ и $0,16$) на фоне общего снижения уровня гетерозиготности ($H_o=0,282$ и $0,291$) и повышения доли гомозигот. И это неудивительно, так как большинство вновь возникающих аллелей при снижении численности популяции в неблагоприятных условиях среды (так называемый, эффект «горлышка бутылки») будут редки даже при их селективной нейтральности (Ohta, 1996). К тому же в зависимости от

погодных условий в Московской области летом могут одновременно встречаться близкородственные виды *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*.

Был отмечен значительный уровень миграции (поток генов $N_m=0,16-0,21$) и появление новых аллелей по большинству локусов (табл. 4) (Шнырева и др., 2004б). Между регионами поток генов был более ограничен ($N_m=0,08$). И, как следствие, мы наблюдали значительные изменения частот генов в популяциях как пространственные, так и временные. Значительные колебания аллельных частот и появление редких аллелей может быть результатом как случайных колебаний (генетического дрейфа), так и инбридинга в популяциях с ограниченной численностью особей. Был отмечен также некоторый дефицит гетерозигот (значения наблюдаемой гетерозиготности $H_o=0,325$ ниже ожидаемых значений $H_e=0,490$). Это свидетельствует о некотором отклонении от равновесия Харди-Вайнберга, что может быть также следствием инбридинга. Однако, дальнейший анализ значений индекса фиксации Райта (F_{IS}) показал, что степень инбридинга не превысил характерный для тетрапольного гетеротализма 25%-ный рубеж: $0,146$ в Воронежской, $0,209$ и $0,219$ в тверской и московской популяциях, а по всем выборкам – $0,018$ (табл. 5). Поэтому можно говорить о том, что природные популяции *P. pulmonarius* приближаются к свободно скрещивающимся.

Была показана значительная внутривидовая дифференциация между популяциями *P. pulmonarius* как между регионами, так и в пределах отдельного региона – Московской области ($F_{ST}=0,750$ и $0,755$ соответственно), т. е. приблизительно 25% генетической изменчивости отмечено в пределах данных выборок, а остальные 75% – между изученными популяциями (табл. 5). Генетический дрейф и инбридинг в популяциях с ограниченной численностью особей, действительно, могут приводить к значительной дифференциации между ними. F_{ST} -статистика Райта, будучи мерой генетической подразделенности (дифференциации) популяции и одновременно эквивалентом инбридинга особей в субпопуляции, несет важный биологический смысл: она отражает баланс процессов дифференциации и интеграции генофондов и, что также принципиально важно, оказывается величиной, авторегулируемой по достижении популяционной системой стационарного режима (Алтухов, 2003). Авторегуляция означает поддержание устойчивого соотношения гомо- и гетерозиготных генотипов, т.е. баланс между инбридингом и аутбридингом.

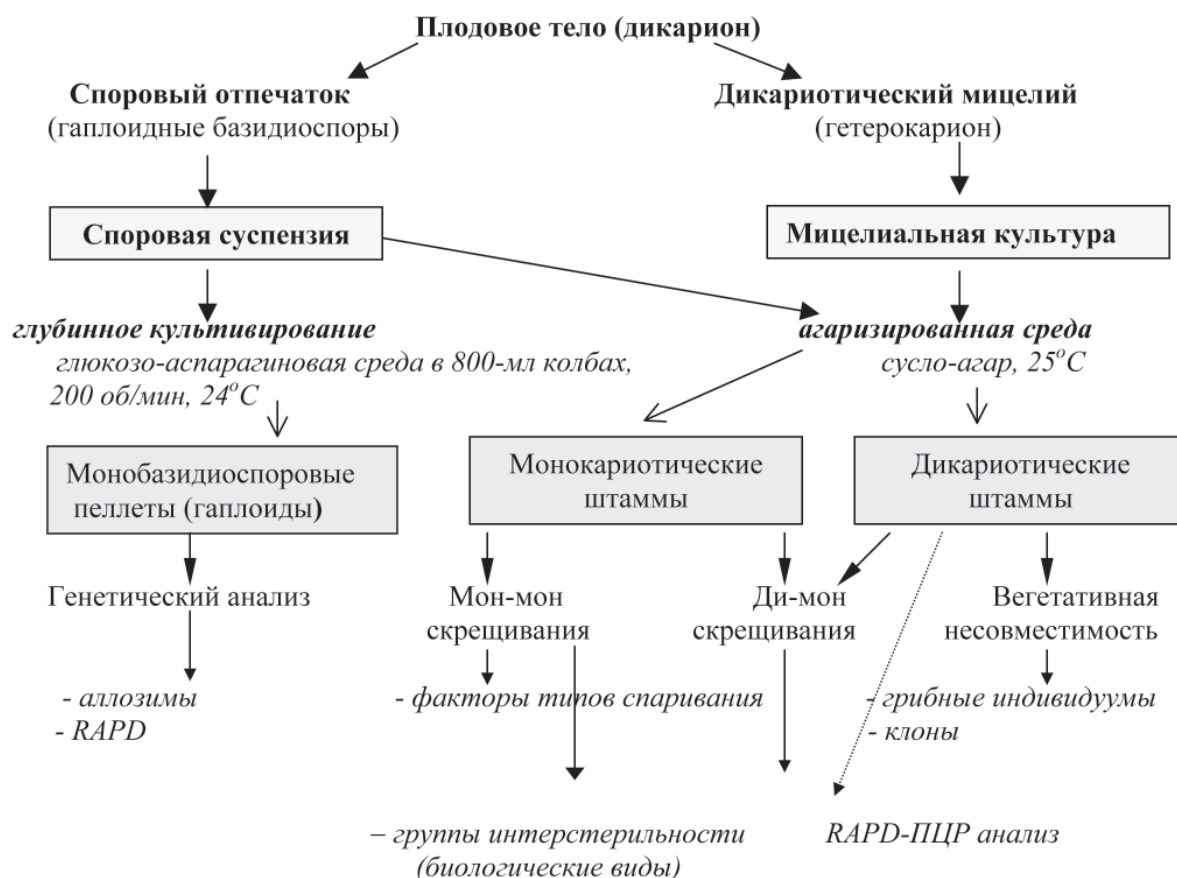


Рис. 3. Схема популяционно-генетического анализа *P. pulmonarius*.

Таблица 4
 Генетическое разнообразие и полиморфизм в популяциях *P. pulmonarius*

Выборки	Число штаммов	P(%)	A	A _E	h _μ	Генотипическое разнообразие			Индекс ассоциации			N _m
						H _O	H _E	I	s _k ²	σ _k ²	I _A	
Воронежская	40	78,57	2,69	1,72	0,22	0,276	0,328	0,586				0,18
Тверская	20	64,29	2,42	1,85	0,02	0,245	0,319	0,560				0,16
Московская, 1996	43	78,57	2,38	1,56	0,22	0,282	0,361	0,525	0,279	0,289	0,010	0,11
Звенигород, 1998	31	78,57	2,50	1,81	0,12	0,398	0,395	0,632	0,202	0,221	0,019	0,21
Звенигород, 2000	42	71,43	2,62	1,85	0,16	0,291	0,374	0,624	0,216	0,221	0,004	0,16
Московская в целом	116	100	3,2	2,23	0,22	0,337	0,483	0,858	0,291	0,324	0,033	0,08
По всем популяциям (в пределах вида)	176	92,86	3,50	2,22	0,20	0,325	0,490	0,824	0,371	0,416	0,046	0,08

Примечание. P – доля полиморфных локусов; все данные представлены по 14 различным локусам; A – среднее число аллелей на локус; A_E – эффективное число аллелей на локус; h_μ – доля редких аллелей (p < 0,09); наблюдаемая (H_O) и ожидаемая (H_E) гетерозиготности; I – индекс генетического разнообразия по Шеннону $I = 1/\sum p_i^2$, где p_i – частота i-того мультилокусного генотипа; I_A – индекс ассоциации, рассчитанный как $s_k^2/\sigma_k^2 - 1$, где s_k² и σ_k² – наблюдаемая и ожидаемая дисперсии по числу локусов k, по которым пара индивидуумов имеет различные аллели (при уровне значимости 0,05); N_m – поток генов, рассчитанный как $F_{ST} = 0,25(1 - F_{ST})/F_{ST}$.

Таблица 5
F-статистика по Райту для всех популяций *P. pulmonarius*

Локусы	Воронежская		Тверская		Московская в целом		По всем выборкам суммарно	
	F _{IS}	F _{ST}	F _{IS}	F _{ST}	F _{IS}	F _{ST}	F _{IS}	F _{ST}
Acp	-0,172	0,413	-0,162	0,418	0,305	0,652	0,132	0,566
Adh	1,0	1,0	-	0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe	1,0	1,0	-0,052	0,473	0,161	0,695	0,636	0,842
Lap-1	0,723	0,861	1,0	1,0	0,448	0,724	0,638	0,891
Lap-2	-0,082	0,458	0,075	0,537	0,369	0,684	0,171	0,585
Idh	0,157	0,578	-0,142	0,428	0,532	0,813	0,487	0,762
Mdh-1	-	0	-	0	-0,143	0,428	-0,054	0,473
Mdh-2	-0,032	0,483	-	0	-0,029	0,485	-0,017	0,491
Pgm	0,525	0,763	1,0	1,0	0,694	0,847	0,768	0,884
Pgi	0,482	0,741	-	0	0,805	0,908	0,718	0,864
Sod	0,466	0,733	0,733	0,866	0,808	0,917	0,828	0,918
Gdh	-	0	-	0	-1,0	0,929	-	0,971
Est-1	-0,249	0,375	0,349	0,674	0,059	0,530	0,078	0,539
Est-2	0,158	0,579	-0,293	0,353	0,354	0,677	0,054	0,615
Среднее *	0,146	0,573	0,209	0,605	0,219	0,755	0,018	0,750

Примечание. FIS – суммарный коэффициент инбридинга, оценивающий снижение уровня гетерозиготности в силу неслучайных скрещиваний в пределах популяции; FST – мера генетической дифференциации между популяциями. * – Среднее значение по всем локусам.

Таким образом, для вешенки характерны дифференцированные локальные популяции, открытые для миграции особей. Однако вклад мигрантов в общий генотипический состав популяции, вероятно, невелик, так как отсутствует эффективная фиксация генов мигрантов в гетерозиготах. Значительная же дифференциация популяций обусловлена колебаниями аллельных частот генов и дифференциальным выживанием генотипов в изменяющихся условиях среды.

Чтобы оценить долю клонального воспроизведения в локальных популяциях вешенки, а фактически показать, насколько такой важный фактор как поток генов ограничен в пространстве, был проведен детальный анализ дикарионов, полученных из плодовых тел в пределах сростка. Все штаммы с одного сростка, а также большинство штаммов, полученных из плодовых тел, расположенных на одном бревне на расстоянии не более 0,5–1 м, были вегетативно совместимы и имели идентичные аллозимные локусы и RAPD-профили. Они фактически являлись генетически сходными вегетативными клонами,

воспроизведенными на одном и том же гетерокариотическом мицелии. Однако на одном бревне обнаруживали также и генетически различные индивидуумы, демонстрирующие антагонистические реакции при слиянии их вегетативных мицелиев и тем самым формирующие мозаику вегетативно несовместимых клонов на одном субстрате. Анализируя распределение аллелей локусов половой совместимости у этих штаммов (в мон-мон скрещиваниях), мы обнаружили *новый тип рекомбинации генотипов* в природе – *ди-мон гибридизацию*: на распространяющемся по субстрату фертильном дикариотическом мицелии образуются плодовые тела, но при этом может происходить повторная дикариотизация и обмен ядер с другими проросшими базидиоспорами (Shnyreva, 2002).

При оценке *гаметического дисбаланса* на основе сравнения наблюдаемых и ожидаемых частот аллелей аллозимных локусов у *гаплоидов* (монобазидиоспорового потомства плодовых тел) было также получено подтверждение панмиксии в популяциях: индекс ассоциации для

звенигородских популяций составил $I_A=0,019$, $0,004$, что свидетельствует о преобладании случайных ассоциаций аллелей по множественным локусам (табл. 4). Монобазидиоспоровое гаплоидное потомство получали из споровых отпечатков, применяя разработанный в нашей лаборатории метод пеллетообразования – погруженного культивирования проросших базидиоспор (Дружинина и др., 1997). Не было обнаружено ассоциаций аллелей аллозимных локусов (неравновесия по сцеплению) и у диплоидов, оцененных с помощью генотипических частот: индекс ассоциации $I_A=0,046$ по всем выборкам (табл. 4). В панмиксных популяциях вешенки поддерживается *гаметический баланс*, и аллели различных локусов сочетаются друг с другом случайным образом, что является следствием активно происходящих в популяции рекомбинационных процессов. Однако, ассоциации аллелей, возникающие в результате действия отбора и дрейфа генов, полностью не исключены особенно в популяциях малой численности. Но рекомбинации в таких популяциях будут неизбежно разрушать любые неслучайные ассоциации аллелей. Это еще раз подтверждает точку зрения о том, что обнаруженные незначительные отклонения от панмиксии ($H_o < H_e$) в популяциях вешенки не являются следствием присутствия доли клонального воспроизведения, а, вероятно, вызваны миграциями на общем фоне незначительного генного дрейфа. В свободно скрещивающихся популяциях вешенки любые возможные *ассоциации аллелей* быстро разрушаются, а вегетативные клоны, ограниченные отдельным субстратом, не оказывают существенного влияния на генотипическую структуру популяций.

Кластерный анализ, проведенный на основе частот аллелей аллозимных локусов и RAPD-маркеров, подтвердил видовую дифференциацию. Наблюдали две основные тенденции в кластеризации природных штаммов вешенки: одна из них связана с существующей в природе репродуктивной изоляцией между близкородственными видами *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*, другая – с географическим фактором. Географически обособленные и репродуктивно изолированные группы штаммов объединились в отдельные кластеры на дендрограмме, построенной на основе аллозимных локусов (рис. 4); на дендрограмме по RAPD-признакам в большей степени выражена географическая дифференциация между штаммами (рис. 5). Зависимости кластеризации штаммов от субстратной принадлежности выявлено не было. И это закономерно, принимая во

внимание то, что основным механизмом распространения гриба в природе служат базидиоспоры полового происхождения, способные разлетаться на значительные расстояния и осваивать новые субстраты.

Анализ популяций близкородственных видов *P. pulmonarius* и *P. ostreatus* фактически показал, что действие экологических и сезонных барьеров в формировании структуры популяций данных видов сочетается с действием основного изолирующего механизма – репродуктивной изоляцией, снижающей поток генов в популяциях.

Заключение

Итак, преобладание той или иной стратегии в размножении грибов определяется, прежде всего, условиями жизни популяций данного вида. В *гетерогенных условиях* жизни популяций, где особое значение для процветания вида имеет широкий размах изменчивости и высокая адаптабельность, а не специализация, преимущество получают половые панмиксные популяции, создающие разнообразие генотипов. В *гомогенных условиях* среды с большой вероятностью будет действовать стабилизирующий отбор на отдельные генотипы, отбирая генотипы (особи) с высокой приспособленностью к данным условиям, т.е. со специализацией. Поэтому функция полового процесса и рекомбинации не столь существенны для выживания вида, и в этом случае может происходить потеря полового процесса и образование бесполой клональной популяций. Репродуктивные стратегии грибов, основанные на особенностях их жизненных циклов, можно разделить на четыре основные категории: 1) гетероталличное спаривание с выраженной бесполой стадией; 2) гетероталличное спаривание с незначительной бесполой репродукцией или полным отсутствием таковой; 3) гомоталличное (или псевдогомоталличное) спаривание с половой репродукцией или без нее; 4) бесполой репродукция при отсутствии половых скрещиваний (Taylor et al., 1999).

Например, у высокоспециализированных фитопатогенов, таких как ржавчинные грибы, фитопфтора, зимовка осуществляется в мицелиальной фазе на озимых культурах и в клубнях, поэтому роль половой генерации для этих грибов не столь существенна (Дьяков, 1999). Среди фитопатогенных грибов можно обнаружить многочисленные примеры изменения репродуктивной стратегии и соответственно генетической структуры популяций с переходом в новые ус-

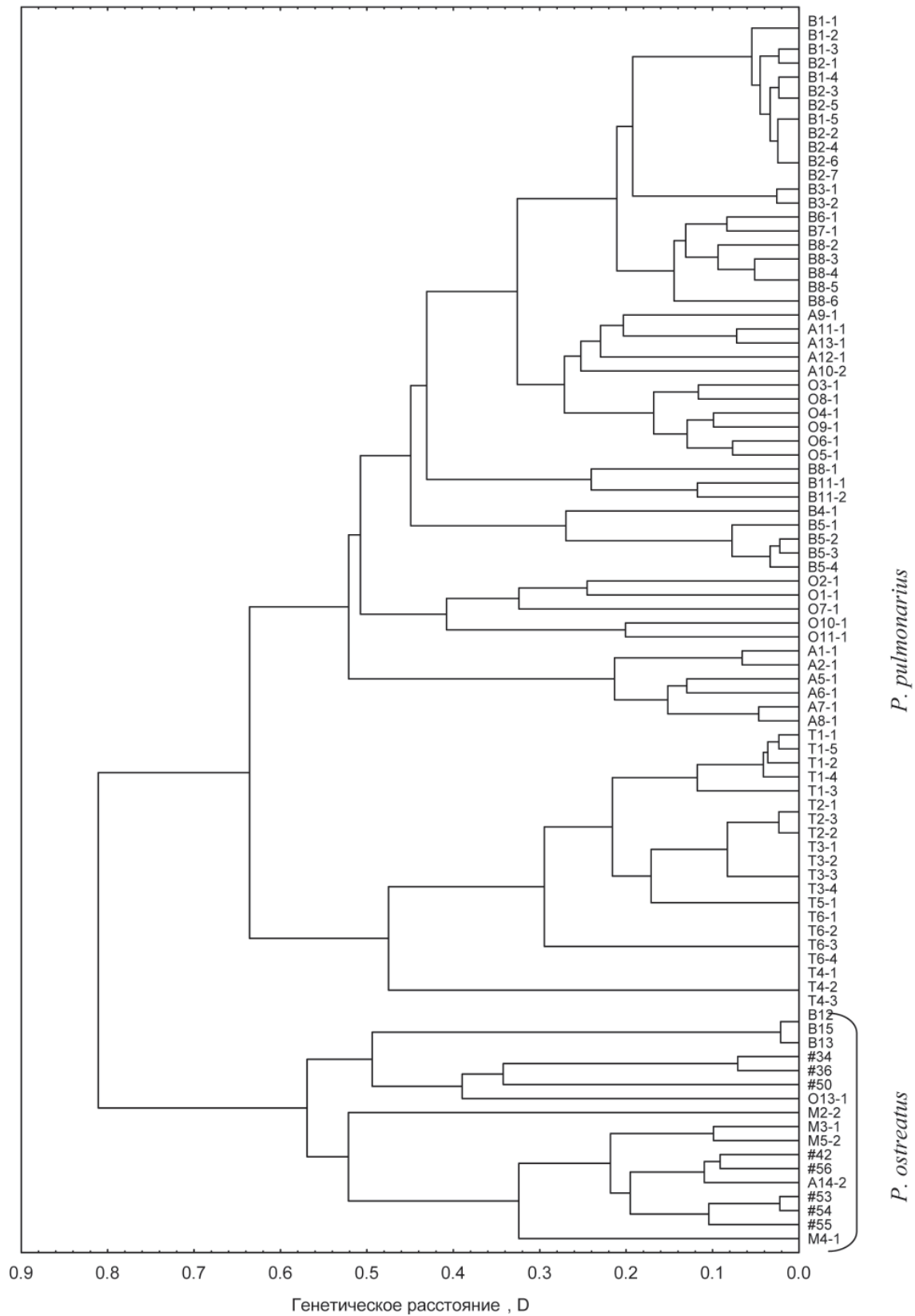


Рис. 4. UPGMA-дендрограмма генетического сходства между штаммами *P. pulmonarius* и *P. ostreatus*, построенная на основе генетических расстояний Нея по 14 аллозимным локусам.

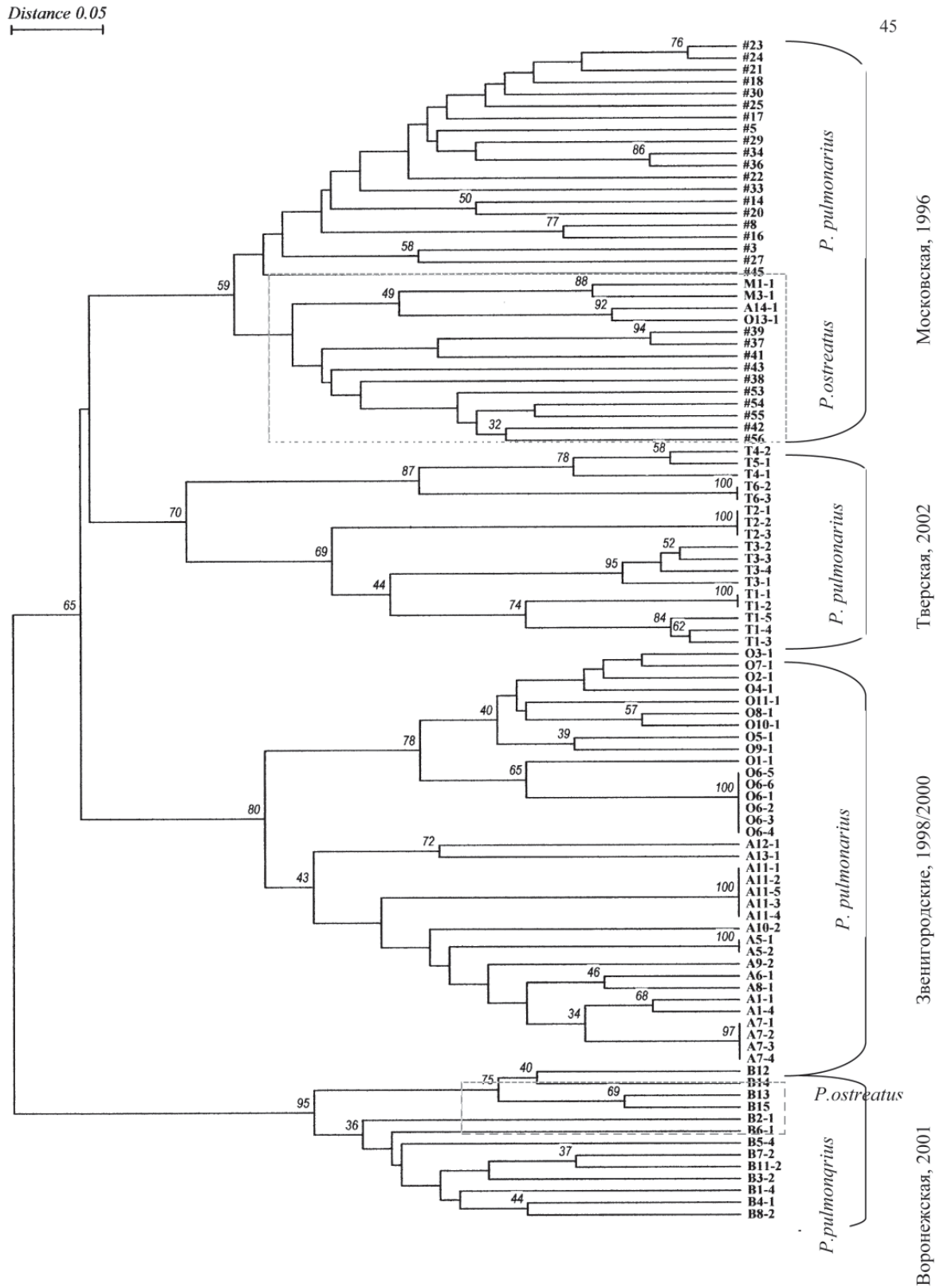


Рис. 5. UPGMA-дендрограмма сходства между штаммами вешенки, построенная на основе генетических дистанций Нея по RAPD-признакам. Цифры на ветвях указывают значения бутстрепа (в %).

ловия существования. Попадание вида в новые условия среды обитания может быть сопряжено с нарушением в прохождении полного полового цикла или с трудностями в поиске партнера для спаривания (так называемый, эффект «горлышка бутылки»), как это показано для европейских популяций *Phytophthora infestans*. Некоторые ржавчинные грибы представляют классический пример замены половой (мейоспоровой) репродукции на бесполою (митоспоровую) в зависимости от наличия промежуточного растения-хозяина. Возбудителю ржавчины пшеницы, *Puccinia graminis f.sp. tritici* для завершения полового цикла необходим промежуточный хозяин – барбарис. В районах Северной Америки, где отсутствует промежуточный хозяин, произошла потеря полового размножения, и популяции гриба полностью состояли из клонов бесполого происхождения (Kolmer, 2005). Виды *Neurospora*, несмотря на обильное конидиеобразование, наоборот, сохранили половой процесс, так как аскоспоры более термостабильны, что позволяет им выживать в жарких климатических условиях тропиков и субтропиков. В противном случае потеря термостабильных аскоспор была бы губительна для видов нейроспоры. Еще более интересная ситуация сложилась в популяциях культивируемого гриба – шампиньона двуспорового, *Agaricus bisporus*, у которого отбор в природе происходил на двуспоровость. В стабильных условиях роста гриба на богатых субстратах происходил отбор псевдогомоталлических штаммов и подавление рекомбинации, а случайно возникающие из одноядерных базидиоспор гомокариотические штаммы шампиньона были нежизнеспособны и элиминировались (Xu et al., 1997).

В целом для димиктических аскомицетов с биполярной системой половой совместимости характерны более разнообразные пути потери рекомбинации (вплоть до агамности), чем для диафоромиктических (тетраполярных) базидиомицетов. Вероятно, у базидиомицетов эволюция полового размножения в сторону панмиксии зашла настолько далеко, что потеря одного типа спаривания приводит не к потере полового процесса (как у оомицетов, аскомицетов), а к гомоталлизму (как у шампиньона двуспорового). У дикариотических базидиомицетов чаще происходит не потеря половых структур, а переход к псевдогомоталлизму (Дьяков, 1999). Большинство несовершенных грибов, размножающихся клонально (спорами бесполого происхождения), произошло от сумчатых грибов, у которых наблюдалась потеря полового процесса. Так, многие фитопато-

генные грибы образуют клональные популяции, а их распространение, экспансия в пространстве, массовое заражение растений-хозяев связаны с эффективным конидиеобразованием. При этом переход к агамности (потере полового процесса) может быть результатом как генетических, так и популяционных механизмов. Популяционные механизмы могут быть связаны как с дрейфом генов, так и с действующим отбором.

Например, в популяциях возбудителя фитофтороза картофеля, *Phytophthora infestans*, размножающихся в природе вегетативно зооспорами бесполого происхождения, фактически произошло пространственное разделение типов спаривания у гетероталлического вида вследствие случайного завоза изолятов типа спаривания A1 из Мексики и их дальнейшего панглобального распространения на Европейском и других континентах (Goodwin et al., 1994; Дьяков, 1999). Резкое преобладание одного полового партнера приводило к редким встречам между противоположными партнерами и постепенному переходу к агамности. В основе пространственного разделения локусов спаривания может действовать также дрейф генов и отбор. В свою очередь, отбор на преобладание какого-либо одного типа спаривания может быть также следствием сцепления локуса спаривания с генами, влияющими на общую приспособленность. Например, среди неагрессивных штаммов возбудителя голландской болезни вязов *Ophiostoma ulmi* соотношение полов (типов спаривания) приближается 1:1. У агрессивных штаммов преобладает тип спаривания В (около 85%), а отбор на высокую агрессивность в природных популяциях гриба сопровождается потерей типа спаривания А. Однако в местах, где агрессивные штаммы появились недавно, частота встречаемости типа А выше, чем в популяциях, функционирующих на данной территории в течение многих лет (Brasier, 1988). Адаптационные преимущества типа спаривания В, очевидно, сцеплены с высокой агрессивностью штаммов гриба.

В этом обзоре представлены только общие схемы возможных путей микроэволюции грибных популяций. Один и тот же вид может демонстрировать различные способы репродукции в зависимости от географической локализации и сезонного фактора. Например, преобладание клонального компонента в популяциях некоторых фитопатогенов может быть связано с сельскохозяйственной практикой возделывания культур в отдельных регионах, хотя в других географических регионах между такими клональными

популяциями могут происходить генетические обмены и миграции. Детальный популяционный анализ практически любого вида вносит нечто новое в понимание общих закономерностей в формировании популяционной структуры видов грибов. И охватить все существующее разнообразие путей микроэволюции грибов в рамках отдельного обзора представляется непосильной задачей, так как мир грибов многогранен и разнообразен.

Собственные исследования природных популяций вешенки были проведены при частичной финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований и гранта «Ведущие научные школы».

Список литературы

- Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику // М.: «Мир». 1984. 232 С.
- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях // М.: ИКЦ «Академкнига». 2003. 431 С.
- Дарага-Шнырева А.В. Популяционное изучение возбудителя пирикулярриоза риса – гриба *Puccinia oryzae* Cav. // Диссертация на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. 1986.
- Дружинина И.С., Инсарова И.Д., Шнырева А.В., Дьяков Ю.Т., Политов Д.В., Алтухов Ю.П. Гомокариотические пеллеты грибов и их использование в генетическом анализе // Генетика. 1997. Т. 33, № 5. С. 644 – 650.
- Дьяков Ю.Т. Системы размножения грибов и их эволюция // Микология и фитопатология. 1999. Том 33. Вып. 3. Р. 137-149.
- Дьяков Ю.Т., Шнырева А.В., Сергеев А.Ю. Введение в генетику грибов // М.: Издат. центр «Академия». 2005. 304 С.
- Шнырева А.В., Дружинина И.С., Дьяков Ю.Т. Генетическая структура комплекса *Pleurotus ostreatus* sensu lato на территории Московской области // Генетика. 1998. Т. 34, № 12. С. 161 – 1618.
- Шнырева А.В., Белоконов Ю.С., Белоконов М.М. Вариабельность изоферментных спектров природных штаммов *Pleurotus ostreatus*, собранных на территории Московской области // Микол. и фитопатол. 2004 а. Т. 38. Вып. 2. С. 59-67.
- Шнырева А.В., Белоконов Ю.С., Белоконов М.М., Алтухов Ю.П. Внутривидовое генное разнообразие вешенки устричной, *Pleurotus ostreatus*, изученное по совокупности аллозимных генов // Генетика. 2004 б. Т. 40. № 8. С. 1068-1080.
- Anderson J.B., Kohn L.M. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi // Annu. Rev. Phytopathol. 1995. Vol. 33. P. 369-391.
- Anderson J.B., Kohn L.M. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground // Trends Ecol. Evol. 1998. Vol. 13. № 11. P. 444-449.
- Ayala F.J. Genetic differentiation during the speciation process // Evol. Biol. 1974. Vol. 8. P. 1-78.
- Banks M.A., Eichert W., Olsen J.B. Which genetic loci have greater population assignment power? // Bioinformatics. 2003. Vol. 19. N 11. P. 1436-1438.
- Barton N.H., Otto S.P. Evolution of recombination due to random drift // Genetics. 2005. Vol. 169. P. 2353-2370.
- Begueret J., Turcq B., Clave C. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk // Trends in Genetics. 1994. Vol. 10. P. 441-446.
- Bisseger M., Rigling D., Heiniger U. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence // Phytopathology. 1997. Vol. 87. № 1. P. 50-59.
- Brasier C.M. Rapid changes in genetic structure of epidemic populations of *Ophiostoma ulmi* // Nature. 1988. Vol. 332. P.538-541.
- Britz H., Wingfield M.J., Coutinho T.A., Marasas W.F., Leslie J.F. Female fertility and mating type distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* f.sp. pini // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol.64. N 6. P. 2094-2095.
- Britz H., Coutinho T.A., Wingfield M.J., Marasas W.F., Gordon T.R., Leslie J.F. *Fusarium subglutinans* f. sp. pini represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 1198-1201.
- Burdon J.J., Roelfs A.P. The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of a population of *Puccinia graminis* // Phytopathology. 1985. Vol. 75. № 9. P. 1068-1073.
- Carvalho D.B., Smith M.L., Anderson J.B. Genetic exchange between diploid and haploid mycelia of *Armillaria gallica* // Mycol. Res. 1995. Vol. 99. № 6. P. 641-647.
- Chen D.H., Zeigler R.S., Leung H., Nelson R.J. Population structure of *Puccinia grisea* at two screening sites in the Philippines // Phytopathology. 1995. Vol. 85. P. 1011-1020.
- Cortesi P., Milgroom M.G., Bisiach M. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy // Mycol. Res. 1996. Vol. 100. P. 1087-1093.
- Di Baptista C., Selosse M.A., Bouchard D., Stenstrom E., Tacon F. Variation in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S238 // Mycol. Res. 1996. Vol. 100. P. 1315-1324.

- Dobzhansky T., Wright S.* Genetics of natural populations. V. Relations between mutation rates and accumulation of lethals in populations of *Drosophila pseudoobscura* // *Genetics*. 1941. Vol. 26. P. 23-52.
- Doudrick R.L., Raffle V.L., Nelson C.D., Furner G.R.* Genetic analysis of homokaryons from a basidiome of *Laccaria bicolor* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) // *Mycol. Res.* 1995. Vol. 99. N. 11. P. 1361-1366.
- Edel V., Steinberg C., Avelange I., Laguerre G., Alabouvette C.* Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains // *Phytopathology*. 1995. Vol. 85. N 5. P. 579-585.
- Endler J.A.* Natural selection in the wild. // Princeton University Press, N.J. 1986. 267 P.
- Ennos R.A., McConnell K.C.* Using genetic markers to investigate natural selection in fungal populations // *Can. J. Bot.* 1995. Vol. 73 (Suppl. 1). P. S302-S310.
- Ennos R.A., Swales K.W.* Estimation of the mating system in a fungal pathogen *Crumenulopsis sororia* (Karst.) Groves using isozyme markers // *Heredity*. 1987. Vol. 59. P. 423 – 430.
- Ennos R.A., Swales K.W.* Genetic variability and population structure in the canker pathogen *Crumenulopsis sororia* // *Mycol. Res.* 1991. Vol. 95. P. 521-525.
- Foster L.M., Kozak K.R., Loftus M.G., Stevens J.J., Ross I.K.* The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi // *Mycol. Res.* 1993. Vol. 97. N. 7. P. 769-781.
- George M.L.C., Nelson R.J., Zeigler R.S., Leung H.* Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences // *Phytopathology*. 1998. Vol. 88. P. 223-229.
- Goodwin S.B., Cohen B.A., Fry W.E.* Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Dutch potato famine fungus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. Vol. 91. P. 11591-11595.
- Hamelin R.C., Dusabenyagasani M., Et-touil K.* Fine-level genetic structure of white pine blister rust populations // *Phytopathology*. 1998. Vol. 88. № 11. P. 1187-1192.
- Hintz W.E., Jeng R.S., Yang D.Q., Hubbes M.M., Horgen P.A.* A genetic survey of the pathogenic fungus *Ophiostoma ulmi* across a Dutch elm disease front in Western Canada // *Genomne*. 1993. Vol. 36. N 3. P. 418-426.
- Ikeda K., Nakayashiki H., Takagi M., Leong S.A.* Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* // *Mol. Gen. Genomics*. 2001. V. 266. P. 318-325.
- Jacobson K.M., Miller O.K., Turner B.J.* Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 9159-9163.
- Kachroo P., Leong S.A., Chattoo B.B.* Mg-SINE: a shot interspersed nuclear element from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. Vol. 92. N 11. P. 1125-1129.
- Kerrigan R.W., Callac P., Xu J., Noble R.* Population and phylogenetic structure within the *Agaricus subfloccosus* complex // *Mycol. Res.* 1999. Vol. 103, № 12. P. 1515 – 1523.
- Kohli Y., Saville B.J., Anderson J.B.* Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia* // *Phytopathology*. 1992. Vol. 82. P. 875-880.
- Kohli Y., Brunner L.J., Yoell H., Milgroom M.G., Anderson J.B., Morral R.A., Kohn L.M.* Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum* // *Mol. Evolution*. 1995. Vol. 4. P. 69-77.
- Kolmer J.A.* Tracking wheat rust on a continental scale // *Curr. Opinion in Plant Biol.* 2005. Vol. 8. N 4. P. 441-449.
- Kohn L.M.* The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations // *Canad. J. Bot.* 1995. Vol. 73 (Suppl. 1). P. S1231-S1240.
- Kubisiak T.L., Milgroom M.G.* Markers linked to vegetative incompatibility (vic) genes and a region of high heterogeneity and reduced recombination near the mating type locus (MAT) in *Cryphonectria parasitica* // *Fungal Genet. Biol.* 2006. Vol. 43. N 6. P. 453-456.
- Laroche A., Gaudet D.A., Schaalje G.B., Erickson R.S., Ginns J.* Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating, RAPD and RFLP analyses // *Mycol. Res.* 1995. Vol. 99, № 3. P. 297-310.
- Lepoint P.C.E., Munaut F.T.J., Maraite H.M.* *Gibberella xylarioides* sensu lato from *Coffea canephora*: a new mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 71. N 12. P. 8466-8471.
- Leslie J.F.* *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable triats // *Can. J. Bot.* 1995. Vol. 73 (Suppl. 1). P. S282-291.
- Leslie J.F.* Fungal vegetative compatibility – Promises and prospects // *Phytoparasitica*. 1996. Vol. 24. P. 3-6.
- Leslie J.F., Klein K.K.* Female fertility and mating type effect on effective population size and evolution in filamentous fungi // *Genetics*. 1996. Vol. 144. P. 557-567.
- Levy M., Romao J., Marchetti M.A., Hamer J.E.* DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequences resolves pathotype diversity in the rice blast fungus // *Plant Cell*. 1991. Vol. 3. P. 95-102.

- Leung H., Nelson R. J., Leach J.E.* Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria // *Advances in Plant Pathology*. 1993. Vol. 10. P. 157-205.
- Lewontin R.C.* The Genetic Basis of Evolutionary Change. 1974. Columbia University Press, New York. 234 P.
- Lewontin R.C.* On measures of gametic disequilibrium // *Genetics*. 1988. Vol. 120. P. 849 – 852.
- Lewontin R.C.* The problem of population biology // In: *Evolutionary genetics from molecules to morphology*. Cambridge University Press. 2000. P. 5-22.
- Liu Y.-C., Cortesi P., Double M.L., MacDonald W.L., Milgroom M.G.* Diversity and multilocus genetic structure in populations of *Cryphonectria parasitica* // *Phytopathology*. 1996. Vol. 86. № 12. P. 1344-1351.
- Maclean D.J., Braithwaite K.S., Manners J.M., Irwin J.A.G.* How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis? // *Advances in Plant Pathology*. 1993. Vol. 10. P. 207-244.
- Maclean D.J., Braithwaite K.S., Irwin J.A.G., Manners J.M., Groth J.V.* Random amplified polymorphic DNA reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus* // *Genetics*. 1995. Vol. 85. P. 757-765.
- MacDonald B.A., Pettway R.E., Chen R.S., Boeger J.M., Martinez J.P.* The population genetics of *Septoria tritici* (teleomorph *Mycosphaerella graminicola*) // *Can. J. Botany*. 1995. Vol. 73 (Suppl. 1). P. S292-S301.
- Manchenko G.P.* Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels // CRC Press, Inc., USA. 1984. 341 P.
- Martin F., Selloso M.A., Tacon F.* The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: structural analysis and allelic polymorphism // *Microbiology*. 1999. Vol. 145. P. 1605-1611.
- Mara R.E., Cortesi P., Bisseger M., Milgroom M.G.* Mixed mating in natural populations of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* // *Heredity*. 2004. Vol. 93. P. 189-195.
- Milgroom M.G.* Population biology of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* // *Can. J. Bot.* 1995. Vol. 73 (Suppl. 1). P. S311-S319.
- Milgroom M.G.* Recombination and the multilocus structure of fungal populations // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1996. Vol. 34. P. 457-477.
- Milgroom M.G., Cortesi P.* Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 10518-10523.
- Nakayashiki H., Nishimoto N., Ikeda K.* Degenerate MAGGY elements in a subgroup of *Pyricularia grisea*: a possible example of successful capture of a genetic invader by a fungal genome // *Mol. Gen. Genet.* 1999. Vol. 261. N 6. P. 958-963.
- Nei M.* *Molecular Population Genetics*. 1975. North-Holland, Amsterdam. 285 P.
- Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. 1978. Vol. 89. P.583 – 590.
- Nei M.* Bottleneck, genetic polymorphism and speciation // *Genetics*. 2005. Vol. 170. P. 1-4.
- Nei M., Graur D.* Extent of protein polymorphism and the neutral mutation theory // *Evol. Biol.* 1984. Vol. 17. P. 73-118.
- Nei M., Li W.H.* Linkage disequilibrium in subdivided populations // *Genetics*. 1973. Vol. 75. P. 213-219.
- Ohta T.* Mutational pressure as the main cause of molecular evolution and polymorphism // *Nature*. 1974. Vol. 252. P. 351-354.
- Nei M., Maruyama T., Wu C.I.* Models of evolution of reproductive isolation // *Genetics*. 1983. Vol. 103. P. 557-579.
- Ohta T.* Mutational pressure as the main cause of molecular evolution and polymorphism // *Nature*. 1974. Vol. 252. P. 351-354.
- Ohta T.* The current significance and standing of neutral and nearly neutral theories // *Bioassays*. 1996. Vol.18. N 8. P. 673-677.
- Royse D.J., May B.* Interspecific allozyme variation among *Morchella* spp. and its inferences for systematics within the genus // *Biochem. Syst. Ecol.* 1990. Vol. 18. P. 475 – 479.
- Saville B.J., Kohli Y., Anderson J.B.* mtDNA recombination in a natural population // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 1331-1335.
- Saville B.J., Yoell H.J., Anderson J.B.* Genetic exchange and recombination in populations of the root-infecting fungus *Armillaria gallica* // *Mol. Ecology*. 1996. Vol.5. P. 115-131.
- Shnyreva A.V.* Rare mechanism of genetic recombination in *Pleurotus ostreatus* natural populations // *Book of Abstracts. The 7th International Mycological Congress. Oslo, 11-17 August, 2002*. P. 312.
- Sing R.* Darwin to DNA, molecules to morphology: the end of classical population genetics and the road ahead // *Genome*. 2003. Vol. 46. P. 938- 941.
- Smith M.L., Duchesne L.C., Bruhn J.N., Anderson J.B.* Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria* // *Genetics*. 1990. Vol. 126. P. 575-582.
- Smith M.L., Bruhn J.N., Anderson J.B.* The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest // *Nature*. 1992. Vol. 356. P. 428-431.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Fisher M.C.* The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation

and classification // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1999. Vol. 37. P. 197-246.

Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // *Comput. Appl. Biosci.* 1994. V.10. P. 569-570.

Wang X.-R. Genetic variability in the canker pathogen fungus, *Gremmeniella abietina*. Contribution of sexual compared with asexual reproduction // *Mycol. Res.* 1997. Vol. 101. № 10. P. 1195-1201.

Weir B.S. Genetic Data Analysis: Methods for discrete population genetic data // Sinauer Associates, Inc., Sunderland MA. 1990. 287 p.

Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure // *Evolution.* 1984. Vol. 38. P. 1358-1370.

Worrall J.J. Somatic incompatibility in basidiomycetes // *Mycologia.* 1997. Vol. 89. N 1. P. 24-36.

Wright S. The interpretation of population structure by F statistics with special regard to systems of mating // *Evolution.* 1965. V.19. P. 395- 420.

Wu J., Saupe S.J., Glass N.L. Evidence for balancing selection operating at the heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi // *Evolution.* 1998. Vol. 95. P. 12398- 12403.

Xu J.P., Kerrigan R.W., Sonnenberg A.S., Callac P. Horgen P.A., Anderson J.B. Mitochondrial DNA variation in natural populations of the mushroom *Agaricus bisporus* // *Mol. Ecology.* 1998. Vol. 7. P. 19-33.

Xu J.P., Kerrigan R.W., Callac P. Horgen P.A., Anderson J.B. The genetic structure of natural populations of *Agaricus bisporus*, the commercial mushroom // *Journal of Heredity.* 1997. Vol. 88. P. 482-494.

Yen F.C., Yang R., Boyle T. POPGENE Version 1.32. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta, Center for International Forestry Research.. 1999.

Zeller K.A., Bowden R.L., Leslie J.F. Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from the United States // *Mol. Ecol.* 2004. Vol. 13. N 3. P. 563-571.

Zeyl C., Bell G. The advantage of sex in evolving yeast populations // *Nature.* 1997. Vol. 388. P. 465-468.

Ю.Т. Дьяков, С.Н. Еланский

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА

Phytophthora infestans

Вступление

Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) deBary – возбудитель фитофтороза, самой экономически важной болезни картофеля и томата – уже более полутора столетий привлекает пристальное внимание исследователей из разных стран. Внезапно появившись в Европе в середине XIX столетия, он вызвал эпидемию картофеля, оставшуюся в памяти многих поколений. До сих пор его часто называют «гриб ирландского голода». Почти сто лет спустя после первых эпидемий были обнаружены устойчивые к фитофторозу дикие мексиканские виды картофеля, разработаны методы их скрещивания с культурным картофелем (Muller, 1935) и получены первые фитофтороустойчивые сорта (Пушкарев, 1937). Однако вскоре после начала их коммерческого выращивания накопились вирулентные к устойчивым сортам расы возбудителя фитофтороза, вводимые в сорта новые гены устойчивости из дикого мексиканского картофеля стали быстро терять эффективность.

Неудачи с использованием моногенной (вертикальной) устойчивости заставили селекционеров искать более сложные пути эксплуатации неспецифической, полигенной (горизонталь-

ной) устойчивости. Однако в последние годы в отдельных популяциях паразита стали накапливаться высоко агрессивные расы, вызывающие эрозию даже неспецифической устойчивости, то есть стала возможна вариация не только вирулентности, но и агрессивности (Филиппов и др., 2004).

Такие же проблемы возникли и при использовании химических методов защиты картофеля. Фитофторовые грибы входят в класс Oomycetes, который образует отдельную от большинства грибов филу, относящуюся к царству Stramenopila (поэтому оомицеты иногда называют псевдогрибами). Вследствие значительных отличий оомицетов от истинных грибов в химическом составе, ультраструктуре и метаболизме системные фунгициды, применяющиеся для защиты растений от многих грибных болезней, для оомицетов неэффективны. Поэтому в химической защите от фитофтороза использовали многократные (до 12 раз за сезон) опрыскивания контактными препаратами. Революцию в химической защите от фитофтороза совершили фениламины, токсичные для оомицетов и системно передвигающиеся в растениях. Однако повсеместное их приме-

нение быстро привело к накоплению в грибных популяциях резистентных к фениламидам штаммов (Davidse et al., 1981), что усложнило применение защитных мероприятий.

Все вышесказанное объясняет огромное внимание, которое уделяют исследователи из разных стран популяциям *P. infestans*, динамике численности и генетического состава, генетическим механизмам изменчивости. Авторы данной публикации много лет работают в этой области

и, наряду с другими сотрудниками, аспирантами и студентами каф. микологии и альгологии Московского университета, в разные годы занимавшимися этой проблемой (Т.А. Кузовниковой, В.Б. Кулиш, Н.Л. Поединок, А.В. Долговой, В.А. Тереховой, Л.М. Супрун, М.К. Деревягиной, И.Н. Рыбаковой, С.Ф. Багировой, А.Н. Смирновым, А.С. Кравцовым, В.П. Апрышко, Ф.Х. Аматахановой, О.И. Лавровой, Д.И. Милутиной), внесли некоторый вклад в ее изучение.

Жизненный цикл *Phytophthora infestans*

P. infestans развивается внутри листьев картофеля межклеточную грибницу с гаусториями. Питаясь тканями листа, он вызывает образование темных пятен, которые во влажную погоду чернеют и загнивают. При сильном поражении погибает весь лист. После периода питания на грибнице образуются выросты – спорангиеносцы, которые высвываются наружу через устьица. Во влажную погоду они образуют налет белого цвета вокруг пятен с нижней стороны листьев. На концах спорангиеносцев формируются лимонovidные зооспорангии, которые отрываются и разносятся брызгами дождя. Попадая в капли воды на поверхности листа картофеля, спорангии прорастают 6–8 зооспорами, которые после периода движения округляются, покрываются оболочкой и прорастают ростковой трубкой. Росток через устьице проникает в ткань листа. При определенных условиях зооспорангий может прорасти ростковой трубкой напрямую в ткань листа. При благоприятных условиях время от заражения до образования нового спороношения составляет всего 3–4 дня.

Попадая на землю и профильтровываясь через почву спорангии заражают клубни. Сильно пораженные клубни при хранении сгнивают, в слабо пораженных инфекция может сохраняться до следующего сезона. Кроме того, возбудитель фитофтороза может сохраняться в зимний период в виде ооспор (толстостенные покоящиеся половые споры) в почве на растительных остатках и на семенах томата. Ооспоры образуются на живых органах растений при встрече штаммов разных типов спаривания при избыточном увлажнении. Весной на посаженных зараженных клубнях и на растительных остатках с ооспорами образуется бесполое спороношение, зооспорангии выходят в почву и вызывают заражение нижних листьев растений. В некоторых случаях

мицелий может расти из зараженного клубня по зеленой части растения и проявляется, как правило, в верхней части стебля.

Серьезное отличие оомицетов от большинства грибов заключается в преобладании диплофазы в их жизненном цикле с гаметическим мейозом и прорастанием зигот (ооспор) без редукционного деления ядер. Эта особенность, плюс дипольный гетероталлизм, заменяющий двуполость, казалось бы, позволяют применить к оомицетам подходы, разработанные для изучения популяций высших эукариот (анализ панмиксии и подразделенности популяций, внутри- и межпопуляционных потоков генов и др.). Однако три фактора не позволяют полностью переносить эти подходы на изучение популяций *P. infestans* :

1. Наряду с гибридными ооспорами в попу-

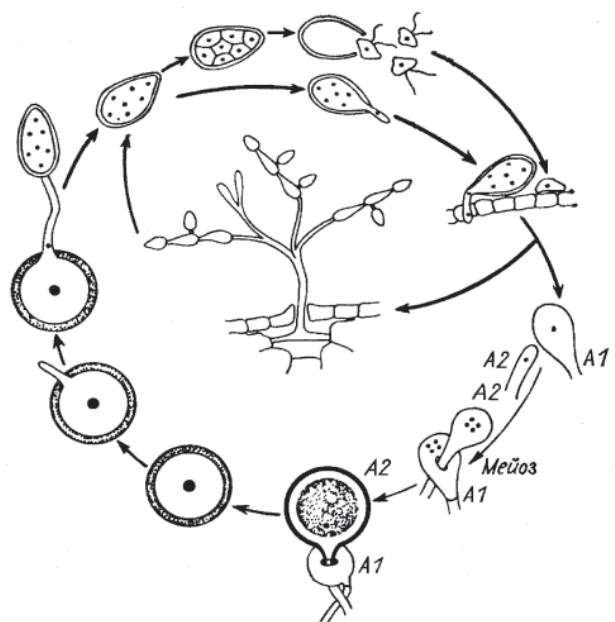


Рис. 1. Жизненный цикл *Phytophthora infestans*.

лияциях образуются самофертильные, партеногенетическое ооспоры (Fife, Shaw, 1992; Аникина и др., 1997a; Savenkova, Cherepennikova-Anikina, 2002; Смирнов, 2003), причем частота их образования может быть достаточной, чтобы повлиять на результаты анализов.

2. Половой процесс у *P. infestans* вносит значительный вклад в динамику численности популяций, ибо гриб размножается главным образом вегетативными спорами, образуя за вегетационный период несколько генераций бесполого спороношения (полициклическое развитие болезни). Ооспоры играют важную роль в сохранении организма в период, когда отсутствуют зеленые растения (зимой) и в первичном заражении всходов. Затем, в течение лета, происходит клональное размножение и увеличение или, наоборот, падение численности отдельных клонов, возникших в результате половой рекомбинации,

что определяется главным образом отбором более приспособленных. Поэтому соотношение отдельных клонов в популяции в начале и конце эпифитотии может быть совершенно различным.

3. Описанный цикл характерен для нативных популяций *P. infestans* на их родине – в Центральной Америке. В других зонах мира более 100 лет половой процесс у этого гриба не был известен, зимующей стадией был вегетативный мицелий в зараженных клубнях картофеля. Жизненный цикл был полностью агамным, а распространение носило очаговый характер: инфекция из единичных зараженных высаженных клубней переходила на листья, образуя первичные очаги болезни, которые могли сливаться при массовом развитии заболевания.

Таким образом, в одних регионах может быть чередование полового и бесполого циклов, а в других – только бесполой цикл (рис.1).

Механизмы изменчивости

Мутационный процесс

Поскольку возникновение мутаций – случайный процесс, протекающий с низкой частотой, возникновение мутаций по какому-либо локусу зависит от частоты мутирования этого локуса и численности популяции. При изучении частоты мутаций штаммов *P. infestans* обычно определяют численность колоний, выросших на селективных питательных средах после обработки химическими или физическими мутагенами. Как видно из представленных в табл. 1 данных, частота мутирования одного и того же штамма по разным локусам может различаться на несколько порядков. Высокая частота мутаций устойчивости к металаксилу может быть одной из причин накопления резистентных к нему штаммов в природе.

Частота спонтанных или индуцированных мутаций, вычисленная на основании лабораторных опытов, не всегда соответствует процессам, происходящим в природных популяциях, по следующим причинам:

1. При несинхронных ядерных делениях невозможно оценить частоту мутаций, происходящих на одну ядерную генерацию. Поэтому большинство экспериментов дает информацию лишь непосредственно о частоте мутаций, не делая различий между двумя мутационными событиями и одним событием, следующим за митозом.

Таблица 1.
Частоты мутаций *Phytophthora infestans* к ростигибирующим веществам под действием нитрозометилмочевины (Долгова, Дьяков, 1986; Bagirova et al., 2001)

Соединение	Частота мутаций
Окситетрациклин	$6,9 \times 10^{-8}$
Бластицидин S	$7,2 \times 10^{-8}$
Стрептомицин	$8,3 \times 10^{-8}$
Трихотецин	$1,8 \times 10^{-8}$
Циклогексимид	$2,1 \times 10^{-8}$
Даконил	$<4 \times 10^{-8}$
Диметоморф	$6,3 \times 10^{-7}$
Металаксил	$6,9 \times 10^{-6}$

2. Одношаговые мутации обычно снижают сбалансированность генома, поэтому наряду с приобретением нового свойства снижается общая приспособленность организма. Большинство экспериментально полученных мутаций имеет пониженную агрессивность и не фиксируется в природных популяциях. Так, коэффициент корреляции между степенью устойчивости мутантов *P. infestans* к фениламидным

фунгицидам и скоростью роста на искусственной среде составил в среднем $(-0,62)$, а между устойчивостью к фунгицидам и агрессивностью на листьях картофеля – $(-0,65)$ (Деревягина и др., 1993), что свидетельствует о низкой приспособленности мутантов. Мутации устойчивости к диметоморфу также сопровождались резким снижением жизнеспособности (Bagirova et al., 2001).

3. Большинство спонтанных и индуцированных мутаций рецессивны и не проявляются фенотипически в экспериментах, но составляют скрытый резерв изменчивости природных популяций. Мутантные штаммы, выделенные в лабораторных опытах, несут доминантные или полудоминантные мутации (Кулиш, Дьяков, 1979). Видимо, диплоидностью ядер объясняются неудачные попытки получить мутантов, вирулентных на ранее устойчивых сортах под воздействием УФ-облучения (МакКее, 1969). По расчетам автора такие мутации могут возникать с частотой менее $1:500000$. Переход рецессивных мутаций в гомозиготное, фенотипически выраженное состояние может произойти вследствие половой или бесполой рекомбинации (см. ниже). Однако даже в таком случае мутация может маскироваться доминантными аллелями ядер дикого типа в ценотическом (многоядерном) мицелии и фенотипически фиксироваться только при образовании одноядерных зооспор.

Размеры популяций также играют решающую роль в появлении спонтанных мутаций. В очень больших популяциях, в которых численность клеток $N > 1/a$, где a – скорость мутирования, мутация перестает быть случайным явлением (Квитко, 1974). Расчеты показывают, что при средней зараженности картофельного поля (35 пятен на одном растении) на одном гектаре ежедневно формируется 8×10^{12} спор (Дьяков, Супрун, 1984). По-видимому, в таких популяциях встречаются все дозволённые типом обмена мутации по каждому локусу. Даже редкая мутация, возникающая с частотой 10^{-9} , будет обретаема тысячами особей из триллионов, обитающих на одном гектаре картофельного поля. Для мутаций, возникающих с более высокой частотой (например, 10^{-6}), в такой популяции могут ежедневно возникать разнообразные парные мутации (одновременно по двум локусам), т.е. мутационный процесс заменит рекомбинацию.

Миграции

Для *P. infestans* известны два главных типа миграции: на близкие расстояния – в пределах картофельного поля или соседних полей – разносом зооспорангиев воздушными токами или дождевыми брызгами, и на дальние расстояния – с посадочными клубнями или перевозимыми плодами томатов. Первый способ обеспечивает расширение очага болезни, второй – создание новых очагов в местах, удаленных от первичного. Распространение инфекции с клубнями и плодами томата не только способствует возникновению болезни в новых местах, но и является основным источником генетического разнообразия популяций. В Московской области выращивается картофель, привезенный из разных регионов России и Западной Европы. Плоды томата привозятся из южных регионов России (Астраханская обл., Краснодарский край, Северный Кавказ). Семена томата, которые тоже могут служить источниками инфекции (Rubin et al., 2001), также привозятся из южных регионов России, Китая, государств Европы и других стран. Подмосковные полевые популяции возбудителя фитофтороза отличаются очень высоким разнообразием. Так, среди 18 проанализированных изолятов сборов 1997–1998 гг. обнаружено 15 мультилокусных генотипов (анализ проводили по 26 фингерпринтам ядерной ДНК, трем гаплотипам митохондриальной ДНК, двум изоферментным локусам и типу спаривания), т.е. практически каждый изолят уникален. В то же время на огромной территории азиатской части России (от Екатеринбурга до Сахалина и Владивостока), где картофель выращивают, в основном, из местного посадочного материала, а томаты сравнительно малораспространены и тоже выращиваются из местных семян, практически все полевые популяции мономорфны, всего же среди 39 проанализированных изолятов, собранных в Сибири и на Дальнем Востоке обнаружено только три генотипа. Один из них, SIB-1, встречается в большинстве популяций от Екатеринбурга до Владивостока и о. Сахалин, другой – SIB-2, выявлен в окрестностях Хабаровска и в Еврейской АО. Третий генотип (единственный изолят) был обнаружен в окрестностях Владивостока (Elansky et al., 2001).

По расчетам Э. Майра (1974), генетические изменения в локальной популяции, обусловленные мутациями, редко превышают 10^{-5} на локус, в то время как в открытых популяциях обмен вследствие встречного потока генов составляет не менее $10^{-3} - 10^{-4}$.

Миграцией в зараженных клубнях обусловлено попадание *P. infestans* в Европу, распространение по всем регионам мира, где выращивают картофель; ими вызваны самые серьезные популяционные перестройки. Фитофтороз на картофеле появился на территории Российской империи почти одновременно с его появлением в Западной Европе. Поскольку болезнь впервые



Рис. 2. Пути миграции *P. infestans* в 40-х годах 19 века. (Fry et al., 1992)

- 1 – первая миграция из Мексики в Северо-Восточные США (1842–1843 гг.),
- 2 – миграция из США в Европу (примерно 1845 г.),
- 3 – миграция из Европы в другие страны мира, последующие года (Goodwin et al., 1994).

была отмечена в 1846–1847 гг в Прибалтике и только в последующие годы распространилась в Белоруссии и Северо-Западных районах России, ее западноевропейское происхождение очевидно. Не столь очевиден первый источник фитофтороза в Старом Свете. Развиваемая Фраем с соавторами (Fry et al., 1992; Fry, Goodwin, 1995, Goodwin et al., 1994)) гипотеза предполагает, что паразит попал из Мексики сначала в Северную Америку, где распространился по посевам, а затем был перевезен в Западную Европу (рис. 2). В результате повторного дрейфа (двойного эффекта «бутылочного горлышка») в Европу попали единичные клоны (возможно, один), потомство которого вызвало пандемию на всей территории Старого Света, где выращивают картофель. В качестве доказательств этой гипотезы авторы приводят, во-первых, повсеместную встречаемость только одного типа спаривания (A1) и, во-вторых, однородность генотипов исследованных штаммов из разных регионов (все они по молекулярным маркерам, включающим 2 изоферментных локуса, паттерны фингерпринтинга ДНК и структуру митохондриальной ДНК, идентичны, и соответствуют описанному в США клону US-1). Однако некоторые данные заставляют сомневаться по крайней мере в некоторых положениях изложенной гипотезы. Анализ митохондриальной ДНК *Phytophthora infestans*, выделенной из гербарных

образцов картофеля, зараженных в годы первой эпифитотии 40-х годов XIX в показал, что по структуре митохондриальной ДНК они отличаются от клона US-1, который, следовательно был, по крайней мере, не единственным источником инфекции в Европе (Ristaino et al, 2001).

Вторая точка зрения, развиваемая Перуанскими фитопатологами (Abad, Abad, 1995; Abad et al., 1995), предполагает южноамериканское (андское) происхождения инфекции. Авторы показали, что *P. infestans* издавна паразитирует (рукописные материалы 16–19 вв.) в Перу и Эквадоре на дынной груше (*Solanum muricatum*), причем штаммы из картофеля и дынной груши взаимно патогенны (Adler et al., 2002a). Из листьев дынной груши выделены изоляты, имеющие оба типа спаривания (Adler et al., 2002b). Против «перуанского» источника инфекции может свидетельствовать сильнейшее поражение картофеля привезенными штаммами, отсутствие у него как вертикальной, так и горизонтальной устойчивости к фитофторозу (мексиканские виды и сорта картофеля высокоустойчивы к фитофторозу).

Ситуация с фитофторозом вновь ухудшилась в 80-е годы XX века. Произошли следующие изменения:

- 1) Увеличилась средняя агрессивность популяции, что привело, в частности, к широкому

распространение наиболее вредоносной формы фитофтороза – поражению черешков и стеблей.

2) Произошел сдвиг времени появления фитофтороза на картофеле – с конца июля на начало июля и даже на конец июня.

3) Стал повсеместно встречаться тип спаривания A2, отсутствовавший в Старом Свете ранее.

Изменениям предшествовали два события: массовое применение нового фунгицида – металаксил (Schwinn, Staub, 1980) и выход Мексики в мировые экспортеры картофеля (Niederhauser, 1993). В соответствии с этим были выдвинуты две причины популяционных изменений – конверсия типа спаривания под влиянием металаксил (Ко, 1994) и массовый занос новых штаммов с зараженными клубнями из Мексики (Fry, Goodwin, 1995). Хотя взаимопревращения типов спаривания под влиянием металаксил получены не только Ко, но и в работах, выполненных в нашей лаборатории (Savenkova, Cherepennikova-Anikina, 2002), вторая гипотеза предпочтительнее. Наряду с появлением второго типа спаривания произошли серьезные изменения в генотипе коллекционируемых штаммов *P. infestans*, в том числе в нейтральных генах – изоферментных и RFLP-локусах, а также в структуре митохондриальной ДНК. Комплекс этих изменений нельзя объяснить действием металаксил, скорее произошел массовый завоз новых штаммов из Мексики, которые, будучи более агрессивными (Kato et al., 1997), вытеснили старые штаммы, став доминирующими в популяциях. Перестал встречаться штамм US-1. Изменение состава европейских популяций произошло в очень короткий срок – с 1980 по 1985 гг (Fry et al., 1992). На территории бывшего СССР «новые штаммы» были обнаружены в сборах из Эстонии 1985 г, то есть раньше, чем в Польше и Германии (Goodwin et al., 1994). Последний раз «старый штамм» в России выделен с пораженного томата в Московской области в 1993 г. (Долгова и др., 1997). Также и во Франции «старые» штаммы встречались в посадках томатов до начала 90-х годов, то есть после того, как на картофеле они давно исчезли (Leberton, Andrivon, 1998). Изменения штаммов *P. infestans* затронули многие признаки, в том числе имеющие важное практическое значение, и усилили вредоносность фитофтороза.

Половая рекомбинация

Для того чтобы половая рекомбинация могла бы вносить вклад в изменчивость необходимо присутствие в популяции двух факторов спари-

вания в соотношении, близком к 1:1, и наличие исходной вариабельности популяции.

Соотношение двух типов спаривания сильно варьирует в разных популяциях и даже в разные годы в одной популяции (таблица 2). Причины столь резких изменений частот типов спаривания в популяциях (как, например, в России и в Израиле в начале 90х гг прошлого века) не известны, но полагают, что это связано с завозом более конкурентоспособных клонов (Cohen, 2002).

Некоторые косвенные данные свидетельствуют о протекании полового процесса в отдельные годы и в отдельных регионах :

1) Исследования популяций из Московской области показало, что в 13 популяциях, в которых доля типа спаривания A2 была менее 10%, общее генетическое разнообразие, вычисленное по трем изоферментным локусам, составило 0,08, а в 14 популяциях, в которых доля типа спаривания A2 превышала 30%, генетическое разнообразие было вдвое выше (0,15) (Еланский и др., 1999). Таким образом, чем выше вероятность полового процесса, тем больше генетическое разнообразие популяции.

2) Связь между соотношением типов спаривания в популяциях и интенсивностью образования ооспор наблюдали в Израиле (Cohen et al., 1997) и в Голландии (Flier et al., 2004). Наши исследования показали, что в популяциях, в которых изоляты с типом спаривания A2 составляли 62, 17, 9 и 6%, ооспоры обнаружены в 78, 50, 30 и 15% проанализированных листочков картофеля (имеющих 2 и более пятен) соответственно. Образцы с 2 и более пятнами значительно чаще содержали ооспоры, чем образцы с 1 пятном (32 и 14% образцов соответственно) (Апрышко и др, 2004).

3) В некоторых регионах были обнаружены уникальные генотипы, возникновение которых связывают с половой рекомбинацией. Так, в Польше в 1989 г и во Франции в 1990 г были обнаружены штаммы, гомозиготные по локусу глюкозо-6-фосфатизомеразы (GPI 90/90). Поскольку ранее в течение 10 лет встречались только гетерозиготы 90/100, гомозиготность приписывают половой рекомбинации (Sujkowski et al., 1994). В бассейне Колумбии (США) обычны изоляты, сочетающие A2 с GPI 100/110 и A1 с GPI 100/100, однако в конце сезона 1994 г (16 августа и 9 сентября) были обнаружены штаммы, имеющие рекомбинантные генотипы (A1 GPI 100/110 и A2 GPI 100/100) (Miller et al., 1997).

4) В некоторых популяциях из Польши (Sujkowski et al., 1994) и Северного Кавказа (Аматханова и др., 2004) распределение фингер-

Таблица 2
 Встречаемость типов спаривания (% A2) в разных регионах

Годы	Япония (Kato et al., 1999)	Израиль (Cohen, 2002)	Россия, Моск. обл. (Воробьева и др., 1991; Долгова и др., 1996); Еланский и др., 1999)	Белоруссия (Авдей, 1995; не опубликовано)	Польша (Sujkowski et al., 1994)	Вост. Германия (Gotz, 1991)	Зап. Германия (Schober-Butin et al., 1995)
1987	54	100	79		0	0	41
1988	71	100	53		0	3	30
1989	90	100	65	2	29	27	33
1990	87	100		4	10	13	22
1991	90	100	76	2			8
1992	97			0			0
1993	97	30	3	23			23
1994		18		65			7
1995		10	5				
1996		0	87				
1997		5	17				
1998		0	26				
1999		30	63	40			
2000		3	65	38			
2001			30				

принтных локусов ДНК и аллозимных локусов белков соответствует распределению Харди-Вайнберга, что свидетельствует о высокой доле вклада половой рекомбинации в изменчивость популяций. В других регионах России соответствия распределению Харди-Вайнберга в популяциях не обнаружено, но показано наличие неравновесного сцепления, свидетельствующего о преобладании клонального размножения (Еланский и др., 1999).

5) Генетическое разнообразие (GST) между группами штаммов, имеющими разные типы спаривания (A1 и A2) было более низким, чем между разными популяциями (Sujkowski et al., 1994), что косвенно свидетельствует о половых скрещиваниях.

В то же время вклад половой рекомбинации в популяционное разнообразие не может быть очень высоким. Подсчет этого вклада был сделан в популяциях из Московской области (Еланский и др., 1999). По расчетам Левонтина (1978) «рекомбинация, которая может продуцировать новые варианты из двух локусов с частотой, не превышающей произведение их гетерозиготностей, становится эффективной только в том случае, если величины гетерозиготности по обоим аллелям уже высокие». При обычном для Московской области соотношении двух типов спаривания, равных 4:1, частота рекомбинации составит 0,25. Вероятность того, что скрещивающиеся штаммы будут гетерозиготны по двум из трех изученных изоферментных локусов в исследованных популяциях составила 0,01

(2 штамма из 177). Следовательно, вероятность возникновения двойных гетерозигот в результате рекомбинации не должна превышать их произведение, помноженное на вероятность скрещивания $(0,25 \times 0,02 \times 0,02) = 10^{-4}$, т.е. половые рекомбинанты обычно не попадают в исследованную выборку штаммов. Эти расчеты сделаны для популяций из Московской области, характеризующихся относительно высокой вариабельностью. В номорфных популяциях, подобных сибирским, половой процесс, если даже и происходит в отдельных популяциях, не может оказать влияние на их генетическое разнообразие.

Кроме того, для *P. infestans* характерны частые нарушения расхождения хромосом в мейозе, что приводит к анеуплоидии. С помощью анализа расхождения RFLP-маркеров показано, что 4% гибридов триплоиды (все 20 маркеров представлены в тройном наборе) и 30% – трисомии по разным хромосомам (Carter et al., 1999). Такие нарушения снижают фертильность гибридов.

Парасексуальная рекомбинация, митотическая конверсия генов

В экспериментах по сращиванию штаммов *P. infestans*, имеющих мутации резистентности к разным ингибиторам роста, было обнаружено возникновение изолятов, устойчивых к обоим ингибиторам (Shattock, Shaw, 1976; Дьяков, Кузовникова, 1974; Кулиш, Дьяков, 1979). Устойчивые к двум ингибиторам роста штаммы возникли вследствие гетерокариотизации мицелия, и, в этом случае, расщеплялись при размножении одноядерными зооспорами (Judelson, Ge Yang, 1998), или не расщеплялись в монозооспоровом потомстве, ибо имели диплоидные (тетраплоидные, поскольку исходные изоляты диплоидны) ядра (Кулиш, Дьяков, 1979). Гетерозиготные диплоиды сегрегировали с очень низкой частотой вследствие гаплоидизации, нерасхождения хромосом и митотического кроссинговера (Поединок и др., 1982). Частоту этих процессов можно было увеличить с помощью определенных воздействий на гетерозиготные диплоиды (УФ-облучением прорастающих спор, обработкой *p*-фторфенилаланином).

Хотя формирование вегетативных гибридов с двойной устойчивостью происходит не только *in vitro*, но и в зараженных смеси мутантов картофельных клубнях (Кулиш и др., 1978), оценить роль парасексуальной рекомбинации в генерировании новых генотипов в популяциях слож-

но. Частота образования сегрегантов вследствие гаплоидизации, нерасхождения хромосом и митотического кроссинговера без специальных воздействий ничтожна (менее 10^{-3}).

В основе возникновения гомозиготных сегрегантов гетерозиготных штаммов может лежать как митотический кроссинговер, так и митотическая генная конверсия, которая у *P. sojae* протекает с частотой от 3×10^{-2} до 5×10^{-5} на локус в зависимости от штамма (Chamnanpant et al., 2001).

Хотя частота возникновения гетерокарионов и гетерозиготных диплоидов оказалась неожиданно высокой (достигает десятков процентов), этот процесс происходит только при сращивании мутантных культур, полученных из одного штамма. При использовании разных изолированных из природы штаммов гетерокариотизация не происходит (или происходит с очень низкой частотой) вследствие наличия вегетативной несовместимости (Поединок, Дьяков, 1981; Аникина и др., 1997б; Cherepennikova-Anikina et al., 2002). Так что роль парасексуальной рекомбинации может быть сведена только к внутриклональной рекомбинации в гетерозиготных ядрах и переходу отдельных генов в гомозиготное состояние без полового процесса. Этот процесс может иметь эпидемиологическое значение у штаммов, имеющих рецессивную или полудоминантную мутацию устойчивости к фунгицидам. Переход ее в гомозиготное состояние вследствие парасексуального процесса повысит резистентность носителя мутации (Долгова, Дьяков, 1986).

Интрогрессия генов

Гетероталлические виды *Phytophthora* способны скрещиваться с образованием гибридных ооспор (Воробьева, Гриднев, 1983; Sansome et al., 1991; Veld et al., 1998). Природный гибрид двух видов *Phytophthora* оказался настолько агрессивным, что уничтожил тысячи экземпляров ольхи в Великобритании (Brasier et al., 1999). *P. infestans* может встречаться с другими видами рода (*P. erythroseptica*, *P. nicotianae*, *P. cactorum* и др.) на общих растениях-хозяевах и в почве, но о возможности возникновения межвидовых гибридов в литературе мало сведений. В лабораторных условиях были получены гибриды между *P. infestans* и *P. mirabilis* (Goodwin, Fry, 1994).

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ

Изучение генетической структуры популяций в настоящее время основывается на анализе чистых культур (изолятов) входящих в нее штаммов. Анализ популяций без выделения изолятов также проводится с определенными целями, такими, например, как изучение агрессивности популяции или присутствия в ней устойчивых к фунгицидам штаммов (Филиппов и др., 2004, Деревягина и др., 1999). Этот тип исследований предполагает использование специальных методов, описание которых выходит за рамки предлагаемого обзора.

Для сравнительного анализа штаммов используют ряд методов, основанных как на анализе структуры ДНК, так и на изучении фенотипических проявлений. При сравнительном анализе популяций приходится иметь дело с большим количеством изолятов, что накладывает определенные требования на используемые методы. В идеале они должны соответствовать следующим требованиям (Cooke, Lees, 2004, Mueller, Wolfenbarger, 1999):

- быть дешевыми, несложными в исполнении, не требовать значительных временных затрат, базироваться на общедоступных технологиях (например, ПЦР),

- должны генерировать достаточно большое число независимых кодоминантных маркерных признаков,

- иметь высокую воспроизводимость,

- использовать минимальное количество исследуемой ткани,

- быть специфичными к субстрату – имеющееся в культуре загрязнение не должно влиять на результаты

- не требовать применения опасных процедур и сильно токсичных химикатов.

Методов, соответствующих всем вышеперечисленным параметрам, к сожалению, не существует. Для сравнительного исследования штаммов в наше время используются методы, основанные на анализе фенотипических признаков: тип спаривания, спектры изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы, и на анализе структуры ДНК: полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), который обычно дополняют гибридизационной пробой RG 57, анализ микросателлитных повторов (SSR и InterSSR), амплификация со случайными праймерами (RAPD), амплификация рестрикционных фрагментов (AFLP), амплифика-

ция с праймерами, гомологичными последовательностям мобильных элементов (например, InterSINE), определение гаплотипов митохондриальной ДНК.

Краткие описания методов сравнительного исследования штаммов, применяемых в работе с *P. infestans*

Тип спаривания

Для проведения исследования необходимы тестерные штаммы с известными типами спаривания – A1 и A2. Исследуемый изолят высевается с ними попарно в чашки Петри с овсяной агаризованной средой. После инкубации в течение 10 дней чашки изучаются на наличие или отсутствие ооспор в среде в зоне контакта штаммов. Возможны 4 варианта: штамм относится к типу спаривания A1, если он образует ооспоры с тестером A2, к A2, если образует ооспоры с тестером A1, к A1A2, если образует ооспоры с обоими тестерами, или является стерильным, если не образует ооспор ни с каким тестером (последние две группы встречаются редко).

Спектры изоферментов

Изоферментные маркеры обычно независимы от внешних условий, показывают менделевское наследование и являются кодоминантными, позволяя различать гомо- и гетерозиготы. Использование белков как генных маркеров позволяет регистрировать как крупные реорганизации генетического материала, включая хромосомные и геномные мутации, так и обнаруживать единичные аминокислотные замены.

Электрофоретические исследования белков показали, что большинство ферментов существуют в организмах в виде нескольких различающихся по электрофоретической подвижности фракций. Эти фракции – результат кодирования множественных форм ферментов разными локусами (изозимы или изоферменты) или разными аллелями одного локуса (аллозимы или аллоферменты). То есть изозимы и аллозимы – это разные формы одного фермента. Разные формы имеют одинаковую каталитическую активность, немного различаются по единичным аминокислотным заменам в составе пептида и по зарядам. Такие различия обычно устанавливаются при проведении электрофореза.

При исследовании штаммов *P. infestans* используют спектры изоферментов двух белков – пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы (этот фермент в российских популяциях мноморфен, поэтому методы его изучения в данной работе не приводятся). Для их разделения на изозимы в электрическом поле на пластину целлюлозоацетатного геля, помещенную в электрическое поле, наносят белковые препараты из изучаемых организмов. Скорость диффузии в геле отдельных белков зависит от заряда и молекулярной массы, поэтому в электрическом поле происходит разделение смеси белков на отдельные фракции, которые можно визуализировать с помощью специальных красителей на соответствующий белок.

Исследование изоферментов пептидазы проводится на целлюлозо-ацетатных, крахмальных или полиакриламидных гелях. Наиболее удобным является метод, основанный на использовании целлюлозо-ацетатных гелей, производимых фирмой **Helena Laboratories Inc.** Он не требует больших количеств исследуемых материалов, позволяет получать контрастные полосы на геле после электрофореза для обоих локусов фермента, его проведение не требует больших временных и материальных затрат.

Анализ спектра изоферментов пептидазы проводят следующим образом. Небольшой кусочек мицелия переносится в микропробирку на 1,5 мл, к нему добавляется 1–2 капли дистиллированной воды. После этого образец гомогенизируется (например, электродрелью с пластмассовой насадкой, подходящей к микропробирке), осаждается в течение 25 секунд на центрифуге при 13000 об/мин. Из каждой микропробирки по 8 мкл супернатанта переносится на плашку аппликатора.

Целлюлозо-ацетатный гель вынимают из контейнера с буфером, промокают между двумя листами фильтровальной бумаги и помещают рабочим слоем вверх на пластмассовую базу аппликатора. Раствор из плашки переносят аппликатором на гель 2–4 раза. Гель перемещают в электрофорезную камеру, на край геля помещается капля краски – свидетеля (бромфеноловый синий). Электрофорез проводится в течение 20 мин. при 200 В. После электрофореза гель переносится на покрасочный столик, покраска проводится следующим раствором (таблица 3). После окончания электрофореза

Таблица 3

Покраска на спектр изоферментов пептидазы

TRIS HCl, 0,05M, Ph 8,0	2 мл
Peroxidase, 1000 U/ml	5 капель
o-dianisidine, 4 mg/ml	8 капель
MgCl ₂ , 20 mg/ml	2 капли
Gly-Leu, 15 mg/ml	10 капель
L-amino-acid oxidase, 20 u/ml	2 капли

гель переносят для покраски на стекло. 10 мл 1,6 % DIFCO агара предварительно расплавляют в СВЧ печи, остужают до 60° С, 2 мл агара смешивают с покрасочной смесью (табл. 3) и выливают на гель, после чего в течение 15–20 мин проявляются полосы. Реактив L-amino-acid oxidase (10 ед/мл) добавляют 90 мкл непосредственно перед смешиванием с расплавленным агаром.

В российских популяциях локус *Per 1* представлен генотипами 100/100 и 92/100. Гомозигота 92/92 встречается крайне редко (около 0,1%). Локус *Per 2* представлен тремя генотипами 100/100, 100/112 и 112/112, причем все 3 варианта встречаются достаточно часто (рис. 3).

Метод исследования спектра изоферментов пептидазы подробно изложен в работе Еланского и Смирнова (Elanky, Smirnov, 2003; она доступна в Интернете по ссылке <http://www.kartofel.org/elansky.htm>).

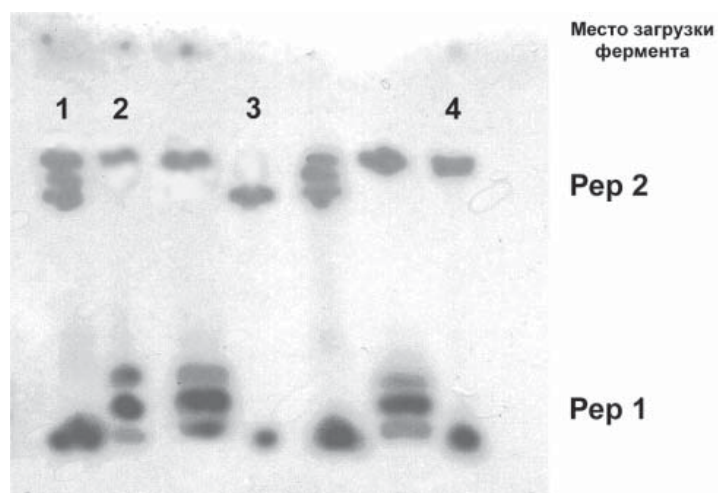


Рис. 3. Спектр изоферментов пептидазы после электрофоретического разделения.

Генотипы (Per 1#Per 2):

1 – 100/100#100/112; 2 – 92/100#100/100;
3 – 100/100#112/112; 4 – 100/100#100/100.

Исследования генома

Полиморфизм длин рестриционных фрагментов с последующей гибридизацией (RFLP-RG 57)

Тотальную ДНК обрабатывают рестриктазой Eco R1, фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза в агарозном геле. Ядерная ДНК очень большая и имеет много повторяющихся последовательностей, в связи с чем непосредственный анализ многочисленных фрагментов, полученных под действием рестриктаз, проводить сложно. Поэтому разделенные в геле фрагменты ДНК переносят на специальную мембрану и используют для гибридизации с зондом RG 57, в состав которого входят нуклеотиды, меченые радиоактивными или флюоресцентными метками. Этот зонд гибридизуется с многократно повторяющимися последовательностями генома (Goodwin et al., 1992). После визуализации результатов гибридизации на свето- или радиоактивночувствительном материале получают многолокусный профиль гибридизации (fingerprinting), представленный 25–29 фрагментами. Бесплое (клоновое) потомство будет иметь одинаковые профили. По расположению полос на электрофорезе судят о сходстве и различиях сравниваемых организмов.

Гаплотипы митохондриальной ДНК

После того, как Griffith и Shaw (1998) разработали несложный и быстрый метод определения гаплотипов мтДНК, этот маркер стал одним из самых популярных при исследованиях *P. infestans*. Суть метода заключается в последовательной амплификации фрагментов P2 и P4 мтДНК праймерами F2-R2 и F4-R4 (табл. 4) и их последующей рестрикции с помощью рестриктаз MspI (P2) и EcoR1 (P4). Он позволяет выделить 4 гаплотипа: Ia, IIa, Ib, IIb. Тип II отличается от типа I присутствием вставки размером 1881 пн и другим расположением сайтов рестрикции в регионах P2 и P4 (рис. 4). Последние 12 лет среди

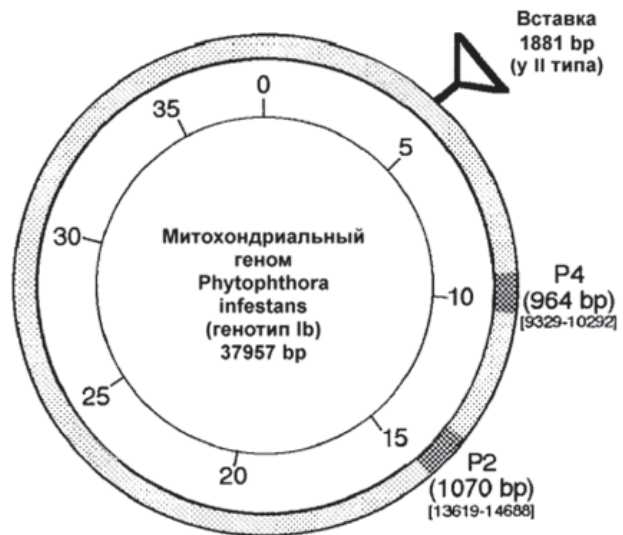


Рис. 4. Схема митохондриального генома *Phytophthora infestans*.

штаммов, собранных на территории России, отмечались только гаплотипы Ia и IIa. Их можно идентифицировать после разделения продуктов рестрикции с праймером F2-R2 в электрическом поле (рис. 5, 6).

Для амплификации используется следующая программа: 1x (300 сек. 94°C), 30x (30 сек. 90°C, 30 сек. 52°C, 90 сек. 72°C); 1x (300сек. 72°C). Реакционная смесь состоит из 0,2U Taq ДНК полимеразы, 1x 2,5 mM MgCl₂-Taq-буфер, 0,2 mM каждого dNTP, 30 pM праймера и 5 ng исследуемой ДНК. Смесь доводится деионизованной водой до 20 мкл.

Рестрикция ПЦР-продукта проводится в течение 2 часов при температуре 37°C. Смесь для рестрикции состоит из 10x MspI (или EcoRI) – 2 мкл, 10x restriction buffer – 2 мкл, деионизованная вода – 6 мкл, ПЦР- продукт – 10 мкл.

Последовательности нуклеотидов митохондриальных геномов разных гаплотипов *P. infestans* к настоящему времени полностью

Таблица 4

Праймеры, используемые для амплификации полиморфных регионов МтDNA

Локус	Праймер	Длина праймера и его размещение у гаплотипа IIa	Длина ПЦР-продукта	Рестриктаза
P2	F2: 5'- TTCCSTTTGTCCTCTACCGAT	21; 13619-13639	1070	MspI
	R2: 5'- TTACGGCGGTTTAGCACATACA	22; 14688-14667		
P4	F4: 5'- TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT	22; 9329-9350	964	EcoRI
	R4: 5'- CCGATACCGATACCAGCACCAA	22; 10292-10271		

определены и доступны в сети Internet. Это способствует легкости конструирования новых тестерных систем на основании структуры мтДНК. Однако проведенные в нашей лаборатории исследования показывают возможность присутствия в мицелии одного изолята митохондрий с различными гаплотипами митохондриальной ДНК (Еланский, Милютин, 2006). Это заставляет по новому взглянуть на исследования, проводимые с использованием гаплотипов митохондриальной ДНК в качестве генетических маркеров. Стандартные тесты, проводимые по методу PCR-RFLP, позволяют, как правило, идентифицировать только преобладающий в мицелии изолята гаплотип мтДНК. В то же время интерпретация результатов использования новых способов сравнительного анализа штаммов и популяций, созданных на основании структуры мтДНК, может быть затруднена, если в одном мицелии присутствуют генетически разные митохондрии.

Амплификация со случайными праймерами (RAPD)

При проведении RAPD используют один праймер (иногда – несколько праймеров одновременно) с произвольной последовательностью нуклеотидов, длиной, как правило, 10 нуклеотидов, с высоким содержанием (от 50%) GC-нуклеотидов и низкой температурой отжига (порядка 35° С). Такие праймеры «садятся» на многочисленные комплементарные сайты в геноме. После амплификации получается большое число фрагментов генома. Их число зависит от используемого праймера (праймеров) и условий реакции (концентрации MgCl₂ и температуры отжига). Визуализацию фрагментов проводят разгонкой в полиакриламидном или агарозном геле. При проведении RAPD анализа необходимо тщательно следить за чистотой анализируемого материала, т.к. контаминация другими живыми объектами может вызвать значительное увеличение артефактов, которых и при анализе чистого материала довольно много (Perez et al, 1998). Использование этого метода при исследовании генома *P. infestans* отражено во многих работах: Judelson, Roberts, 1999, Ghimire et al., 2003, Carlisle et al., 2001. Подбор условий реакции и праймеров (исследован 51 десятинуклеотидный праймер) приведен в статье Abu-El Samen et al., 2003.

Анализ микросателлитных повторов (SSR)

Микросателлитные повторы состоят из коротких последовательностей из 2–3 (до 6) нуклеотидов (например, CAT) которые повторяются

много раз (CATCATCAT...). Количество повторов может различаться даже у разных индивидуумов. Праймеры должны быть гомологичны последовательностям, ограничивающим регионы с повторами, поэтому их разработка необходима для каждого вида живых организмов в отдельности и достаточно трудоемка. К счастью, для *P. infestans* эта работа уже проведена (Кнарова et al., 2001, Кнарова, Gisi, 2002) и SSR анализ не представляет большой сложности. В работе использовали две группы праймеров на локусы Pi4B и Pi4G соответственно:

F: 5' – AAAATAAAGCCTTTGGTTCA и

R: 5'– GCAAGCGAGGTTTGTAGATT

F: 5'– CGCTGTGTGGATGACAAGTA и

R: 5'– TCGACCTGACATACGAGCTA

Реакционная смесь (15 мкл): 1x 1,5 mM MgCl₂-Taq-буфер, 0,38 U Taq ДНК полимеразы, 0,075 mM каждого dNTP, 0,5 мкМ и 1 мкМ прямого и обратного праймера соответственно, 30 ng исследуемой ДНК, деионизованная вода – до 15 мкл.

Условия амплификации: 35x (40 сек. 94°С, 40 сек. 58°С, 20 сек. 72°С); 1x (5 мин. 72°С).

Близким к этому методу является метод InterSSR, который основан на использовании праймеров, представляющих собой участки микросателлитных повторов (например, CATCATCATCAT). Этот метод позволяет получить большое количество ПЦР-продуктов разного размера. Для уменьшения количества ПЦР-продуктов к праймеру добавляют один произвольный нуклеотид. Хорошие результаты при исследовании *P. infestans* показал праймер (GA)₈C (Ю.М. Тикунов, личное сообщение).

Реакционная смесь (25 мкл): 1U Taq ДНК полимеразы, 1x 1,5 mM MgCl₂-Taq-буфер, 0,25 mM каждого dNTP, 30 pM праймера и 5 ng исследуемой ДНК, деионизованная вода – до 25 мкл.

Условия амплификации: 5 мин. 94°С, 35 циклов: 1 мин. 94°С, 1 мин. 55°С, 2 мин. 72°С; 7 мин. 72°С.

Полиморфизм длин амплифицированных рестрикционных фрагментов (AFLP)

После рестрикции выделенной из объекта ДНК с помощью рестриктаз MseI и EcoRI на продуктах рестрикции остаются «липкие концы» (одноцепочечные участки ДНК). К этим «липким концам» надстраиваются специальные адаптеры с гомологичными «липким концом» участками. После этого проводится амплификация с праймерами, комплементарными пос-

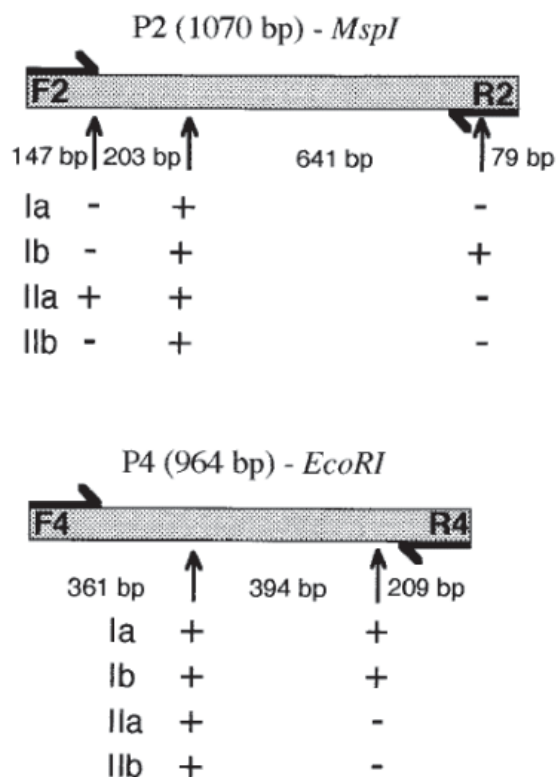


Рис.5. Продукты, получающиеся после рестрикции ПЦР-продуктов регионов P2 и P4 (Griffith, Shaw, 1998).

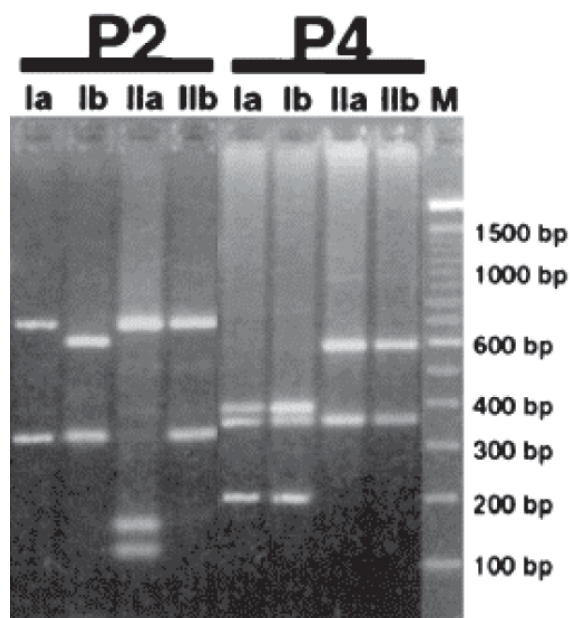


Рис. 6. Вид продуктов рестрикции после электрофоретического разделения (Griffith, Shaw, 1998).

ледовательностям адаптеров. Для уменьшения числа ПЦР-продуктов к праймерам добавляются 1 или 2 нуклеотида. Метод обладает хорошей воспроизводимостью. Подробное описание метода приведено в работах Mueller, Wolfenbarger, 1999, Savelkoul et al., 1999. Изучение применения 17 пар праймеров для AFLP *P. infestans* описано в работе Abu-El Samen et al., 2003.

Амплификация с праймерами, гомологичными последовательностям мобильных элементов (InterSINE)

Мобильные элементы встречаются в большом числе в геномах большинства живых объектов. Поэтому, если сделать праймеры, комплементарные стабильным последовательностям тех или иных мобильных элементов, можно амплифицировать участки генома, находящиеся между ними. В исследованиях возбудителя фитофтороза успешно применялся метод амплификации участков генома с помощью 25-нуклеотидного праймера RevSINE, комплементарного коровой последовательности ретропозона SINE (Short Interspersed Nuclear Elements) 5'-GGGATCGAACCAGAAGTGACTACGG-3' (Лаврова, Еланский, 2003). Программа амплификации была следующей: 1x (300 сек. 95°C), 30x (60 сек. 95°C, 60 сек. 48°C, 60 сек. 72°C); 1x (300сек. 72°C), состав реакционной смеси – как при исследовании митохондриальной ДНК (см. выше). Метод обладает очень высоким разрешением и средней воспроизводимостью.

Особенности применения методов сравнительного исследования штаммов в популяционных исследованиях

При планировании исследования надо четко представлять цели, которые оно преследует, и использовать соответствующие методы. Так, некоторые методы позволяют генерировать большое число независимых маркерных признаков, но при этом имеют низкую воспроизводимость, сильно зависят от используемых реактивов, условий реакции, загрязненности исследуемого материала. Поэтому в работе с каждой группой штаммов необходимо использовать несколько стандартных (референтных) изолятов, но даже и в этом случае результаты нескольких экспериментов очень трудно объединить. К этой группе методов можно отнести RAPD, AFLP, InterSSR, InterSINE. После амплификации получается большое число фрагментов ДНК разного разме-

ра. Подобные методики целесообразно использовать в случае необходимости установления различий между близкородственными штаммами (родители-потомки, дикий тип-мутанты, и т.д), либо в других случаях, когда необходим детальный анализ небольшой выборки. Так, метод AFLP широко используется при генетическом картировании у *P. infestans* и при внутривидовых исследованиях (Кнарова, Gisi, 2002, Cooke et al, 2003, Flier et al, 2003). Эти методы нецелесообразно использовать при создании баз данных штаммов, т.к. практически невозможно унифицировать учет результатов при проведении анализов в разных лабораториях. При кажущейся простоте и скорости исполнения (выделение ДНК без хорошей очистки, амплификация, визуализация результатов) эта группа методов требует применения специального метода документирования результатов: разгонки в полиакриламидном геле с мечеными (радиоактивно или люминисцентно) праймерами и последующей засветки свето- или радиоактивночувствительного материала. Обычный метод визуализации в агарозном геле с бромистым этидием для этих методов обычно непригоден, т.к. большое число фрагментов ДНК разного размера может сливаться.

Другие методы, напротив, позволяют генерировать малое число признаков при их очень высокой воспроизводимости. К этой группе можно отнести исследование гаплотипов митохондриальной ДНК, типов спаривания, спектров изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы (в России варибельности по этому признаку нет, хотя в других странах мира отмечается значительный полиморфизм). Эти признаки целесообразно использовать при анализе коллекций, составлении баз данных регионального и мирового масштаба. В случае анализа изоферментов и гаплотипов митохондриальной ДНК можно обойтись вообще без стандартных штаммов, при анализе типов спаривания необходимо два тестерных изолята с известными типами спаривания. Условия реакции и реактивы могут влиять только на контрастность продукта на электрофореграмме, проявление артефактов в этих видах исследований маловероятно.

В настоящее время большинство популяций в европейской части России представлены штаммами обоих типов спаривания (табл. 2), среди них встречаются изоляты с Ia и IIa типами митохондриальной ДНК (другие 4 типа, встречающиеся в мире, в России после 1993 года не обнаружены). Спектры изоферментов пептидазы представлены

двумя генотипами по локусу Per 1 (100/100, 92/92 и гетерозигота 92/100, причем генотип 92/92 встречается крайне редко (<0,1%)) и двумя генотипами по локусу Per 2 (100/100, 112/112 и гетерозигота 100/112, причем генотип 112/112 встречается реже 100/100, но тоже достаточно часто). Варибельности спектра изоферментов глюкозо-6-фосфат изомеразы после 1993 года (исчезновение клональной линии US-1) не отмечено, все исследованные изоляты имели генотип 100/100 (Elansky, Smirnov, 2003).

Третья группа методов позволяет получить достаточное число независимых маркерных признаков при высокой воспроизводимости. На сегодняшний день к этой группе можно отнести пробу RFLP-RG57, которую можно использовать как при анализе выборок, так и при составлении баз данных. Разработка RFLP-RG57 в начале 90-х годов прошлого века существенно активизировала популяционные исследования возбудителя фитофтороза. Он стал основой метода, основанного на выделении и анализе «Клональных линий» (см. ниже). До сих пор этот метод остается основным при проведении популяционных исследований *P. infestans*. Однако широкому его распространению препятствуют довольно высокая стоимость и трудоемкость в исполнении.

Другим перспективным методом, пока довольно редко используемому в исследованиях *P. infestans*, является анализ микросателлитных повторов (SSR). Он генерирует небольшое (4–7) число ПЦР-продуктов, что делает возможным учет результатов в агарозном геле. Используемая ДНК не требует высокой очистки. Его применение для анализа структуры популяций *P. infestans* на картофеле и томате из Франции и Швейцарии показало хорошие результаты (Кнарова et al., 2001, Кнарова, Gisi, 2002).

Для анализа штаммов широко использовались (и продолжают использоваться) такие фенотипические маркерные признаки, как наличие генов вирулентности к сортам картофеля (Авдей, 1995, Иванюк и др., 2002, Уланова и др., 2003) и томата. К настоящему времени гены вирулентности к сортам картофеля утратили свою ценность как маркерные признаки для популяционных исследований в связи с появлением максимального (или близкого к нему) числа генов вирулентности у подавляющего большинства изолятов. В то же время ген вирулентности T1 к сортам томата, несущим соответствующий ген Ph1, до сих пор успешно используется в качестве маркерного признака (Лаврова и др., 2003, Уланова и др., 2003).

Во многих работах в качестве маркерного признака используется устойчивость к фунгицидам, особенно часто – к фениламидным фунгицидам. Этот признак нежелательно использовать в популяционных исследованиях в связи с достаточно легким появлением мутаций устойчивости в клональных линиях после применения металаксил- (или мефеноксам-) содержащих фунгицидов на поле. Например, существенные различия по уровню устойчивости показаны внутри клональной линии Sib1 (Elansky et al., 2001).

Итак, предпочтительными маркерными при-

знаками для создания банков данных и маркирования штаммов в коллекциях являются тип спаривания, спектр изоферментов пептидазы, тип митохондриальной ДНК, RFLP-RG57. Для сравнения ограниченных выборок, при необходимости применения максимального числа маркерных признаков, можно использовать AFLP, RAPD, SSR, InterSSR, InterSINE. Однако следует помнить, что эти методы слабОВОспроизводимы, и в каждом отдельном эксперименте (цикле амплификация – электрофорез) необходимо использовать несколько референтных изолятов.

СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ

В отсутствие рекомбинации или при незначительном ее вкладе в популяционную структуру популяция состоит из некоторого числа клонов, генетические обмены между которыми крайне редки. В таких популяциях более информативно изучение не частот отдельных генов, а частот генотипов, имеющих общее происхождение (**клональных линий** или clonal lineages) и различающихся лишь точковыми мутациями. Популяционные исследования возбудителя фитофтороза и анализ **клональных линий** существенно ускорились после появления метода RFLP-RG57 в начале 90-х годов прошлого века. Наряду с RFLP-RG57 для идентификации клональных линий применяют тип спаривания, спектры изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфатизомеразы и тип митохондриальной ДНК. Характеристики наиболее часто встречающихся клональных линий приведены в таблице 6.

Клон US-1 повсеместно доминировал в популяциях до конца 80-х годов XX века, после чего стал заменяться другими клонами и исчез из Европы и Северной Америки. Сейчас он встречается на Дальнем Востоке (Филиппины, Тайвань, Китай, Япония, Корея, Koh et al., 1994, Mosa et al., 1993), в Африке (Уганда, Кения, Руанда, Goodwin et al., 1994, Vega-Sanchez et al., 2000; Ochwo et al., 2002) и в Южной Америке (Эквадор, Бразилия, Перу, Forbes et al., 1997, Goodwin et al., 1994). Никогда не было идентифицировано штаммов, принадлежащих к линии US-1, в Австралии. По-видимому, в Австралию изоляты *P. infestans* попали с другой волной миграции (Goodwin, 1997).

Клон US-6 мигрировал из Северной Мексики в Калифорнию в конце 70-х годов и вызвал там эпидемию на картофеле и томатах после 32 лет отсутствия болезни. В связи с высокой

агрессивностью он вытеснил клон US-1 и стал доминировать на западном побережье США (Goodwin et al., 1995a).

Высокоагрессивные клональные линии US-7 и US-8 были обнаружены в США в 1992 г и уже в 1994 г широко распространились в США и Канаде. В течение одного полевого сезона клон US-8 способен почти полностью вытеснить клон US-1 на картофельных делянках исходно зараженных обоими клонами в равной концентрации (Miller, Johnson, 2000).

Клоны BC-1 – BC-4 изолированы в Британской Колумбии у небольшого числа изолятов (Goodwin et al., 1995b). Клон US-11 широко распространился в США и вытеснил US-1 на Тайване. Клоны JP-1 и EC-1 наряду с клоном US-1 распространены в Японии и Эквадоре соответственно (Koh et al., 1994; Forbes et al., 1997).

SIB-1 – клон, доминирующий в России на огромной территории от Московской обл. до Сахалина. Его тип спаривания A1. В Московской обл. он был обнаружен в 1993 г., причем некоторые полевые популяции состояли преимущественно из штаммов этой клональной линии, высокоустойчивых к металаксилу. После 1993 г. его широкого распространения не отмечалось. За Уралом в 1997–1998 годах встречался повсюду за исключением Хабаровского края (там распространен клон SIB-2, имеющий тип спаривания A2) в сборах 1995, 1997 и 1998 гг. Пространственное разделение клонов, имеющих разные типы спаривания, исключает половой процесс на территории Сибири и Дальнего Востока. В Московской области, в отличие от Сибири, после 1993 г. популяция представлена множеством клонов, так что почти каждый изолят имеет уникальный мультилокусный генотип (Elansky et al., 2001).

Это разнообразие нельзя объяснить только завозом штаммов гриба из разных районов мира с посадочными клубнями. Поскольку в популяции встречаются оба типа спаривания, возможно, ее разнообразие обусловлено также рекомбинацией. Так, в Британской Колумбии предполагается возникновение генотипов ВС-2, ВС-3 и ВС-4 вследствие гибридизации клонов ВС-1 и US-6 (Goodwin et al., 1995b). По-видимому, в Московских популяциях также встречаются гибридные штаммы. Например, гетерозиготные по PEP-локусу штаммы МО-4, МО-8 и МО-11 могут быть гибридами между штаммами МО-12, МО-21, МО-22, имеющими тип спаривания А2 и гомозиготными по одной аллели PEP-локуса и штаммом МО-8, имеющим тип спаривания А1 и гомозиготным по другой аллели локуса. А если это так, и в современных популяциях *P. infestans* имеется тенденция к усилению роли полового процесса, то информационное значение анализа мультилокусных клонов будет падать, как это показано для подмосковных популяций.

Изменчивость в клональных линиях

Как уже было сказано выше, до 90-х годов 20 века в мире была широко распространена клональная линия US-1. Большинство полевых и региональных популяций состояли исключительно из штаммов с генотипом US-1. Однако при этом наблюдались и различия между изолятами, вызванные, вероятнее всего, мутационным процессом. Мутации отмечались в ядерной и митохондриальной ДНК, уровне устойчивости к фениламидным препаратам, в числе генов вирулентности к сортам картофеля. Линии, отличающиеся от исходных генотипов мутациями, обозначаются как дополнительные номера через точку после названия исходного генотипа (например, мутантная линия US-1.1 клональной линии US-1). Фингерпринтинги ДНК линии US-1.5 и US-1.6 содержат добавочные линии разного размера (Goodwin et al., 1995a, 1995b), клональная линия US-6.3 также отличается от US-6 добавочной линией на фингерпринтинге (Goodwin, 1997, табл. 7).

При исследовании митохондриальной ДНК выяснилось, что в клональной линии US-1 встречается только 1b тип митохондриальной ДНК (Carter et al., 1990). Однако при исследовании штаммов этой клональной линии из Перу и Филиппин были отмечены изоляты, типы митохондриальной ДНК которых отличались от 1b наличием вставок и делеций (Koh et al., 1994).

Также встречаются изменения в спектрах изоферментов. Как правило, они вызваны распадом исходно гетерозиготного по этому ферменту организма на гомозиготные. В 1993 году на плодах томата нами был идентифицирован штамм с характерными для US-1 признаками: фингерпринтингом, типом митохондриальной ДНК и генотипом 86/100 по глюкозо-6-фосфатизомеразе, но он был гомозиготен (100/100) по первому локусу пептидазы вместо типичной для этой клональной линии гетерозиготы 92/100. Генотип этого штамма мы назвали МО-17 (таблица 6). Мутантные линии US-1.1 и US-1.4 отличаются от US-1 мутациями в первом локусе пептидазы.

Мутации, ведущие к изменениям числа генов вирулентности к сортам картофеля и томата встречаются довольно часто. Они были отмечены среди изолятов клональной линии US-1 в популяциях из Нидерландов (Drenth et al., 1994), Перу (Goodwin et al., 1995a), Польши (Sujkowski et al., 1991), северной части Северной Америки (Goodwin et al., 1995b). Различия в числе генов вирулентности к картофелю также были отмечены среди изолятов клональных линий US-7 и US-8 в Канаде и США (Goodwin et al., 1995a), среди изолятов линии Sib-1 в Азиатской части России (Elansky et al., 2001).

Довольно часто отмечаются мутации устойчивости к фениламидным фунгицидам. Так, изоляты, имеющие сильные различия в уровнях устойчивости к фениламидным препаратам, были идентифицированы в моноклональных полевых популяциях, все штаммы в которых принадлежали к клональной линии Sib-1 (Elansky et al., 2001). Исследования штаммов клональной линии US-1, большинство которых высокочувствительны к металаксилу, также показало присутствие устойчивых изолятов Филиппинах (Koh et al., 1994) и в Ирландии (Goodwin et al., 1996).

Таблица 5
Сравнение методов сравнительного исследования штаммов по практически важным критериям

Критерий	ТС	Изоферменты	MtDNA	RFLP- RG57	RAPD	ISSR	SSR	AFLP	Rev SINE
Количество информации	Н	Н	Н	С	В	В	С	В	В
Воспроизводимость	В	В	В	В	Н	Н	С	С	С
Возможность артефактов	Н	Н	Н	Н	В	С	Н	С	В
Стоимость	Н	С	Н	В	Н	Н	Н	С	Н
Трудоемкость	Н	Н	Н	В	НС*	НС*	Н	С	НС*
Скорость проведения анализа**	Н	В	В	С	В	В	В	В	В

Прим.: Н – низкая, С – средняя, В – высокая; НС* – трудоемкость низкая при использовании агарозного геля или автоматического генотайпера, средняя – при разгонке в полиакриламидном геле с мечеными праймерами, ** – не считая затрат времени на наращивание мицелия для выделения ДНК.

Таблица 7
Мультилокусные генотипы и их мутантные линии

Название	Тип спаривания	Изоферменты		Фингерпринты ДНК (RG57)	Примечания
		GPI	PEP-1		
US-1	A1	86/100	92/100	1011101011001101000110011	Исходный генотип 1
US-1.1	A1	86/100	<u>100</u> /100	1011101011001101000110011	Мутация в PEP
US-1.2	A1	86/100	92/100	101110101 <u>0</u> 001101000110011	Мутация в RG57
US-1.3	A1	86/100	92/100	10111010 <u>0</u> 1001101000110011	Мутация в RG57
US-1.4	A1	86/100	<u>100</u> /100	101110101 <u>0</u> 001101000110011	Мутация в RG57 и PEP
US-1.5	A1	86/100	92/100	10111010110011010 <u>1</u> 0110011	Мутация в RG57
US-6	A1	100/100	92/100	1011111001001100010110011	Исходный генотип 2
US-6.1	A1	100/100	92/92	1011111001001100010110011	Мутация в PEP
US-6.2	A1	100/100	92/100	10111 <u>0</u> 1001001100010110011	Мутация в RG57
US-6.3	A1	100/100	92/100	10111110010 <u>1</u> 1100010110011	Мутация в RG57
US-6.4	A1	100/100	100/100	1011 <u>0</u> 11001001100010110011	Мутация в RG57 и PEP
US-6.5	A1	100/100	92/100	101111100100110001 <u>0</u> 010011	Мутация в RG57
BR-1	A2	100/100	100/100	1011101000001100001111011	Исходный генотип 3
BR-1.1	A2	100/100	100/100	10101010000011000011 <u>1</u> 0011	Мутация в RG57

Таблица 6
 Мультилокусные генотипы некоторых клональных линий *Phytophthora infestans*

Название	Тип спаривания	Изоферменты		Фингерпринты ДНК	Тип MtDNA
US-1	A1	86/100	92/100	1011101011001101000110011	Ib
US-2	A1	86/100	92/100	1011101001001101011110011	—
US-3	A1	86/100	92/100	1011100000001101000110011	—
US-4	A1	100/100	92/92	1011101001001101100110011	—
US-5	A1	100/100	92/100	1011101001001101011110011	—
US-6	A1	100/100	92/100	1011111001001100010110011	IIb
US-7	A2	100/111	100/100	1001100001001101010110011	Ia
US-8	A2	100/111/122	100/100	1001100001001101000110111	Ia
US-9	A1	100/100	83/100	—*	—
US-10	A2	111/122	100/100	—	—
US-11	A1	100/111	92/100	1010111001001101010110011	IIb
US-12	A1	100/111	92/100	1000100001001100010110011	—
US-14	A2	100/122	100/100	1000000000001100010110011	—
US-15	A2	100/100	92/100	1000100001001110010110011	Ia
US-16	A1	100/111	100/100	1000110001001101010110011	—
US-17	A1	100/122	100/100	1010001000001101010110011	—
US-18	A2	100/100	92/100	1000100001001101000110011	Ia
US-19	A2	100/100	92/100	1010101000001101000110011	Ia
EC-1	A1	90/100	96/100	1111101001001101000111011	IIa
SIB-1	A1	100/100	100/100	1000100011001101000110011	IIa
SIB-2	A2	100/100	100/100	1000100001001101000110011	IIa
SIB-3	A1	100/100	100/100	1100101010001101000110011	IIa
MO-1	A2	100/100	100/100	1000100011001101000110011	IIa
MO-2	A2	100/100	100/100	1000100001001101000110011	Ia
MO-3	A1	100/100	100/100	1010100001001101000110011	IIa
MO-4	A1	100/100	92/100	1010111011001101000110011	IIa
MO-5	A1	100/100	100/100	1000101001001101010110011	IIa
MO-6	A1	100/100	100/100	1010101001001101000110011	Ia
MO-7	A1	100/100	92/100	1000100011001100000110011	IIa
MO-8	A1	100/100	92/92	1010110001001100000110011	IIa
MO-9	A1	100/100	92/100	1000100001001101000110011	IIa
MO-10	A1	100/100	100/100	1010110000001100000110011	Ia
MO-11	A1	100/100	92/100	1010101001001100000110011	Ia
MO-12	A2	100/100	100/100	1010101001001101000110011	Ia
MO-13	A1	100/100	100/100	1010101000001101000110011	Ia
MO-14	A1	100/100	100/100	0010101001001100000110011	Ia
MO-15	A1	100/100	100/100	0110111001001100010110011	Ia
MO-16	A1	100/100	100/100	1000100000001101000110011	IIa
MO-17	A1	86/100	100/100	1010101011001101000110011	Ib
MO-18	A1	100/100	100/100	1010111001001101000010011	IIa
MO-19	A1	100/100	100/100	1010101000001101010110011	IIa
MO-20	A2	100/100	100/100	1010101000001101000110011	IIa
MO-21	A2	100/100	100/100	1010101000001100010110011	IIa

Прим. * — нет данных.

ДИНАМИКА ГЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА ПОПУЛЯЦИЙ

Изменения генотипического состава популяций *P. infestans* могут происходить под влиянием миграции новых клонов из других регионов, агротехнических приемов (смены сортов, применения фунгицидов) и погодных условий. Внешние воздействия влияют неодинаково на клоны, находящиеся на разных этапах жизненного цикла, поэтому в популяциях ежегодно протекают циклические смены частот генов, подверженных отбору, обусловленные сменой преобладающей роли генного дрейфа и отбора.

Влияние сорта

Новые сорта с эффективными генами вертикальной устойчивости (R-генами) являются мощным селективным фактором, отбирающим в популяциях *P. infestans* клоны с комплементарными генами вирулентности. При отсутствии у сорта картофеля неспецифической устойчивости, сдерживающей рост популяции патогена, процесс смены доминирующих в популяции клонов происходит очень быстро. Так, после распространения в Московской области сорта Домодедовский, имеющего ген устойчивости R3, частота клонов, вирулентных для этого сорта, за один год выросла с 0,2 до 0,82 (Dyakov, Derevjagina, 2000). Однако смена частот генов вирулентности (патотипов) в популяциях происходит не только под влиянием выращиваемых сортов картофеля. Например, в Белоруссии до 1977 г доминировали клоны с генами вирулентности 1 и 4, что было вызвано выращиванием сортов картофеля, имеющих гены устойчивости R1 и R4 (Дорожкин, Бельская, 1979). Однако в конце 70х годов XX века появились клоны, имеющие различные гены вирулентности и их сочетания, причем комплементарные им гены устойчивости никогда не были использованы в селекции картофеля (лишние гены вирулентности) (Иванюк и др., 2002). Причина появления таких клонов, по-видимому, обусловлена миграцией в Европу инфекционного материала из Мексики с клубнями картофеля. На родине эти клоны развивались не только на культурном картофеле, но и на диких видах, несущих разнообразные гены устойчивости, поэтому сочетание в геноме многих генов вирулентности было необходимо для выживания в тех условиях.

Что касается сортов с неспецифической устойчивостью, то они, снижая скорость размноже-

ния патогена, задерживают эволюцию его популяций, которая, как уже было сказано, является функцией численности. Поскольку агрессивность полигенна, клоны, содержащие большее число генов «агрессивности», накапливаются тем скорее, чем выше численность популяции. Поэтому высоко агрессивные расы не являются продуктом адаптации к выращиваемым сортам с неспецифической устойчивостью, а наоборот, скорее выявляются в посадках высоковосприимчивых сортов, которые являются накопителями спор паразита. Так, в России наиболее агрессивные популяции *P. infestans* обнаружены в зонах ежегодных эпифитотий (Сахалин, Ленинградская, Брянская области). Агрессивность этих популяций оказалась более высокой, чем Мексиканской (Филиппов и др., 2004).

Кроме того, в листьях устойчивых сортов формируется меньше ооспор, чем в восприимчивых (Hanson, Shattock, 1998), то есть неспецифическая устойчивость сорта также снижает рекомбинационные способности паразита и возможность альтернативных способов зимовки.

Влияние фунгицидов

Фунгициды не только снижают численность фитопатогенных грибов, т.е. влияют на количественную характеристику их популяций, но могут также изменять частоты отдельных генотипов, т.е. влиять на качественный состав популяций. Среди важнейших показателей популяций, изменяющихся под влиянием фунгицидов можно назвать следующие: изменение резистентности к фунгицидам, изменение агрессивности и вирулентности и изменение систем размножения.

Влияние фунгицидов на резистентность и агрессивность популяций

Степень подобного влияния определяется, прежде всего, типом используемого фунгицида, которые можно условно разделить на *полисайтовые*, *олигосайтовые* и *моносайтовые*.

К первым относится большинство **контактных фунгицидов**. Резистентность к ним (если она возможна вообще) контролируется большим числом очень слабо экспрессивных генов. Эти свойства обуславливают отсутствие видимых изменений резистентности популяции после обработки ее фунгицидами (хотя в экспериментах некоторое повышение резистентности было по-

лучены при работе со многими грибами (в том числе с *P. infestans*)). Грибная популяция, сохранившаяся после опрыскиваний контактными фунгицидами, состоит из двух групп штаммов: 1) Штаммы, сохранившиеся на участках растений, не обработанных препаратом. Поскольку контакта с фунгицидом не было, агрессивности и резистентности этих штаммов не меняются. 2) Штаммы, контактировавшие с фунгицидом, концентрация которого в местах контакта была ниже летальной. Как было сказано выше, резистентность этой части популяции также не меняется, однако, вследствие частичного повреждающего действия фунгицида даже в сублетальной концентрации на метаболизм грибной клетки, падает общая приспособленности и ее паразитический компонент – агрессивность (Деревягина, Дьяков, 1990).

Таким образом, даже не погибшая часть популяции, подвергнутая контакту с фунгицидом, имеет слабую агрессивность и не может быть источником эпифитотии. Поэтому тщательная обработка, снижающая частоту не контактирующей с фунгицидом доли популяции – условие успеха защитных мероприятий.

Устойчивость к **олигосайтовым фунгицидам** (большой частью – системным) контролируется несколькими аддитивными генами. Мутация каждого гена приводит к некоторому повышению резистентности, а общая степень резистентности обусловлена сложением таких мутаций. Поэтому повышение резистентности происходит ступенчато. Примером ступенчатого увеличения резистентности является фунгицид диметоморф, широко используемый для защиты картофеля от фитофтороза. Устойчивость к диметоморфу полигенна и аддитивна. Одношаговая мутация незначительно повышает резистентность. Каждая следующая мутация уменьшает размер мишени и, следовательно, частоту последующих мутаций (Bagirova et al., 2001). Увеличение средней резистентности популяции после многократных обработок олигосайтовым фунгицидом происходит ступенчато и постепенно. Скорость этого процесса определяется, по крайней мере, тремя факторами: частотой мутирования генов резистентности, коэффициентом резистентности (отношением летальной дозы резистентного штамма по отношению к чувствительному) и влиянием мутаций генов резистентности на приспособленность.

Частота возникновения каждой последующей мутации ниже, чем предыдущей, поэтому процесс имеет затухающий характер (Bagirova et al., 2001). Однако, если в популяции протека-

ют рекомбинационные процессы (половой или парасексуальный), то возможно объединение в гибридном штамме разных мутаций родителей и ускорение процесса. Поэтому панмиксные популяции приобретают резистентность быстрее агамных, а у последних – популяции, не имеющие барьеров вегетативной несовместимости, быстрее, чем популяции, подразделенные такими барьерами. В связи с этим наличие в популяциях штаммов, различающихся типами спаривания, ускоряет процесс приобретения резистентности к олигосайтовым фунгицидам.

Второй и третий факторы не способствуют быстрому накоплению резистентных к диметоморфу штаммов в популяциях. Каждая последующая мутация увеличивает резистентность примерно вдвое, что незначительно, и при этом снижает как скорость роста на искусственной среде, так и, особенно, агрессивность (Bagirova et al., 2001; Stem, Kirk, 2004). Может быть поэтому среди природных штаммов *P. infestans*, даже собранных из обработанных диметоморфом посадок картофеля, практически нет резистентных.

Популяция, подвергнутая обработке олигосайтовым фунгицидом, также будет состоять из двух групп штаммов: не контактировавших с фунгицидом, и поэтому не изменивших первоначальных признаков (если среди этой группы и встречаются резистентные штаммы, они не будут накапливаться вследствие более высокой агрессивности и конкурентоспособности чувствительных штаммов), и контактировавших с сублетальными концентрациями фунгицида. Именно среди последних возможно накопление резистентных штаммов, ибо здесь они имеют преимущества перед чувствительными. Поэтому при использовании олигосайтовых фунгицидов важна не столько тщательная обработка, сколько высокая концентрация препарата, в несколько раз превышающая летальную дозу, ибо при ступенчатом мутагенезе начальная резистентность мутатных штаммов невелика.

Наконец, мутации резистентности к **моносайтовым фунгицидам** высоко экспрессивны, то есть одна мутация может сообщить высокий уровень резистентности вплоть до полной потери чувствительности. Поэтому повышение резистентности популяций происходит очень быстро. Примером таких фунгицидов могут быть фениламиды, включая наиболее распространенный препарат ридомил (металаксил). Мутации устойчивости к нему возникают с высокой частотой, причем степень резистентности у мутантов очень высокая – превышает чувствительный

штамм в тысячу и больше раз (Деревягина и др., 1993). Хотя скорость роста и агрессивность резистентных мутантов снижается, на фоне гибели чувствительных штаммов от системного фунгицида численность резистентной популяции быстро растет и параллельно повышается ее агрессивность. Поэтому через несколько лет использования фунгицида агрессивность резистентных штаммов может не только сравняться с агрессивностью чувствительных, но и превзойти ее (Деревягина, Дьяков, 1990).

Влияние фунгицидов на системы размножения и частоту рекомбинации

Влияние на половую рекомбинацию. Поскольку частое нахождение типа спаривания A2 в популяциях *P. infestans* совпало по времени с интенсивным использованием металаксил против фитофтороза, было предположено, что металаксил вызывает конверсию типов спаривания. У вида *P. parasitica* такая конверсия под действием хлоронеба и металаксил была доказана экспериментально (Ко, 1994). Однократный пассаж на среде с низкой концентрацией металаксил привел к возникновению гомоталличных изолятов из чувствительного к металаксилу штамма *P. infestans* с типом спаривания A1 (Savenkova, Cherepennikova-Anikina, 2002). При последующих пассажах на средах с более высокой концентрацией металаксил не удалось обнаружить ни одного изолята, имеющего тип спаривания A2, однако большинство изолятов при скрещивании с изолятами A2 вместо ооспор формировали уродливые скопления мицелия и были стерильными. Пассажи резистентного штамма, имеющего тип спаривания A2, на средах с высокой концентрацией металаксил позволили обнаружить три формы изменений типа спаривания:

1) полную стерильность при скрещивании с изолятами A1 и A2;

2) гомоталлизм (формирование ооспор в монокультуре);

3) конверсия A2 типа спаривания в A1. Таким образом, металаксил может быть причиной изменений типов спаривания в популяциях *P. infestans* и, следовательно, протекания в них половой рекомбинации.

Влияние на вегетативную рекомбинацию.

Некоторые гены резистентности к антибиотикам увеличивали частоту гетерокариотизации гиф и диплоидизации ядер (Поединок, Дьяков, 1981). Как было сказано, гетерокариотизация гиф при сращивании разных штаммов *P. infestans* происходит очень редко вследствие явления вегетив-

ной несовместимости у этого гриба. Однако гены устойчивости к некоторым антибиотикам могут оказывать побочные действия, выражающиеся в преодолении вегетативной несовместимости. Таким свойством обладал ген устойчивости к стрептомицину мутанта 1S-1. Наличие подобных мутантов в полевых популяциях фитофторы может увеличить поток генов между штаммами и ускорить адаптацию всей популяции к новым сортам или фунгицидам.

Некоторые фунгициды и антибиотики могут оказывать влияние на частоту митотической рекомбинации, также способной изменять частоты генотипов в популяциях. Широко используемый фунгицид беномил связывается с β -тубулином – белком, из которого построены микротрубочки цитоскелета, и тем самым нарушает процессы расхождения хромосом в анафазе митоза, увеличивая частоту митотической рекомбинации (Hastie, 1970). Таким же свойством обладает фунгицид пара-фторфенилаланин, используемый для лечения язв от голландской болезни. Пара-фторфенилаланин увеличивал частоту рекомбинации и у гетерозиготных диплоидов *P. infestans* (Поединок и др., 1982).

Циклические изменения генотипического состава популяций в жизненном цикле *P. infestans*

Классический цикл развития *P. infestans* в умеренной зоне складывается из 4-х фаз.

1) Фаза экспоненциального роста популяции (полициклическая фаза) с короткими генерациями. Эта фаза обычно начинается в июле и продолжается 1,5–2 мес.

2) Фаза остановки роста численности популяции вследствие резкого уменьшения доли непораженной ткани или наступления неблагоприятных погодных условий. Эта фаза в хозяйствах, проводящих заблаговременное предуборочное удаление ботвы, выпадает из годового цикла.

3) Фаза зимовки в клубнях, сопровождающаяся значительным уменьшением численности популяции вследствие случайного заражения клубней, медленного развития в них инфекции, отсутствия при нормальных режимах хранения перезаражения клубней, сгнивания и выбраковки пораженных клубней.

4) Фаза медленного развития в почве и на всходах (моноциклическая фаза), при которой продолжительность генерации может достигать месяца и больше (конец мая – начало июля). Обычно в это время больные листья трудно обнаружить даже при специальных наблюдениях.

Фаза экспоненциального роста популяции (полициклическая фаза)

Многочисленные наблюдения (Пшедецкая, Козубова, 1964; Борисенко, 1969; Оша, 1969; Дьяков, Супрун, 1984; Рыбакова, Дьяков, 1990) показали, что в начале эпифитотии преобладают маловирулентные и слабоагрессивные клоны, которые в дальнейшем заменяются более вирулентными и агрессивными, причем скорость роста агрессивности популяции тем выше, чем менее устойчив сорт растения-хозяина.

По мере роста численности популяции увеличивается концентрация как селективно-важных генов, введенных в коммерческие сорта (R1-R4), так и селективно нейтральных (R5-R11). Так, в подмосковных популяциях в 1993 г. средняя вирулентность с конца июля до середины августа выросла с 8,2 до 9,4, причем наибольший рост наблюдался для селективно нейтрального гена вирулентности R5 (с 31 до 86% вирулентных клонов) (Смирнов, 1996).

Уменьшение скорости роста популяции сопровождается снижением паразитической активности популяции. Поэтому в депрессивные годы как общее число рас, так и доля высоковирулентных рас ниже, чем в эпифитотийные (Борисенко, 1969). Если в разгар эпифитотии погодные условия изменяются на неблагоприятные для фитофтороза и уменьшается пораженность картофеля, то концентрация высоковирулентных и агрессивных клонов также уменьшается (Рыбакова и др., 1987).

Увеличение частот генов, влияющих на вирулентность и агрессивность популяции, возможно, происходит вследствие отбора более вирулентных и агрессивных клонов в смешанной популяции. Для демонстрации отбора разработан метод анализа нейтральных мутаций, с успехом использованный в хемостатных популяций дрожжей (Adams et al., 1985) и *Fusarium graminearum* (Wiebe et al., 1995). Частота мутантов, устойчивых к бластицидину S, в полевой популяции *P. infestans* падала параллельно росту агрессивности популяции, что свидетельствует о смене доминирующих клонов в процессе роста численности популяции (Рыбакова и др., 1987).

Фаза зимовки в клубнях

В процессе зимовки в клубнях картофеля вирулентность и агрессивность штаммов *P. infestans* падают, причем падение вирулентности происходит медленнее, чем агрессивности (Рыбакова, Дьяков, 1990). По-видимому, в условиях, способствующих быстрому росту численности популяции (г-отбору), «лишние» гены вирулентности и высокая агрессивность оказываются полезными, поэтому развитие эпифитотии сопровождается отбором наиболее вирулентных и агрессивных клонов. В условиях насыщения среды, когда большую роль приобретает не скорость размножения, а стойкость существования в неблагоприятных условиях (К-отбор), «лишние» гены вирулентности и агрессивности снижают приспособленность, и клоны, имеющие эти гены, первыми вымирают, так что средняя агрессивность и вирулентность популяции падает.

Фаза вегетации в почве (моноциклическая фаза)

Эта фаза – самая загадочная в жизненном цикле (Andrison, 1995). Ее существование постулировано чисто умозрительно – вследствие отсутствия сведений о том, что происходит с патогеном в течение длительного срока (иногда – более месяца) – от появления всходов картофеля до возникновения на них первых пятен болезни. На основе наблюдений и экспериментов было реконструировано поведение гриба в этом периоде жизни (Hirst, Stedman, 1960; Богуславская, Филиппов, 1976).

На зараженных клубнях в почве может формироваться спороношение гриба. Образующиеся споры прорастают гифами, которые могут длительно вегетировать в почве. Первичные (образовавшиеся на клубнях) и вторичные (на мицелии в почве) споры капиллярными токами поднимаются на поверхность почвы, но приобретают способность заражать картофель только после того, как его нижние листья опустятся и придут в контакт с поверхностью почвы. Такие листья (именно на них обнаруживают первые пятна болезни) формируются не сразу, а после длительного роста и развития ботвы картофеля.

Таким образом, в жизненном цикле *P. infestans* может существовать и фаза сапротрофной вегетации. Если в паразитической фазе жизненного цикла агрессивность является важнейшим компонентом приспособленности, то в сапротрофной фазе отбор направлен на снижение паразитических свойств, как это показано экспериментально для некоторых фитопатоген-

ных грибов (см. Carson, 1993). Поэтому в данной фазе цикла агрессивные свойства должны теряться наиболее интенсивно. Однако прямых экспериментов, подтверждающих высказанные предположения, не проведено.

Сезонные изменения затрагивают не только патогенные свойства *P. infestans*, но и резистентность к фунгицидам, которая в полициклической фазе (в период эпифитотий) растет, а в период зимнего хранения – падает (Деревягина и др., 1991; Kadish, Cohen, 1992). Особенно интенсивное падение резистентности к металаксилу наблюдалось в период между высадкой пораженных клубней и появлением первых пятен болезни в поле.

Внутривидовая специализация и ее эволюция

P. infestans вызывает эпидемии на двух коммерчески важных культурах – картофеле и томате. Если эпифитотии на картофеле начались вскоре после попадания гриба в новые районы, то, хотя поражение томата было отмечено также вскоре после попадания инфекции, но эпифитотии на томате были отмечены лишь через сто лет – в 40х-60х годах XX столетия. Вот что пишут о поражении томатов в США Галлегли и Нидерхаузер (1962): «В течение примерно 100 лет после сильной эпифитотии 1845 г. мало или почти совсем не делалось попыток для получения устойчивых сортов томата. Хотя впервые фитофтороз зарегистрирован на томате еще в 1848 г., он не стал на этом растении объектом серьезного внимания селекционеров вплоть до сильной вспышки болезни в 1946 г.». На территории России фитофтороз томата был зарегистрирован еще в XIX веке. «На это заболевание долгое время исследователи не обращали внимания, так как оно не причиняло существенного экономического ущерба. Но в 60-70х гг. эпифитотии фитофтороза на томате наблюдаются и в Советском Союзе, главным образом в Нижнем Поволжье, на Украине, Северном Кавказе, в Молдавии...» (Балашова, 1979). С тех пор поражения томата фитофторозом стали ежегодными, распространились по всей территории промышленного и приусадебного культивирования и вызывают огромный экономический ущерб этой культуре.

Что же произошло? Почему первое появление паразита на картофеле и эпифитотийное поражение этой культуры произошли почти одновременно, а для возникновения эпифитотии на томате понадобилось столетие? Эти различия свидетельствуют в пользу мексиканского, а не южноамериканского источника инфекции.

Если вид *Phytophthora infestans* сформировался как паразит мексиканских клубненосных видов рода *Solanum*, понятно, почему столь сильно поразила культурный картофель, относящийся к той же секции рода, что и мексиканские виды, но, вследствие отсутствия коэволюции с паразитом, не выработавший механизмов специфической и неспецифической устойчивости. Томат относится к иной секции рода, тип его обмена имеет существенные отличия от клубненосных видов, поэтому, несмотря на то, что томат не находится за пределами пищевой специализации *P. infestans*, интенсивность его поражения была недостаточной для серьезных экономических потерь. Возникновение эпифитотий на томате обусловлено серьезными генетическими изменениями паразита, повысившими приспособленность (патогенность) при паразитировании. Мы полагаем, что новая, специализированная для паразитирования на томате форма – это описанная М. Галлегли раса Т1, поражающая сорта вишневидного томата (Red Cherry, Ottawa), устойчивого к распространенной на картофеле расе Т0 (Gallegly, 1952). По-видимому, мутация (или серия мутаций), превратившая расу Т0 в расу Т1 и привела к появлению клонов, высоко приспособленных к поражению томата. Как часто случается, повышение патогенности к одному хозяину сопровождалось понижением ее к другому, то есть возникла начальная, пока не полная внутривидовая специализация – к картофелю (раса Т0) и к томату (раса Т1).

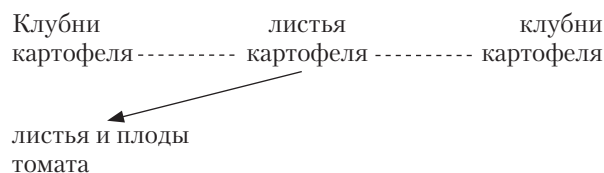
Каковы свидетельства в пользу этого предположения?

1) Встречаемость на картофеле и томате.

На листьях томата раса Т1 преобладает, в то время как на листьях картофеля она встречается редко. По данным С.Ф. Багировой и Т.А. Орешонковой (не опубликовано) в Московской области в 1991–1992 гг. встречаемость расы Т1 в посадках картофеля составила 0%, а в посадках томата – 100%; в 1993–1995 гг. – 33% и 90% соответственно; в 2001 г. – 0% и 67%. Сходные данные получены и в Израиле (Cohen, 2002). Эксперименты с заражением клубней картофеля изолятами расы Т1 и смесью изолятов Т0 и Т1 показали, что изоляты расы Т1 плохо сохраняются в клубнях и вытесняются изолятами расы Т0 (Дьяков и др., 1975; Рыбакова, 1988).

2) Динамика расы Т1 в посадках томата.

Первичное заражение листьев томата осуществляется изолятами расы Т0, которые доминируют при анализе инфекции в первых пятнах, образующихся на листьях. Это подтверждает общепринятую схему миграции паразита:



Основной массив инфекции из картофеля составляет раса T0, однако, незначительное число клонов расы T1, сохранившихся в картофеле, попав на томат вытесняет расу T0 и накапливается к концу эпифитотии. Возможно и наличие альтернативного источника инфекции листьев томата расой T1, не столь мощного, как картофельные клубни и листья, но постоянного. Поэтому на генетическую структуру популяции, заражающей томат, этот источник влияет слабо, но в дальнейшем обуславливает накопление расы T1 (Рыбакова, 1988; Дьяков и др., 1994).

3) Агрессивность к картофелю и томату

Искусственное заражение изолятами рас T0 и T1 листьев томата и картофеля показало, что первые более агрессивны для картофеля, чем для томата, а вторые более агрессивны для томата, чем для картофеля. Эти различия проявляются в вытеснении изолятов не «своей» расы из смешанной популяции при пассажах на листьях в теплице (Дьяков и др., 1975) и в полевых делянках (Leberton et al., 1999); различиях в минимальной инфекционной нагрузке, латентном периоде, размере инфекционных пятен и споровой продукции (Рыбакова, 1988; Дьяков и др., 1994; Legard et al., 1995; Forbes et al., 1997; Oyarzun et al., 1998; Leberton et al., 1999; Vega-Sanchez et al., 2000; Кнарoва, Gisi, 2002; Suassuna et al., 2004).

Агрессивность изолятов расы T1 к сортам томата, не имеющим генов устойчивости, настолько высока, что эти изоляты спороносят на листьях как на питательной среде без некротизации зараженной ткани (Дьяков и др., 1975; Vega-Sanchez et al., 2000).

4) Вирулентность для картофеля и томата

Раса T1 поражает сорта вишневидного томата, обладающие геном устойчивости Ph1, а раса T0 не способна поражать эти сорта, т.е. обладает более узкой вирулентностью. По отношению к дифференциаторам R-генов картофеля наблюдается обратная зависимость, т.е. штаммы, выделенные из листьев томата менее вирулентны, чем «картофельные» штаммы (табл. 8).

5) Нейтральные маркеры.

О разнонаправленном внутривидовом отбо-

ре свидетельствует и анализ нейтральных маркеров в популяциях *P. infestans*, паразитирующих на картофеле и томате.

Изоферменты. В таблице 9 сведены данные по частотам ферментных локусов в разных популяциях *P. infestans*. Исходя из преобладания клональной системы размножения, в таблице приведены не аллельные частоты, как это принято в популяционной генетике, а частоты гомо- и гетерозиготных генотипов. В таблице однозначно показано, что частоты генотипов и направления их эволюции в популяциях, паразитирующих на картофеле и томате, различны.

Та же особенность отмечена и в Московской области, где, в отличие от выше цитированных работ, проводили сравнение аллельных частот изоферментов в посадках картофеля и томата, расположенных в непосредственной близости. Глюкозофосфатизомеразы оказалась мономорфной (все изоляты были гомозиготны – 100/100), а по пептидазе наблюдался полиморфизм (таблица 10).

Мультилокусные генотипы ДНК. В бразильских популяциях *P. infestans* изоляты из листьев томата принадлежали к клональной линии US-1, а из листьев картофеля – к линии BR-1 (Suassuna et al., 2004). Во Флориде (США) на картофеле с 1994 г. начал доминировать (встречаемость более 90%) клон US-8, а на томате – клоны US-11 и US-17, причем изоляты последнего более агрессивны для томата, чем для картофеля (Weingartner, Tombolato, 2004).

Достоверные различия частот генотипов (фингерпринтов ДНК) у изолятов из картофеля и томата установлено для 1200 штаммов *P. infestans*, собранных в США с 1989 по 1995 годы (Deahl et al., 1995).

Использование метода AFLP позволило разделить 74 штамма, собранных с листьев картофеля и томата в 1996–1997 гг во Франции и Швейцарии, на 7 групп. Штаммы из картофеля и томата четко не разошлись, но «картофельные» штаммы оказались генетически более разнообразными, чем «томатные». Первые встречались во всех семи кластерах, а вторые – только в четырех, что свидетельствует о более специализированном геноме последних (Кнарoва, Gisi, 2002).

6) Механизмы изоляции.

Если популяции паразита на двух видах растений-хозяев эволюционируют в направлении сужения специализации к «своему» хозяину, то возникают различные пре- и постмейотические механизмы, препятствующие межпопуляционным генетическим обменам (Дьяков, Лекомцева, 1984). В нескольких работах было исследовано

Таблица 8
Частоты генов вирулентности к сортам-дифференциаторам картофеля у штаммов *Phytophthora infestans*

Страна	Год	Среднее число генов вирулентности у штаммов		Автор
		Из картофеля	из томата	
Франция	1995			Leberton et al., 1999 Leberton, Andrivon, 1998
	4,4	3,3		
	1996	4,8	3,6	
Франция, Швейцария США США, Зап. Вашингтон	1996–97	6,8	2,9	Кнапова, Gisi, 2002 Goodwin et al., 1995
	1989–94	5,0	4,8	
	1996	4,6	5,0	Dorrance et al., 1999
	1997	6,3	3,5	
Эквадор	1993–95	7,1	1,3	Oyarzun et al., 1998
Израиль	1998	7,0	4,8	Cohen, 2002
	1999	6,0	5,7	
	2000	6,7	6,1	
Россия, Моск. обл.	1993	8,9	6,7	Смирнов, 1996 Козловская и др. (не опубликовано)
Россия, разные области	1995	9,4	8,0	
	1997	9,2	9,2	
	2000	8,7	4,8	

Таблица 9
Частоты изоферментных локусов в популяциях *P. infestans* из разных регионов

Регион	Годы	Хозяин	GPI-1								Pep-1			Источник
			100/100	90/100	100/111	86/100	96/100	100/122	86/122	100/111/122	100/100	92/100	83/100	
США	80е-90е	Томат	–	–	50	20	–	30	–	–	80	20	–	Legard et al., 1995
		Картоф.	29,4	–		55,9	–	–	5,9	8,0	23,5	76,5	–	
Франц	1996	Томат	85,4	14,6		–	–	–	–	–	85,4	–	14,6	Leberton et al., 1999
		Картоф.	12,5	87,5		–	–	–	–	–	25	–	75	
Эквадор	1994-1996	Томат	–	–		98,3	1,7	–	–	–	1,7	98,3	–	Forbes et al., 1997
		Картоф.	–	–		–	100	–	–	–	100	–	–	
США, Сев. Каролина	1994-1998	Томат	26,8	–	57,0	0,6	–	–	–	26,8	73,2	26,8	–	Wangsomboondee et.al., 2002
		Картоф.	98,8	–	1,2	–	–	–	–	–	99,4	0,6	–	

Таблица 10
Аллельные частоты *Per-1* штаммов
Phytophthora infestans, собранных в посадках
картофеля и томата в Московской области
(Еланский и др., не опубликовано)

Год	Растение-хозяин	Аллели локуса <i>Per-1</i>		
		100	96	92
1993	Картофель	1,0	—	—
	Томат	0,83	—	0,17
1995	Картофель	0,92	0,08	—
	Томат	0,77	0,23	—
1996	Картофель	1,0	—	—
	Томат	0,15	—	0,85
1997	Картофель	0,86	—	0,14
	Томат	0,10	0,76	0,14
1998	Картофель	0,70	0,07	0,23
	Томат	0,22	0,76	0,02
1999	Картофель	0,88	—	0,12
	Томат	0,39	0,61	—
2001	Картофель	0,98	—	0,02
	Томат	0,80	—	0,20

влияние источника родительских штаммов на эффективность гибридизации.

При скрещивании штаммов, изолированных из разных видов рода *Solanum* в Эквадоре (Oliva et al., 2002), было установлено, что штаммы с типом спаривания А2 из диких пасленовых (клональная линия ЕС-2) хуже всего скрещиваются со штаммами из томата (линия ЕС-3), а наиболее эффективно скрещиваются со штаммом из картофеля (ЕС-1). Штаммы из диких пасленовых занимали промежуточное положение. Все гибриды оказались непатогенными. Авторы полагают, что низкий процент гибридизации и редукция патогенности у гибридов обусловлены постмейотическими механизмами репродуктивной изоляции популяций.

В опытах Багировой с соавторами (1998) проведено скрещивание большого числа штаммов из картофеля и томата, имеющих свойства рас Т0 и Т1. Наиболее высокофертильными оказались кроссы штаммов Т1 x Т1, выделенных из томата (36 ооспор в поле зрения микроскопа, 44% прорастания ооспор), наименее эффективными – скрещивания рас Т0 x Т1, выделенных из разных хозяев (низкое число формирующихся и

проросших ооспор, высокая доля абортивных и недоразвитых ооспор). Эффективность кроссов между изолятами расы Т0, выделенными из картофеля оказалась промежуточной. Поскольку основной массив штаммов расы Т0 поражает картофель, она имеет надежный источник зимовки – картофельные клубни, вследствие чего значение ооспор как зимующих инфекционных единиц для популяций из картофеля невысоко. Адаптированная «томатная форма» способна зимовать на томате в форме ооспор (см. ниже) и поэтому сохраняет более высокую продуктивность полового процесса. За счет высокой фертильности Т1 приобретает самостоятельный потенциал первичной инфекции на томате.

Таким же образом можно интерпретировать результаты, полученные Кнаповой с соавторами (Кнарова et al., 2002). Кроссы штаммов, выделенных из картофеля с штаммами из томата дали наивысшее число ооспор – 13,8 на кв. мм. среды (с разбросом 5–19) и промежуточный процент прорастания ооспор (6,3 с разбросом 0–24). Скрещивания штаммов, изолированных из томата, дали наименьший процент ооспор (7,6 с разбросом 4–12) при наивысшем проценте их прорастания (10,8). Кроссы между штаммами, выделенными из картофеля, дали промежуточное число ооспор (8,6 с высоким разбросом данных – 0–30) и наименьший процент прорастания ооспор (2,7). Таким образом, штаммы из картофеля менее фертильны, чем из томата, но межпопуляционные скрещивания дали не худшие результаты, чем внутрипопуляционные. Возможно, различия с приведенными выше данными Багировой с соавторами объясняются тем, что российские исследователи работали с штаммами, изолированными в начале 90-х годов XXв, а швейцарские – с штаммами изолированными в конце 90-х гг.

В основе низкой фертильности может лежать гетероплоидность штаммов. Если в Мексиканских популяциях, где половой процесс и первичное заражение ооспоровым потомством регулярны, большинство исследованных штаммов *P. infestans* диплоидны, то в странах Старого Света наблюдается внутрипопуляционный полиморфизм плоидности (ди-, три- и тетраплоидные штаммы, а также гетерокариотические штаммы с гетероплоидными ядрами), причем штаммы, имеющие разные типы спаривания, т.е. взаимно фертильные, различаются плоидностью ядер (Therrien et al., 1989, 1990; Whittaker et al., 1992; Ritch, Daggett, 1995). Разноплоидность ядер в антеридиях и оогониях может быть причиной низкой фертильности.

Что касается ядерных обменов между гифами при анастомозах, то этому препятствует вегетативная несовместимость, разбивающая бесполое популяции на множество генетически изолированных клонов (Поединок, Дьяков, 1981; Горбунова и др., 1989; Аникина и др., 1997b).

7) Конвергенция популяций.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что гибридизация между «картофельными» и «томатными» штаммами *P. infestans* возможна. Также возможно реципрокное перекрестное заражение разных хозяев, хотя и с пониженной агрессивностью. Исследование популяционных маркеров у изолятов из расположенных рядом полей картофеля и томата в 1993 г показало, что примерно четверть изолятов, выделенных из листьев томата, перенесена с соседнего картофельного поля (Долгова и др., 1997). Теоретически можно было предполагать, что дивергенция популяций на двух хозяевах будет усиливаться и приведет к возникновению внутривидовых специализированных форм (f.sp. potato и f.sp. tomato). Тем более что ооспоры могут сохраняться в растительных остатках (Drenth et al., 1995; Багирова, Дьяков, 1998) и семенах томата (Rubin et al., 2001). Следовательно, томаты имеют в настоящее время независимый от клубней картофеля источник весеннего возобновления.

Однако все произошло иначе. Зимовка ооспорами позволила паразиту избежать самого узкого этапа в его жизненном цикле – моноциклическую стадию вегетации в почве, при которой снижаются паразитические свойства, постепенно восстанавливающиеся летом в полициклической фазе.

Первичные зооспорангии и зооспоры, которыми прорастают ооспоры, обладают высокой степенью паразитической активности, особенно если ооспоры сформировались партеногенетически под влиянием феромонов штамма, обладающего противоположным типом спаривания. Поэтому инфекционный материал на всходах томата, выросший из зараженных ооспорами семян, высоко патогенен как для томата, так и для картофеля. Эти изменения привели к очередной популяционной перестройке, выразившейся в следующих важных с эпидемиологической точки зрения переменах:

1) Зараженные всходы томата стали важным источником первичного заражения картофеля (Филиппов, Иванюк, личные сообщения).

2) В связи с этим эпифитотии на картофеле стали наблюдаться уже в июне, примерно на месяц ранее, чем обычно.

3) В посадках картофеля увеличился процент расы T1, которая раньше встречалась там в незначительном количестве (Уланова и др., 2003).

4) Штаммы, изолированные из листьев томата, перестали отличаться от штаммов из картофеля по вирулентности на картофельных дифференциаторах генов вирулентности и стали превосходить «картофельные» штаммы по агрессивности не только на томате, но и на картофеле (Лаврова и др., 2003; Уланова и др., 2003).

Таким образом, вместо дивергенции произошла конвергенция популяций – возникновение единой популяции на двух растениях-хозяевах с высокой вирулентностью и агрессивностью к обоим видам.

Заключение

Итак, несмотря на более чем 150-летнее интенсивное изучение *Phytophthora infestans*, в биологии, в том числе, в популяционной биологии этого возбудителя важнейших болезней культивируемых пасленовых растений, остается много неизвестного. Непонятно, как влияет на структуру популяций прохождение отдельных этапов жизненного цикла, каковы генетические механизмы канализованной изменчивости агрессивности и вирулентности, каково соотношение половой и клональной систем размножения в природных популяциях, как наследуется вегетативная несовместимость, какова роль картофеля и томата в первичном заражении

этих культур и в чем заключается их влияние на структуру популяций паразита. До сих пор не решены такие важнейшие для практической деятельности вопросы, как генетические механизмы изменения агрессивности паразита или эрозия неспецифической устойчивости картофеля. По мере углубления и расширения исследований фитотрофа картофеля и томата паразит ставит перед исследователями все новые задачи. Только совершенствование экспериментальных возможностей и возникновение новых методологических подходов манипуляции с генами и белками позволяют надеяться на успешное продвижение вперед.

Список литературы

1. Авдей О.В. Расовый состав и типы совместности *Phytophthora infestans* // В сб. «Защита растений в условиях реформирования АПК: экономичность, эффективность, экологичность». С.-Пб.: 1995. 149с.
2. Аникина М.И., Савенкова Л.В., Дьяков Ю.Т. Самофертильные изоляты *Phytophthora infestans* // Изв. РАН, сер. биол. 1997а. №4. С. 414–418.
3. Аникина М.И., Савенкова Л.В., Дьяков Ю.Т. Взаимодействия между штаммами *Phytophthora infestans* (Mont.) deBy. // Микол. и фитопатол. 1997b. Т.31. С. 33–38.
4. Апрышко В.П., Петрунина Я.В., Побединская М.А., Еланский С.Н. Ооспоры *Phytophthora infestans* в природных очагах фитофтороза в Московской области в 2003 г. // Материалы Юбилейной конференции «Микология и альгология – 2004». М.: Прометей. 2004. С. 21–22.
5. Аматханова Ф.Х., Дьяков Ю.Т., Петрунина Я.В., Побединская М.А., Еланский С.Н., Козловская И.Н., Козловский Б.Е., Морозова Е.В., Смирнов А.Н. Популяции *Phytophthora infestans* на Северном Кавказе // Микол. и фитопатол. 2004. Т.38. В.3. С. 71–78.
6. Багирова С.Ф., Дьяков Ю.Т. Роль ооспор в возобновлении первичной инфекции фитофтороза томата // С-Х биология. 1998. №3. С.67–71.
7. Багирова С.Ф., Ан Цзянь Ли, Дьяков Ю.Т. Механизмы генетической изоляции специфических патогенных форм *Phytophthora infestans* в половых и бесполой популяциях // Микол. и фитопатол. 1998. Т.32, №4. С. 47–50.
8. Балашова Н.Н. Фитофтороустойчивость рода *Lycopersicon Tomp.* и методы использования ее в селекции томата. Кишинев: Штиница. 1979.
9. Богуславская Н.В., Филиппов А.В. Распространение возбудителя фитофтороза в почве // Микол. и фитопатол. 1976. Т. 10. С. 316–317.
10. Борисенко А.Б. Расовый состав *Phytophthora infestans* в годы, различающиеся метеорологическими условиями // Тр. V Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1969. Т.4, В.8. С. 83–88.
11. Воробьева Ю.В., Гриднев В.В. Генетика фитофторозных грибов. Сообщ.2. // Генетика. 1983. Т.19. С. 1786–1789.
12. Воробьева Ю.В., Кваснюк Н.Я., Гриднев В.В., Шемякина Е.П., Морозова Е.В., Кузнецова Л.Н. Защита картофеля от фитофтороза в системе семеноводства // Защита растений. 1991. №5. С.17–20.
13. Галлегли М.Е., Нидерхаузер Д.С. Генетическое регулирование взаимодействий хозяина и паразита при фитофторозе картофеля // В сб. «Проблемы и достижения фитопатологии». М.: Сельхозиздат. 1962. С. 193–211.
14. Горбунова Е.В., Багирова С.Ф., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Вегетативная несовместимость у фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* // ДАН СССР. 1989. Т.104. С. 1245–1248.
15. Деревягина М.К., Воловик А.С., Дьяков Ю.Т. Изменение чувствительности к ридомилу в жизненном цикле возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* и целесообразность весенних опрыскиваний // Микол. и фитопатол. 1991. Т. 25. С. 426–436.
16. Деревягина М.К., Воловик А.С., Дьяков Ю.Т. Мутанты *Phytophthora infestans*, резистентные к фениламидным фунгицидам // Микол. и фитопатол. 1993. Т.27, №3. С.57–61.
17. Деревягина М.К., Еланский С.Н., Дьяков Ю.Т. Резистентность *Phytophthora infestans* к фунгициду диметоморфу // Микол. и фитопатол. 1999. Т. 33, №3. С. 208–213.
18. Деревягина М.К., Дьяков Ю.Т. Влияние системных и контактных фунгицидов на поражение листьев картофеля фитофторозом // Микол. и фитопатол. 1990. Т. 24. С. 252–256.
19. Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Генетика устойчивости возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* к фунгициду металаксилу // Генетика. 1986. Т.22, №10. С. 2423–2429.
20. Долгова А.В., Смирнов А.Н., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в России и некоторых странах бывшего СССР // Микол. и фитопатол. 1996. Т.30, №3. С. 55–60.
21. Долгова А.В., Смирнов А.Н., Малеева Ю.В., Багирова С.Ф., Козловская И.Н., Колесников А.А., Шоу Д.С., Дьяков Ю.Т. Сравнение популяций *Phytophthora infestans* на картофеле и томатах в Московской области // В сб. «Проблемы оптимизации фитосанитарного состояния растениеводства». СПб.: 1997. С. 348–357.
22. Дорожкин Н.А., Бельская С.И. Болезни картофеля. Минск: Наука и техника. 1979. 248 с.
23. Дьяков Ю.Т., Ащайе А., Вайнштейн В.М. О статусе “томатных” рас *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 1975. Т.9, №4. С. 277–282.
24. Дьяков Ю.Т., Долгова А.В., Рыбакова И.Н., Багирова С.Ф. Дивергенция популяций фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* в связи со специализацией к растению-хозяину // Журнал общей биол. 1994. 55. С. 179–188.
25. Дьяков Ю.Т., Кузовникова Т.А. Гетерокариоз у *Phytophthora infestans*. II. Генетические исследования // Микол. и фитопатол. 1974. Т.8, №2. С. 81–89.
26. Дьяков Ю.Т., Лекомцева С.Н. О симпатрическом видообразовании у грибов // Биол. науки. 1984. №11, С. 5–16.
27. Дьяков Ю.Т., Супрун Л.М. Вероятностный метод расчета частот генов вирулентности и его применение для анализа популяций возбудителя фи-

тофтороза картофеля *Phytophthora infestans* // Сельскохозяйственная биология. 1984. №3. С.111–118.

28. Еланский С.Н., Смирнов А.Н., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в Московской области. 1. Системы размножения // Микол. и фитопатол. 1999. Т.33, №5. С. 346–352.

29. Еланский С.Н., Милютина Д.И. Гетероплазмоз у *Phytophthora infestans* // Генетика. 2007. №3. С. 255–259.

30. Иванюк В.Г., Журомский Г.К., Авдей О.В. Микроэволюция *Phytophthora infestans* в условиях Белоруссии // Микол. и фитопатол. 2002. Т.36, №6. С. 81–90.

31. Квитко К.В. Относительная роль мутаций и отбора в микробных популяциях // Успехи совр. генетики. 1974. Т.5. С.101–113.

32. Кулиш В.Б., Дьяков Ю.Т., Ерохина С.А. Гетерокариоз у *Phytophthora infestans*. 3. Фитопатологические исследования // Микол. и фитопатол. 1978. Т.12, №5. С. 406–409.

33. Кулиш В.Б., Дьяков Ю.Т. Выделение диплоидных штаммов из смешанных культур двух физиологических рас *Phytophthora infestans* // ДАН. 1979. Т.244, №3. С. 435–438.

34. Лаврова О.И., Еланский С.Н. Идентификация SINE-подобных элементов в геноме *hytophthora infestans* и оценка возможности их применения для сравнительного анализа штаммов // Ж. Росс. Фитопатол. общества. 2003. Т.4. С. 39–45.

35. Лаврова О.И., Еланский С.Н., Дьяков Ю.Т. Селекция штаммов *Phytophthora infestans* в бесполой генерации // Ж. Росс. Фитопатол. общества. 2003. Т.4. С. 1–7.

36. Левонтин Р. Генетические основы эволюции. М.: «Мир». 1978.

37. Майр Э. Популяции, виды и эволюция. М.: «Мир». 1974. 457 с.

38. Оша М.Я. Расы *Phytophthora infestans* и устойчивость сортов и гибридов картофеля в Латвийской ССР // Тр. V Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1969. Т.4, В.8. С. 110–114.

39. Поединок Н.Л., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Парасексуальный процесс фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* // Генетика. 1982. Т.18. С. 1423–1428.

40. Поединок Н.Л., Дьяков Ю.Т. Обнаружение вегетативной несовместимости у фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 1981. Т.15, №4. С. 275–279.

41. Пушкарев И.И. Новый фитофтороустойчивый сорт картофеля 8670. М.: Сельхозгиз. 1937.

42. Пшедецкая Л.И., Козубова И.А. Изучение сезонной динамики расового состава гриба *Phytophthora infestans* на различных сортах картофеля // Труды Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1964. Т.4, В.8. С. 38–41.

43. Рыбакова И.Н. Изменение агрессивности и вирулентности в популяциях *Phytophthora infestans* (Mont.) de By – возбудителя фитофтороза картофеля и томатов // Автореферат канд. дисс. М. 1988. 23 с.

44. Рыбакова И.Н., Дьяков Ю.Т. Циклические изменения генотипического состава популяций фитопатогенных грибов на примере возбудителя фитофтороза картофеля // Журнал общей биол. 1990. Т. 51. С. 651–660.

45. Рыбакова И.Н., Супрун Л.М., Дьяков Ю.Т. Динамика генотипов в популяциях фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // Докл. АН СССР. 1987. Т.294. С. 696–698.

46. Смирнов А.Н. Популяционная структура фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* в Московской области в 1991–1996 гг. // Автореферат канд. дисс. М. 1996. 24 с.

47. Смирнов А.Н. Ооспоры *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 2003. Т.37. №1. С. 3–21.

48. Уланова Т.И., Еланский С.Н., Филиппов А.В., Дьяков Ю.Т., Апрышко В.П., Козловский Б.Е., Смирнов А.Н., Коффей М.Д. Устойчивость к фитофторозу некоторых перспективных линий диких *Lycopersicon hirsutum* // Ж. Российского фитопатологического общества. 2003. Т.4. С. 9–15.

49. Филиппов А.В., Гуревич Б.И., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Спиглазова С.Ю., Кравцов А.С., Сметанина Т.И., Смирнов А.Н. Горизонтальная устойчивость листьев картофеля к *Phytophthora infestans* и агрессивность изолятов патогена из разных географических районов // Микол. и фитопатол. 2004. Т.38, №5. С. 74–87.

50. Abad Z.G., Abad J.A. Historical evidence on the occurrence of late blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America // In “*Phytophthora infestans* 150”. L.J. Dowly et al., eds. Dublin, Ireland. 1995. P. 36–41.

51. Abad Z.G., Abad J.A., Ochoa C. Historical and scientific evidence that supports the modern theory of the peruvian Andes as the center of origin of *Phytophthora infestans* // In “*Phytophthora infestans* 150”. L.J. Dowly et al., eds. Dublin, Ireland. 1995. P. 239–245.

52. Abu-El Samen F.M., Secor G.A., Gudmestad N.C. Genetic variation among asexual progeny of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers // Plant Pathology. 2003. V.52. P. 314–325.

53. Adams J., Paquin Ch., Oeller P.W., Lee L.W. Physiological characterization of adaptive clones in evolving populations of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1985. V.110. P. 173–185.

54. Adler N., Chacon G., Forbes G., Flier W. *Phytophthora infestans* sensu lato in South America

- population substructuring through host specificity // In "Late blight: Managing the Global Threat" Lima, Peru. 2002a. P. 13–17.
55. Adler N.E., Chacon G., Flier W.G., Forbes G.A. The Andian fruit crop, pear melon (*Solanum muricatum*) is a common host for A1 and A2 strains of *Phytophthora infestans* in Equador // Plant Pathol. 2002b. V.51. P. 802.
56. Andrivon D. Biology, ecology, and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil // Phytopathology. 1995. V.85. P.1053–1056.
57. Bagirova S.F., An Zsan Li, Dolgova A.V., Elanski S.N., Shaw D.C., Dyakov Y.T. Mutants of *Phytophthora infestans* resistant to dimethomorph fungicide // J. Rus. Phytopathol. Soc. 2001. V.2. P. 19–24.
58. Brasier C.M., Cooke D.E.L., Duncan J.M. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V.96. P. 5878–5883.
59. Carlisle D.J., Cooke L.R., Brown A.E. Phenotypic and genotypic characterization of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* // Europ. J. of Plant Pathology. 2001. V. 107, №3. P. 291–303.
60. Carson M.L. Relationship between parasitic and saprophytic fitness in *Cochliobolus heterostrophus*, cause leaf blight of maize // In "Durability of Disease Resistance". Kluwer Acad. Publ. The Netherlands. 1993. 285 p.
61. Carter D.A., Buck K.W., Archer S.A., Van der Lee T., Shattock R.C., Shaw D.S. The detection of nonhybrid, trisomic, and triploid offspring in sexual progeny of mating of *Phytophthora infestans* // Fungal Genet. and Biol. 1999. V.26. P. 198–208.
62. Carter D.A., Archer S.A., Buck K.W., Shaw D.S., Shattock R.C. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans* // Mycol. Res. 1990. V.94. P. 1123–1128.
63. Chamnanpant J., Shan Wei-xing, Tyler B.M. High frequency mitotic gene conversion in genetic hybrids of the oomycete *Phytophthora sojae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V.98. P. 14530–14535.
64. Cherepennikova-Anikina M.I., Savenkova L.V., Dolgova A.V., Shaw D.S., Dyakov Yu.T. Vegetative incompatibility of *Phytophthora infestans* // J. Russ. Phytopathol. Soc. 2002. V.3. P. 19–32.
65. Cohen Y. Populations of *Phytophthora infestans* in Israel underwent three major genetic changes during 1983 to 2000 // Phytopathology. 2002. V.92. P. 300–307.
66. Cohen Y., Farkash S., Reshit Z., Baider A. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves // Phytopathology. 1997. V.87. P. 191–196.
67. Cooke D.E.L., Young V., Birch P.R.J., Toth R., Gourlay F., Day J.P., Carnegie S., Duncan J.M. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995 – 1997) // Plant Pathology. 2003. 52. P. 181–192.
68. Cooke D.E.L., Lees A.K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity // Plant pathology. 2004. N 53. P. 692–704.
69. Davidse L.C., Looijen D., Turnensteen L.I., Vanderwal D. Occurrence of metalaxyl resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields // Neth. J. Plant Pathol. 1981. V.87, №2. P. 65–68.
70. Deahl K.L., De Muth S.P., Fry W.E. Genetic and phenotypic diversity in population of *Phytophthora infestans* in the United States of America // In "Phytophthora infestans 150". L.J. Dowly et al., eds. Dublin, Ireland. 1995. 362p.
71. Dorrance A.E., Inglis D.A., Derie M.L., Brown C.R., Goodwin S.B., Fry W.E. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Western Washington // Phytopathology. 1999. V.89. P. 423–428.
72. Drenth A., Goodwin S.B., Fry W.E., Davidse L.C. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphism // Phytopathology. 1993. V. 83. P. 1087–1092.
73. Drenth A., Janssen E.M., Govers F. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions // Plant Pathol. 1995. V.44. P. 86–94.
74. Drenth A., Tas I.C.Q., Govers, F. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands // Eur. J. Plant Pathol. 1994. V.100. P. 97–107.
75. Dyakov Yu.T., Derevjahina M.K. Late blight of potato and its control in Russia // Pesticide Outlook. 2000. V.11. P. 230–232.
76. Elansky S. N., Smirnov A. N. Second locus of Peptidase as a marker for genetic investigations of *Phytophthora infestans* // Botanica Lithuanica. 2003. V.9, №3. P. 275–283.
77. Elansky S., Smirnov A., Dyakov Y., Dolgova A., Filippov A., Kozovskiy B, Kozlovskaya I., Russo P., Smart C., Fry W. Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow Region, Siberia and Far East // J. Phytopathology. 2001. V.149. P. 605–611.
78. Erselius L.J., Hohl H.R., Ordonez M.E., Oyarzun P.J., Jarrin F., Velasco A., Ramon M.P., Forbes G.A. Genetic diversity among isolates of *Phytophthora infestans* from various hosts in Equador // CIP program report 1997-98. 1998. P. 39–48.
79. Fife A.M., Shaw D.S. An analysis of self-fertility in field isolates of *Phytophthora infestans* // Mycol. Res. 1992. V.96. P. 390-394.

80. Flier W.G., Kessel G.J.T., Schepers H.T.A.M. The impact of oospores of *Phytophthora infestans* on late blight epidemics // Plant breeding and seed science. 2004. V. 50. P. 5–13.
81. Flier W.G., Grunwald N.J., Kroon L.P.N.M., Sturbaum A.K., van der Bosch T.B.M., Geray-Serrano E., Lozoya-Saldana H., Fry W.E., Turkensteen L.J. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca valley of Central Mexico suggests genetic differentiations between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp // Phytopathology. 2003. V.93. P. 382–390.
82. Forbes G.A., Escobar X.C., Ayala C.C., Revelo J., Ordonez M.E., Fry B.A., Doucett K., Fry W.E. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador // Phytopathology. 1997. V.87. P.375–380.
83. Forbes G.A., Oyarzun P.J., Pozo A., Ordonez M.E. Host specificity of late blight pathogen on potato and tomato in Ecuador. Program Report 1995-1996 // Internat. Potato Center. 1997. P. 138–143.
84. Fry W.E., Goodwin S.P., Matuszak J.M., Spielman L.J., Milgroom M.G. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans* // Ann. Rev. Phytopathol. 1992. V.30. P. 107–129.
85. Fry W.E., Goodwin S.B. Recent migrations of *Phytophthora infestans* // In “*Phytophthora infestans* 150”. L. T. Dowly et al. editors. Dublin, Ireland. 1995. P. 89–95.
86. Gallegly M.E. Physiological races of tomato late blight fungus // Phytopathology. 1952. V. 42. P. 461–462.
87. Ghimire S.R., Hyde K.D., Hodgkiss I.J., Shaw D.S., Liew E.C.Y. Variations in the *Phytophthora infestans* population in Nepal as revealed by nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms // Phytopathology. 2003. V.93, N.2. P. 236–243.
88. Goodwin S.B. The population genetics of *Phytophthora* // Phytopathology. 1997. V. 87, N 4. P. 462–473.
89. Goodwin S.B., Drenth A., Fry W.E. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans* // Current Genetics. 1992. V. 22, №2. P. 107–115.
90. Goodwin S.B., Drenth A. Origin of A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico // Phytopathology. 1997. V. 87, №10. P.992–999.
91. Goodwin S.B., Cohen B.A., Fry W.E. Panglobal distribution of single clonal lineage of the Irish potato famine fungus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V.91. P. 11591–11595.
92. Goodwin S.B., Fry W.E. Genetic analysis of interspecific hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora mirabilis* // Exp. Mycol. 1994. V.18. P. 20–32.
93. Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Fry W.E. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineage of the potato late blight disease fungus // Phytopathology. 1995a. V.85. P. 669–676.
94. Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Fry W.E. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and western Canada // Phytopathology. 1996. V.86. P. 793–800.
95. Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Dyer A.T., Fry B.A., Fry W.E. Direct detection of gene flow and probably sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North America // Phytopathology. 1995b. V.85. P. 473–479.
96. Gotz E. Untersuchungen zum Auftreten des A2-Paarungstyps bei *Phytophthora infestans* in Ostdeutschland // Potato Res. 1991. V.34. P. 233–237.
97. Griffith G.W., Shaw D.S. Polymorphism in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure culture or from host lesion // Applied and Env. Microbiol. 1998. Vol.64, № 10. P. 4007–4014.
98. Hanson K., Shattock R.C. Formation of oospores of *Phytophthora infestans* in cultivars of potato with different levels of race-nonspecific resistance // Plant Pathol. 1998. V.47. P. 123–129.
99. Hastie A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids // Nature. 1970. V. 226. P. 771.
100. Hirst J.M., Stedman O.J. The epidemiology of *Phytophthora infestans*. II. The source of inoculum // Ann. App. Biol. 1960. V.48. P. 489–517.
101. Judelson H.S., Ge Yang. Recombination pathways in *Phytophthora infestans*: polyploidy resulting from aberrant sexual development and zoospore-mediated heterokaryosis // Mycol. Res. 1998. V.102. P. 1245–1253.
102. Judelson H.S., Roberts, S. Multiple loci determining insensitivity to phenylamide fungicides in *Phytophthora infestans* // Phytopathology. 1999. V. 89, №9. P. 754–760.
103. Jyan M.H., Ann P.J., Tsai J.N., Hsin S.D., Chang T.T., Liou R.F. Recent occurrence of *Phytophthora infestans* US-11 as the cause of severe late blight on potato and tomato in Taiwan // Canad. J. Plant Pathol. P. 188–192.
104. Kadish D., Cohen Y. Overseasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers // Phytopathology. 1992. V.82. P. 887–889.
105. Kato M., Mizubuti E.S., Goodwin S.B., Fry W.E. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineage of *Phytophthora infestans* in the United States // Phytopathology. 1997. V.87. P. 973–978.

106. Kato M., Sato N., Takahashi K., Shimaniki T. Yearly change of frequency and geographic diatribution of A2 mating type isolates of *Phytophthora infestans* in Japan from 1987 to 1993 // Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 1999. V.64. P. 168–174.
107. Knapova G., Gisi U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* population on potato and tomato in France and Switzerland // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 641–553.
108. Knapova, G, Tenzer, I., Gessler, G., Gisi, U. Characterization of *Phytophthora infestans* from potato and tomato with moleculare markers // Proceedings of the 5th congress of the European Foundation for Plant Pathology. Taormina, Italy. 2001. P. 6–9.
109. Knapova G., Schlenzig A., Gisi U. Crosses between isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato and characterization of F1 and F2 progeny for phenotypic and molecular markers // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 698–709.
110. Ko W.H. An alternative possible origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico // Phytopathology. 1994. V. 84. P. 1224–1227.
111. Koh Y.J., Goodwin S.B., Dyer A.T., Cohen B.A., Ogoshi A., Sato N., Fry W.E. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries // Phytopathology. 1994. V.84. P. 922–927.
112. Leberton L., Andrivon D. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype // Phytopathology. 1998. V. 88. P. 583–594.
113. Leberton L., Lucas J-M., Andrivon D. Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolayes collected from potato and tomato in France // Phytopathology. 1999. V.89. P. 679–686.
114. Legard D.E., Lee T.Y., Fry W.E. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: aggrecciveness on tomato // Phytopathology. 1995. V.85. P. 1356–1361.
115. McKee R.K. Effects of ultraviolet irradiation on zoospores of *Phytophthora infestans* // Transact. British Mycol. Soc. 1969. V.52. P.281–291.
116. Miller J.S., Hamm P.B., Johnson D.A. Characterization of the *Phytophthora infestans* populations in the Columbia basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995 // Phytopathology. 1997. V.87. P. 656–660.
117. Miller J.S., Johnson D.A. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions // Phytopathology. 2000. V.90. P. 220–227.
118. Mosa A.A., Kobayashi K., Ogoshi A., Kato M., Sato N. Isoensime polymorphysm and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan // Plant pathol. 1993. V. 42. P. 26–34.
119. Muller K.O. Uber den augenbicklichen Stand unserer Kenntnis zur biologischen Spezialisierung des Krautfauleerrggers der Kartoffel (*Phytophthora infestans*) // Der Zuchter. 1935. N7.
120. Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting // TREE. 1999. V.14, N. 10. P. 389–394.
121. Niederhauser J.S. International cooperation in potato research and development // Ann. Rev. Phytopathol. 1993. V.31. P. 1–21.
122. Ochwo M.K.N., Kamoun S., Adipala E., Rubaihayo P.R., Lamour K., Olanya M. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* (Mont.)de Bary in the Eastern and Western highlands of Uganda // J. Phytopathol. 2002. V.150. P. 541–542.
123. Oliva R.F., Erselius L.J., Adler N.E., Forbes G.A. Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 710–719.
124. Oyarzun P.J., Pozo A., Ordonez M.E., Doucett K., Forbes G.A. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador // Phytopathology. 1998. V.88. P. 265–271.
125. Perez T., Alborno J., Dominguez A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature // Mol.Ecol. 1998. V.7. P. 1347 – 1358.
126. Reis A., Smart C.D., Fry W.E., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from Southern and Southeastern Brazil from 1998 to 2000 // Plant Disease, V.87, №8. P. 896–900.
127. Ristaino J.B., Groves C.T., Parra G.R. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens // Nature. 2001, V. 411. P. 695–697.
128. Ritch D.L., Daggett S.S. Nuclear DNA content and chromosome number in German isolates of *Phytophthora infestans* // Mycologia. 1995. V.87. P. 579–581.
129. Rubin E., Baider A., Cohen Y. *Phytophthora infestans* produced oospores in fruits and seeds of tomato // Phytopathology. 2001. V.91. P. 1074–1080.
130. Sansome E., Brasier C.M., Hamm P.B. *Phytophthora meadii* may be a species hybrid // Mycol. Res. 1991. V.95. P. 273–277.
131. Savelkoul P.H., Aarts H.J.M., de Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L.W., Schouls L., Lenstra J.A. Amplified Fragment Lenth Polymorphism analysis: the State of the Art // Journal of Clinical Microbiology. Oct. 1999. P. 3083–3091.
132. Savenkova L.V., Cherepennikova-Anikina M.I. Effect of metalaxyl and N-nitro-N-nitrosomethylurea on mating type of *Phytophthora infestans* // J. Russ. Phytopathol. Soc. 2002. V.3. P. 33–38.

133. Schober-Butin B., Knapova G., Knipfelberg L., Nieopold F. *Phytophthora infestans* in Germany: population dynamics and modern methods in diagnosis // In “*Phytophthora infestans* 150”. L.J. Dowly et al., eds. Dublin, Ireland. 1995. P. 96–101.
134. Schwinn F.J., Staub T. Biological properties of metalaxyl. In “System Fungizides and Antifungale Verbindungen” // 6 Internat. Symp. Abh. Akad. Wiss. DDR. 1980. P. 123–133.
135. Shattock R.C., Shaw D.S. Novel phenotypes of *Phytophthora infestans* from mixed cultures of antibiotic resistant mutants // Transact. British Mycol. Soc. 1976. V.67. P. 201–206.
136. Stem J.M., Kirk W.W. The generation and quantification of resistance to dimethomorph in *Phytophthora infestans* // Plant Disease. 2004. V.88. P. 930–934.
137. Sujkowski L.S., Goodwin S.B., Fry W.E. Changes in specific virulence in polish population of *Phytophthora infestans*: 1985–1991 // Eur. J. Plant Pathol. 1991. V.102. P. 555–561.
138. Sujkowski L. S., Goodwin S. B., Dyer A. T., Fry W. E. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland // Phytopathology. 1994. V.84. P. 201–207.
139. Sujkowski L.S., Goodwin S.B., Dyer A.T., Fry W.E. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland // Phytopathology. 1994. V.84. P. 201–207.
140. Suassuna N.D., Maffia I.A., Mizubuti F. S.G. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans* // Plant Pathol. 2004. V.53. P. 405–413.
141. Therrien C.D., Daggett S.S., Ritch D.L., Sato N., Spielman L.J., Tolley P.N. Mating type, nuclear DNA content, and isozyme composition of thirty-three isolates of *Phytophthora infestans* from Japan // Phytopathology. 1990. V.80. P. 124 (abstr.).
142. Therrien C.D., Ritch D.L., Davidse L.C., Jespers B.K., Spielman L.J. Nuclear DNA content, mating type, and metalaxyl sensitivity of eighty-three isolates of *Phytophthora infestans* from the Netherlands // Mycol. Res. 1989. V.92. P. 140–146.
143. VanBruggen A.H.C. Plant disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming system // Plant Disease. 1995. V.79, N.10. P. 976–984.
144. Vega-Sanchez M.E., Erselius L.J., Rodriguez A.M., Bastidas O., Hohl H.R., Ojiambo P.S., Mukalazi J., Vermeulen T., Fry W.E., Forbes G.A. Host adaptation to potato and tomato within the US-1 clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Uganda and Kenya // Plant Pathol. 2000. V.49. P. 531–539.
145. Veld W.A.M., Veenbaas-Rijks W.J., Ilieva E., de Cock A.W.A.M., Bonants P.J.M., Pieters R. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA // Phytopathology. 1998. V.88. P. 922–929.
146. Weingartner D.P., Tombolato D. Temporal, geographic and host distribution of *Phytophthora infestans* genotypes in Florida // Amer. Potato J. 2004. V.81. P. 94–95.
147. Whittaker S.L., Shattock R.S., Shaw D.S. The duplication cycle and DAPI-DNA contents in nuclei in germinating zoospores cysts of *Phytophthora infestans* // Mycol. Res. 1992. V.96. P. 355–358.
148. Wiebe M.G., Robson G.D., Oliver S.G., Trinici A.P.J. Evolution of *Fusarium graminearum* a315 grown in a series of glucose-limited chemostat cultures at a high dilution rate // Mycol. Res. 1995. V.99. P. 173–178.

ЭКОЛОГИЯ грибов

Е.Ю. Воронина

МИКОРИЗЫ В НАЗЕМНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МИКОРИЗНЫХ СИМБИОЗОВ

The role of symbiotic mycorrhizal fungi in shaping terrestrial ecosystems is fundamental.

R. Finlay

The intimate cooperation between wholly different life forms – plants and fungi – is not only an amazing biological phenomenon but also a vitally important factor in the diversity of plant life on earth.

F. Ryan

Микориза представляет собой важнейший из симбиозов, в который вовлечены растения и грибы. Более 80% наземных растений образует микоризы различных типов (Brundrett, 2002). Микоризы встречаются практически во всех растительных ассоциациях и оказывают значительное влияние как на растения-фитобионты, так и на весь биогеоценоз в целом. Встречаются немикоризные (далее НМ) растения, но практически не существует безмикоризных растительных сообществ. Эктомикоризы (далее ЭМ) в лесных сообществах способны осуществлять связь между растениями

не только разных видов, но и принадлежащих к разным ярусам, объединяя их в единую систему с общим оборотом питательных веществ, принимая участие в циклах биогенных элементов (Booth, 2004; Read et al., 2004). В бореальной зоне ЭМ играет решающую роль, так как ее образуют древесные породы-доминанты и эдификаторы растительных сообществ. Микоризные грибы образуют в лесных почвах обильный мицелий и участвуют в широком спектре взаимоотношений с почвенными организмами разных таксономических и трофических групп (Linderman, 1988).

Термин «микориза» традиционно используется в двух значениях: с одной стороны, для обозначения структуры – модифицированной части корня растения-хозяина, заселенной грибом, т.е. микоризного окончания, и с другой – для определения типа трофических взаимоотношений между корневой системой растения и микобиотом, т.е. в случае, когда более корректным представляется употребление термина «микотрофия». Среди множества определений микоризы, данных различными исследователями, приведем определение И.В. Каратыгина (1993): «Микоризу можно определить как эволюционно сложившуюся между корнями высших растений и грибами, а также нередко и прокариотами трофоценотическую, структурно оформленную ассоциацию, в которой перечисленные организмы воспроизводятся и существуют в физиологически и экологически взаимозависимом состоянии и в отношениях, называемых мутуалистическим симбиозом». Важная особенность микоризной ассоциации, подчеркнутая в данном определении – то, что микориза является эволюционным образованием – продуктом длительной коэволюции грибов и растений. Что касается типа симбиоза, к которому следует относить микоризы, то мутуалистический характер, как показывает большое количество работ последних лет – отнюдь не обязательная характеристика микоризных ассоциаций (Comandini, Rinaldi, 2001; Jones, Smith, 2004; Neuhauser, Fargione, 2004). Еще одной важной особенностью микоризы, отличающей этот тип грибо-растительных ассоциаций от прочих, является наличие специализированной зоны контакта между симбионтами, служащей для обмена веществами. (Smith, Read, 1997; Peterson, Massicotte, 2004 и др.). Патогенные ассоциации также формируют зону контакта, но отличие состоит в отсутствии тока веществ от гриба к растению и быстрому появлению симптомов заболевания у хозяина. Микоризы формируются в специализированных органах растений, где близкое взаимодействие симбионтов возможно благодаря их синхронному развитию (Brundrett, 2004). Микоризы развиваются преимущественно в корневой системе, но встречаются также в подземных побегах и талломах мхов (Smith, Read, 1997; Read et al., 2000).

История изучения микотрофности растений и современное состояние вопроса

Сожительство грибов с высшими растениями было известно давно. Еще Теофраст указывал на приуроченность отдельных видов грибов к корням дуба и некоторых других деревьев. История научного исследования микотрофности растений насчитывает 125 лет. Это явление было открыто в 1881 г. русским ученым Францем Михайловичем Каменским (1851–1913) (Kamieński, 1881). Он описал грибные образования на корнях подбельника (*Monotropa hypopitys*), показал наличие сложного тройного симбиоза (ель-подбельник-гриб-микоризообразователь) и высказал важные соображения о роли гриба как симбионта растений: «Если мы теперь спросим себя, каким образом в корнях подбельника могут попадать питательные вещества из гумусной почвы, то нам станет ясным, что это может происходить только через вышеупомянутый слой грибного мицелия, так как у всех до сих пор исследованных растений не наблюдается ни одной здоровой клеточки корня, которая соприкасалась бы с почвой и могла бы питаться непосредственно. Таким образом, гриб играет здесь роль посредника в поглощении питательных веществ» (Каменский, 1886). За рубежом приоритет открытия микориз приписывают Альберту Бернарду Франку (1839–1900). В 1885 г. вышла работа Франка «О питании деревьев путем симбиоза корней с подземными грибами», где он описал грибные чехлы на корнях деревьев (Frank, 1885). Им же был введен термин «микориза» («грибокорень»), получивший широкое распространение, и составлена первая классификация микориз. В своих исследованиях он пришел к выводу, что гриб и растение находятся в мутуалистическом симбиозе, и сделал множество предположений о физиологии микоризы, вначале оспариваемых научным сообществом, но впоследствии безоговорочно подтвержденных многочисленными экспериментами (Trappe, 2005).

Анатомические характеристики арбускулярной микоризы (далее АМ) были впервые даны А. Шлихтом в 1889 г., но хотя в конце 1880-х – начале 1890-х гг. существовало много независимых описаний микоризных структур, грибы-микобиоты АМ долгое время не были известны (Koide, Mosse, 2004).

На первом этапе изучения микориз (до 1920-х гг.) внимание исследователей привлекали в основном анатомия и морфология микориз

различных типов, а также физиология симбионтов. В этом направлении исследований весьма важной была работа Э. Штала (Stahl, 1900). Им было изучено более 3000 видов растений и высказана гипотеза о природе микотрофного способа питания растений. Она состояла в том, что у микотрофных растений нет корневых волосков, а транспирационный ток слаб. В это же время были осуществлены первые попытки культивирования грибов-микоризообразователей, активно велись дискуссии о пользе и вреде микориз для растения. В период с 1920-х гг. до конца 1950-х гг. активно работали над выделением микоризообразователей в чистую культуру, предпринимали попытки синтеза микориз *in vitro*, разрабатывали методики применения микориз в лесоводстве и сельском хозяйстве (в СССР – методики искусственной микоризации семян для лесоразведения в степи). В то же время проводились активные исследования арбускулярной микоризы (Koide, Mosse, 2004; ссылки на исследования, проводимые в СССР см. в Селиванов, 1981).

В течение следующего этапа исследования микориз, продлившегося до начала 1990-х гг., были разработаны детальные классификации типов микориз (Катенин, 1968; Селиванов, 1973), продолжалось активное изучение анатомии и морфологии микориз и составление атласов и определителей микориз на основе полученных данных (Доминик, 1963; Agerer, 1987–1996 и др.). В 1970-е гг. ученые переходят от изучения микориз отдельных видов к исследованию микотрофности растений в растительных ассоциациях (эколого-ценотическим исследованиям микосимбиотрофизма) и изучению физиологии микориз с применением изотопных методов (Sanders, Tinker, 1971 и мн. др.).

Начало 1990-х гг. ознаменовалось применением молекулярных методик к исследованию микориз, что позволило вывести изучение структуры сообществ микоризных грибов на новый уровень: изучать не только надземную, но и подземную составляющую сообществ, а также идентифицировать микобионт непосредственно из микоризного окончания (Bruns, Bidartondo, 2002; Bruns et al., 1998; Dahlberg et al., 1997; Horton, 2002; Horton, Bruns, 2001 и др.).

В настоящее время исследования в области микоризных ассоциаций представлены целым рядом направлений, исследующих проблему на уровнях от молекулярного и клеточного до биогеоценотического. При этом объектом исследо-

ваний являются и каждый из симбионтов и их взаимодействие, а также роль этого взаимодействия в эволюции, экологии (в том числе и при антропогенном влиянии на места обитания) грибов и растений, рассматриваются физиологические, генетические и молекулярные аспекты симбиоза. Наиболее активно разрабатываемые области исследования микориз в настоящее время следующие:

- Определение положения микориз различных типов в симбиотическом континууме и установление факторов, влияющих на сдвиг равновесия в симбиозе (Brundrett, 2002; 2004; Hibbett et al., 2000; Jones, Smith, 2004; Neuhauser, Fargione, 2004);

- Анализ биотических связей грибов-микоризообразователей с другими группами организмов, взаимовлияние микроорганизмов в микоризосфере (Великанов, Сидорова, 1997; 1998; De Boer et al., 2005; Frey-Klett, Garbaye, 2005; Timonen, Marschner, 2005);

- Оценка влияния микоризы на структуру фитоценозов и ее роль в восстановлении растительных сообществ после нарушений (Kytöviita et al., 2003; Ozinga et al., 1997; van der Heijden et al., 1998);

- Исследование структуры и функций экстраметрического мицелия микоризообразующих грибов в связи с возможным транспортом веществ между различными растениями в сообществе по «микоризным сетям» (Landerweert et al., 2003; Leake et al., 2004a; Simard, Durall, 2004; Wallander et al., 2001);

- Анализ отношений симбионтов микориз на молекулярно-генетическом уровне и выявление природы сигналов, определяющих возникновение симбиоза и развитие симбиотических структур (Bècard et al., 2004; Martin et al., 2001; Gianinazzi-Pearson et al., 2004; Kosuta et al., 2004)

- Изучение генетических и молекулярных механизмов, лежащих в основе транспорта веществ между симбионтами в зоне контакта микориз (Bücking, 2004; Buscot et al., 2000; Govindarajulu et al., 2005; Rausch, Bucher, 2002)

- Изучение филогении микоризообразующих грибов и эволюции микориз (Bidartondo, 2005; Hibbett et al., 2000; Bruns, Schefferson, 2004).

Данные, полученные в современных исследованиях в указанных направлениях, будут обобщены далее в соответствующих разделах.

Взгляды на природу микоризного симбиоза. Положение микориз различных типов в симбиотическом континууме

С момента открытия микоризного симбиоза существовали различные, часто противоположные друг другу, мнения о «пользе» и «вреде» этой ассоциации для каждого из партнеров. Характер отношений гриба с растением постоянно служил предметом дискуссий. В конце XIX в. господствовало мнение, что микоризы вредны для растений при любых условиях, хотя Франк отмечал благотворность симбиоза (Frank, 1885; Jones, Smith, 2004). Отчасти это объясняется отсутствием в то время физиологических исследо-

ваний микориз в природе – сведения получали в лабораторных условиях, при обеспеченности растения элементами минерального питания значительно отличной от имеющейся в природных сообществах, и отсутствию естественного набора почвенных микроорганизмов, оказывающих влияние на образование и функционирование микоризы. Относительно АМ точка зрения на микобионт как на паразитический организм была распространена до середины XX в. (Koide, Mosse, 2004). После появления данных экспериментальных работ с АМ, начавшихся с исследования Асаи в 1943 г., стала преобладать точка зрения на АМ как на симбиоз, в большинстве случаев, благоприятный для растения (Koide, Mosse, 2004).

Таблица 1. Механизмы, стабилизирующие мутуалистические симбиозы и предотвращающие вторжение «эксплуататоров» (по Bidartondo et al., 2000; Egger, Hibbett, 2004).

Механизм	Действие	Примечания
Генетическое единообразие симбионтов	Обеспечение низкого уровня изменчивости при бесполом размножении, препятствующего возникновению новых комбинаций симбионтов.	Микобионты ЭМ размножаются преимущественно половым способом. У бесполой микобионтов АМ выявлено высокое генетическое разнообразие.
Вертикальный перенос симбионтов	При переходе симбионтов к потомству от родителей успешное развитие (в том числе, и размножение) одного симбионта связано с другим.	АМ грибы, которые могут передаваться при вегетативном росте растения, чаще всего колонизируют новые растения не через семена, а заново – спорами и мицелием, т.е. осуществляется горизонтальный перенос.
Самоограничение численности «эксплуататоров»	Когда «эксплуататоров» становится слишком много, против них начинается отбор у хозяина.	Механизм не действенен для ЭМ растений с крупными семенами – потомство прорастает рядом с родительскими особями и колонизируется их микобионтом.
Отбор симбионтов, выбраковывающий «эксплуататоров»	Отличив «эксплуататора» от полезного симбионта, возможно блокировать его доступ к питательным веществам.	Растение контролирует независимое старение отдельных участков корневой системы (при невыгодном симбиозе).
Контроль транспортных процессов в контактной зоне	Прогрессирующее усложнение контактной зоны приводит к тесной сопряженности потоков веществ в обе стороны	
Побочное действие эксплуативного симбиоза	Отсутствие двустороннего транспорта компенсируется преимуществами, предоставляемыми симбионтом.	Стимуляция роста и усиление микоризообразования микогетеротрофным растением из рода <i>Sarcodes</i>
Способность к образованию симбиоза с многими партнерами	«Эксплуатируемый» в одном симбиозе партнер может одновременно быть «эксплуататором» в другом.	

Условные обозначения см. в тексте.

В течение XX в. преобладала точка зрения на микоризный симбиоз как на благоприятный для обоих симбионтов, хотя существовало мнение о том, что ЭМ и эндофитные грибы – потенциальные паразиты, а микоризы – «двойной безвредный паразитизм» (Burgess, 1936; Melin, 1953). К началу 1990-х гг. общепринятой становится точка зрения на микоризы как на мутуализм, и большинство исследователей полагали мутуализм принципиальной характеристикой микоризного симбиоза (Каратыгин, 1993 и мн. др.). Микоризы фигурировали в учебниках как пример мутуализма и трактовались как «преимущественно мутуализм с изредка встречающимися отклонениями от нормы, такими как комменсализм и паразитизм» (Johnson et al., 1997).

В настоящее время большинством исследователей признается, что мутуалистический характер – отнюдь не обязательное свойство микоризного симбиоза. Встречаются такие названия работ, посвященных микоризам, как «Вместе, но не навсегда» (Comandini, Rinaldi, 2001), «Всегда ли микориза – мутуализм?» (Jones, Smith, 2004) и т.д. Во многих посвященных микоризам исследованиях продемонстрировано, что всегда и на всех этапах развития симбиоза происходит «конфликт интересов» партнеров, исход которого зависит от действия целого комплекса факторов окружающей среды, а также генетических и онтогенетических факторов (Gardes, 2002; Egger, Hibbett, 2004). Кроме того, все мутуалистические симбиозы доступны для мошенничества и эпипаразитизма. Предполагается существование ряда компенсаторных механизмов, стабилизирующих симбиоз и снижающих количество остаточных «выгод», которые могут быть использованы эксплуататорами (табл. 1). Тем не менее, полностью от эксплуатации не защищен ни один мутуалистический симбиоз (Egger, Hibbett, 2004). Многие современные исследователи вернулись к мнению, бытовавшему в первой половине XX в., о том, что микоризы представляют собой взаимный паразитизм, т.е. каждый из партнеров стремится минимизировать свой вклад в ассоциацию и максимизировать собственную выгоду. В этом случае конфликт интересов партнеров неизбежен – выгода одного из симбионтов в большей или меньшей степени оказывается затратой другого.

Среди микоризных ассоциаций некоторые в норме являются мутуалистическими (сбалансированными), а иногда имеет место паразитизм одного партнера на другом – эксплуативные микоризы. Термины «сбалансированная»

и «эксплуативная» микориза предложены М. Брандреттом для обозначения, соответственно, мутуалистических и немутуалистических типов микориз (Brundrett, 2002). Использование таких специальных терминов помогает избежать разночтений при различном понимании часто применяющихся терминов «симбиоз» и «мутуализм». Основные характеристики этих типов микориз приведены в табл. 2 и 3. К сбалансированным относят микоризные ассоциации, в которых оба партнера получают значительную выгоду в ходе взаимного обмена. Эксплуативные микоризы – это ассоциации, где только растение получает заметную выгоду от обмена веществами. Например, микоризы бесхлорофилльных растений (сем. Monotropaceae, сем. Orchidaceae и др.), представляют собой трехкомпонентный симбиоз, в котором взаимодействуют зеленое фотосинтезирующее растение, гриб, образующий с ним микоризу, и бесхлорофилльное растение, фактически, паразитирующее на этой микоризе: напрямую на микобионте и опосредованно – на растении. Таким образом, микоризы незеленых растений можно считать уникальным для растительного мира примером эпипаразитизма. Это первый случай мошенничества, использующего мутуалистический симбиоз гриба и растения: прочие примеры известны из животного мира (например, поедающие пыльцу и неопыляющие насекомые) (Bidartondo, Bruns, 2001; Taylor, 2004). Растения с подобным типом питания выделяют в отдельную трофическую группу микогетеротрофов (Leake, 1994).

Кроме того, даже исходно мутуалистические микоризные типы представляют собой неустойчивое равновесие, и в случае изменения условий окружающей среды или на определенном этапе своего развития могут переходить от мутуализма к антагонизму между симбионтами.

Пытаясь определить микоризный симбиоз, следует принимать во внимание весь спектр возможных микоризных ассоциаций. Микоризы пересекают несколько континуумов, демонстрируя разные варианты взаимозависимости и морфологической специализации симбионтов (рис. 1). Мутуалистические микоризные симбиозы занимают область «++», т.е. взаимной выгоды и процветания обоих партнеров на диаграмме грибо-растительных ассоциаций, контрастируя с зонами подавления одного из симбионтов («+-» и «-+»). Мутуализм отражает ситуацию, при которой оба вида вместе способны выживать более успешно, чем по отдельности. Область диаграммы, где отмечен мутуализм,

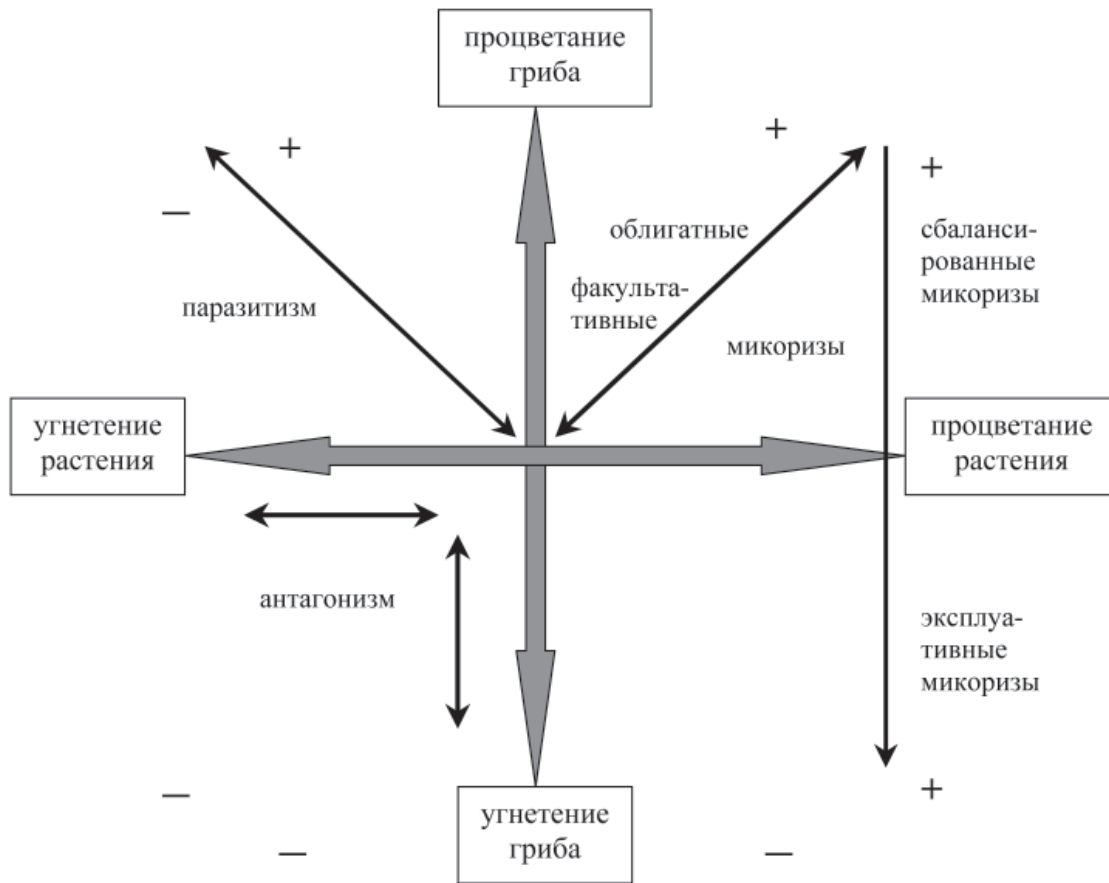


Рис.1. Определение положения различных типов микориз в континууме «паразитизм-мутуализм» (по Brundrett, 2004).

представляет континуум возрастающей зависимости растения от микобионта – от факультативно микоризных и НМ растений до облигатно микотрофных. Зона облигатной микотрофности является переходом ко второму континууму, отражающему уменьшение пользы симбиоза для микобионта при сохранении «выгод» растения, с кульминацией в точке микориз нефотосинтезирующих микогетеротрофов. Паразитические и антагонистические ассоциации расположены на соседних квадратах диаграммы. Диаграмма отражает наиболее общие представления, в то время как соотношение между угнетением растения и «выгодой» гриба может значительно меняться у разных типов эндوفитных и патогенных грибов. Кроме того, следует отметить, что учет «выгод» и «затрат» симбионтов трудно осуществим, особенно в природных условиях. Благополучие измеряется не состоянием отдельно взятой особи, а является производной взаимоотношений на уровне популяций, сообществ и экосистем (Jones, Smith, 2004).

Таким образом, сейчас стало очевидным, что, если рассматривать все типы в целом, то к микоризам возможно применить только определение симбиоза в самом широком понимании этого термина: «совместное проживание двух и более организмов», и взаимоотношения партнеров в микоризной ассоциации трактуются как мутуалистически-паразитический континуум (Bronstein, 1994; Johnson et al., 1997; Smith, Read, 1997; Neuhauser, Fargione, 2004). Микоризные ассоциации – пример динамического равновесия в симбиозе, где возможен переход партнеров к паразитизму, и, для микобионта, к свободному сапротрофному существованию. Как писал А. Келли, «Нет микоризных грибов, есть микоризные состояния» (Келли, 1952). В подходящих условиях некоторые виды типичных гумусовых сапротрофов или ксилотрофов приобретают способность образовывать микоризу. По крайней мере, для ЭМ базидиомицетов показано, что симбиотрофия возникала неоднократно: симбионты произошли от свободноживущих

Таблица 2. Сбалансированные и эксплуативные микоризные ассоциации (по Brundrett, 2004)

Фактор	Сбалансированная микориза	Эксплуативная микориза
Жизненная форма растения	Все типы	В норме мелкие травы без одревеснения
Местообитание растения	Доминанты большинства наземных местообитаний, способность выживать при сильном затенении ограничена	Ограничены особыми местообитаниями, часто при значительном затенении
Надземная часть растения	Активно фотосинтезирующая	Нефотосинтезирующая или фотосинтез слабый
Подземная часть растения	Типичная корневая система	Корни редуцированы или отсутствуют
Зависимость растения от микобионта	Облигатная или факультативная	Облигатная
Образ жизни микобионта	Приспособлен к росту как в почве, так и в растении	Сапротрофы, паразиты или микобионты сбалансированной микоризы
Зависимость микобионта от растения	Большинство – облигатные симбионты, неспособные к самостоятельному существованию	Выгода микобионта в симбиозе неочевидна
Обменные процессы	Взаимный транспорт веществ, необходимых грибу и растению	Транспорт веществ, нужных растению, за счет микобионта
Зона контакта	Специализированные гифы в специализированных органах растения	Неспециализированные или специализированные гифы в высокоспециализированных органах растения
Развитие	Колонизация микобионтом синхронизирована с ростом органов растения; внедрение происходит в молодой орган растения	Гриб может повторно колонизировать одни и те же клетки; может продолжать функционировать во взрослом растении

сапротрофных предков и могут вернуться к сапротрофии. Почти половина современных сапротрофных гомобазидиомицетов произошла от микоризных форм, что свидетельствует о наличии некоего континуума также и между сапротрофией и симбиотрофией (Hibbett et al., 2000). В заключение описания эволюции взглядов на природу микоризного симбиоза можно привести высказывание Гаргаса (Gargas et al., 1995): «Грибы – оппортунисты: сапротрофы становятся симбионтами, симбионты переключаются с мутуализма на паразитизм».

Как было сказано выше, при определенных условиях или на определенной стадии в ходе развития ассоциации «амплуа» микоризного гриба может меняться. Один и тот же микобионт может быть эндофитом, мутуалистическим симбионтом, сапротрофом или некротрофным паразитом (Brundrett, 2004) (табл. 4).

Эндофитная активность микоризообразующих грибов

Наиболее распространенное определение эндофитизма – бессимптомные ассоциации растений с другими организмами, проживающими внутри тканей живого растения. Наиболее изученной группой эндофитов являются грибы, хотя ту же экологическую нишу могут занимать бактерии, водоросли и даже другие растения. Эндофитный рост микоризных грибов в растениях встречается достаточно часто, но отличается от микоризы отсутствием специализированной контактной зоны, синхронности развития гриба и растения и недостаточностью транспорта веществ в направлении растения. Неясно, что при этом получает микобионт, так как микоризные грибы неспособны к длительному эндофитному существованию. Свободные гифы АМ грибов не могут всасывать сахара, а ЭМ грибы встречаются

Таблица 3. Свидетельства сбалансированности большинства микоризных симбиозов* (по Brundrett, 2004)

Корреляция продуктивности обоих симбионтов	Связь между состоянием растения-хозяина и его микоризностью
	Необходимость наличия хозяина для споруляции микоризного гриба
	Снижение продуктивности одного из симбионтов при действии факторов, отрицательно влияющих только на второй симбионт
Совместная встречаемость обоих симбионтов	Культивирование АМ грибов возможно только в бинарной культуре с хозяином
	ЭМ грибы в природе встречаются только совместно с растением-хозяином
	Изменение биомассы и разнообразия при значительных нарушениях сообществ происходит параллельно у обоих симбионтов
Постоянный взаимный обмен веществами между симбионтами	Наличие синхронных двунаправленных потоков питательных веществ
	Развитие экстратрикальных гиф гриба в ответ на рост растения и увеличение его потребности в минеральных веществах
	Накопление минеральных веществ в растении может быть обусловлено фенологией микоризы
Физиологическая взаимозависимость симбионтов	Зависимость многих растений от микоризы показана в опытах при концентрациях минеральных веществ, близких к имеющимся в почвах
	Корневые системы многих растений более приспособлены к формированию симбиозов, чем к прямому поглощению веществ из почвы
	Большинство грибов – микоризообразователей – облигатные симбиотрофы
Синхронное развитие симбионтов	Для ростовых процессов в корне необходимо формирование микоризы
	Поглощение минеральных веществ синхронно с образованием микоризы и активностью гиф микобionта в почве

* – ссылки на оригинальные исследования, в которых получены данные см. в Brundrett, 2004

Условные обозначения: см. в тексте

только вместе с растением-хозяином (табл. 3). Микобionты АМ часто растут в корнях ЭМ растений. Эта ассоциация отличается от смешанной АМ/ЭМ микоризы отсутствием арбускул. Также часто встречается АМ колонизация НМ растений, но считается, что ее функциональная значимость ограничена, т.к. она не способствует росту растений и встречается в старых корнях. Некоторые ЭМ грибы способны образовывать ассоциации с чехлом, но без сети Гартига на корнях растений не-хозяев, что также считают вариантом эндофитного развития – гриб утилизирует корневые экссудаты, не проникая между клетками (Brundrett, 2004). Есть данные о том, что некоторые штаммы *Rhizoctonia*, образующие микоризу у Орхидных (далее ОМ), могут быть эндофитами или паразитами в корневых системах растений других семейств. Причины эндофитной активности микоризобразующих грибов пока неясны. Возможно, грибы получают при

этом некоторую выгоду, или она просто является следствием высокого содержания их спорул в почве.

Сбалансированные микоризы

Наиболее распространенные типы микориз, тем не менее, в большинстве случаев являются сбалансированными, т.е. мутуалистическими, о чем свидетельствует ряд особенностей физиологии и экологии симбионтов (табл. 3). Сбалансированные ассоциации оставались доминирующим типом микориз на протяжении всей эволюционной истории наземных растений (Brundrett, 2002). Обменные процессы между симбионтами находятся в динамическом равновесии: время от времени выгода одного из партнеров может оказаться меньше его «затрат», но через некоторое время должен произойти сдвиг в обратную сторону. Основные характеристики сбалансированных микориз и важная роль вза-

Таблица 4. Различные стадии в развитии микоризных грибов и соответствующие аспекты микофитных ассоциаций (по Brundrett, 2004)

Стадия развития	Микобионты микориз разных типов
Свободноживущие	Грибы АМ и ЭМ – не способны долго выживать без растения в целом, но существует долгоживущий свободный экстраматрикулярный мицелий Прочие – сапротрофная фаза может быть расширена
Эндофиты	Гифы в корнях не хозяев (АМ, ЭМ, ОМ) Долговременно в старых корнях хозяев Заселение талломов мхов грибами ЭрМ
Мутуалистические микоризы	Формирование нормальных ассоциаций с специализированными зонами контакта для обмена веществами Гифы имеют гистотропную приуроченность (ЭМ, АМ) Рост и формирование корневой системы растений-хозяев приспособлены к формированию микоризы
Эксплуативные (немутуалистические) микоризы	Микогетеротрофные ассоциации с бесхлорофилльными растениями (Monotropaceae, Orchidaceae, Gentianaceae)
Антагонисты	В высокоплодородных почвах снижаются темпы роста растения-хозяина (АМ) Защитные реакции в тканях хозяина (накопление таннинов (ЭМ), выработка фитоалексинов – например, орхинола (ОМ)) Заселение несовместимых растений Микобионты орхидных – патогены для других растений
Некротрофы	Односторонний транспорт от отмерших корней к грибу Инвазия гиф в клетки стареющих корней (ЭМ) Несовместимые микобионты, убивающие проростки (Orchidaceae)

Условные обозначения: см. в тексте

имного обмена веществами между симбионтами были известны исследователям уже в самом начале изучения этих ассоциаций (Rayner, 1928). То, что большинство растений-хозяев постоянно получает выгоду от микоризных ассоциаций – устоявшаяся научная парадигма (Smith, Read, 1997). Интересно, что симбионты всех прочих типов мутуалистических симбиозов гораздо менее скоординированы в отношении метаболизма и морфологии, чем в сбалансированных микоризах. Практически оценить баланс «выгод» и «затрат» симбионтов в микоризе крайне сложно, особенно в природных условиях – информация такого рода обычно получается в ходе лабораторных экспериментов по синтезу микоризы (Brundrett et al., 1996). Тем не менее, в настоящее время накоплено достаточно свидетельств о корреляции в продуктивности, совместной встречаемости, взаимном обмене, синхронном развитии и взаимозависимости симбионтов (см. табл. 3). Физиологическая взаимозависимость продемонстрирована, в частности, на примере связи между утилизацией углеводов и развитием микоризы, синхронность развития

подтверждается детальными морфологическими исследованиями, которые также показали непродолжительность срока жизни активной зоны контакта (сеть Гартига, арбускулы, гифальные клубки). Связь между развитием микоризы и улучшением состояния растения была продемонстрирована экспериментально, но в данном случае необходимо учитывать действие множества факторов в почве (рис. 2).

Факультативные микоризы – сбалансированные ассоциации, в которых «выгода» растения зависит от плодородности почвы. Факультативно АМ растения образуют микоризы только при низкой доступности фосфора, а их корневые системы, в отличие от облигатно микоризных видов, в типе состоят из сравнительно длинных, тонких и сильно разветвленных корней. Факультативно микоризные растения обладают способностью ограничивать «затраты» на симбиоз в случае, если он приносит мало пользы. Некоторые данные свидетельствуют об ухудшении состояния растения по мере роста микоризной колонизации корня (Gange, 1999 и др.). Принимая во внимание



Рис. 2. Факторы, влияющие на положение микориз в мутуалистически-паразитическом континууме (по Johnson et al., 1997).

широчайшее распространение АМ, сообщения подобного рода очень редки. В данном случае, речь идет, вероятно, о факультативно микоризных растениях, растущих на сравнительно плодородных почвах. Микориза улучшает состояние растения в том случае, если интенсификация минерального питания или прочие факторы перевешивают затраты на микоризную ассоциацию. В агроценозах наблюдались «паразитические» микоризы, т.е. переход микобионта к паразитизму на растении (Johnson et al., 1997). Также следует помнить, что польза от микоризы рассчитывается в неестественных условиях путем сравнения с безмикоризным контролем, т.е. растениями в норме не встречающимися в природе в таком статусе. Кроме того, микобионты значительно различаются между собой по способности к поглощению углерода и минеральных элементов, поэтому, например, растения-интродуценты, вынужденные формировать симбиозы с непривычными видами грибов, могут чувствовать себя хуже, чем в ассоциации с исходными микобионтами (Brundrett et al., 1996). На практике отнесение

растения к факультативно микоризным часто основывается не на полученных данных по физиологии, а на непостоянном обнаружении микоризы у данного вида в полевых условиях или отмечаемом низком уровне микоризации, что может быть связано и с методическими погрешностями исследований (Brundrett, 2002).

Эксплуативные микоризы

Эти ассоциации характеризуются односторонним током веществ (от гриба к растению). Термин «эксплуативная микориза» точно отражает картину взаимоотношений между симбионтами: эксплуатирующим растением и эксплуатируемым грибом. Эксплуататор мутуализма – это особь, получающая выгоды, предоставляемые мутуалисту, но не оплачивающая их ничем (Bronstein, 2001). Ни одного эксплуатирующего вида грибов к настоящему моменту неизвестно (Egger, Hibbett, 2004). Эти отношения обратны тем, которые наблюдаются у фитопатогенных грибов и растений-хозяев (рис. 1). Растения эксплуативных микориз, как правило, лишены хлорофилла, побеги и корневая систе-

ма у них редуцированы (таб. 2). Растения-паразиты часто имеют сходную морфологию, но не образуют микориз и посредством гаусторий физически контактируют с хозяином. Отдельные линии растений эксплуативных микориз произошли от фитобионтов АМ, ЭМ или ОМ (Brundrett, 2002). Микогетеротрофные растения не способны к выработке метаболитов для обмена с микобионтом, поэтому они косвенно паразитируют на других видах своего фитоценоза для обеспечения своего микобионта энергией. Возможно, воду и минеральные вещества они получают также через мицелий. Микогетеротрофам свойственна исключительно высокая специфичность в отношении микобионта, поэтому они более чувствительны к колебаниям численности популяций микоризных грибов, чем другие, менее специфичные, растения. В отличие от сбалансированных ассоциаций, микобионты некоторых эксплуативных микориз не эволюционировали совместно с растениями (Brundrett, 2002). Зоны контакта симбионтов в эксплуативных микоризах характеризуются высокой сложностью, и механизмы их действия изучены недостаточно (Leake, 1994; Rasmussen, 2002). Разрушение старых гиф предоставляет возможность повторно колонизировать те же клетки, позволяя экономно использовать ограниченное пространство в редуцированных корнях микогетеротрофов (Brundrett, 2002). Частично микогетеротрофные растения также могут формировать эксплуативные микоризы. Растения, образующие арбутоидную микоризу (далее АрМ), в основном содержат хлорофилл, но через мицелий микобионта соединяются с находящимися поблизости деревьями и могут получать от них питательные вещества. По мицелиальным сетям ЭМ грибов органические вещества могут передаваться от одного растения-хозяина к другому (Simard et al., 1997; подробнее см. далее).

Антагонизм

Оппортунистические ассоциации грибов-микоризообразователей с растениями – не-хозяевами или растений с неподходящими микобионтами, в которых возможно угнетение одного из симбионтов, могут трактоваться как антагонизм (рис. 1). И ЭМ и АМ грибы могут наносить ущерб корневой системе несовместимого растения при попытке проникновения. Например, колонизация *Cyperus rotundus* АМ грибами приводит к замедлению роста, особенно в присутствии микоризного растения-компань-

на (Muthukumar et al., 2004). Если в сообществе доминируют растения с одним типом микоризы, может наблюдаться антагонизм в отношении видов, формирующих микоризные симбиозы другого типа. Деревья с ЭМ часто не могут развиваться на участках, занятых кустарниками с эрикоидной микоризой (далее ЭрМ) – *Calluna*, *Gaultheria*, *Rhododendron* (Walker et al., 1999), но другими исследованиями показано, что это аллелопатическое влияние Вересковых, наблюдаемое в лабораторных условиях, в природе не имеет большого значения (Nilsen et al., 1999). Изменение свойств почвы под воздействием ЭМ грибов в биогеоценозах, где доминируют микоризы этого типа, заключающееся в замедлении круговорота элементов и преобладании органических веществ, делает почву менее пригодной для развития АМ грибов, чем для ЭМ (Allen et al., 1995). Вещества, содержащиеся в листовом опаде ЭМ растений могут аллелопатически воздействовать на АМ грибы, а мицелиальные маты ЭМ грибов, изменяя физические и химические характеристики почвы, вероятно, создают условия, неподходящие для появления других растений (ссылки на оригинальные исследования см. в Brundrett, 2004).

Существует гипотеза, что эпифитные Орхидные находятся в антагонистических отношениях с растением, на котором поселяются. Микобионт ОМ может проникать в ветви и листья дерева, соединя с ним эпифит, а состояние растения-хозяина ухудшается по мере развития эпифита – возникает эпифитоз. Предполагается, что наиболее активно эпифиты заселяют ослабленные растения (Ruinen, 1953). Эта гипотеза достаточно противоречива и нуждается в проверке посредством современных методов исследования.

Некротрофия у микоризных грибов

АМ грибы способны долго, до 10 лет, находиться в старых отмерших корнях растений-хозяев после исчезновения арбускул, являясь источником инокулюма микобионта для следующего поколения растений. Грибы ЭМ тоже могут в некоторых случаях некротрофно заселять стареющие корни (Brundrett, 2004).

Таким образом, микоризообразующие грибы могут иметь различные фазы активности в разное время и в разных ситуациях, и структурное и функциональное разнообразие микоризных ассоциаций в естественных растительных сообществах значительно выше, чем обычно предполагается.

Распространенность микотрофии среди групп растений

В образовании микориз различных типов принимает участие около 82% наземных растений, а в настоящее время микоризы открыты и у некоторых водных растений (Brundrett, 2002). Различные формы микориз присутствуют у представителей более 1000 родов высших растений из почти 400 семейств (Molina et al., 1992).

Покрытосеменные возникли предположительно в начале мелового периода, и исходным типом микоризы для этой группы растений была АМ, что подтверждается повсеместным распространением этого типа микоризных ассоциаций и его доминированием среди прочих типов микориз Покрытосеменных (табл. 5). Среди Покрытосеменных микотрофны 75% однодольных и 80–90% двудольных. В сводке 1987 г. Дж. Трэпп привел данные о микотрофности 6507 видов Покрытосеменных, и 67% из них (учитывая факультативное микоризообразование и смешанные АМ/ЭМ ассоциации, например, виды рода *Eucalyptus*) образовывали АМ (Trappe, 1987) (рис. 3). На прочие типы микориз у Покрытосеменных приходится 15%, а 18% видов не образуют микоризы. Несмотря на сравнительно небольшое видовое разнообразие ЭМ растений, они доминируют в бореальных лесных экосистемах, и этот тип микориз имеет большое значение в их функционировании.

Нельзя делать вывод о микотрофности растения на основании только лишь его таксономической принадлежности, т.к. имеется много исключений, обоснованных экологическими факторами. Если в пределах одной таксономической группы тип микоризы сохраняется более или менее постоянным, то интенсивность микоризообразования может значительно меняться. Виды одного рода обычно формируют микоризу одного и того же типа или остаются безмикоризными, но из этого правила много исключений (Newman, Reddell, 1987 и др.). Трудность количественной оценки распределения микоризы по таксономическим и экологическим группам растений во многом объясняется тем, что отношения между симбионтами не являются неизменными, и подвижность симбиотрофных связей требует во всех случаях специального экологического анализа.

Гаметофиты Плауновидных, вероятно, формируют эксплуативные микоризные ассоциации, а спорофиты – нормальную АМ, теми же

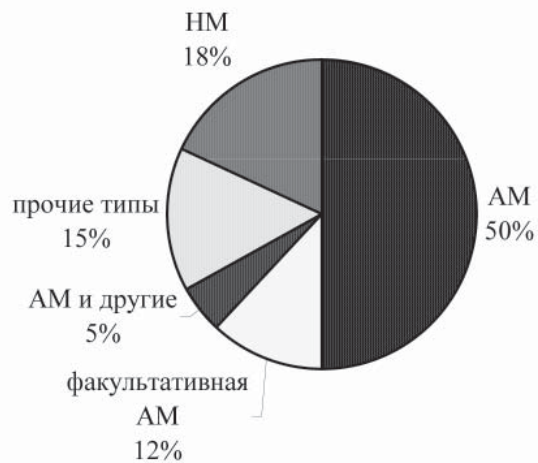


Рис. 3. Распространенность типов микориз у Покрытосеменных (по Trappe, 1987).

особенностями характеризуются Псилотовые. Утрата корней и листьев у Псилотовых могла произойти в связи с микогеотрофией растений на некоторых этапах жизненного цикла (Leake, 1994; Read et al., 2000). Полностью микотрофны такие группы растений как Голосеменные, Псилотовые*, Плауновидные (облигатно АМ на стадии гаметофита) (Newman, Reddell, 1987). Хвощевидные ранее считались НМ, но в последнее время у 90% исследованных видов рода *Equisetum* была обнаружена АМ, хотя, во многих условиях хвощи способны вполне эффективно развиваться без микобионта. У фотосинтезирующих гаметофитов микоризы неизвестны, но у спорофитов часто формируется АМ с арбускулами (Read et al., 2000; Brundrett, 2002). Также микоризны спорофиты многих Папоротниковидных (кроме водных – Марсиллиевых и Сальвиниевых). Факультативные микоризы считаются особенностью эволюционно продвинутых Папоротникообразных (пор. Filicales), в то время как более примитивные представители этой группы (*Ophioglossum*) имеют более толстые корни, содержащие микобионт (Read et al., 2000). Эксплуативные АМ встречаются у подземных гаметофитов *Ophioglossum* и *Botrychium*. Менее вероятно микоризообразование у эпифитных и эпилитных папоротников (табл. 6)

Сравнительно недавно начато изучение микотрофии у Мохообразных (Read et al., 2000;

* Ранее считалось, что Псилотовые колонизируются паразитическим хитридиомицетом из рода *Cladochytrium*, но в настоящее время от этой точки зрения отказались (Read et al., 2000).

Таблица 5. Микоризный статус основных групп Покрытосеменных растений (по Brundrett, 2002)

Микоризный статус	Группы Покрытосеменных
только АМ (если известна микориза)	Исходная группа Покрытосеменных Эумагнолиды поp. Acorales Liliales Pandanales Arecales Zingiberales Saxifragales Geraniales Oxalidales Cucurbitales Cornales Garryales Solanales Aquifoliales Apiales Asterales Dipsacales Dioscoreales* Gentianales*
ЭМ (некоторые представители)	поp. Malpighiales Rosales Myrtales Malvales Sapindales Fabales*
ЭМ (множество представителей)	поp. Fagales
НМ (некоторые представители)	поp. Ranunculales Lamiales
НМ (множество представителей)	поp. Brassicales Ceratophyllales Alismatales Poales Commelinales Proteales Caryophyllales Santalales
АМ/ЭрМ/ЭМ	поp. Ericales*
АМ/ОМ	поp. Asparagales*

Условные обозначения см. в тексте.

* – имеются эксплуативные микоризы

Bidartondo et al., 2003 и др.). Из трех отделов Мохообразных безмикоризны только представители отд. Bryophyta. Для отд. Hepatophyta и Anthoceroophyta показаны симбиотические структуры, образованные грибами разных таксономических групп и подземными частями талломов Мохообразных, получившие название «микоталлии». Группа представляет большой теоретический интерес, так как первые вышедшие на сушу в ордовикском периоде и

вступившие в симбиоз с грибами растения, как предполагается, были сходны с современными Печеночными мхами (Taylor, Osborn, 1996). В зависимости от типа микобионта и морфологии образующихся структур выделяют три типа грибных ассоциаций Мохообразных (табл. 6). АМ-подобная образована грибами из отд. Glomeromycota, причем мхи часто делят микобионт АМ с Покрытосеменными. В талломе мхов – представителей поp. Marchantiales

Таблица 6. Типы грибных ассоциаций у споровых растений (по Read et al., 2000)

Таксоны симбионтов	Тип ассоциации		
	подобная АМ	подобная ЭрМ	подобная ЭМ или ОМ
Таксоны грибов	Glomeromycota	Ascomycota	Basidiomycota
Таксоны растений	Marchantiales Metzgeriales <i>Anthoceros</i> <i>Lycopodium</i> <i>Botrychium</i> <i>Psilotum</i> Gleicheniaceae	Jungermanniales	Jungermanniales Metzgeriales Aneuraceae

Условные обозначения см. в тексте

и Metzgeriales (*Pellia fabbronia*), образуются типичные структуры АМ, такие как арбускулы (Read et al., 2000). Аналогичные структуры отмечены у *Anthoceros punctatus* (Schüssler, 2000). Аскомицетные ассоциации, характерные для сем. scae и близких к нему представителей пор. Jungermanniales, сходны с ЭрМ Вересковых и образованы теми же микобионтами, заселяющими вздутые кончики ризоидов мхов (*Telaranea nematodes*) и образующими гифальные клубки в клетках. Гифы микобионтов имеют характерное для аскомицетов строение септы и окрашиваются специфичными для этой группы грибов красителями. В чистой культуре симбионты мхов *Cephalozia* и *Curzia* образуют типичную ЭрМ с сеянцами видов *Calluna*, *Erica* и *Vaccinium*. И, напротив, микобионт ЭрМ с широким кругом хозяев *Hymenoscyphus ericae* образует в культуре ассоциации с несколькими видами Печеночных мхов. К третьему типу относят ассоциации, образованные печеночными мхами из сем. Lophoziaceae, Arneliaceae и Scapaniaceae и базидиомицетами и аналогичные ЭМ или ОМ. Микобионт с долипоровыми септами образует подобные ОМ клубки гиф в талломе мха (Read et al., 2000). Среди Мохообразных имеются и микогетеротрофные представители. Так, печеночный мох с подземными бесхлорофилльными талломами *Cryptothallus mirabilis* специфично паразитирует на ЭМ березы или сосны с базидиомицетами из рода *Tulasnella*, известными как микобионты ОМ. Показан перенос органических веществ – продуктов фотосинтеза дерева к таллому мха через мицелий микобионта (Bidartondo et al., 2003). К настоящему времени исследование грибных ассоциаций Мохообразных находится на описательной стадии, и возможно только констатировать их наличие и определенное структурное сходство с мико-

ризами семенных растений. Такие вопросы как функциональная значимость микоталлий и их физиологическая аналогия с микоризой требуют дальнейшего изучения.

В отд. Голосеменные не известны НМ или микогетеротрофные растения и наблюдается разнообразие типов микориз. Так у Цикадовых (и ископаемых, и современных) обнаружена АМ, как и у доминировавших в лесных ценозах в юрском и меловом периодах представителей родов *Podocarpus*, *Araucaria*, *Agathis*, *Ginkgo*. Эти АМ Голосеменные остались доминантами в некоторых типах лесов в Южном полушарии. Для сем. Pinaceae и рода *Gnetum* характерна ЭМ, а другие представители пор. Gnetales могут образовывать АМ (*Welwitschia*) (Brundrett, 2002).

Немикоризные растения (НМ)

Микотрофия свойственна подавляющему большинству видов растений, но существует ряд групп, не образующих ассоциации с грибами. Существует по меньшей мере 10 эволюционных линий Покрытосеменных НМ растений, но большинство из них содержит и АМ виды. Наиболее древними истинно безмикоризными растениями, являются представители сем. Proteaceae и Restionaceae, возникшие более 100 млн лет назад. НМ растения преобладают в переувлажненных и нарушенных вследствие природных катастроф (вулканические извержения, таяние ледников или сильный лесной пожар) или деятельности человека (изменение свойств почвы и состава почвенной биоты пахотой, внесением удобрений, пестицидов и т.п.) местообитаниях, где затруднена встреча с микобионтом вследствие разрушения мицелия в почве. Пионерные растения в сукцессии после нарушения обычно безмикоризны, а микотроф-

ные появляются позже, когда восстанавливается поврежденный мицелий (Brundrett, 1991). Растения в агроценозах обычно колонизированы микобионтами в меньшей степени, чем в природных местообитаниях. Обычно безмикоризное состояние коррелирует с травянистой жизненной формой и укороченным жизненным циклом, при котором микориза не успевает сформироваться или невыгодна растению, т.к. в начале симбиоза микобионт более потребляет, чем дает растению (Каратыгин, 1993). Среди древесных и кустарниковых форм полностью НМ только представители сем. Proteaceae (около 1 тыс. видов), распространенные в Южном полушарии. Для растений этого семейства, а также Бобовых, характерным компенсаторным механизмом, заменяющим микоризу, являются так называемые «кластерные» или щетковидные корни – плотные скопления латеральных корней до 2 см в длину (Brundrett et al., 1996). Часто НМ статус сопровождается также гипертрофированным развитием корневых волосков. У злаков и многих других Однодольных формируются плотные волокнистые массы корней, близкие по функциям к корням Протеиных.

Среди травянистых растений не образуют микориз паразитические (представители пор. Santalales и сем. Orobanchaceae) и насекомоядные, а также первичноводные растения (Частуховые, Шейхцериевые, Рдестовые, Ситниковые) (Newman, Reddell, 1987). У некоторых вторичноводных представителей наземных семейств Покрытосеменных (*Littorella uniflora* (сем. Plantaginaceae), *Lobelia dortmanna* (сем. Lobeliaceae), *Ranunculus flammula* (сем. Ranunculaceae), *Polygonum amphibium* (сем. Polygonaceae), *Epilobium hirsutum* (сем. Lythraceae), *Veronica anagallis-aquatica* (сем. Scrophulariaceae), *Myosotis palustris* (сем. Boraginaceae) и др.) исследованиями последних лет обнаружены микоризы (Beck-Nielsen, Madsen, 2001; Nielsen et al., 2004). Безмикоризны многие эпифиты, но некоторые образуют АМ, ОМ или ЭрМ (Brundrett, 2002). Достаточно редко наблюдается микоризообразование у галофитов, но для ряда видов, обитающих на засоленных почвах (*Plantago maritima*, *Artemisia maritima*, *Aster tripolium*), показано формирование типичной АМ (Brundrett, 1991; Landwehr et al., 2002).

Среди крупных семейств Покрытосеменных НМ состояние преобладает у представителей Brassicaceae, Chenopodiaceae, Caryophyllaceae, Commelinaceae, Paraveraceae, Polygonaceae. Ра-

нее считалось, что преимущественно НМ виды Суревцевые (74%), но при более детальном исследовании выявлено наличие АМ у многих видов рода *Carex* и ЭМ у представителей рода *Kobresia* (Massicotte et al., 1998; Muthukumar et al., 2004). Микоризный статус Осоковых в значительной мере зависит от условий окружающей среды – в том числе, неравномерности увлажнения в течение сезона вегетации. Неизвестно, первичен НМ статус Осоковых или приобретен в процессе расселения в местообитания, где микоризы не были благоприятны для растения.

Единой причины безмикоризности растений не существует, действует комплекс факторов окружающей среды, а также эколого-физиологические и биохимические особенности растений (табл. 7). Например, вторичные метаболиты Крестоцветных подавляют микоризообразование (причем и у растений других семейств, растущих рядом с Крестоцветными, также), и все сведения о микоризообразовании у диких представителей этого семейства касаются заселения мертвых кортикальных клеток растения без образования арбускул (Vierheilig et al., 2000). Эти ингибиторные вещества – изотиоцианаты – образуются при ферментативном гидролизе серосодержащих вторичных метаболитов Крестоцветных глюкоинозилатов, которые часто бывают летучими. Кроме фунгицидной, у них предполагается антибиотическая, аллелопатическая и инсектицидная активность (Koide, Schreiner, 1992). У вида *Urtica dioica*, представителя преимущественно НМ сем. Urticaceae было показано наличие хитин-связывающего лектина, агглютиниана UDA, потенциально ингибирующего рост гриба, хотя другие растительные лектины обладают меньшим фунгистатичным действием и присутствуют у микотрофных растений. Часто затруднительно разграничить прямое ингибирование растением роста гриба и просто неспособность растения к выделению веществ, являющихся сигналом к началу микоризообразования. Возможно также одновременное присутствие обоих механизмов (Koide, Schreiner, 1992).

Существовали попытки объяснения отсутствия микориз у отдельных групп, таких как сем. Caryophyllaceae, историей происхождения. Гвоздичные происходят из высокогорных аридных местообитаний, где микоризообразование затруднено большой сухостью субстрата (Селиванов, 1981), но почти все современные аридные растения микотрофны. НМ растения обладают различными компенсаторными механизмами

Таблица 7. Возможные причины безмикоризного состояния растений*

Фактор, обуславливающий немикоризность	Механизм действия	Примеры безмикоризных растений
Короткий жизненный цикл растения	Микориза не успевает сформироваться	Однолетние травянистые Покрытосеменные
	Микориза становится «выгодной» для растения не сразу после формирования	
Состояние и качество почвы: нарушение структуры почвы наличие доступных растению минеральных соединений	Гифы микоризообразователей механически повреждаются, встреча их с растением затруднена	Безмикоризные растения в агроценозах
	Микоризообразование подавляется наличием доступных растению соединений фосфора	
Водные и переувлажненные местообитания	Отсутствует контакт корневой системы растения с почвой	Виды поп. <i>Salviniales</i> , <i>Stratiotes</i>
	Недостаток кислорода препятствует развитию микоризообразователей или ингибирует прорастание спор и инфекцию новых особей	<i>Alismataceae</i> , <i>Potamogetonaceae</i> , <i>Scheuchzeriaceae</i> , сфагновые мхи
Сильно засоленные местообитания	pH почвы находится в неблагоприятной для развития микобионтов области	Галофиты
Экстремальные или нарушенные местообитания	Снижается конкуренция с другими видами растений – микориза «невыгодна»	Рудеральная флора или растения агроценозов
	Затруднена встреча с потенциальным хозяином	
Биохимические факторы	Вторичные метаболиты растений обладают фунгицидным или фунгистатическим действием	<i>Brassicaceae</i> (<i>Alliaria petiolata</i>), <i>Urticaceae</i>
Неясные причины		Листостебельные мхи немикотрофны в отличие от печеночных

* – использованы данные из следующих работ: Каратыгин, 1993; Brundrett, 1991; 2002; Brundrett et al., 1996; Bruns, Shefferson, 2004; Koide, Schreiner, 1992; Read et al., 2000; Roberts, Anderson 2001; Smith, Read, 1997.

для интенсификации поглощения элементов минерального питания, включающими разнообразными изменениями корневой системы и использование растениями дополнительных источников минерального питания (табл. 8).

Причины безмикоризности некоторых групп растений неизвестны. Например, не образуют микоризы Зеленые мхи, хотя среди Печеночных микоризообразование широко распространено. Предполагают, что полифенольные соединения в составе клеточной стенки мхов ингибируют микоризообразование, но, вероятно, преимущества, предоставляемые наличием этих соединений, перевешивают утрату симбиоза.

Классификация микориз

Классификация микориз представляет собой сложный и запутанный вопрос. Этому посвящен ряд работ (Доминик, 1963; Горбунова, 1955; Селиванов, 1973; 1981; Катенин, 1968; Brundrett, 2004 и др.), где приводятся системы типов микориз и обсуждается правомерность употребления в различных случаях тех или иных терминов. Первая попытка разделить микоризы на типы была сделана Франком (Frank, 1887). Он писал, что «относит все формы к эктотрофным, если гриб, питающий растение, находится вне его, и к эндотрофным, если гриб проникает внутрь некоторых клеток корня». Однако Мелин (Melin, 1953) наблюдал внутриклеточную инфекцию у ряда древесных пород (*Larix*, *Betula*, *Populus*) в

Таблица 8. Компенсаторные механизмы безмикоризных растений*

Механизм, компенсирующий отсутствие микоризы	Примеры растений	
Приспособления корневой системы к безмикоризному образу жизни: · гипертрофированное развитие корневых волосков	Травянистые НМ Покрытосеменные, сем. Proteaceae	
· щетковидные «кластерные» корни (скопление латеральных корней) с избытием корневых волосков	Сем. Proteaceae, некоторые представители сем. Fabaceae	
· утолщенные корни · связывающие песок корни	Сем. Cyperaceae, Haemodoraceae, Restionaceae	
Альтернативные источники питания растения	Насекомые	Насекомоядные растения (<i>Drosera</i> и др.)
	Минеральные элементы, растворенные в воде, собирающиеся в листьях, всасываемые через волоски листьев	Эпифиты из сем. <i>Bromeliaceae</i>
	Другие растения	Паразитические растения из сем. Loranthaceae, Orobanchaceae, Scrophulariaceae и др.
Накопление биомассы в корневой системе, а не в надземной	Сем. Cyperaceae	
Наличие запасяющих органов	Травянистые НМ Покрытосеменные	

Условные обозначения: см. в тексте.

* – использованы данные из следующих работ: Каратыгин, 1993; Brundrett, 2002; Brundrett et al., 1996; Muthukumar et al., 2004.

эктотрофных микоризах и назвал эти микоризы экто-эндотрофными. По мнению И.А. Селиванова, этот тип представляет собой просто стадию развития эктотрофной микоризы, встречающуюся либо у старых и ослабленных растений, либо у молодых, но растущих в неблагоприятных условиях (Селиванов, 1981). Также вносят путаницу сами термины «экто-, эндотрофная микориза», обозначающие как структурные изменения корней, вызываемые грибами, так и физиологические особенности корневого питания растения. Позднее они были заменены более четкими терминами «эктомикориза» и «эндомикориза» применительно к корневым структурам (Reugeton et al., 1969). В настоящее время термин «эндомикориза» практически вышел из употребления, т.к. выяснилось, что объединяемые под этим назва-

нием типы ассоциаций (АМ, ЭрМ, ОМ) значительно различаются по происхождению, анатомическому строению и функциям (Brundrett, 2004).

В большинстве исследований последних лет выделяют семь основных типов микориз: арбускулярная (АМ), эктомикориза (ЭМ), эктэндомикориза (ЭЭМ), эрикоидная (ЭрМ), арбутоидная (АрМ), монотропидная (ММ) и орхидная (ОМ). Два последних типа относят к эксплуативным, прочие в большинстве случаев представляют собой сбалансированные ассоциации (Smith, Read, 1997 и мн. др.). Основные характеристики перечисленных типов приведены в табл. 9. Классификация на практике основана на морфологических и анатомических особенностях, т.к. связи между колонизацией мико-

Таблица 9. Эволюционные и функциональные категории растительно-грибных ассоциаций (по Brundrett, 2002)

Ассоциация:	АМ	ЭМ	ЭрМ	ОМ	Эксплуативная микориза	Патогены	Эндифиты
растение – основное местообитание гриба	+	+	?	?	-?	+	+
способность гриба эффективно поглощать минеральные вещества из почвы	+	+	+	+	- или +		
высокая специализация гиф в зоне контакта	+	+			+ или -	+	-
коэволюция гриба и растения	+	+	?	-?			
приблизительный возраст ассоциации, млн. лет	>4	>1	<1	~1	настоящее время	>10	>4
специфичность гриба и растения-хозяина	низкая	средняя	средняя	высокая, средняя	очень высокая	разная	высокая?
Роль:							
поток минеральных веществ к растению	+	+	+?	+	+		
поток органического вещества к грибу	+	+	+?	- или +?	-	+	+ -
поток органического вещества к растению	-(+)	-(+)	-	+ или -	+		
Растение:							
переход к новым эволюционным линиям грибов	-	+	+	+	+		
продолжение вовлечения новых линий растений в симбиоз	?	+			+	+	+
фотосинтез	+(-)	+(-)	+	+(-)	-	+	+
облигатность ассоциации	+ или ±	+	+?	+ или -	+		
Гриб:							
множественность линий грибов	-	+	+	+	+	+	+
продолжение вовлечения новых линий грибов в симбиоз	-	+	+?	+	+	+	+
облигатность (хозяин необходим для роста)	+	+	?			+	+или -?
способность к самостоятельному росту (в аксеничной культуре)	-	+ или -	+	+	+ или -	+ или -	+
категория микоризных грибов	1	2	2 или 3	1, 2, 3 или 4	НМ		

Условные обозначения: ? – необходимы дальнейшие исследования; () – иногда встречающийся необычный статус; категории микоризных грибов: 1 – синхронного происхождения с наземными растениями;

2 – синхронного происхождения с покрытосеменными растениями

3 – недавно вступившие в образование ассоциаций

4 – не коэволюционировавшие с растениями;

прочие обозначения см. в тексте.

бионтом и изменением физиологических параметров растения во многих случаях остаются неисследованными. Структурные особенности, определяющие тип микоризы, могут регулироваться одним из симбионтов или взаимоотношениями между ними. Предпочтение отдается особенностям, определяемым растением-хозяином, т.к. черты строения, контролируемые микобионтом очень вариабельны: например, на корневой системе одной особи ЭМ растения можно обнаружить множество морфотипов микоризных окончаний, образованных разными видами грибов (Brundrett, 2004).

Сбалансированные микоризы

Арбускулярная микориза (АМ).

Наиболее широко распространенный тип микориз в растительном мире. Ее образуют более 300 тыс. видов растений, преимущественно травянистых, и около 150 видов грибов*, малоспецифичных к хозяину, облигатных симбионтов, относимых в настоящее время к 3 семействам (Glomeraceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae) пор. Glomerales отдела Glomeromycota (Schüssler et al., 2001). Они монофилетичны по происхождению (что подтверждается и морфологическим единообразием) и эволюционировали, по-видимому, независимо от других групп грибов, утратив совершенную стадию. Некоторыми авторами приводятся сведения о наличии полового процесса у как минимум одного вида из этой группы, но не указано, у какого именно и в каких работах опубликованы исходные данные (Kendrick, 2001). Гломусовые грибы представляют собой несколько древних эволюционных линий, которые могли дивергировать до или после того, как они начали образовывать микоризы (Redecker et al., 2000b; Schüssler et al., 2001). Они распространены повсеместно и обитают как в стабильных, так и в нарушенных сообществах. Популяции АМ грибов занимают в течение долгого времени одни и те же местообитания, если в экосистеме не происходят серьезные нарушения или она не переведена в агроценоз с монокультурой. Микобионт образует несептированный многоядерный гетерокариотический мицелий, который присутствует в межклетниках растения-хозяина, образуя

* – эта цифра показывает количество видов, идентифицированных на основании морфологии, но данные последних исследований с применением молекулярных методов позволяют предположить, что видов АМ грибов значительно больше (Fitter et al., 2005)

внутриклеточные структуры – арбускулы и везикулы, по названиям которых этот тип микориз ранее называли «везикулярно-арбускулярным». Известно, что споры АМ грибов многоядерны, но генетика АМ грибов пока остается малоизученной. Неясно, отображает ли последовательность 1 молекулы ДНК геном одного изолята, что затрудняет интерпретацию данных полевых исследований (Finlay, 2005). Геном АМ грибов достаточно большой (от 0,3 до 1,12 пг ДНК на ядро в зависимости от вида), что также затрудняет генетические исследования (Bonfante, 2003).

Вопрос первой важности для понимания облигатной биотрофии микобионтов АМ – способны ли АМ грибы к синтезу липидов без растения-хозяина, т.к. липиды – их основные запасные вещества. В присутствии корней НМ растений у *Glomus* не идет синтез липидов в прорастающих спорах, хотя происходят все прочие метаболические процессы. В любом случае, регуляцией растением метаболической активности микобионта можно объяснить облигатную биотрофность АМ грибов (Vècard et al., 2004).

Арбускулы представляют собой контактную зону симбионтов, через которую осуществляется транспорт. Это гифальные древоподобные структуры (название дано в 1905 г. Галло (Gallaud, 1905)), образующиеся внутри клеток коры и заключенные в плазмалемму растительной клетки. Обилие арбускул обычно коррелирует со степенью колонизации молодых корней микобионтом (Toth et al., 1990). Клетка, содержащая арбускулу, сохраняет жизнеспособность. Арбускулы начинают формироваться через 2 дня после внедрения гриба и через 4–15 дней отмирают, и клетка возвращается в исходное состояние. Несколькими независимыми исследованиями было показано, что у разных видов АМ растений гены переносчиков фосфата экспрессируются только в микоризованных корнях, в клетках, содержащих арбускулы (Harrison et al., 2002 и др.). После переваривания арбускулы растение может получить дополнительный источник питательных веществ, но основной обмен между симбионтами происходит через живую контактную зону. Везикулы – запасающие структуры – тонкостенные, вздутые, часто наполненные липидами. Могут развиваться в больших количествах, особенно в старых корнях, так что кора выглядит как сплошная масса везикул. Арбускулы свойственны всем представителям отд. *Glomeromycota* (за исключением случаев эксплуативных микориз), а везикулы (запасающие структуры) не образуют виды сем. *Gigasporaceae*, ввиду чего наиболее распростра-

ненным в настоящее время названием этого типа симбиоза является «арбускулярная микориза» (Brundrett, 2004)*. В зависимости от того, какие из структур (арбускулы или везикулы) преобладают в корне, можно сделать вывод о том, является ли микориза сбалансированной (преобладание арбускул) или равновесие сместилось в сторону паразитизма гриба на фитобионте (преобладание везикул). Помимо внутри- и межклеточных структур у АМ грибов имеются экстраматричные гифы, отходящие от растения-хозяина в почву (на расстояние до 8 см, что значительно превышает длину корневых волосков), на которых могут формироваться бесполое хламидоспоры с толстой многослойной клеточной стенкой, способные к долгому периоду покоя. Благодаря этим гифам растение может использовать намного больший объем почвы, чем при отсутствии микоризы. Гифы делятся на более толстые – поисковые (20–30 мкм в диаметре) и тонкие (2–7 мкм) – всасывающие, которые могут формировать разветвленные всасывающие структуры в местах скопления питательных веществ. Количество свободного мицелия может достигать 55 м на 1 г почвы (Read, 1984). Хламидоспоры могут формироваться поодиночке или в агрегатах до 2 см в диаметре (Brundrett et al., 1996). Это приспособления для долговременного выживания в почве, когда растение-хозяин недоступно или находится в состоянии покоя. Хламидоспоры выполняют функции запасаания (у видов, не образующих везикулы), переживания неблагоприятных условий и размножения. Спора прорастает, внедряется в корень растения-хозяина через корневой волосок (они сохраняются, в отличие от ЭМ симбиоза, где их замещают микоризные окончания), формируют аппрессории и проникают в зону элонгации корня. Гифы проникают в клетки или между клеток коры, но не входят в меристему или эндодерму. Корень продолжает нормально функционировать, если не заселена стела. АМ может составлять 4–17% сухого веса корня и содержать до 1,4 м гиф на 1 см корня (Harley, 1989).

Филогенетические исследования показали, что наиболее примитивные гломусовые грибы имели диморфные споры (Morton, Redecker, 2001 и др.). Один из типов спор, скорее всего,

функционировал преимущественно как короткоживущая запасающая структура. Филогенетическое происхождение спор АМ грибов неизвестно, и они могли с большей вероятностью эволюционировать от запасающей структуры, чем от половой споры. Появлению хламидоспор и везикул должно было предшествовать много сходных биохимических и генетических процессов, т.к. обе структуры возникли из утолщений неспециализированных гиф и накапливают запасные вещества. Грибы, не имеющие везикул в настоящее время, скорее всего, произошли от предков с везикулами.

Наблюдая микоризные ассоциации у разных растений, Галло (Gallaud, 1905) выделил два хорошо различающихся морфологических типа АМ, которые он назвал *Arum* и *Paris*-тип по названию растения-хозяина. В корнях с *Arum*-типом АМ гифы распространяются в коре, продвигаясь вдоль между клетками растения-хозяина. Это возможно благодаря росту гиф по продольным воздухоносным каналам (Brundrett et al., 1996). В *Paris*-типе гифы АМ гриба образуют завитки между клетками, т.к. у растения нет воздухоносных каналов. Между типами АМ возможны физиологические различия, т.к. предполагается, что контактной зоной между симбионтами в *Paris*-типе являются не только арбускулы, но и гифальные завитки. Арбускулярная зона контакта одинакова в обоих типах (Peterson, Massicotte, 2004). Арбускула отделена от цитоплазмы растительной клетки периабускулярной мембраной и материалом матрикса контактной зоны. И матрикс, и периабускулярная мембрана образуются из растительных тканей. Матрикс, находящийся между грибной клеточной стенкой и периабускулярной мембраной, является апопластным компартментом, составленным компонентами растительной клеточной стенки (целлюлоза, пектин, β -1,3-глюканы и гликопротеины, обогащенные пролином). Существует точка зрения, что развитие апопластной зоны между грибной структурой и растительной клеткой – важнейшее событие, сопровождающее успешное микоризообразование (Bonfante, Perotto, 1995). АТФ-азная активность, обнаруженная у плазмалеммы грибной клетки в зоне контакта, показывает, что в обменных процессах присутствует активный транспорт веществ, и гены мембранных АТФ-аз у растений экспрессируются более активно в микоризованных корнях (Peterson, Massicotte, 2004). Транспортеры углерода и фосфора в АМ пока недостаточно изучены. Еще одно изменение в кортикальных клетках, содержащих арбускулы, заключается в изменениях экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие

* Ранее этот тип микоризы часто называли «фикомицетной эндомикоризой», чтобы отличить от эндомикоризных симбиозов, образуемых Орхидными или некоторыми представителями Вересковых с базидиомицетами и аскомицетами, но в настоящее время этот термин вышел из употребления ввиду утраты таксономического значения названием «Фикомицеты»

щие в метаболизме углеводов, что приводит к возникновению направленного транспорта сахарозы из флоэмы к арбускулам. Откладывание матрикса контактной зоны и формирование периарбускулярной мембраны подразумевает значительные изменения в функционировании клетки растения, и предполагается, что изменения в цитоскелете растительной клетки могут играть в этих процессах важную роль, но этот вопрос требует дальнейшего изучения (Peterson, Massicotte, 2004). Гифы микобионта, находящиеся в межклетниках, хотя и не окружены мембранами растительного происхождения, могут принимать участие в транспорте, возможно, этим путем происходит перенос углерода к микобионту. В этом случае в транспорте задействована мембрана только микобионта.

Разница между типами АМ находится под генетическим контролем растения-хозяина, но не является специфичной для рода растения, поэтому желательна введение для этих типов наименований, не связанных с родовыми названиями. М. Брандретт предлагает называть *Arum*- и *Paris*-типы «линейным» («linear») и «спиральным» («coiling») соответственно (Brundrett, 2004). Экспериментально установлено, что один микобионт с разными растениями может формировать и тот, и другой тип АМ.

АМ относят к сбалансированным, несмотря на то, что в первые недели после колонизации микобионтом часто наблюдается ухудшение состояния растения. Но кратковременные потери впоследствии компенсируются долгосрочной выгодой (ссылки на оригинальные исследования см. в Johnson et al., 1997). АМ распространены повсеместно, преобладают в ценозах с преимущественно травянистой формой растений (луга, степи, саванны, полупустыни), в умеренных лесах встречаются у растений, обитающих под пологом. В тропических лесах, для которых характерно отсутствие сезонности и низкое содержание органических веществ в почвах, АМ образуют также деревья и кустарники. Функциональное разнообразие АМ грибов пока неизвестно, хотя принимая во внимание наличие некоторых высокоспецифичных АМ симбиозов (см. «Эксплуативные микоризы»), следует отметить, что не все АМ грибы экологически одинаковы (Bidartondo et al., 2002). Существуют данные о том, что микобионты различаются по способности свободного мицелия поглощать соединения фосфора из почвы (ссылки на оригинальные исследования см. в Koide, Mosse, 2004). Исследования луговых трав умеренной зоны также показали, что определенные виды растений чаще коло-

низируются определенными видами АМ грибов (Vandenkoornhuise et al., 2002).

Эктомикориза (ЭМ)

ЭМ образуют около 5–6 тыс. видов растений*, почти исключительно древесных или кустарниковых из Голосеменных (сем. Pinaceae, Cupressaceae) и Покрытосеменных (18 семейств, из которых важнейшие Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Myrtaceae, Tiliaceae) (Molina et al., 1992). Среди травянистых растений ЭМ указана для *Kobresia bellardii* (Cyperaceae) и *Polygonum viviparum* (Polygonaceae), а также видов рода *Carex* с *Cortinarius cinnamomeus* (Massicotte et al., 1998; Harrington, Mitchell, 2002). Только тщательное микроскопическое исследование анатомии корневой системы растения может служить доказательством наличия у него ЭМ. В старой литературе ошибочно указаны как эктомикоризные роды *Fraxinus*, *Ulmus* и др., формирующие нетипичную АМ, но по морфологии корневой системы сходные с ЭМ растениями (см. Brundrett, 2002; 2004). Микобионты ЭМ – около 6 тыс. видов грибов, преимущественно агарикоидные и гастероидные базидиомицеты (сем. Amanitaceae, Hygrophoraceae, Tricholomataceae, Cortinariaceae, Boletaceae, Russulaceae, Pisolithaceae, Sclerodermataceae), реже аскомицеты (сем. Geoglossaceae, Helvellaceae, Pezizaceae, Elaphomycetaceae, Tuberaeae) (Kendrick, 2001). Среди представителей этих преимущественно симбиотрофных семейств также встречаются исключения, например, *Boletinellus merulioides* и *Xerocomus parasiticus*, близкородственные микоризным видам, но не являющиеся микобионтами ЭМ. Примерно 40% всех макромицетов образуют микоризы. Большинство гастероидных базидиомицетов, для которых показана связь с агарикоидными родами, микоризны, также как и родственные им агарикоидные. Большинство из них – космополиты, многие приурочены к высокогорным хвойным лесам. Эти виды гастеромицетов часто имеют гипогейные плодовые тела в связи с низкими температурами и значительными суточными температурными колебаниями (Miller, 1983). Для представителей рода *Mesophellia* с гипогейными плодовыми телами показан уникальный тип ЭМ, при котором микоризные корни

* – по данным, приведенным в обзоре Р. Финлея, в настоящее время предполагаемое число видов ЭМ растений около 8000, а микобионтов ЭМ – от 7 до 10 тыс. видов, и отмечено, что оно растет по мере увеличения количества проводимых молекулярными методами исследований (Finlay, 2005).

входят в плодовые тела микобионта (Dell et al., 1990). Среди гастероидных НМ представители пор. *Nidulariales* и *Tulostomatales*. Также предполагается наличие зигомицетных ЭМ, образованных видами рода *Endogone* (Kendrick, 2001).

ЭМ грибы могут быть ассоциированы с узким или широким кругом хозяев, наиболее частый случай – множество растений-хозяев (Horton et al., 2005; Horton, Bruns, 1998, 2001; Kennedy et al., 2003; Molina et al., 1992). У некоторых микобионтов (*Suillus*, *Rhizopogon*) наблюдается высокая специфичность к хозяину, у других, напротив, круг хозяев очень широк (Bruns et al., 2002). Гифомицет с темноокрашенным мицелием *Cenococcum geophilum* Fr. формирует так называемую «черную микоризу» более чем со 130 видами деревьев и кустарников в лесных сообществах Северного полушария (Fogel, Hunt, 1983). Одновременно одна особь растения может содержать несколько различных видов ЭМ симбионтов (Smith, Read, 1997). У *Pseudotsuga menziesii* высотой около 30 м имеется порядка 100 млн. микоризных окончаний, которые могут содержать 10–12, а то и более видов ЭМ грибов. Для вида *Pseudotsuga menziesii* показано микоризообразование с 2000 видами микобионтов из десятков семейств, из которых 72% способны к микоризообразованию с множеством видов растений-хозяев (Molina et al., 1992). В процессе развития растения происходит сукцессия микобионтов, и с возрастом растение может приобретать новых партнеров по ЭМ. Например, у *Pinus monticola* в возрасте 15 лет отмечено 5 видов микобионтов, 30–40 лет – 34–37 видов, 175–215 лет – 78 видов грибов (Miller, 1983). В начале сукцессии пионерные виды древесных растений, как правило, образуют микоризы со специализированными микобионтами, а на более поздних стадиях – с менее специфичными видами (Molina et al., 1992). Вероятно, это связано с тем, что пионерные виды микоризуются преимущественно спорами микобионта и со способностью спор специализированных микобионтов к продолжительному покою и последующей инокуляцией растения propagулами из «банка спор» – необходимой стратегией для подбора нужного вида растения-хозяина (Bruns et al., 2002). Среди растений большинство имеет очень широкий круг симбионтов, включающий виды из филогенетически удаленных линий. Даже в небольших однопородных лесах может встречаться свыше 50 видов ЭМ грибов (Horton, Bruns, 2001). Генерализм растений может объясняться, как минимум, двумя причинами: он повышает шансы выживания семян, оказавшихся в

новых для них местообитаниях, и таким образом увеличивает число доступных растениям местообитаний и может увеличивать доступ растений к питательным веществам, если микобионты варьируют по способности усваивать минеральные вещества почвы (Bruns et al., 2002). Высокая специфичность характерна для *Pisonia grandis* – вида, образующего микоризу только с одним микобионтом из Телефоровых (Chambers et al., 1998). Тот факт, что многие роды микобионтов ЭМ формируют симбиоз с определенными семействами растений – еще одно свидетельство коэволюции грибов и растений (Molina et al., 1992).

Неясно, какие преимущества дает микобионту специализация. В случае если специализация приводит к большей физиологической совместимости симбионтов, возможно, она способствует повышению конкурентоспособности растения-хозяина и лучшему доступу микобионта к ресурсам хозяина. Недостатком ассоциации со специализированным микобионтом является снижение шансов установления симбиоза по сравнению с ассоциациями с грибами-генералистами. Эта проблема решается посредством способности спор узкоспециализированных микобионтов к продолжительному периоду покоя в ожидании появления необходимого растения-хозяина, как в случае ЭМ ольхи и *Alpova diplophloeus* (Bruns et al., 2002). В качестве возможного преимущества специализации предполагается снижение подобным путем возможности эпипаразитизма. Специфичные симбиозы снижают шансы непрямои помощи конкурирующим видам растений, растения со специфичными микобионтами лучше защищены, чем виды с широким кругом микоризообразователей (Bidartondo et al., 2001; Molina et al., 1992) (более подробно см. «Эксплуативные микоризы»).

Монофилетичная группа родов, включающая *Suillus*, *Rhizopogon*, *Truncocolumella*, *Gomphidius*, *Chroogomphus*, демонстрирует высокий уровень специфичности к хозяину. Представители этих родов приурочены почти исключительно к видам сем. Pinaceae, и это наиболее крупная столь специфичная группа ЭМ микобионтов (Bruns et al., 2002). Кроме того, большинство сциллоидных видов приурочены к родам, под родам или группам видов в пределах сем. Pinaceae. Исследованиями М. Гардес и Т. Брунса было показано, что, несмотря на доминирование плодовых тел *Suillus pungens* в изучаемом ЭМ сообществе, в микоризных окончаниях он являлся минорным компонентом. Было выдвинуто предположение, что этот микобионт более эффективно, чем про-

чие поглощает органические соединения из тканей хозяина при равных способностях к обеспечению его водой и минеральными веществами, и таким образом, слишком «дорого обходится» растению, ввиду чего растение-хозяин минимизирует число микоризных окончаний, заселенных этим видом (Gardes, Bruns, 1996). Это предположение может дать хотя бы частичный ответ на вопрос о преимуществах специализации для микобионтов ЭМ. Интересно также то, что *Suillus grevillei*, специфичный к видам рода *Larix*, может образовывать микоризы с другими растениями, например, *Pinus* или *Pseudotsuga*, но при этом в микоризном окончании накапливаются фенольные соединения – растение реагирует на микобионт как на патоген, что может быть еще одним объяснением узкой специализации (Duddridge, 1986 – цит. по Bruns et al., 2002). Возможно, что многие виды, считающиеся малоспецифичными, на самом деле состоят из ряда специализированных к растению-хозяину популяций (Buscot et al., 2000). Недавно было показано, что существующие между видами и штаммами ЭМ грибов различия по степени специфичности к растению-хозяину связаны с количественными изменениями в генной экспрессии и изменениями в нуклеотидных последовательностях связанных с симбиозом генов (Le Quéré et al., 2004).

Впервые характеристика ЭМ была дана А. Франком в 1887 г. По его мнению, основными признаками ЭМ являются: изменение морфологии корневой системы растения-хозяина (отсутствие типичных корневых волосков, редукция корневого чехлика и наличие грибного чехла на поверхности молодых корневых окончаний); наличие сети гиф, проникающих между клетками коры, связанных с наружными гифами; отсутствие внутриклеточного мицелия в клетках коры; наличие микоризы на корнях в течение всей жизни растения; распространение микоризы по всей поглощающей зоне корневой системы (Frank, 1887). Для ЭМ характерно значительное морфологическое изменение корневой системы растения-хозяина за счет аномального ветвления латеральных корней и наличия на их поверхности мицелиальных чехлов. Структура чехла может значительно меняться при колонизации растения разными видами микобионтов (Agerer, 1995). Из-за близкого контакта гиф с растительными клетками, активного ветвления гиф и наличия в них многочисленных митохондрий и других органелл, было сделано заключение, что зоной контакта симбионтов и двустороннего транспорта веществ служит сеть Гартига. Это

мицелиальная структура, располагающаяся в межклетниках эпидермиса или коры, наличие транспортных процессов в которой (перенос фосфора и углерода) в настоящее время подтверждено исследованиями с применением микрорадиоавтографического метода (ссылки на оригинальные данные см. у Peterson, Massicotte, 2004). Внутренняя часть чехла, примыкающая к слою клеток эпидермиса, может являться второй контактной зоной, а в случае, когда сеть Гартига не развивается (например, у *Pisonia grandis*), – единственной (Ashford, Allaway, 1982; Peterson, Massicotte, 2004). При нормальном развитии симбиоза внутриклеточные грибные структуры не формируются (Harley, Smith, 1983). В некоторых типах ЭМ формируются транспортные клетки – модифицированные клетки растения-хозяина. Апопластный компартмент, аналогичный контактному матриксу в АМ, создается веществом, откладывающимся между клеточными стенками гриба и растения в месте контакта симбионтов. Цитоплазматические мембраны и гриба и растения вовлечены в процессы переноса веществ. Клеточные стенки обоих симбионтов играют важную роль на всех этапах формирования и функционирования ЭМ, в местах контакта симбионтов они модифицируются (Tagu et al., 2002). Пока не выяснено, приводят ли модификации клеточных стенок растения во внутренней части чехла и сети Гартига к увеличению проницаемости клетки для неорганических ионов и органических молекул сравнительно с клетками, не контактирующими с гифами микобионта. Характерной особенностью клеточных стенок растения-хозяина в зоне сети Гартига является наличие кислых инвертаз, расщепляющих сахарозу до глюкозы и фруктозы в апопластном компартменте. Эти сахара могут быть усвоены грибными гифами (Nehls et al., 2001). Для этого типа микориз характерно наличие обильного наружного мицелия, частично представленного чехлом на корневом окончании, частично – веревидными мицелиальными структурами, распространяющимися в почве на расстояние до 20 см от корня (Duddridge et al., 1980). ЭМ мицелий чувствителен к концентрации кислорода в почве, и его развитие подавляется избыточным количеством влаги, а рост обычно направлен в сторону более сухих верхних горизонтов почвы (Read, 1984). Часто гифы свободного мицелия агрегированы в тяжи, иногда называемые ризоморфами, но отличающиеся от настоящих ризоморф отсутствием отчетливого апикального роста. В середине зрелого тяжа проходят гифы

большого диаметра, обычно без цитоплазмы, окруженные более тонкими гифами с цитоплазмой (Duddridge et al., 1980). Считается, что именно по этим толстым гифам-сосудам идет основной транспорт воды и растворенных в ней соединений. Вегетативный мицелий микобионтов растений из сем. Pinaceae, таких как виды родов *Suillus*, *Thelephora*, *Pisolithus*, *Lactarius*, в верхних горизонтах почвы в хвойных лесах составляет большую часть биомассы микроорганизмов (Read, 1984). В микоризах древесных растений структуры микобионта составляют до 40% объема (Шубин, 1990).

Микоризные окончания не являются многолетними структурами, они существуют 6–16 месяцев. Образование микоризы состоит из следующих этапов: проникновение гиф между клетками коры корня с последующим формированием сети Гартига, образование чехла на поверхности корня, выход экстраматрикулярных гиф в окружающую почву. По морфологии выделяют два типа ЭМ: типичный для Покрытосеменных, где сеть Гартига расположена в эпидермисе, и присутствующий Голосеменным (Pinaceae) с сетью Гартига, пронизывающей многочисленные слои клеток коры (Brundrett et al., 1996). Существует несколько исключений – ЭМ Покрытосеменных с коровой сетью Гартига (*Dryas*), но в целом эти типы хорошо разграничены между группами растений (Brundrett, 2004). Как и в случае *Arum*- и *Paris*-типов АМ, эти особенности строения зависят от растения, и один микобионт способен образовывать оба типа ЭМ с разными растениями. Конвергенция в эволюции ЭМ растений выражается в формировании диморфной корневой системы с наличием коротких боковых корней, обладающих ограниченным апикальным ростом и высокой плотностью ветвления (Brundrett, 2002).

Структура и функции ЭМ, образованной разными микобионтами у одного вида растения, могут существенно различаться (Agerer, 1995). Микобионты ЭМ демонстрируют поразительное функциональное разнообразие по целому ряду признаков: способности усваивать те или иные источники азота, ответу на водный стресс, способности формировать «ризоморфы» и мн. др. ЭМ грибы различаются по способности к микоризообразованию при разных температурах, уровнях влажности и кислотности почвы (ссылки на оригинальные исследования см. в Bowen, 1994). Не только разные виды, но даже различные генотипы микобионтов ЭМ могут по-разному влиять на обмен веществ растения-хозяина (Guidot et al., 2003).

Не всегда возможно проследить связи между обилием и биомассой плодовых тел, количеством мицелия в почве и частотой встречаемости вида в микоризных окончаниях. Работы последних лет показывают, что над- и подземная структура ЭМ сообществ различна. Особенно существенна эта разница, когда речь идет о видах с подземными ПТ или в местах, где доминируют микоризы *Cenococcum geophilum* (Horton, Bruns, 2001; Yamada, Katsuya, 2001). По данным А. Дальберга, полученным при исследовании в старовозрастных еловых лесах южной Швеции, на виды ЭМ грибов, составляющие 70% годовой биомассы плодовых тел, приходится менее 30% микоризных окончаний (Dahlberg et al., 1997). Это несоответствие может объясняться различными жизненными стратегиями разных видов – «вложением» получаемых от растения органических соединений в вегетативные либо генеративные структуры, т.е., предпочтением вегетативного либо полового размножения (Horton, Bruns, 2001). Часто бывает так, что подземная часть сообщества по видовому составу более разнообразна, чем надземная (Horton, 2002). В природе сравнительно малое количество доминантных видов микобионтов формируют большинство микоризных окончаний (Gardes, Bruns, 1996). С появлением молекулярных методов исследования стало возможным прямое изучение микоризных окончаний и экстраматрикулярного мицелия и исследование структуры подземной части ЭМ сообщества (Bruns, Bidartondo, 2002; Gardes, Bruns, 1996; Landerweert et al., 2003 и мн. др.). Таким образом, стало возможным изучать отдельные генотипы микобионтов, что может служить ключом к разгадке их специфичности (Bruns, Bidartondo, 2002; Guidot et al., 2003).

Структура ЭМ сообщества значительно меняется во времени в зависимости от изменений концентраций углеводов, поступающих от растений, температуры и влажности почвы и ряда других факторов (Koide et al., 2005). Так как корневая система одного растения связана одновременно с несколькими видами микобионтов, видовой состав сообщества ЭМ грибов и относительные обилия видов могут оказывать существенное влияние на функционирование лесных ценозов, включая круговороты биогенных элементов, испарение и разложение подстилки (Baxter et al., 1999; Horton, 2002; Horton et al., 2005; Koide et al., 2005; Landerweert et al., 2003; Sakakibara et al., 2002).

Некоторыми исследователями ЭМ грибы подразделяются на факультативные и облигатные. Считается, что факультативные микоризообразователи мало зависят от высших растений и могут образовывать плодовые тела в их отсутствии, менее специализированы, мало содействуют росту растения и легко вытесняются облигатными симбиотрофами (Шубин, 1990). Из широко распространенных видов к факультативным относят *Laccaria laccata*, *Inocybe fastigiata*, *Paxillus involutus*, но основной признак факультативности – способность к плодоношению в отсутствие растения-хозяина – по отношению к ним не установлен. Также важным вопросом представляется изучение экологических ниш ЭМ грибов. В микоризе микобионт является одновременно сапротрофом и биотрофом. Группа ЭМ микобионтов таксономически неоднородна и разнообразна по свойствам сапротрофии и биотрофии. В отличие от сапротрофных видов, свободный мицелий симбиотрофных грибов способен проникать в минеральные горизонты (Шубин, 1998; Read et al., 2004; Rosling et al., 2003). По данным исследований, проведенных в хвойных лесах на юге Швеции, половина выявленных видов микобионтов ЭМ была ассоциирована с минеральными горизонтами, преимущественно, горизонтом E1, располагающимся сразу под органическим (Landeweert et al., 2003). Интересно, что микобионты, занимающие эти два местообитания различны, несмотря на то, что их первичный источник энергии – корни растения-хозяина – один и тот же (Read et al., 2004).

ЭМ – доминирующий тип микориз в лесах бореальной и умеренной зоны с выраженной сезонностью и высоким содержанием органических соединений в почвах. В лесных экосистемах ЭМ грибы могут составлять до одной трети микробной биомассы, и они ассоциированы с почти всеми всасывающими корнями древесных растений в северных, умеренных и некоторых субтропических лесах (Wallander et al., 2001). Важный источник видовой разнообразия ЭМ грибов – тропические леса, микобиота которых изучена недостаточно. Предполагается, что в этих ценозах присутствует множество неописанных представителей ЭМ родов *Lactarius* и *Russula*, по видовому разнообразию сопоставимых с доминирующим в бореальных лесах ЭМ родом *Cortinarius*, насчитывающим около 2000 видов (Finlay, 2005). Ранее считалось, что в тропических лесах ЭМ не имеет большого значения, т.к. в отсутствие сезонности большинство тро-

пических древесных пород образует АМ, но ЭМ представители сем. *Dipterocarpaceae* и *Fabaceae* из Африки и Юго-Восточной Азии являются важными компонентами саванн и тропических дождевых лесов.

Вероятно, что ЭМ возникла в меловом периоде одновременно с происхождением пор. *Fagales* и сем. *Pinaceae*. Линия *Fagales* включает сем. *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Juglandaceae*, *Muricaceae*, *Nothofagaceae* и *Fagaceae*, большинство представителей которых образует ЭМ (Brundrett, 2002).

Эктэндомикориза (ЭЭМ)

Многие исследователи не выделяют этот тип микориз, считая его возрастной стадией (молодой или, наоборот, стареющей) ЭМ или видоизменением ЭМ при неблагоприятных для растения условиях, когда микобионт переходит к паразитизму (Селиванов, 1973; Brundrett, 2004 и др.). В настоящее время этот тип достоверно известен только у видов *Larix* и *Pinus* в лесных питомниках или нарушенных местообитаниях, у прочих растений сходные структуры образует стареющая ЭМ. Условия, в которых наблюдалась ЭЭМ, нехарактерны для природных сообществ, растения не получали преимуществ от формирования микоризы, а конкуренция между видами грибов была ограничена. Микобионт, ранее идентифицированный на основании морфологических данных как несовершенный «штамм Е», образующий также и ЭМ, при обнаружении телеоморфы отнесли к аскомицетам (род *Wilcoxina*). В настоящее время круг микобионтов ограничивается 3 видами аскомицетов из пор. *Pezizales* (*Wilcoxina mikolae*, *W. rehmi*, *Sphaerosporella brunnea*) и 2 видами несколько реже образующих ЭЭМ несовершенных грибов *Phialophora finlandia* и *Chloridium paucisporum*, для которых показана связь с аскомицетами (Yu et al., 2001).

Микоризы этого типа характеризуются одновременным наличием структур ЭМ (чехла (более тонкого, чем у ЭМ) и сети Гартига) и внутриклеточных гиф микобионта в эпидермисе и коре растения-хозяина. Клетки корня, содержащие гифы микобионта, остаются живыми – в них присутствуют ядра и другие органеллы. Не было проведено работ, демонстрирующих, что в предполагаемых контактных зонах между симбионтами идет обмен, и ничего не известно о молекулярных аспектах колонизации корня микобионтом и развитии контактной зоны. Различия между ЭМ и ЭЭМ неясны, т.к. эти ассоциации не включают четко разделенные филогенетические линии сим-

бионтов, а грибы ЭЭМ плохо изучены. Возможны также случаи, когда сеть Гартига формирует один микобионт, а в клетки растения-хозяина проникают гифы другого, или проникновение в клетки растения происходит только в стареющих микоризных окончаниях (Peterson, Massicotte, 2004).

Эрикоидная микориза (ЭрМ).

Этот тип микориз приурочен к растениям сем. Ericaceae (Вересковые) из пор. Ericales, распространенных в Северном и Южном полушариях*. Наиболее экологически значимыми и распространенными являются роды *Calluna*, *Erica*, *Gaultheria*, *Rhododendron*, *Vaccinium* (Read et al., 2004). Вересковые доминируют в болотных ценозах, на торфянистых почвах с очень низким содержанием азота и высокой кислотностью, под пологом бореального леса и в субнивальном высокогорном поясе в Северном полушарии, а также встречаются в тропических дождевых лесах и даже на сухих песчаных равнинах Австралии. В тундре они смешаны с кустарничковыми представителями сем. Salicaceae и Betulaceae. В болотных биогеоценозах Вересковые выступают в роли «инженеров сообщества», так как древесные растения редко способны выживать в этих очень бедных минеральным питанием почвах (Read et al., 2004). Несмотря на географические и климатические различия этих мест обитания, все они характеризуются олиготрофными почвами с низкими значениями рН и наличием ряда факторов, вызывающих стресс растений (большое количество металлов в почве, сильно пониженная или повышенная влажность, повышенные или пониженные температуры и др.). Процессы разложения и минерализации при низких температурах и высокой влажности идут очень медленно (общий выход неорганического азота может быть менее 25% за 3 мес.), в том числе и потому, что органические вещества, образуемые Вересковыми, в изобилии содержат фенольные соединения, многие из которых токсичны для грибов и растений (фенольные кислоты) и ингибируют разложение подстилки (хиноны, в соединении с фульвиновыми и гуминовыми кислотами связывающие и ингибирующие ферменты) (Cairney, Meharg, 2003; Leake, Read, 1989; Read, 1984; Straker, 1996). ЭрМ образуют ас-

комицеты из пор. Leotiales (*Hymenoscyphus ericae* и его анаморфа *Scytalidium vaccinii*), Onygenales (*Muxotrichum setosum*, *Gymnascella dancaliensis* и их анаморфы из рода *Oidiodendron* (*O. griseum*, *O. majus*), *Pseudogymnoascus roseus* с анаморфой *Geomyces*) и Hypocreales (только анаморфа – *Acremonium strictum*) (Monreal et al., 1999). Всего известно около 130 микобионтов, хотя раньше считалось, что круг их весьма узок (Straker, 1996). Чаще всего ЭрМ образует *Hymenoscyphus ericae* и его анаморфа. Он формирует микоризу с 25 родами (*Calluna*, *Erica*, *Vaccinium*) и 2 тыс. видов деревьев и кустарников сем. Ericaceae в Северном полушарии (Harley, 1989; Read, 1984). Про микобионты Вересковых Южного полушария (бывшее сем. Ericaceae) известно мало, но показан род *Oidiodendron* и связь микоризообразователей с пор. Leotiales (Cairney, Ashford, 2002; Hutton et al., 1994). Для некоторых микобионтов бывшего сем. Ericaceae показана совместимость с Вересковыми Северного полушария, и наоборот (ссылки на оригинальные исследования см. в Cairney, Ashford, 2002). Физиологические особенности этих микобионтов мало изучены, но показано, что их способности к утилизации азот- и фосфорсодержащих органических соединений аналогичны таковым у более исследованных микобионтов ЭрМ Северного полушария (более подробно см. *Снабжение растения элементами минерального питания*). Грибы ЭрМ могут встречаться в почве в свободном виде и поддаются культивированию. Кроме того, с микоризой ассоциирован светло- и темноокрашенный стерильный мицелий. Были получены данные о базидиомицетных микобионтах ЭрМ (обнаружен мицелий с долипоровыми септами), но попытки синтезировать базидиомицетную микоризу с Вересковыми оказались безуспешными (Straker, 1996; Cairney, Ashford, 2002).

Hymenoscyphus ericae и другие микобионты ЭрМ могут одновременно быть ассоциированы с ЭМ окончаниями. Недавно эти ассоциации были показаны для ряда хвойных и лиственных пород деревьев (*Picea*, *Pinus*, *Betula*, *Populus*, *Salix*, *Quercus*), и выяснилось, что это достаточно широко распространенное явление (Cairney, Meharg, 2003; Villareal-Ruiz et al., 2004 и др.). Тем не менее, его экологическая значимость до сих пор неизвестна. В 2004г. впервые из ЭМ *Pinus sylvestris* был выделен микобионт, близкий к виду *Cadophora* (= *Phialophora*) *finlandia*, принадлежащему к комплексу *Hymenoscyphus ericae*, который *in vitro* образовывал ЭМ с сеянцами сосны и ЭрМ с сеянцами черники. ЭрМ стимулировала рост сеянцев и влияла на архитектуру

* До недавнего времени Вересковые Южного полушария выделялись в отдельное семейство в пределах пор. Ericales – сем. Ericaceae, но в настоящее время показано их близкое родство с видами сем. Ericaceae, и представители бывшего сем. Ericaceae (34 рода, включающие свыше 450 видов) составляют 7 триб сем. Ericaceae (Cairney, Ashford, 2002).

их корневой системы (Villareal-Ruiz et al., 2004). Кроме того, *Hymenoscyphus ericae* и подобные ему штаммы также являются эндофитами некоторых видов Печеночных мхов из Европы, Австралии и Антарктиды (Chambers et al., 1999; Duckett, Read, 1995). Эндофиты с простой септой и тельцами Воронина были обнаружены в ризоидах 16,2% печеночных мхов Великобритании, и эти ассоциации были чрезвычайно сходны по структуре с ЭрМ (Duckett et al., 1991). Физиология этого симбиоза и его значение пока неясны, но для бореальных и умеренных лесов, где печеночные мхи часто встречаются вместе с ЭрМ растениями, было сделано предположение, что мхи выступают в качестве депо инокулюма микобионта для прорастающих семян Вересковых, но доказательств этого отсутствуют (Duckett, Read, 1995). Напротив, флора островной и континентальной Антарктики ограничивается преимущественно лишайниками и мхами, и принципиальная возможность контакта мха и Вересковых отсутствует. Тем не менее, выделенный из антарктического печеночника *Cephaloziella varians* (= *C. exiliflora*) микобионт принадлежал к виду *Hymenoscyphus ericae* и обладал ферментативной активностью, сходной с таковой у изолятов из Вересковых умеренной зоны. Возможно, микобионт поглощает и транспортирует в растение органические формы фосфора и азота из стареющих талломов мхов (Chambers et al., 1999).

Для некоторых видов Вересковых показано наличие двойных симбиозов (гавайские эндемичные виды рода *Vaccinium* образуют ЭрМ на «волосковидных корнях» и АМ в прочих частях корневой системы) (ссылки на оригинальные исследования см. в Straker, 1996).

ЭрМ представлена клубками недифференцированных гиф в клетках растения-хозяина и формируется только в очень тонких волосковидных корнях. Микоризованные корни покрыты рыхлой сетью гиф, настоящий чехол не образуется. В зрелом состоянии волосковидные корни содержат эпидермис, 2 слоя коровых клеток и стелу. Ранее считалось, что кора в них отсутствует, но это объясняется их плохой видимостью при электронномикроскопических исследованиях: клетки малопроницаемы для реактивов из-за наличия большого количества фенольных соединений (Cairney, Ashford, 2002). До 80% объема волосковидного корня бывает колонизировано микобионтом. Иногда до 70% объема клетки заполнено гифами (Read, 1984). Неизвестно, насколько растение-хозяин контролирует распространение микобионта в своих тканях. Сущест-

вует предположение, что некоторые углеводные молекулы, входящие в состав слизи, содержащей растворимые сахара и окружающей поверхностные гифы, функционируют как сигнальные соединения (Cairney, Ashford, 2002). Выработка слизи подавляется, когда микобионт оказывается в корне. Колонизация происходит только в дифференцированных клетках эпидермиса, клеточные стенки которых содержат малое количество пектина и целлюлозу в виде спиралевидных структур, повторно микобионт колонизирует растение из почвы ежегодно, но в некоторых эпидермальных структурах может сохраняться в покоящихся стадиях (Straker, 1996).

Внутриклеточные завитки гиф отделены от цитоплазмы растительной клетки мембраной и материалом матрикса контактной зоны, отличным по составу от матрикса в зоне контакта симбионтов АМ (Peterson, Massicotte, 2004). Как и в микоризах других типов, двусторонний транспорт происходит в апопластном компартменте зоны контакта. Это малоизученный вопрос, но показана АТФ-азная активность у мембраны, окружающей гифы микобионта. Внутриклеточные грибные структуры активно живут до 4–5 недель, затем цитоплазма растительной клетки погибает. В противоположность тому, что наблюдается в других типах микориз с внутриклеточным внедрением симбионта, где растительная клетка надолго переживает развивающиеся в ней грибные структуры и может быть вновь заселена микобионтом, цитоплазма колонизированной клетки при ЭрМ разрушается быстрее, чем гифы гриба. Это предполагает, что растительная клетка может быть утилизирована микобионтом ЭрМ (Cairney, Ashford, 2002).

Экстрематрикулярный мицелий слабо развит, и распространение его за пределами корня весьма ограничено (0,5–1 см). Большинство наружных гиф проходит параллельно корню и некоторые из них обладают значительно большим диаметром. Это поисковые гифы, боковые ответвления которых проникают во вновь дифференцированные клетки коры растения-хозяина (Read, 1984). Преимущественное развитие интраматрикулярного мицелия имеет важное функциональное значение: в ЭрМ функция поглощения веществ из почвы в большей степени выполняется диффузной, далеко распространяющейся системой волосковидных корней. Коллоидные органические соединения, в которых находятся корни, обладают очень высокой влагоемкостью, и корни Вересковых погружены в раствор органических кислот, содержащий свободные и адсорбирован-

ные питательные вещества. В таких условиях затраты на обширную сеть наружных гиф не выгодны растению-хозяину. Кроме того, оптимум рН для мицелия микобионтов ЭрМ, как выяснилось в экспериментах с чистыми культурами, лежит в более щелочной области (6–7 по сравнению с 3–4 – рН почв вересчатников), что является одной из причин его скудного развития вне тканей хозяина (Read, 1984).

Несмотря на филогенетические свидетельства происхождения ЭрМ от ЭМ, этот тип микоризных ассоциаций четко отграничен от прочих и должен рассматриваться отдельно.

Арбутоидная микориза (АрМ)

АрМ часто считают переходным типом между ЭрМ и ЭМ, морфофункционально близким к ЭМ, но, тем не менее, традиционно рассматриваемым отдельно. Филогенетические исследования продемонстрировали, что Вересковые с ЭрМ произошли от предков с АрМ, так что более вероятно происхождение АрМ от ЭМ, а не от ЭрМ (Cullings, 1996). Микобионты – базидиомицеты, типичные для ЭМ хвойных пород (*Suillus*, *Tricholoma*, *Lactarius*, *Astraeus* и др.), реже аскомицеты, следовательно, особенности этой ассоциации, отличающие ее от ЭМ должны регулироваться растением. Среди растений АрМ образуют представители п/сем. *Arbutoideae* (*Arbutus*, *Arctostaphylos*) и сем. *Rufoleaceae* из Вересковых. Среди микобионтов 2 вида рода *Suillus*, *Tricholoma flavovirens*, *Lactarius paradoxus* – агариикоидные, *Astraeus hygrometricus* – гастероидный и *Coltricia perennis* – афиллофороидный базидиомицеты образуют ЭМ с *Pinus banksiana* и арбутоидную микоризу с *Arctostaphylos uva-ursi*. Микобионты *Arctostaphylos* являются карбофилами и развиваются после пожаров, их включение одновременно в образование и ЭМ и АрМ с разными видами растений, произрастающих совместно, влияет на сукцессионные процессы: показано, что сеянцы дугласовой ели значительно лучше растут вблизи *Arctostaphylos*, чем рядом с АМ кустарниками. Таким образом АрМ способствуют восстановлению хвойных пород после пожаров и других нарушений (Amaranthus, Perry, 1994; Smith, Read 1997).

Структурно АрМ представлена чехлом или рыхлым сплетением гиф на поверхности корня (у видов сем. *Rufoleaceae*) и развитой сетью Гартига, но клетки коры, как правило, пронизаны гифами, образующими клубки. Тип ветвления корневых окончаний и толщина чехла определяются микобионтом. АрМ сходна с ЭМ наличием

чехла, сети Гартига и межклеточных гифальных комплексов и отличается присутствием внутриклеточных гиф микобионта в эпидермисе растения-хозяина. У *Arbutus menziesii* в наружном слое клеток коры в клеточной стенке развиваются волокна суберина, функцией которых может быть ограничение распространения сети Гартига эпидермисом. Как и в ЭМ, возможно наличие 3 типов зоны контакта симбионтов: внутренний слой чехла – эпидермис, гифы сети Гартига – эпидермис и внутриклеточные гифальные комплексы – цитоплазма эпидермальных клеток. Экспериментально транспортные процессы в этом типе симбиоза не исследованы (Peterson, Massicotte, 2004).

Смешанные типы микориз

В некоторых случаях растение-хозяин может принимать участие в образовании микориз разного типа. Древесные породы, такие как *Alnus*, *Salix*, *Quercus*, *Populus* и *Eucalyptus*, могут одновременно формировать АМ и ЭМ на одном и том же растении (ЭМ формируется в подстилке, а АМ – в минеральном горизонте), что является свидетельством продолжающейся в настоящее время эволюции типов микориз. Представитель сем. *Murtagaceae* *Leptospermum* образует ЭМ или АМ в зависимости от типа почвы (Brundrett et al., 1996). Черный тополь в молодом возрасте формирует АМ, в возрасте 10–25 лет к этому типу симбиоза добавляется ЭМ, а затем, по мере старения, процент АМ снижается (Smith, Read, 1997).

Эксплуативные микоризы

Эксплуативные микоризы представляют собой один из полюсов мутуалистически-паразитического континуума: паразитизм растения на микобионте (рис. 1). Более точно эти взаимоотношения можно определить как эпипаразитизм – паразитизм на мутуалистическом симбиозе. Характерными чертами являются гетеротрофность и узкая специфичность, свойственная паразитам. Эксплуативная микориза предполагает обязательное наличие грибо-растительного мутуалистического симбиоза, ни один из которых не защищен от вторжения «эксплуататоров», несмотря на наличие ряда защитных механизмов (табл.1) (Bronstein, 2001). У микоризных грибов имеется способность к образованию множества зон контакта с разными растениями, растущими рядом, благодаря чему возможно существование микогетеротрофов. Так как эпипаразит не контактирует напрямую

с зеленым растением, невозможно вести против него отбор, не нанося одновременно ущерба микобионту. Специализация делает проблематичным формирование симбиоза, но может позволить лучше адаптироваться к физиологии определенного хозяина (которым в данном случае является ЭМ гриб), увеличив до максимума возможность получения от него питания, либо паразит может быть принужден к специализации развитием устойчивости у потенциальных хозяев. Данные, позволяющие подтвердить или опровергнуть эти предположения, пока не получены (Bruns et al., 2002).

Монотропидная микориза (ММ)

Ранее этот тип микориз относили к АрМ, но в нем не происходит проникновения гиф в клетки (кроме специализированных гаусторий) и формирование клубков. Симбиоз включает зеленое древесное растение, ЭМ микобионт и бесхлорофильное растение из сем. Подъельниковые (Monotropaceae). Семейство включает 10 родов, все представители бесхлорофильные (следовые количества хлорофилла *a*, хлорофилл *b* полностью отсутствуют) и, следовательно, неспособные к фотосинтезу. В данном случае растения через микоризу получают не только минеральные вещества (в том числе, соединения азота), но и углеводы – продукты фотосинтеза находящихся поблизости ЭМ древесных пород (ель, сосна, пихта, реже ива, бук, кедр и дуб). Это показано в экспериментах с мечеными атомами углерода (продукты фотосинтеза дерева попадали в гифы его ЭМ симбионта *Tricholoma*, а затем в корневую систему *Monotropa*) (Leake et al., 2004b и др.). Меченые атомы фосфора, введенные в микоризу *Monotropa* оказывались в корневой системе дерева, то есть связь все-таки не является односторонней, что подтверждает давние предположения ученых (Vreeland et al., 1981).

Симбиоз очень специфичный, причем специфичность обусловлена не распространением и не локальной доступностью партнеров, но напрямую зависит от взаимоотношений симбионтов. Впервые подобное было показано на примере *Pterospora andromedea* (Cullings et al., 1996). В настоящее время многочисленными молекулярными исследованиями продемонстрировано, что близкородственные виды или группы видов грибов образуют симбиоз с близкородственными видами Monotropaceae, и пересечений нет (Bidartondo, Bruns, 2001; 2002). Дополнительные свидетельства специфичности предоставляют исследования с применением изотопных меток:

для ряда видов микогетеротрофов показана корреляция содержания ^{15}N у микобионта и бесхлорофильного растения, что также отражает специфичность симбиоза (Trudell et al., 2003). Долгое время специфичность ММ была неизвестна ввиду слабой изученности биологии Подъельниковых и отсутствия методик их культивирования, а также идентификации преимущественно некультивируемых микобионтов (табл. 10). Один вид растения чаще всего взаимодействует с 1 родом или группой близких видов в пределах рода ЭМ грибов (например, *Allotropa virgata* – *Tricholoma magnivelare*, *Monotropa hypopitys* – *Tricholoma* spp., *Pleuricospora fimbriolata* – *Gautieria monticola*, *Pterospora andromedea* – *Rhizopogon salebrosus*, *Sarcodes sanguinea* – *Rhizopogon ellenae*) (Bidartondo, Bruns, 2002; Bidartondo, 2005). У крупнейшего в семействе рода *Monotropa* круг микобионтов более широк, включает виды родов *Tricholoma*, *Russula* и *Lactarius* (*Monotropa uniflora* – *Russula paludosa*, *R. integra*; *M. hypopitys* – *Tricholoma portentosum*, *T. saponaceum*, *T. terreum*, *T. cingulatum*). Для вида *Monotropa hypopitys* показана ассоциация с тем или иным видом *Tricholoma* в зависимости от того, какая древесная порода входит в симбиоз. При росте рядом с *Salix*, микобионтом является специфичный ЭМ симбионт *Salix T. cingulatum*, а рядом с *Pinus* – *T. terreum*, вид, специфичный для Pinaceae (Leake et al., 2004b). Все виды Monotropaceae специфичны, но в целом семейство взаимодействует с различными эволюционными линиями грибов (5 филогенетически отдаленных семейств ЭМ базидиомицетов, объединенных только ЭМ статусом). Наблюдается корреляция филогении Подъельниковых и их микобионтов: сестринские линии растений могут образовывать симбиоз с микобионтами из одной секции рода (*Pterospora* и *Sarcodes* с *Rhizopogon* sect. *Amylopogon*) (Bidartondo, Bruns, 2001; 2002). Подобная специфичность значительно ограничивает распространение растений, они редко встречаются массово, многие виды – редкие и охраняемые (Leake et al., 2004b). Растения из сем. Monotropaceae часто единственные представители травянистого яруса в хвойных лесах, где из-за сильного затенения не могут выжить фотосинтезирующие зеленые растения.

Семена представителей семейства очень мелкие и образуются в огромном количестве: на соцветии *Pterospora* образуется 2×10^5 семян диаметром менее 0,5 мм. Места обитания Подъельниковых характеризуются высоким видовым разнообразием ЭМ грибов, что предоставляет

Таблица 10. Микобионты монотропной микоризы (по Bidartondo, 2005)

Растение	Микобионты, предполагавшиеся ранее	Микобионты, указанные на настоящий момент
<i>Allotropia virgata</i>	<i>Cenococcum geophilum</i> <i>Rhizopogon vinicolor</i>	<i>Tricholoma magnivelare</i>
<i>Cheilothea</i> sp.	–	Russulaceae
<i>Hemitomes congestum</i>	<i>Cenococcum geophilum</i> <i>Rhizopogon vinicolor</i>	<i>Hydnellum</i>
<i>Monotropa hypopitys</i>	<i>Boletus</i> <i>Elaphomyces granulatus</i> <i>Elaphomyces muricatus</i> клада <i>Suillus</i> <i>Tricholoma</i> <i>Tubercinia monotropa</i> * <i>Xerocomus chrysenteron</i> <i>Xerocomus subtomentosus</i> разные сапротрофы	<i>Tricholoma</i>
<i>Monotropa uniflora</i>	<i>Armillaria mellea</i> <i>Hymenoscyphus monotropae</i> Russulaceae разные сапротрофы	Russulaceae
<i>Monotropastrum humile</i>	<i>Elaphomyces granulatus</i>	Russulaceae
<i>Monotropis odorata</i>	–	<i>Hydnellum</i>
<i>Pityopus californicus</i>	–	<i>Tricholoma</i>
<i>Pleuricospora fimbriolata</i>	<i>Cenococcum geophilum</i> <i>Rhizopogon vinicolor</i> <i>Truncocolumella citrina</i>	<i>Gautieria monticola</i>
<i>Pterospora andromedea</i>	<i>Cenococcum</i> <i>Rhizopogon</i>	<i>Rhizopogon salebrosus</i>
<i>Sarcodes sanguinea</i>	клада <i>Cantharellus</i> клада <i>Suillus</i>	<i>Rhizopogon ellenae</i>

* представитель Головных грибов, в некоторых работах фигурирует как первое упоминание о микобионте *Monotropa*. Обнаружен в корневой системе и надземной части *Monotropa* Фризом (1832)

большие возможности для симбиоза с широким кругом микобионтов, но, тем не менее, ассоциации крайне специфичны. Проблема поиска хозяина решается посредством наличия периода покоя у семян с последующим прорастанием в ответ на специфичную стимуляцию со стороны хозяина, как и в случае паразитов. Экспериментами *in vitro* показана химическая стимуляция грибами прорастания семян *Monotropaceae* с помощью как растворимых, так и летучих веществ, но данные, получаемые *in vitro* не всегда коррелируют с наблюдаемыми в природе. Обычно *in vitro*, круг стимулов прорастания семян шире, что часто приводит к недооценке специфичности растения. Проросток может образовать с грибом стабильный симбиоз или отторгаться грибом как

паразит. Прорастание симбиотическое, т.к. прорастая без микобионта, растения достигают определенной стадии и далее не развиваются (Leake et al., 2004b). Круг микобионтов значительно сужается по мере развития растения (рис. 4). Это сужение связано или с заменой несовместимого микобионта на подходящий, или с гибелью растения при ассоциации с неподходящим видом гриба. Последний механизм особенно интересен, так как предполагает отбор наиболее подходящего микобионта на самой ранней стадии развития (Taylor et al., 2002). В норме семена развиваются в недифференцированные на органы протокормы. Большая часть цикла развития Подъельниковых проходит под землей, надземная фаза – только цветение и созревание семян. Корневая

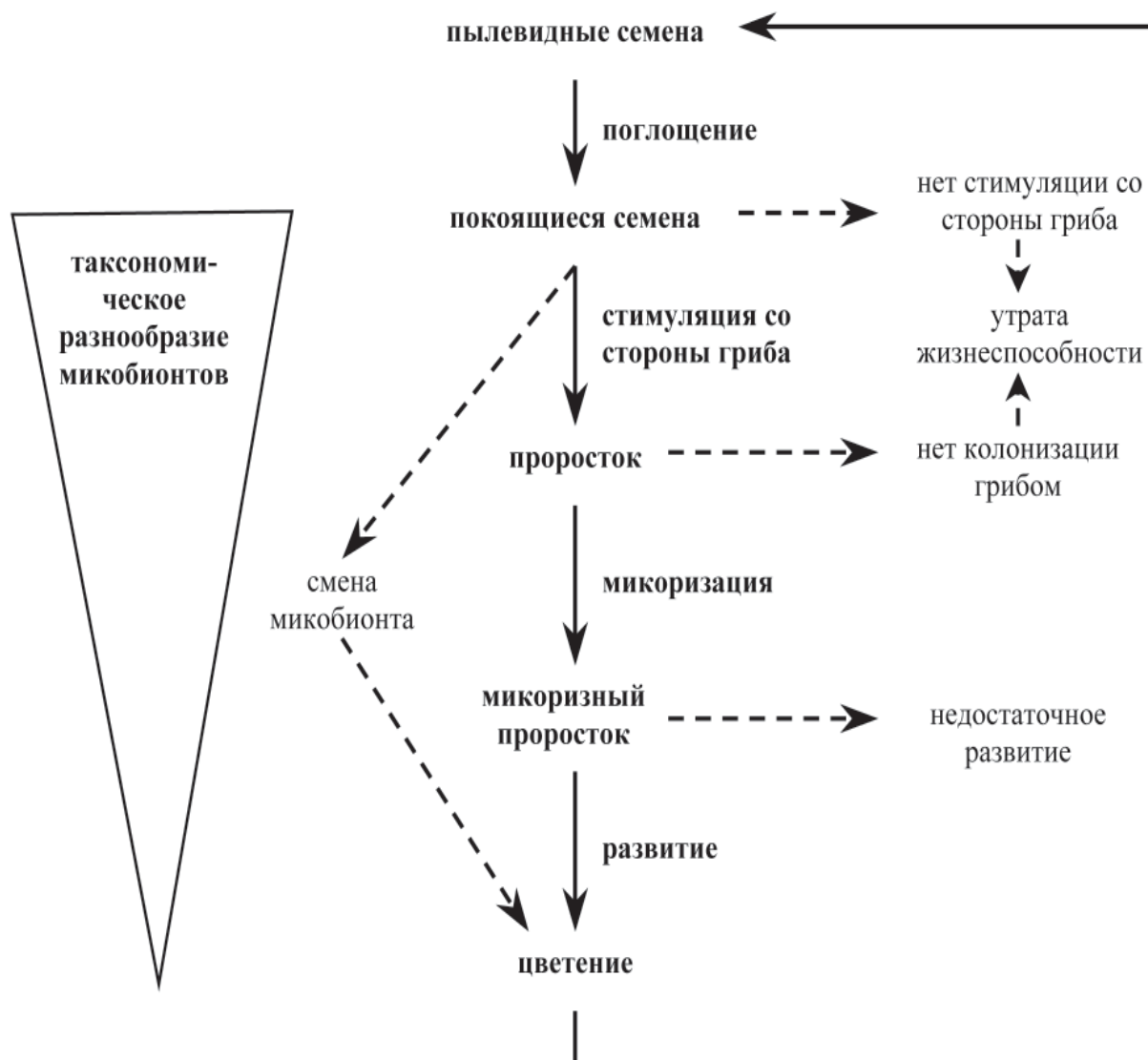


Рис. 4. Модель развития микогетеротрофного растения из семени (по Bidartondo, 2005).

система Подъельниковых редуцирована и не способна к прямому поглощению минеральных веществ из почвы, но приспособлена к микотрофному питанию, растения могут достигать крупных размеров: *Sarcodes* может весить до нескольких килограммов, а *Pterospora* и *Allotropia* – достигать в высоту 2 м (Taylor et al., 2002).

Подъельниковые имеют ряд приспособлений к своему образу жизни: способны стимулировать развитие зеленого растения и микобионта и обладают специальными внутриклеточными структурами для обмена веществ (ток органических веществ противоположен тому, который характерен для микориз зеленых растений). В отличие от паразитов, корни Подъельниковых не заселяют свои симбионты, а, напротив, сами

активно колонизируются микобионтом. На примере рода *Sarcodes* показано, что микогетеротрофы стимулируют рост и микоризообразование гриба-симбионта – концентрация микоризных окончаний корней пихты и обилие микобионта (*Rhizopogon*) на корнях значительно выше вблизи растений ММ и резко снижается на расстоянии (основной обмен между эпипаразитом и микоризой идет на небольшой дистанции – менее 10 см). Микориза образуется в ответ на присутствие *Sarcodes*, но неизвестно, стимулирует он напрямую микобионт ЭМ и косвенно рост корней, или наоборот. Неясно также, не причиняет ли стимуляция ЭМ гриба какой-либо вред (снижение спорообразования и др.). Данное явление сходно с часто вызываемой паразитами

Таблица 11. Примеры микоризных ассоциаций недавнего происхождения, приуроченных к небольшим группам Покрытосеменных растений (по Brundrett, 2002).

Растение-хозяин	Структура	Микобионт
Бесхлорофилльные орхидные (<i>Corallorhiza</i>)	Гифальные клубки в клетках корневища	ЭМ микобионты древесных пород (Russulaceae, Thelephoraceae)
Бесхлорофилльные орхидные (<i>Galeola</i> , <i>Gastrodia</i> и др.)	Гифальные клубки в клетках корневища	Высокоспецифичные ассоциации с ксилотрофными сапротрофами и паразитами (<i>Armillaria</i>)
Орхидные (<i>Corybas</i>)	Гифы и везикулы в корнях	АМ грибы
Бесхлорофилльные растения из сем. Monotropaceae	ЭМ, но с внедрением гиф в клетки растения и очень сложной поверхностью контакта	Высокоспецифичные ЭМ грибы, симбионты деревьев (<i>Rhizopogon</i>)
Микогетеротрофные бесхлорофилльные растения из сем. Gentianaceae (<i>Voyria</i>) и др.	АМ, но часто без арбускул и с необычным характером роста гиф	АМ грибы
Растения с частичным паразитизмом на АМ микобионте (из сем. Gentianaceae)	Имеется растение-компаньон, формирующее микоризу	АМ грибы
<i>Thysanotus</i> (Anthericaceae)	Гифы в субэпидермальной полосе	Неизвестный микобионт
ЭМ растения в типично безмикоризных семействах: <i>Kobresia</i> – Cyperaceae, <i>Polygonum</i> – Polygonaceae, <i>Pisonia</i> – Nyctaginaceae	ЭМ с чехлом и сетью Гартига	ЭМ грибы
Отдельные виды ЭМ растений в типично АМ семействах (<i>Dryas</i> – Rosaceae)	ЭМ с чехлом и сетью Гартига	ЭМ грибы
Дополнительные ЭМ ассоциации у травянистых растений из АМ семейств в Австралии (Asteraceae, Goodeniaceae)	ЭМ-подобные, но без чехла и с тонкой сетью Гартига, функции неясны	Аскомицеты, не образующие ЭМ с другими растениями
Гавайские виды Ericales	ЭрМ и АМ с арбускулами	Микобионты ЭрМ и АМ грибы
Осоковые и Ситниковые	АМ изредка присутствует у одних видов, отсутствует у других, функции неясны	АМ грибы

Условные обозначения см. в тексте.

гипертрофией, но для микобионта, скорее всего, благоприятно. Корни зеленого растения напрямую не соединены с корневой системой *Sarcodes*, в отличие от случая вызываемой паразитом гипертрофии (Bidartondo et al., 2000). Имеются данные о резком снижении биомассы плодовых тел *Tricholoma terreum* и *Tricholoma magnivelare* в присутствии их симбионтов *Monotropa hypopitys* и *Allotropia virgata* соответственно – микобионт размножается преимущественно вегетативно, что значительно замедляет выработку ответа грибной популяции с целью избежания эпипа-

разитизма (Bidartondo, 2005). Отбирая «свой» микобионт и стимулируя его развитие, микогетеротрофные растения способны значительно изменять структуру сообщества ЭМ грибов, хотя и на небольших расстояниях (Taylor et al., 2002).

Структурно ММ образована плотным грибным чехлом (у рода *Sarcodes* он отсутствует), мицелиальной сетью и проникающими в клетки шиповидными «гаусториями», по которым ток веществ осуществляется в сторону микогетеротрофа. Мицелиальная структура, аналогичная сети Гартига у ЭМ, распространяется в эпидермисе,

в коровые клетки не заходит (за исключением отдельных гиф, проникающих в наружные клетки коры). Особенностью анатомии микориз этого типа является образуемая микобионтом гаустория в виде шипа (по одной на эпидермальную клетку), которая не проникает через плазмалемму растительной клетки (происходит ее инвагинация), и шип остается окруженным мембраной. Происхождение шипа в микоризах разных родов Подбельниковых может быть различным: у видов рода *Monotrop* он формируется из гиф внутренней части чехла, проникающих в наружный слой эпидермальных клеток, у родов *Sarcodes* и *Pterosp* – из гиф сети Гартига (Duddridge, Read, 1982; Peterson, Massicotte, 2004). По мере роста площадь поверхности контакта увеличивается, из мембраны, окружающей шип, развиваются мешковидные и лентовидные выросты. По обилию митохондрий, ЭПР, микротрубочек и выростов клеточной стенки, свидетельствующих об активном метаболизме, эти структуры аналогичны растительным транспортным клеткам, распространенным в тканях, участвующих в обмене веществами (Smith, Read, 1997). Зона контакта состоит из плазмалеммы и клеточной стенки микобионта и растения. Когда шип полностью развивается, его кончик открывается, и вещества выбрасываются в мембранный вырост. Содержимое шипа наполняет мембранный мешочек, но никогда напрямую не попадает в клеточную цитоплазму. Кольцо из высокоосмофильных веществ формируется рядом с местом вскрывания шипа и, предполагается, что это препятствует оттоку вещества обратно в шип. Ранее считалось, что вскрывание шипа нужно для усиления транспорта веществ от гриба к растению, но у исследованных родов Подбельниковых вещества мешочка оказались мало сходны по составу с цитоплазмой микобионта. После вскрывания шип не остается пустым, он содержит цитоплазму и органеллы. До сих пор полученных данных недостаточно, чтобы оценить, насколько значителен вклад вскрывания шипа в активный транспорт веществ между симбионтами в ММ (Trudell et al., 2003). Неизвестно также, насколько вовлечены в обмен веществами такие предполагаемые зоны контакта симбионтов, как сеть Гартига и внутренний слой чехла ММ (Peterson, Massicotte, 2004).

Количество образуемых гаусторий зависит от времени года, пик образования приходится на июнь и совпадает со временем роста цветоноса, а их вскрывание происходит в июле-августе, когда созревают семена. Предполагают, что это связано с тем, что во время роста цветоноса растение более нуждается в питательных веществах, осо-

бенно в углеводах. Формирование транспортных клеток, стимулированное развитием гаусторий, показывает, что происходит быстрое передвижение элементов. Вскривание также обеспечивает освобождение питательных веществ для продукции семян до старения цветоноса (Duddridge, Read, 1982).

Скорее всего, изначально образовалась ЭМ с проникновением ЭМ гриба в клетки эпидермиса (как в АрМ), а затем равновесие сдвинулось в сторону эксплуатации гриба растением, и предковые формы *Monotropaceae* утратили хлорофилл. Так как в условиях жизни под пологом многие растения развивают способность к микогетеротрофии, по-видимому, Подбельниковые произошли от фотосинтезирующих Вересковых (п/ сем. *Arbutoideae*, сем. *Ryrolaceae*), обитающих под пологом леса (Bidartondo, 2005).

Орхидная микориза (ОМ)

ОМ характерна для сем. Орхидные (*Orchidaceae*), одного из крупнейших семейств Покрытосеменных (около 35 тыс. видов, распространенных по всему земному шару от арктических тундр до тропических лесов). Это одно из наиболее эволюционно продвинутых семейств Покрытосеменных со сложными адаптациями к опылению специфичными видами насекомых и очень различными жизненными стратегиями: от эпифитных до наземных, от вечнозеленых до полностью бесхлорофилльных. Однолетние виды в семействе отсутствуют. ОМ развивалась гетерохронно, о чем свидетельствует различная степень приспособленности к микотрофии у разных представителей семейства Орхидных, эволюция ОМ активно продолжается и в настоящее время (Taylor, Bruns, 1997) (табл. 11). Все Орхидные на определенном этапе жизненного цикла лишены хлорофилла, и, следовательно, микогетеротрофны. Как и Подбельниковые, они образуют большое количество мелких пылевидных семян, что предполагает, что на ранних стадиях развития смертность растений очень высока. Их семена от прорастания до формирования фотосинтетических органов (в течение месяцев или даже лет) зависят от органических веществ, поставляемых грибом. Около 200 видов остаются бесхлорофилльными всю жизнь, например, *Corallorhiza*, *Gastrodia*, *Galeola*, и полностью зависят от внешних источников органических веществ. Кроме того, многие зеленые орхидеи обитают в условиях недостаточной освещенности, где фотосинтез затруднен (эпифиты в кронах, наземные под пологом хвойных лесов) или долго

(до нескольких лет) пребывают в стадии покоя, в течение которой они ведут подземный образ жизни. Даже для активно фотосинтезирующих видов не показан транспорт органических веществ к микобионту (Taylor, 2004; Gardes, 2002; Rasmussen, 2002). По степени обеспеченности углеводами среди представителей Орхидных можно выделить 3 категории: фотосинтезирующие зеленые растения открытых местообитаний, предположительно фотосинтезирующие виды затемненных местообитаний, где эффективность фотосинтеза очень низка, и абсолютно бесхлорофильные. В двух последних случаях микобионт, скорее всего, вступает еще и в ЭМ, обеспечивая поток продуктов фотосинтеза от зеленого растения-хозяина к орхидее, но этот вопрос нуждается в дальнейшем исследовании. Зеленые Орхидные затемненных местообитаний, ранее считавшиеся облигатно автотрофными в связи с наличием у них хлорофилла, сейчас трактуются как частичные микогетеротрофы (Bidartondo et al., 2004). У эпифитных видов воздушные корни не содержат микобионт, колонизированы только корни, соприкасающиеся с субстратом (Rasmussen, 2002).

Микобионты ОМ – преимущественно базидиомицеты: телеоморфы комплексного таксона *Rhizoctonia* (сем. Ceratobasidiaceae, Tulasnellaceae), виды родов *Armillaria*, *Hymenochaete*, *Thelephora*, *Tylospora*, *Piloderma*, *Sebacina*, *Tremellodon*, *Tulasnella* и др., являющиеся сапротрофами, ЭМ грибами или паразитами растений, иногда аскомицеты (Currah et al., 1997; Smith, Read, 1997; Terashita, Chuman, 1987 – цит. по Bidartondo, 2005; Selosse et al., 2002 a, b и мн. др.). Трофическая принадлежность большинства симбиотических видов рода *Rhizoctonia* неизвестна (Taylor, 2004). Симбионты Орхидных могут быть патогенами для растений других семейств (*Rhizoctonia solani* и др. виды – некротрофные паразиты) или для прочих Орхидных (*Ceratobasidium cereale* – формирует микоризу с европейскими видами Орхидных и может быть патогенен для североамериканских видов) (Smreciu, Currah, 1989). Микобионты Орхидных способны существовать в свободном состоянии как сапротрофы в почве или древесине и имеют широкое распространение. Исторически сложившиеся представления о микобионтах Орхидных как сапротрофах и паразитах других растений недавно были расширены появлением данных об использовании в симбиозе микобионтов ЭМ древесных пород (табл. 12). Свидетельства этого были получены независимо методом молекулярно-экологичес-

кого анализа нефотосинтезирующих видов Орхидных, образовывавших микоризу с симбионтами, одновременно формировавшими ЭМ на корнях растущих рядом деревьев (Taylor, Bruns, 1997; Selosse et al., 2002b) и методом масс-спектрометрического анализа полностью бесхлорофильных и предположительно фотосинтезирующих Орхидных, показавшего пути получения растениями азота и углерода исходя из расположения радиоактивных меток этих элементов (Trudell et al., 2003 и др.). Микобионты способны к продолжительному существованию вне растения-хозяина, у многих Орхидных микоризные структуры однолетние, и повторная колонизация происходит ежегодно из почвы, что свидетельствует о том, что Орхидные чем-то привлекают грибы (Rasmussen, 1995).

Специфичность ОМ долгое время недооценивалась ввиду недостаточной изученности анаморфного комплексного полифилетического таксона *Rhizoctonia*, телеоморфы которого, как было недавно показано, относятся к нескольким семействам базидиомицетов и различным трофическим группам. Выделяемые из Орхидных анаморфные стадии имеют скудную морфологию (общая черта – наличие цепочек вздутых монилиоидных конидий), что привело к объединению в одну группу ряда таксонов, родственных весьма отдаленно. Кроме того, как показали исследования последнего десятилетия, понимание изолированных из Орхидных видов *Rhizoctonia* как гомогенной группы несостоятельно с эволюционной точки зрения (Taylor et al., 2002). Предполагалось, что комплекс *Rhizoctonia* не образует симбиозов с бесхлорофильными видами Орхидных, т.к. микогетеротрофы нуждаются в большем количестве органических веществ, чем то, которое могут предоставить микобионты из этой группы, но исследования последних лет установлено, что некоторые полностью микогетеротрофные виды, такие как *Neottia nidus-avis*, специфично ассоциированы в природе с телеоморфами ризоктоний (*Sebacina*), образующими ЭМ с древесными породами (McKendrick et al., 2000a; Taylor, Bruns, 1999; Selosse et al., 2002 a, b).

Считается, что бесхлорофильные Орхидные приурочены к линиям микобионтов ЭМ, а фотосинтезирующие используют свободноживущие сапротрофы или фитопатогенные грибы, но, тем не менее, зеленые Орхидные, обитающие в условиях значительного затенения (под пологом леса) способны образовывать микоризы с ЭМ микобионтами древесных пород (Bidartondo et al., 2004). Таким образом, вопреки существую-

Таблица 12. Микобионты микориз Орхидных*

Виды Орхидных и наличие у них способности к фотосинтезу**	Таксоны микобионтов ОМ				
	Сапротрофные свободноживущие и фитопатогенные***			Эктомикоризообразующие*	
	Базидиомицеты		Аскомицеты	Базидиомицеты	Аскомицеты
	<i>Rhizoctonia</i> – комплекс	прочие			
<i>Cephalanthera damasonium</i> З(-)				<i>Cortinarius, Hymenogaster, Inocybe, Thelephora, Tomentella</i>	
<i>C. austinae</i> БХ				<i>Tomentella</i>	
<i>C. rubra</i> З(-)			<i>Leptodontidium</i>	<i>Tomentella, Phialophora</i>	
<i>Epipactis atrorubens</i> СЗ			<i>Leptodontidium</i>	<i>Inocybe, Phialophora,</i> клада <i>Sebacina, Tulasnella</i>	<i>Tuber, Wilcoxina</i>
<i>E. distans</i> З(-)					<i>Wilcoxina</i>
<i>E. helleborine</i> З(-)	<i>Ceratobasidium</i>			клада <i>Sebacina</i>	<i>Tuber</i>
<i>E. palustris</i> СЗ	<i>Ceratobasidium</i>		<i>Leptodontidium</i>	<i>Tulasnella,</i> клада <i>Sebacina</i>	
<i>Platanthera chlorantha</i> СЗ	<i>Ceratobasidium</i>		<i>Leptodontidium</i>	<i>Phialophora, Tulasnella</i>	
<i>Dactylorhiza majalis</i> СЗ	<i>Ceratobasidium</i>			<i>Tulasnella</i>	
<i>Goodyera pubescens</i> ВЗ(-)				<i>Tulasnella</i>	
<i>Liparis lilifolia</i> СЗ				<i>Tulasnella</i>	
<i>Tipularia discolor</i> СЗ		Auriculariales (в протокормах)		<i>Tomentella, Tulasnella</i>	
<i>Cymbidium sp.</i> СЗ		<i>Mycena</i>			
<i>Gastrodia elata</i> БХ		<i>Mycena osmundicola, Armillaria mellea</i>			
<i>Erythrorchis ochobiensis</i> БХ		<i>Erythromyces crocicreas</i>			
<i>Galeola sp.</i> БХ		<i>Armillaria</i>			
<i>Corallorhiza maculata</i> БХ				Russulaceae	
<i>Corallorhiza trifida</i> СЗ				<i>Thelephora – Tomentella</i> КОМПЛЕКС	
<i>Neottia nidus-avis</i> БХ				<i>Sebacina</i>	

* – данные о симбионтах взяты из работ Bidartondo et al., 2004; McCormick et al., 2004; Rasmussen, 2002; Taylor, Bruns, 1997;

** – категории Орхидных по способности к фотосинтезу: БХ – бесхлорофилльный вид (микогетеротрофный); ВЗ – вечнозеленый вид (предполагаемо автотрофный); СЗ – сезонно-зеленый вид (предполагаемо автотрофный); З(-) – хлорофилл-содержащий, но обитающий в условиях сильного затенения вид (частично микогетеротрофный)

*** – жирным шрифтом выделены роды облигатных ЭМ микобионтов, не вызывающие сомнений, для прочих родов показано наличие некоторых ЭМ видов

щей теории, «переключение» на ЭМ микобионты произошло до, а не после утраты хлорофилла, аналогично тому, что происходило в сем. Вересковые (Bidartondo, Bruns, 2001). Как и у Вересковых, скорее всего, именно это «переключение» предоставляет Орхидным возможность не просто выживать, а процветать в условиях сильного затемнения, часто являясь единственными зелеными растениями под пологом. Еще одним экологическим следствием существования симбиоза Орхидных с ЭМ грибами является то, что эти микобионты, в отличие от космополитных почвообитающих сапротрофных видов *Rhizoctonia*, привязаны в своем распространении к древесным породам, с которыми они образуют микоризы, что в свою очередь, ограничивает распространение Орхидных участками с уже сформированной ЭМ (Bidartondo et al., 2004; McCormick et al., 2004).

В большинстве случаев облигатно микоризной является только стадия сеянца, т.к. семена Орхидных очень мелкие и имеют крайне ограниченный запас питательных веществ (содержат белки и липиды, но очень малое количество сахаров). Роль грибных ассоциаций у взрослых растений изучена мало, особенно у фотосинтезирующих видов, и немного известно о том, каково влияние разнообразия микориз на распространение Орхидных, размеры их популяций и генетическое разнообразие. Прорастание семян зависит от колонизации грибом-микоризообразователем, в природе большинство Орхидных не прорастает в отсутствие микобионта. Микобионт обеспечивает растение полностью, включая поступление сахаров, аминокислот, витаминов. Некоторые штаммы микоризных грибов способны обеспечить прорастание семян Орхидных, даже если были изолированы далеко от места произрастания этих орхидей. *In vitro* индукция прорастания может осуществляться не только потенциальным микобионтом, но и видами грибов, не способными принимать участие в образовании ОМ и даже патогенами (напр., *Penicillium*) или штаммами потенциального микобионта, не образующими микоризу *in situ* (физиологического, а не экологического микобионта). Так, например, семена *Erythrorchis ochobiensis*, вида, ассоциированного во взрослом состоянии с микобионтом *Erythromyces crocicreas*, *in vitro* способны прорасти и развивать микоризные сеянцы в присутствии *Ganoderma australe*, *Loweporus tephroporus*, *Microporus affinis*, *Phellinus* sp., *Auricularia polytricha* и *Lentinula edodes*, не являющимися в норме микобионтами этого вида. Но

даже физиологическая совместимость *in vitro* имеет определенные пределы – в присутствии некоторых видов грибов (*Lyophyllum shimeji*, *Tricholoma fulvocastaneum*) семена *Erythrorchis ochobiensis* не прорастали, либо сеянец не содержал нормально развитой микоризы (Masuhara, Katsuya, 1994; Rasmussen, 2002 и др.). Стимуляторный эффект на семена *in vitro* оказывают выделяемые некоторыми микобионтами этилен и ауксины (Rasmussen, 1995). Для прорастания семян в природе важным фактором является также конкуренция между микобионтом ОМ и прочими грибами. Также в ОМ возможен синергизм между микроорганизмами: ряд бактерий (*Pseudomonas putida*, *Xanthomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*), ассоциированных с орхидными (*Pterostylis vittata*) стимулирует симбиотическое прорастание семян, возможно, путем образования индоллил-3-уксусной кислоты или стимуляцией растения к синтезу ауксинов (Wilkinson et al., 1994).

На стадии сеянца устойчивость растения к неоптимальному симбионту наиболее низкая и смертность наиболее высокая (рис. 5). На баланс между симбионтами влияет, среди прочего, и доступность органических и некоторых минеральных веществ. Инфекция микобионтом не всегда ведет к образованию симбиоза, развитие взаимоотношений может происходить тремя путями: образование симбиоза (при недостатке азота и доступности углеводов); переход микобионта к паразитизму, ведущий к угнетению и гибели протокорма (при недостатке углеводов); отторжение симбионта растительной клеткой (утолщение клеточной стенки, накопление фенольных соединений при доступности азота и углеводов) (Beyrle et al., 1995). Это показывает динамичность и нестабильность отношений в симбиозе данного типа, который не является мутуалистическим. ОМ – это тонкое равновесие между агрессией микобионта и защитной системой растения, и только немногие пары гриб-растение могут успешно совместно функционировать. Зависимость растения от микобионта меняется на протяжении жизни орхидеи; у большинства она снижается после стадии сеянца. Несмотря на способность к фотосинтезу, растение может оставаться микоризованным. Сеянцы могут быть ассоциированы с более широким кругом микобионтов, чем взрослые растения, что может показывать смену видов гриба в течение жизни растения. Для некоторых симбиозов характерна смена микобионта на определенной стадии развития или наличие нескольких симбионтов, утилизирующих разные

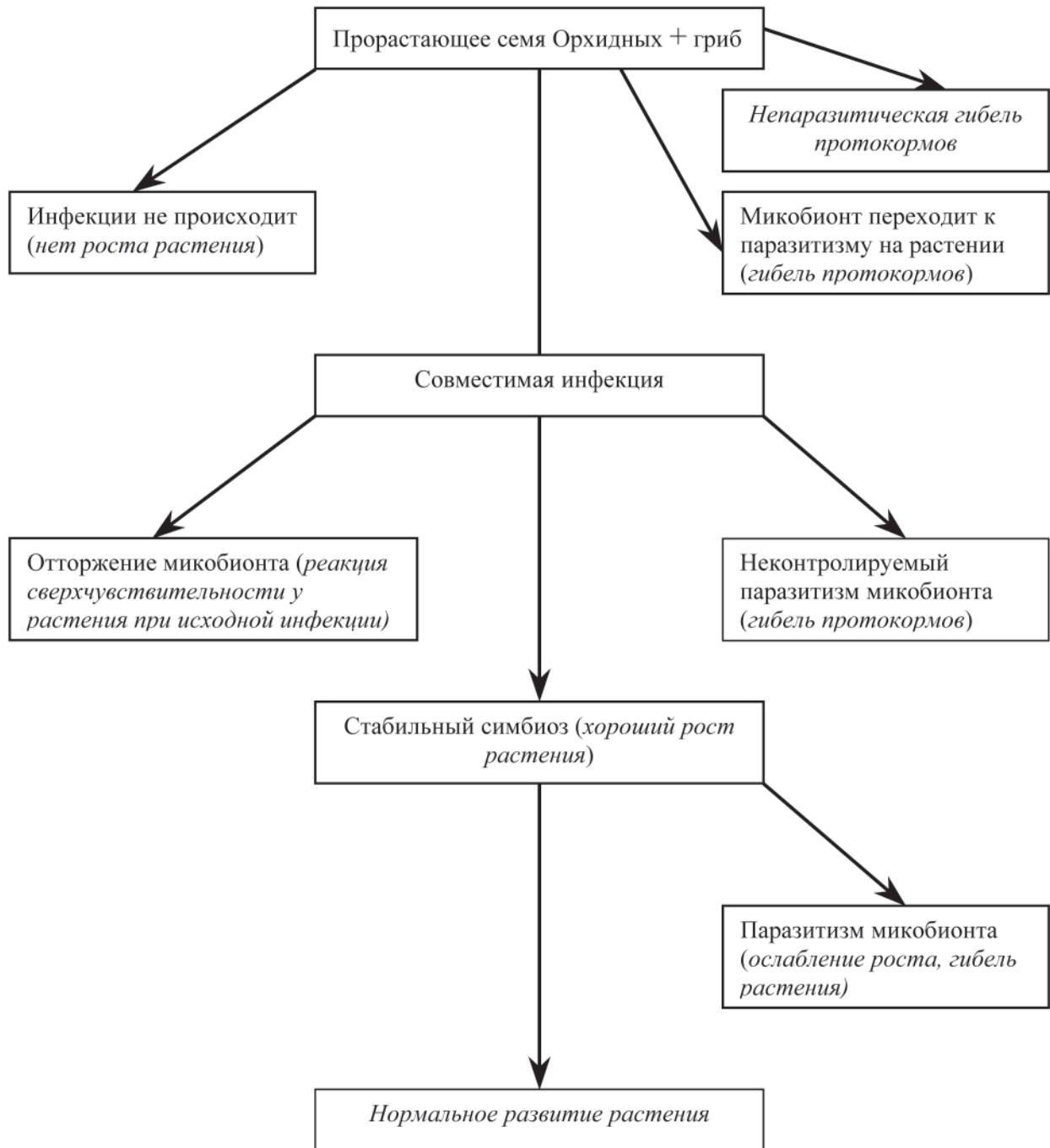


Рис. 5. Схема симбиотического развития орхидных (по Hadley, 1970).

субстраты. Например, вид *Tipularia discolor* во взрослом состоянии не проявляет специфичности, образуя симбиоз в основном с представителями рода *Tulasnella*. Протокормы связаны с узким кругом микобионтов, не выделяющихся в культуру, близких к Аурикуляриевым и являющихся ксилотрофами. Прорастание семян *Tipularia* происходит почти исключительно в разлагающейся

древесине (McCormick et al., 2004). У бесхлорофильной орхидеи *Gastrodia elata* регулярно на определенном этапе происходит переход от подстилочного сапротрофа *Mycena osmundicola* к ксилотрофному паразиту *Armillaria mellea* (Lan et al., 1994; Rasmussen, 1995). Смена микобионта может предоставлять следующие преимущества: на начальном этапе (или для короткоживущих

видов) удобен симбионт со слабой конкурентоспособностью и низкой специализацией к субстрату, а во взрослом состоянии – более агрессивный, с обильным мицелием и универсальными способностями к разложению субстрата (Dijk et al., 1997).

Ряд видов Орхидных обладает способностью к микоризообразованию с широким кругом микобионтов, другие виды, напротив, узкоспецифичны, что ведет к редкости этих видов, также как у животных – узкие пищевые предпочтения. В ряде случаев специфичность связана с генотипом растения. На примере микогетеротрофа *Corallorhiza maculata* продемонстрировано, что различные генотипы растения ассоциированы с микобионтами из отдельных клад сем. Russulaceae (Taylor, et al., 2004). Было сделано предположение, что генотип особи *Corallorhiza* – более значимый фактор распространения микобионта в растениях, чем местообитание, т.к. разные генотипы никогда, даже при совместном произрастании не делят между собой один вид *Russula*. Напротив, каждый растительный генотип ассоциирован с отдельной линией микобионта, вне зависимости от присутствия или отсутствия растений с другими генотипами или других видов микобионта в том же местообитании. Наличие корреляции с местообитанием объясняется предпочтением растений с различными генотипами несколько разных типов местообитания (Taylor, Bruns, 1999). Такие суперспециализированные генотипы («расы») микогетеротрофных растений напоминают расы фитопатогенных грибов (Taylor et al., 2002). Бесхлорофилльные виды демонстрируют узкую специфичность уже на самых ранних стадиях своего развития. Изучение этого вопроса стало возможным при разработке методик проращивания семян в пакетах с перфорациями, достаточными для проникновения грибных гиф, что позволило сравнить грибные ассоциации в протокормах в условиях, близких к природным, с симбиозами взрослых особей в природе (Rasmussen, Whigham, 1993). Было установлено, что и проростки, и взрослые растения специфичны и ассоциированы с одними и теми же микобионтами, например *Corallorhiza trifida* с представителями сем. Thelephoraceae, *Neottia nidus-avis* – с *Sebacina*-подобными видами (McKendrick et al., 2000b; 2002). Тем не менее, в тех же исследованиях показано, что сеянцы иногда ассоциированы с микобионтами, не обнаруженными во взрослых растениях, но это нуждается в проверке (McKendrick et al., 2000b).

Существует очень мало данных, о том, как меняется специфичность у Орхидных, бесхлорофилльных на ранних стадиях развития, а затем становящихся зелеными. При изучении в полевых условиях *Spiranthes sinensis* было установлено, что фотосинтезирующая орхидея ассоциирована с теми же самыми видами микобионта, что и бесхлорофилльный протокорм (Masuhara, Katsuya, 1994). Но существуют данные и обратного характера: для *Cypripedium calceolus*, *C. passerinum*, *Platanthera hyperborea* и *Spiranthes romanzoffiana* показаны различные микобионты у сеянцев и взрослых растений, т.е. сукцессия микобионтов в течение онтогенеза Орхидных (Zelmer et al., 1996). Предполагалось, что у зеленых Орхидных разнообразие микориз выше, чем у бесхлорофилльных, но микоризное разнообразие может не быть обусловлено способностью к фотосинтезу растения во взрослом состоянии (McCormick et al., 2004). Таким же образом, у вечнозеленых Орхидных микоризное разнообразие не всегда выше, чем у сезонно-зеленых. По этому вопросу имеется множество противоречивых данных, и в ряде случаев постулируемая низкая специфичность к микобионту (более зависящая от географических причин, чем от вида растения) у зеленых Орхидных связана с методическими ошибками в исследованиях, и есть данные о высокой специфичности у взрослых фотосинтезирующих растений. Например, вид *Epipactis helleborine*, в отличие от прочих Орхидных, часто образующий бесхлорофилльные формы, смешанные с зелеными растениями, на значительном участке ареала в Восточной Европе постоянно ассоциирован с морфологически отличным по темноокрашенным толстостенным бородавчатым гифам без пряжек, не принадлежащим к *Rhizoctonia* микобионтом (Salmia, 1988; 1989). Вероятно, Орхидные, подобно большинству растений, могут быть одновременно связаны с широким кругом микобионтов, а, кроме того, можно предполагать, что одновременно с микоризообразователем, корневую систему Орхидных могут колонизировать как эндофиты и паразиты виды грибов, таксономически близкие к микобионту. К примеру, агрессивные виды *Rhizoctonia* из клалды *Ceratobasidium/Thanatephorus*, заселяющие корни *Lepanthes*, *Hexalectris* и *Corallorhiza* наряду с микобионтами – *Rhizoctonia* из клалды *Sebacina* и др. (Taylor et al., 2002). Возможна также множественная инфекция одного растения различными микоризными и немикоризными грибами (Zelmer et al., 1996). В этом случае прояснить ситуацию возможно путем примене-

ния тонких молекулярных методик, но пока они применялись в основном к бесхлорофилльным видам. Тем не менее, в недавнем исследовании зеленой орхидеи *Dactyloporhiza majalis* были получены имеющие диагностическое значение грибные гены напрямую из единичного пелотона, что позволило установить наличие в одном пелотоне (в пределах одной клетки коры) двух различных микобионтов (Kristiansen et al., 2001).

Колонизация микобионтом во всех случаях происходит в паренхиме протокорма, гифы формируют скопления – пелотоны. Пелотоны (гифальные клубки) – структуры ОМ, расположенные внутри клеток коры, несколько напоминающие структуры АМ *Paris*-типа или ЭрМ (Taylor et al., 2002). Пелотоны значительно увеличивают площадь поверхности обмена веществами, они окружены растительной мембраной, лишенной аденилат-циклазной активности, а в остальном сходной с плазмалеммой, и матриксом контактной зоны. Эта мембрана – продолжение цитоплазматической, и изменение ее свойств происходит при контакте с гифой. Аденилатциклаза катализирует реакцию образования цАМФ – вторичного мессенджера, его возможная роль в предотвращении или стимуляции внедрения гиф микобионта пока неясна. Ориентация микротрубочек и микрофибрилл клеточной стенки, как и в случае АМ, меняется в процессе симбиоза и играет роль в изменениях в цитоплазме и синтезе мембран, окружающих пелотоны (Peterson et al., 1997). На мембране пелотона отмечена АТФ-азная активность и наличие нейтральных и кислых фосфатаз (ссылки на оригинальные данные см. в Peterson, Massicotte, 2004). Срок жизни этих структур невелик – несколько дней, после чего они перевариваются клетками растения. Этот процесс носит название толипофагия, он присущ подавляющему большинству Орхидных. Неизвестно, ферментами растения или микобионта осуществляется этот процесс. Состав матрикса зависит от возраста пелотона. В начале процесса колонизации в матриксе отсутствуют пектин, целлюлоза, β -1,3-глюканы, эти компоненты клеточной стенки появляются при старении пелотона или разрушении гиф (Peterson, Massicotte, 2004). Второй тип ОМ – птиофагия, свойственный только ряду высокомикотрофных тропических видов (Rasmussen, 1995). При птиофагии идет образование птиозом – телец, возникающих за счет излияния грибной плазмы в полость клетки растения. Вокруг этой плазмы, смешанной с цитоплазмой растения, образуется оболочка за счет веществ, выделяемых обоими симбионтами. Птиозомы считаются структурами, осуществля-

ющими эндоцитоз, они содержат продукты растворения гифы. Раньше птиофагия трактовалась как лизис кончиков гиф и последующее высвобождение клеточного содержимого, в то время как толипофагия подразумевает полный коллапс гифального клубка и разрушение гиф, но это определение, в свете данных, полученных при применении электронной микроскопии, нуждается в пересмотре. Несомненно, птиофагия заметно отличается от толипофагии как на гистологическом уровне (формирование транспортных каналов), так и на уровне физиологии процесса переваривания микобионта (образование эндоцитозных трубочек, пиноцитоз фрагментов гифальных клеточных стенок). Характерные для толипофагии скопления разрушенных и скученных гифальных стенок отсутствуют. При птиофагии происходит разрушение гиф в областях корня, содержащих «переваривающие клетки», что приводит к высвобождению питательных веществ, которые были предварительно в интактных пелотонах в соседних клетках. Есть данные, что при птиофагии возможен ограниченный поток углеводов от микогетеротрофа к грибу: в опытах с меченой глюкозой показано, что вводимый углевод транспортировался от орхидеи *Gastrodia elata* к ее микобионту *Armillaria mellea*, и следы метки обнаруживались в ризоморфах (Lan et al., 1994). Тем не менее, этот эксперимент может иллюстрировать и феномен старения: нет сомнений, что основной поток углеводов направлен в сторону полностью бесхлорофилльной орхидеи. Гифы внутри растения живут также недолго, они вакуолизируются, образуют толстые стенки, цитоплазма отмирает; и гифы перевариваются растением. Во время этих процессов клетка остается жизнеспособной и вновь может быть колонизирована микобионтом. В клетках, заселенных микобионтом по мере развития ассоциации, возрастает активность пероксидазы, полифенолоксидазы и каталазы, частично это может быть связано с перевариванием пелотонов (Rasmussen, 2002).

Хотя толипофагия хорошо изучена, остаются нерешенными вопросы о том, какие механизмы действуют в клетках, где не идет переваривание гиф и где гифы отторгаются, как идет транспорт веществ от микобионта в цитоплазму растительной клетки и из переваривающих клеток в стелу и т.д. (Rasmussen, 1995). Показано, что витамины, аминокислоты и сахара транспортируются от микобионта к растению, но неизвестно, проходят ли эти вещества через жизнеспособную зону контакта или высвобождаются после переваривания грибных структур (Hadley, 1982).

Кортикальная система микротрубочек (МТ) исчезает во время инфекции, но между гифами в колонизированных клетках отмечены короткие МТ, формирующие сеть сквозь пелотон и соединяющиеся с ядром. Во время лизиса МТ обнаружены между гифами внутри и вокруг разрушающегося пелотона (Uetake, Peterson, 1998). Активные филаменты (АФ) также перестраиваются при внедрении микобионта, образуя сеть, расходящуюся от мембраны гиф по направлению к клеточной стенке. Эта сеть сохраняется во время лизиса пелотонов, но кортикальная система АФ постепенно исчезает (Uetake, Peterson, 1997). И МТ, и АФ в переваривающих клетках стабилизируют пелотон и, возможно, направляют везикулы и органеллы в зону контакта и в противоположном направлении.

Взаимодействие симбионтов тонко регулируется растением, начиная от стадии инфекции и при дальнейшем развитии микобионта в тканях корня. Распространение микобионта строго локализовано и контролируется растением, в отличие от грибной инфекции теми же видами растений других семейств. Орхидные выделяют орхинол, фитоалексин, под действием которого происходит разрушение пелотонов, недавно впервые обнаруженный в протокормах *Orchis*, а до того известный из клубней и корневищ Орхидных (Beyrle et al., 1995; Gaumann, 1960; Hadley, 1982). Выработка орхинола представляет собой умеренную защитную реакцию со стороны растения, предполагается, что он ингибирует рост микобионта. В течение сезона степень микоризации меняется, что показывает контроль растения над поглощением питательных веществ и предотвращение им паразитизма со стороны микобионта (Rasmussen, 2002). Динамика микоризности растения в течение года зависит только от фенологии микоризованных органов и не связана с активностью фотосинтетических структур Орхидных (Masuhara, Katsuya, 1992). Развитие способности контролировать колонизацию эндوفитными и некротрофными грибами и введение их в микоризные симбиозы уникально для Орхидных.

Противоречие этого типа симбиоза заключается в том, что, с одной стороны, присутствуют очень специализированные механизмы межклеточного взаимодействия симбионтов (образование и переваривание пелотонов), а с другой – в отличие, например, от АМ, микобионт, как правило, ведет независимое сапротрофное существование.

Роль микоризы в прорастании семян орхидей была открыта Ноэлем Бернаром в конце XIX

в., а в начале XX были опубликованы данные исследования ранних стадий развития Орхидных (Bernard, 1904). Им же была сформулирована первая гипотеза симбиогенного происхождения наземных сосудистых растений (Bernard, 1909). Она заключалась в том, что инфицирование симбиотическими грибами протокорма имело эволюционное значение. Происхождение Орхидных Бернар объяснял долгой коэволюцией мико- и фитобионта, а впоследствии предположил, что возникновение многолетности у растений и развитие всей наземной растительности связано с образованием симбиозов грибов и первых сосудистых растений. Так же объяснялось возникновение специализированных запасующих органов – клубней и корневищ.

Прочие типы эксплуативных микориз

Микогетеротрофия независимо возникала в ходе эволюции растений неоднократно. Как минимум, один раз у Печеночных мхов, один раз у Папоротникообразных, один раз у Голосеменных, возможно, десятки раз у Однодольных и минимум 4 раза у Двудольных. Только в пределах сем. *Orchidaceae*, на долю которого приходится 35% видов микогетеротрофов, она независимо появлялась 20 раз (Bidartondo et al., 2004; Leake, 1994). Всего имеется около 500 видов микогетеротрофов из 10 семейств (Bidartondo, 2005). Точное число раз возникновения микогетеротрофии установить сложно, так как возникают сложности с систематикой бесхлорофилльных растений. Большую часть жизни микогетеротрофы проводят под землей, многие филогенетические линии их неизвестны. Чаще объектом эпипаразитизма является ЭМ, но существуют и микогетеротрофы на АМ: бесхлорофилльные представители сем. *Gentianaceae* (*Voyria*, *Voyriella*) и *Corsiaceae* (*Arachnitis*, *Corsia*), получающие питание от находящихся рядом АМ растений. (Imhof, 1999; Bidartondo et al., 2002). Несмотря на наличие древесных растений, образующих ЭМ, эти виды используют только АМ симбиоз. Предполагается, что бесхлорофилльные виды ведут свое происхождение от зеленых АМ, сумевших в ходе эволюции «повернуть» ток органических соединений в микоризе в свою сторону, утративших хлорофилл и специализировавшихся к узкому кругу АМ грибов. Микобионтами *Arachnitis* являются представители узкой группы в пределах рода *Glomus*, для рода *Voyriella* и большинства видов *Voyria* симбионты относятся к той же группе, но не перекрываются между видами растений, как и в случае микогетеротрофов на ЭМ. Около

Таблица 13. Филогенетические линии растений, в которых развивалась микогетеротрофия (по Bidartondo, 2005)

Полностью микогетеротрофные (около 500 видов)	Микогетеротрофные только в начале развития (около 20000 видов)
Печеночные мхи (<i>Cryptothallus</i>)	Плауны (<i>Lycopodium</i> , <i>Huperzia</i> , <i>Phylloglossum</i>)
Burmanniaceae	<i>Psilotum</i> , <i>Tmesipteris</i>
Triuridaceae	<i>Botrychium</i> , <i>Ophioglossum</i>
<i>Arachnitis</i> , <i>Corsia</i> (Corsiaceae)	<i>Actinostachys</i> , <i>Schizaea</i> , <i>Stromatopteris</i>
Orchidaceae	Orchidaceae
Gentianaceae	
Monotropaceae	

48% видов растений-микогетеротрофов принадлежит к предположительно АМ Однодольным (сем. Burmanniaceae, Triuridaceae, Petrosaviaceae, Lacandoniaceae, Corsiaceae) (Leake, 1994).

Корневая система *Voyria aphylla* развивает корневые волоски только в местах контакта с корнями соседних растений или органическими веществами подстилки. Корневые волоски *Voyria* растут в направлении корней фотосинтезирующих растений, как гаустории у паразитов, перед образованием гифальных соединений (Imhof, 1999). Внедрение микобионта происходит также практически только в местах контакта корней. Образующая микориза относится к АМ *Paris*-типа, но лишена арбускул. Многие споровые растения (Мохообразные, Папоротникообразные) демонстрируют сходную форму микотрофии на стадии гаметофита.

Микогетеротрофия возможна на определенной стадии жизненного цикла (все Орхидные, многие папоротникообразные и плауны) или в течение всей жизни (некоторые Орхидные, Горечавковые, все представители семейств Monotropaceae и Triuridaceae) (табл.13).

До сих пор неизвестно, являются ли микогетеротрофы паразитами или мутуалистами, не исключено, что они предоставляют некоторые преимущества своим симбионтам, но оценить получаемую ими «выгоду» очень трудно. Эволюцию микогетеротрофии возможно будет понять только тогда, когда появится возможность точно оценить «затраты» и «выгоду» каждого из партнеров по симбиозу (Taylor, 2004). Несмотря на то, что микогетеротрофные растения не являются доминантами фитоценозов, изучение их и поиск ответов на многочисленные связанные с ними вопросы крайне важны. Микогетеротрофия представляет собой уникальную модель для исследования экологии, физиологии и эволюции грибо-растительных ассоциаций. Во-первых, это

пример для изучения транспорта органических соединений между зелеными растениями по микелиальной сети, а во-вторых, для исследования эволюции паразитизма, который резко отличается от привычных в данном случае клише – фитопатогенных грибов и насекомых-фитофагов. Это удивительный случай паразитизма растения на грибе, исследование которого может приблизить к пониманию фундаментальных основ появления и развития симбиотических – мутуалистических и паразитических – отношений в разных группах организмов.

Молекулярно-генетические аспекты взаимодействий симбионтов в микоризах. Роль сигнальных систем в установлении симбиоза

У обоих партнеров в микоризах имеются специфические элементы генетической программы для симбиоза. Совместимость, подавление или преодоление защиты растения и обмен веществами, позволяющие двум очень различным организмам делить общий источник углерода, эволюционировали и в дальнейшем были использованы для других типов симбиоза (Bècard et al., 2004; Gianinazzi-Pearson et al., 2004). Получение мутантов АМ растений с нарушенной способностью к микоризообразованию позволило продемонстрировать, что колонизация растения микобионтом – многоступенчатый, генетически регулируемый процесс, находящийся под контролем специфических локусов (Bonfante, 2003; Hahn, Mendgen, 2001) (табл. 14). При анализе взаимодействия симбионтов на клеточном уровне выяснилось, что в клеточных стенках, мембранах и цитоскелете обоих партнеров происходят существенные изменения. Что касается молекулярных основ взаимодействий в микоризах, то их изучение находится пока на начальной

Таблица 14. Стадии жизненного цикла АМ гриба (по Salzer et al., 2004).

Стадии развития АМ симбиоза	Мутанты растений с блокировкой микоризообразования на различных стадиях	Нарушение микоризообразования у мутантных растений
Прорастание споры микобионта, стимулированное корневыми экссудатами растения-хозяина	PrePen- M161и M20 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Прорастание спор не стимулируется (ингибируется?) корневыми экссудатами растения
Направленный рост гифы из прорастающей споры в сторону корня растения-хозяина (хемотропизм по градиенту CO ₂ и в сторону корневых экссудатов растения)		
Ветвление гиф микобионта под влиянием фактора ветвления, выделяемого корнем растения-хозяина		
Формирование аппрессорий на поверхности корня под действием топологического сигнала растения-хозяина	Мyc ⁻¹ (<i>Pisum sativum</i>)	Проникновение гифы предотвращается защитными реакциями растения (формирование каллусной папиллы, отложение фенольных соединений под аппрессорией)
Проникновение гиф микобионта в корень между клетками эпидермиса или сквозь них	SYMRK ⁻ (<i>Lotus japonicus</i>)	Проникновение гиф ограничивается эпидермисом под действием рецепторной киназы растения
Проникновение гиф микобионта сквозь клеточные стенки клеток коры корня растения-хозяина	Мyc ⁻² (<i>Pisum sativum</i>)	Остановка развития арбускул на интраматричных гифах
Развитие арбускул: 1. проникновение гифы в клетки коры и формирование арбускул 2. ветвление арбускул и транспорт между симбионтами 3. появление септ и деградация арбускул		
Формирование экстраматричных гиф и новых спор		

стадии, в отличие от клубенькового симбиоза Бобовых, для которого показана тонкая регуляция сигнальными молекулами, которые принимаются рецепторами, активирующими каскад сигнальной трансдукции, постепенно ведущий к активации генов и формированию клубенька (Bonfante, 2003). Исследования диалога симбионтов на уровне генов и молекул касаются в основном двух наиболее широко распространенных и хорошо изученных типов микоризных ассоциаций – АМ и ЭМ. Для прочих типов микориз вопросы, связанные с формированием симбиоза и процессами транспорта веществ в уже сформированных ассоциациях еще ждут ответов.

Этапы формирования АМ и сигналы симбионтов

Ввиду чрезвычайно широкого распространения АМ среди групп растений предполагается, что ключевые моменты молекулярных и генетических составляющих симбиотических клеточных программ у разных растений могут быть общими (Koide, Schreiner, 1992). Чаще всего, для исследования молекулярного диалога между растением и АМ микобионтом в качестве модельных объектов выбирают растения из сем. Бобовые, т.к. для них были получены мутанты, дефектные по нескольким стадиям формирования АМ. Кроме того, было сделано предположение, что ряд генетических и молекулярных механизмов,

задействованных в симбиотической программе, был заимствован в ходе эволюции клубенькового симбиоза из уже установившейся к тому времени АМ ассоциации, что также определяет выбор Бобовых как модельных растений для изучения соответствующих аспектов симбиозов (Hahn, Mendgen, 2001). Исследования молекулярного диалога между партнерами по АМ симбиозу затруднены облигатно биотрофным статусом микобионтов, их многоядерностью и неожиданно высоким уровнем их генетической изменчивости, а также присутствием в симбиозе третьего компонента – эндосимбиотических бактерий, обитающих в цитоплазме грибных клеток (Bonfante, 2003; Finlay, 2005; Koide, Mosse, 2004).

Споры АМ грибов способны прорасти без хозяина, но рост мицелия в этом случае очень ограничен, чтобы предотвратить растрату питательных веществ (Barker et al., 1998; Mosse, 1959). Корневые экссудаты растения-хозяина играют важную роль в привлечении микобионта. Усиление роста гиф из прорастающей споры и их ветвление происходит в ответ на корневые экссудаты или летучие вещества растения-хозяина (Koide, Schreiner, 1992 и др.). Несовместимые растения в ряде случаев ингибируют прорастание спор АМ грибов, но иногда не оказывают отрицательного влияния. Корневые выделения НМ растений (*Brassica*, *Lupinus*) не стимулируют прорастание спор АМ грибов и активное ветвление гиф (Giovannetti et al., 1993; Harrison, 1999). По данным о стимуляции прорастания спор АМ грибов различными растениями, приведенным в работе Джованнетти и Сбраны, можно заключить, что на этом этапе АМ грибы не могут отличить совместимое растение от несовместимого: максимальная стимуляция прорастания (98% спор проросло) наблюдалась в присутствии ЭрМ растения *Vaccinium myrtillus*, не образующего АМ, а присутствие некоторых НМ растений стимулировало прорастание спор в равной или даже большей степени, чем присутствие АМ растения-хозяина (94% или 96% сравнительно с 94,3%) (Giovannetti, Sbrana 1998). Ветвление гиф необходимо для поиска корня или уже в момент приближения к нему, что резко увеличивает возможность контакта с хозяином (Giovannetti et al., 1993; Bècard et al., 2004). Гифы не всегда демонстрируют направленный рост в сторону корня до тех пор, пока не окажутся совсем близко от хозяина. В месте контакта с корнем гифы начинают активно веерообразно ветвиться (Koide, Schreiner, 1992). Существует предположение, что летучее вещество, обладающее свойствами

сигнального – углекислый газ, т.к. показано, что *in vitro* это вещество может стимулировать рост гиф некоторых видов АМ грибов (Bècard, Piché, 1989; Gadkar et al., 2001). Флавонол кверцетин, фенольное соединение, образуемое семенами и корнями растений, также стимулирует рост АМ гиф перед синтезом микоризы (Bècard et al., 1989; 1992). Несовместимые растения не оказывают отрицательного влияния на распространение гиф, но не усиливают их ветвление. Это первый этап формирования АМ, на котором происходит разделение растений на хозяин и несовместимое (Giovannetti, Sbrana 1998). В настоящее время активно ведется работа по идентификации корневых сигналов, что осложнено тем, что корневые экссудаты представляют собой смесь, где трудно выделить именно сигнальные молекулы. Ранее считалось, что основными сигнальными молекулами являются флавоноиды, т.к. они часто присутствуют в корневых экссудатах, участвуют как сигнальные вещества в других растительно-микробных взаимодействиях, обнаруживаются в корнях в более высоких концентрациях в почвах, где мало фосфора, в микромолярных концентрациях могут значительно стимулировать рост АМ грибов *in vitro*, стимулируют микоризообразование, и в микоризованных корнях происходит их модификация (Barker et al., 1998; Harrison, 1999; Koide, Schreiner, 1992 и др.). Эта точка зрения была опровергнута тем, что мутанты без флавоноидов способны к нормальному микоризообразованию (Bècard et al., 1995). И напротив, часто используемый модельный объект для изучения АМ, геномодифицированная морковь, не образует флавоноиды. Сигнальные вещества могут быть аналогичны олигосахаридным сигнальным молекулам, которые присутствуют во взаимодействиях паразит-хозяин и *Rhizobium* – Бобовые. У микоризообразующих грибов показана слабая целлюлазная и полигалактуронозная активность, а эти ферменты способны высвобождать олигосахариды из растительной клеточной стенки. Этот процесс может запускать каскад реакций, контролируемых растением (Gadkar et al., 2001).

В ходе недавних исследований из корня *Lotus japonicus* был впервые выделен фактор ветвления гиф и определен как стриголактон 5-деокси-стригол. Стриголактоны – группа сесквитерпенов лактонов, ранее выделяемых как стимуляторы прорастания семян у паразитических растений *Striga* и *Orobancha* (Koide, Schreiner, 1992). Стриголактоны способны вызывать ветвление гиф у прорастающих спор АМ грибов в очень низких концентрациях (Akiyama et al., 2005).

До физической встречи партнеров для АМ гриба важны сигналы растения. Неизвестно, играют ли роль сигналы гриба для установления симбиоза, например, для подавления защитных реакций растения. В последнее десятилетие было обнаружено, что некоторые растительные гены, участвующие в трансдукции Nod-факторов, образуемых бактерией *Rhizobium*, необходимы также и для успешного формирования АМ симбиоза. Мутанты Бобовых, неспособные к образованию клубеньков (Nod-), также являются НМ (Muc-). У этих двух типов симбиозов есть общие элементы сигнальной трансдукции у растения-хозяина, что предполагает наличие у микобионтов АМ «Muc»-факторов, подобных Nod-факторам (Kosuta et al., 2004). Это сигналы, узнаваемые корнями растения-хозяина и играющие главную роль в установлении успешного симбиоза. Хитиновая основа молекулы Nod – фактора более типична для грибов, чем для бактерий: сигнальный механизм *Rhizobium* мог эволюционировать из более древнего АМ симбиоза (Hahn, Mendgen, 2001). Прорастающие споры АМ грибов выделяют диффундирующий фактор, который усваивается корнем без прямого контакта и индуцирует симбиоз-специфичную генную экспрессию у растения. АМ грибной фактор индуцирует экспрессию гена MtENOD11 (индуцируемого также в клубеньковом симбиозе у *Medicago truncatula*). НМ грибы его не образуют, что приводит к специфичности симбиоза. Индукция гена MtENOD11 ассоциирована с появлением пресимбиотического гифального ветвления (Kosuta et al., 2004).

Существуют некоторые свидетельства наличия молекулярного диалога между симбионтами АМ в пресимбиотической фазе (перед непосредственным контактом). У АМ гриба *Gigaspora* показана индукция генов, связанных с митохондриальной активностью, интенсификация дыхания и увеличение числа митохондрий в ответ на фактор в корневых экссудатах растения-хозяина (Tamasloukht et al., 2003). Дыхание приводит к увеличению пула АТФ в цитоплазме, поглощенный фосфат симпортируется с протоном АТФазой. АТФазная активность цитоплазматической мембраны ведет к повышению основности цитоплазмы, что влияет на многие внутриклеточные процессы (дифференциацию, метаболизм, клеточный цикл), активизируя их (Bècard et al., 2004). рН цитозоля *Gigaspora* при росте рядом с живым корнем от 6,5 до 6,9, а без растения цитозоль имеет кислую реакцию. Показано, что гены протон-зависимой АТФазы индуцируются

симбиозом (Hahn, Mendgen, 2001). Далее прямо (ген на ген) или косвенно происходит индукция «Muc»-факторов гриба, которые действуют как триггер на генную экспрессию в корне растения и запускают симбиотическую программу хозяина.

Две главные ступени формирования АМ симбиоза – появление аппрессорий на поверхности корня, необходимое для проникновения микобионта внутрь хозяина, и дифференциация внутрикорневого мицелия с образованием арбускул – основной обменной зоны между симбионтами (Giovannetti, Sbrana, 1998; Gianinazzi-Pearson et al., 2004). Симбиотическая стадия формирования АМ также находится под контролем растения-хозяина. Начало формирования аппрессорий (утолщений гиф) может управляться биохимическими сигналами на поверхности корня, также как и экспрессией новых генов. На несовместимых растениях аппрессории не образуются (могут формироваться только уродливые утолщения гиф) (Giovannetti, Sbrana, 1998). Формирование аппрессорий показано также на изолированных, очищенных клеточных стенках корня, но только клеток из эпидермиса, а не клеток коры или сосудов, и только совместимого растения (Douds, 1997 – цит. по Bècard et al., 2004). Очищенные клеточные стенки не стимулируют активного ветвления гиф микобионта, что наблюдается в интактных корнях. Гифы растут от аппрессорий и затем пронизывают корень. Проникновение микобионта внутрь корня – функция нескольких растительных генов, что показано в исследованиях мутантов с блокировкой микоризообразования на разных стадиях (Harrison, 1999). Процесс внедрения активно контролируется растением-хозяином и зависит от подавления его защитных реакций. Мутанты могут образовывать аппрессории, но не могут проникать в растение и образовывать арбускулы, т.к. им препятствует защита растения, заключающаяся в реакции сверхчувствительности по отношению к АМ грибам (табл.14). Исследование мутантов Muc⁻¹ гороха показало, что, например, формирование каллусных папилл и накопление фенольных соединений под местом прикрепления аппрессории останавливает продвижение гифы микобионта АМ (Salzer et al., 2004). У мутанта *Lotus japonicus*, дефектного по образованию ассоциированной с симбиозом рецепторной киназы (SYMRK) было показано, что проникновение микобионта блокируется в эпидермисе. Это показывает, что SYMRK в эпидермисе является звеном в каскаде сигналов. (Salzer et al., 2004). Сигналы могут снизить защитную

реакцию растения. Молекулы углеводов действуют как сигнальные в множестве других грибо-растительных взаимодействий, и, вероятно, они индуцируют формирование аппрессорий в АМ симбиозе. Проникновение в корень, скорее всего, происходит тем же путем, что и у корневых патогенов: путем синтеза ферментов, разрушающих растительные клеточные стенки вкупе с механическим воздействием проникающей гифы. АМ грибы выделяют экзо- и эндоглюконазы, целлюлазы, ксилотрансферазы и пектолитические ферменты, включая полигалактуроназу, каждый из которых может участвовать в проникновении в корень растения-хозяина (Harrison, 1999).

Известно, что на стадии формирования аппрессорий происходит модификация белков (до 14 новых или повышающих экспрессию белков при формировании АМ у *Medicago truncatula*), но их происхождение и кодирующие последовательности не определены. Из 5 грибных генов, экспрессирующихся в аппрессории, 2 кодирующих гипотетические белки не обнаружены в экстраматричных гифах или спорах, что позволяет предполагать их участие в симбиотических взаимодействиях. При изучении ответов корня на контакт, предшествующий проникновению гиф микобионта, на стадии аппрессорий, выявлено, что одна треть сверх-экспрессируемых растительных генов кодируют белки, ассоциированные с сигнальной трансдукцией (например, МАП-киназы) или белковым синтезом (факторы инициации и элонгации трансляции). Это первое свидетельство активации сигнальной трансдукции на этой стадии развития микоризы (Gianinazzi-Pearson et al., 2004).

Финальная стадия микоризного синтеза включает образование арбускул, везикул и гифальных клубков. После формирования аппрессорий гифы строго локально продуцируют гидролитические ферменты, разрушая растительную клеточную стенку в зоне контакта и входят в эпидермис и кору, где внутриклеточно развиваются арбускулы (Smith, Read 1997). У совместимых растений везикулы образуются после формирования арбускул, у несовместимых – в отсутствие арбускул. Образование везикул может происходить в растениях с недостатком аппрессорий и арбускул (Giovannetti, Sbrana 1998). Это позволяет предположить, что гриб может действовать более как паразит, чем как мутуалист, и успех симбиоза зависит от множества условий. Исследование мутантов Мус⁻² гороха показало, что стадия формирования арбускул находится под контролем растения. Развитие

матрикса в зоне контакта требует синтеза ряда белков *de novo*. К примеру, семейство ксилотрансфераз индукцируется во время развития микоризной ассоциации. Эти ферменты отвечают за разрушение и перестройку ксилотрансферных связей в клеточных стенках, и предполагается, что они вовлечены в размягчение клеточных стенок растения для проникновения гифой микобионта и в поддержание структуры матрикса зоны контакта. Ряд генов, напротив, снижает свою экспрессию при микоризообразовании. На примере *Medicago truncatula* это показано для генов фосфатных транспортеров и гомолога кислой фосфатазы. Повышающаяся концентрация фосфатов во внешнем пространстве снижает экспрессию этих генов (Harrison, 1999).

После формирования АМ меняется состав корневых экссудатов, и это отрицательно влияет на дальнейшую микоризацию. Экссудаты более не стимулируют развитие АМ гриба (показано на примере *Glomus intraradices*, *Gigaspora rosea*). Предполагается, что более высокая доступность фосфора у микоризных растений приводит к снижению продукции стимулирующих экссудатов. Микоризные корни могут регулировать выделение АМ грибами ингибиторных соединений. Контроль над избыточной микоризной инфекцией, возможно осуществляется так же, как и при системной устойчивости к патогенам. Как показано, важным негативным регулятором микоризации и образования клубеньков у растения является гормон этилен (Bècard et al., 2004).

В последнее время открыто множество индуцируемых микоризообразованием растительных генов. Гены, связанные с защитой растения, индуцируются на ранних этапах симбиоза и в основном подавляются на поздних стадиях. Два гена хитиназ III класса, специфично экспрессирующиеся у *Medicago truncatula* во время микоризации, вовлекаются в подавление защитной реакции растения на поздних этапах симбиоза. Хитиназы растения-хозяина могут инактивировать хитиновые элиситоры микобионта и таким образом подавлять защитную реакцию растения (Harrison, 1999; Salzer et al., 2004). Генная индукция носит тканеспецифичный характер: индукция нескольких растительных генов совпадает с формированием аппрессорий и ранними стадиями инфекции (OsLtp у риса и MtENOD11 у люцерны) или с формированием арбускул (StPT3 у картофеля) (ссылки на оригинальные исследования см. в Bècard et al., 2004). Экспрессия хитиназы корнем *Medicago truncatula* оказывала стимуляторный эффект на жизненный цикл мико-

бионта AM *Glomus intraradices*: ускорялось прорастание спор, гифы более активно пролиферировали в тканях растения-хозяина и возросло число образуемых спор. Пока неизвестно, с чем связана стимуляция прорастания спор: с прямым воздействием хитиназа растения на хитин в клеточных стенках споры, или с модификацией сигнальных молекул (Hahn, Mendgen, 2001; Salzer et al., 2004). Старение арбускул сопровождается накоплением в клетке H_2O_2 . Неизвестно, связано ли это с экспрессией гена хитиназы, но отмечено, что пока экспрессируется ген, не происходит накопления H_2O_2 (Harrison, 1999).

Индукция защитных реакций в корневой системе при формировании нормальных микоризных ассоциаций была описана и для AM, и для ЭМ. Защитные реакции растения при формировании AM симбиоза слабы и непродолжительны – действуют только на начальных стадиях колонизации микобионтом коры корня как не скоординированная индукция соответствующих генов или белков, в отличие от реакции на патоген (Gianinazzi-Pearson et al., 2004; Koide, Schreiner, 1992). Защитные реакции совместных растений никогда не достигают уровня, нужного для предотвращения внедрения гриба. AM грибы либо не вызывают стандартной защитной реакции растения, либо эта реакция подавляется параллельными механизмами, индуцированными микобионтом (Gadkar et al., 2001). Эта дискретная и локальная активация защитного ответа до уровня, совместимого с симбиотическими функциями, может быть ключевым моментом в контроле внутриклеточного развития микобионта без индукции гибели клеток растения-хозяина (Gianinazzi-Pearson et al., 2004). Было показано, что хитиназы и пероксидазы играют ключевую роль в защитной системе растения, и их синтез индуцируется внедрением микобионта. Максимальная индукция была вызвана наиболее совместимыми штаммами (Albrecht et al., 1994). AM грибы также вызывают у растения синтез фитоалексинов, но полностью защитные реакции не происходят (Harrison, 1999; Koide, Schreiner, 1992). Наличие умеренной защитной реакции объясняется тем, что микобионт не может совершенно избежать ответа растения на вторжение или тем, что на ранних этапах симбиоза отношения не являются сбалансированными. Индукция защитных систем требует от растения некоторых затрат, но повышает устойчивость к возможному проникновению патогенов (Vècard et al., 2004).

Что касается молекулярно-генетических аспектов функционирования AM после ее форми-

рования, то внимание исследователей в основном привлекают гены, кодирующие определенные функциональные белки, но идентифицированы гены и белки преимущественно растительного происхождения (Harrison, 1999 и др.). Растительные функции, выявленные в симбиотических тканях, преимущественно сводятся к защитным реакциям (40%), образованию клубеньков (15%) или процессам мембранного транспорта (около 14%), и по большей части локализованы в клетках, содержащих арбускулы (Harrison, 1999; Harrison et al., 2002; Gianinazzi-Pearson et al., 2004 и др.). Гены переносчиков фосфатов (например, Le PT1 (*Lycopersicon esculentum* Phosphate Transporter 1) – ген, кодирующий фосфатный транспортер в томате) активны в микоризованных корнях, и их экспрессия согласуется с их ролью в транспорте фосфатов в растение после высвобождения их из гиф микобионта (Hahn, Mendgen, 2001; Rausch, Bucher, 2002). Более того, специфичные гены из семейства растительных H^+ АТФаз индуцируются, когда арбускулы развиваются в клетках хозяина, что может являться необходимой движущей силой для транспорта фосфатов через мембраны в контактной зоне симбионтов (Gianinazzi-Pearson et al., 2000). Для AM также показаны изменения в цитоскелете клеток растения-хозяина под действием микоризного гриба (Blancaflor et al., 2001). Также микобионт усиливал экспрессию растительных генов белков, ответственных за изменение архитектуры клеточной стенки (ксилоглюкан-эндотрансгликозилазы и др.). Кроме этого, среди мембранных белков отмечено повышение генной экспрессии протон-зависимых АТФаз гриба и растения в ответ на формирование микоризы. Эти белки участвуют в переносе фосфатов и др. питательных веществ (Gianinazzi-Pearson et al., 2000).

Этапы формирования ЭМ и сигналы симбионтов

Как и в случае AM, развитие ЭМ симбиоза требует включения множества генов в сложной взаимозависимой последовательности (Martin et al., 2001). Гифы микобионта внедряются в корневую чехлик и растут сквозь него, трансформируя своим внедрением ткани растения-хозяина. Прикрепившись к эпидермису, гифы образуют серию слоев, и дальнейшая дифференциация приводит к образованию ЭМ чехла. Гифы погружены во внеклеточный полисахаридно-протеиновый матрикс. Микобионт оказывает сложное влияние на корень, включающее общую ростовую стимуля-

цию, тропизмы, направленный рост гиф внутрь тканей растения, морфогенетические эффекты. Гифы стимулируют образование боковых корней, дихотомии апикальной меристемы у сосны и дифференциацию клеток корня (Martin et al., 2001).

Для ЭМ сигнальные молекулы и их узнавание неизвестны или описаны ошибочно. Молекулы, регулирующие взаимодействия между симбионтами, можно классифицировать следующим образом: ризосферные сигналы, вызывающие тропизмы гиф по отношению к растительным тканям; белки, отвечающие за прикрепление гиф и их внедрение в ткани хозяина (адгезины, гидролазы); гормоны и вторичные сигналы, осуществляющие индукцию органогенетической программы и в грибной и в растительной клетках; молекулы, нейтрализующие действие защитных систем растения; молекулы, координирующие стратегии для обмена веществами между симбионтами и сбалансированного роста свободного мицелия в почве для получения минеральных веществ (Martin et al., 2001). Растение-хозяин выделяет в ризосферу сигнальные вещества, включающие флавоноиды, дитерпены, гормоны и питательные вещества. Э. Мелин (Melin, 1953) впервые сделал предположение о том, что прорастание спор ЭМ грибов стимулируется выделениями корней растений-хозяев. Абиетовая кислота, выделенная из корня сосны, индуцировала прорастание спор микобионта из рода *Suillus* в очень низких концентрациях (10^{-7} моль) (Fries et al., 1987). Прорастание спор близкого рода *Rhizopogon* также стимулируется экссудатами корней сосны, но природа сигнала неизвестна (Bruns et al., 2002). Метаболиты хозяина способны значительно менять морфологию гиф (флавонол рутин стимулирует рост, а цитокинин зеатин меняет угол ветвления гиф). Также корневые экссудаты запускают накопление связанных с формированием симбиоза молекул микобионта, таких как гипафорин. Этот грибной алкалоид индольной природы был выделен из ЭМ гриба *Pisolithus*, он образуется во время формирования ЭМ и снижает, наряду с механическим действием ЭМ чехла, рост корневых волосков. Триптофан-бетаин-гипафорин – первая идентифицированная молекула микобионта, индуцирующая дифференциацию клеток растения-хозяина в связи с симбиозом. Это антагонист ауксина, по-видимому, участвующий в супрессии удлинения корневых волосков во время развития ЭМ. Но пока это вещество известно только для *Pisolithus tinctorius*, и неясно, играют

ли подобные молекулы сравнимую роль в ЭМ взаимодействии (Hahn, Mendgen, 2001). Добавление индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) – антагониста гипафорина – восстанавливает рост кончиков корней. ИУК микобионта контролирует некоторые ступени морфогенеза ЭМ. Мутанты *Hebeloma* с избыточной продукцией ИУК образуют микоризу с многорядной сетью Гартига с гифами, проникающими внутрь растительных клеток (Gay et al., 2004; Hahn, Mendgen, 2001; Martin et al., 2001). Это не наблюдается при нормальном развитии ЭМ ассоциации, но микобионт при этом не проявляет черты патогена, т.е., сверхпродукция ИУК не влияет на симбиотический статус гриба (Gay et al., 2004). Хотя способность ЭМ грибов к синтезу ИУК давно известна, роль этого метаболита в симбиозе долгое время оставалась неясной. В настоящее время известно, что выделяемая микобионтом ИУК может влиять на генную экспрессию растения-хозяина: при формировании ЭМ *Hebeloma cylindrosporum* было обнаружено 4 гена с повышающей регуляцией ауксином. Ген *Pp-iaa88* гомологичен генам, кодирующим факторы транскрипции, экспрессия повышалась непосредственно после контакта симбионтов; ген *PpGH3.16* кодирует белок, предполагаемо ингибирующий рост латеральных корней, он снижает экспрессию при микоризообразовании; *Pp-C61* – кодирует неизвестный белок, вероятно, участвующий в защите растения от вторжения гриба; *Pp-Prx75* – кодирует пероксидазу, его экспрессия повышается при формировании микоризного симбиоза, но нельзя утверждать, что это связано с действием ауксина (Gay et al., 2004).

При взаимодействии микобионта с корнем растения-хозяина происходят изменения в экспрессии генов некоторых белков, ассоциированных с клеточной стенкой (Hahn, Mendgen, 2001; Martin et al., 1999). В ЭМ *Pisolithus tinctorius* и *Eucalyptus* при взаимодействии симбионтов наблюдается высокая концентрация белков клеточной стенки гриба. Гидрофобины, отвечающие за гидрофобность клеточной стенки, также участвуют в адгезии микобионта и растения-хозяина и в формировании контактной зоны между симбионтами. Наиболее интересной является группа белков SRAP – symbiosis-regulated acidic proteins (симбиоз-регулируемые кислые белки) (Tagu, Martin, 1996). Эти белки появляются после адгезии при образовании чехла и формировании сети Гартига, и некоторые из них имеют последовательности, типичные для животных белков адгезинов (Barker et al., 1998). В SRAP-белках

присутствует фрагмент Arg-Gly-Asp, который, как показано, взаимодействует с фибронектин- и интегрин-подобными белками. Поскольку фибронектин и интегрин ассоциированы с цитоскелетом, возможно, что SRAP-белки могут изменять форму клеток (Barker et al., 1998). Показана повышающая регуляция гена *EgTubA1*, кодирующего α -тубулин у эвкалипта, при формировании ЭМ, а у кукурузы промотор гена α -тубулина *Tub3a* активировался специфично в клетках, содержащих арбускулы (ссылки на оригинальные исследования см. в Barker et al., 1998).

Многие грибные метаболиты вызывают защитный ответ растения. Также ответные реакции индуцируют продукты разложения растительной клеточной стенки. Пути сигнальной трансдукции включают изменения в фосфорилировании белков, модификацию ионных потоков, увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле, деполяризацию плазмалеммы и изменения в экспрессии генов. Посттрансляционная модификация белков путем фосфорилирования – универсальный механизм в восприятии/трансдукции сигналов патогенов и симбионтов (Martin et al., 2001). Индуцируемые элизиторами реакции, наблюдаемые при формировании ЭМ, сходны с показанными на начальных стадиях реакции на внедрение патогена. Элизиторы из *Amanita muscaria* и *Hebeloma* при микоризообразовании индуцировали хитиназы и пероксидазы у *Picea abies*. У семян эвкалипта эти ферменты образовывались даже в ответ на экстракт ЭМ гриба *Pisolithus* без клеток. Возможно, что подобные реакции ограничивают распространение сети Гартига в корне, но, как и в случае АМ, колонизация микобионтом не приводит к реакции сверхчувствительности и гибели клеток. Способы подавления защитных реакций хозяина при формировании ЭМ в целом еще не изучены, но выявлены некоторые возможные механизмы. На примере ЭМ ели и *Hebeloma* показано, что быстрые изменения в фосфорилировании белков инактивируются внеклеточными хитиназами и глюканазами растения, и разрушение хитиновых элизиторов *Hebeloma* предотвращает индукцию выброса ионов калия и хлора, защелачивание внеклеточного пространства и синтез перекиси водорода клетками ели. Хитиназы – часть механизма, позволяющего микобионту проникать в растение, не будучи распознанным как патоген (Hahn, Mendgen, 2001; Harrison, 1999). На примере модельной ЭМ ассоциации – суспензии культуры клеток *Picea abies* и *Hebeloma crustuliniforme* показано, что гриб постоянно выделяет хитиноподобные

элизиторы. Они индуцируют быстрый каскад защитных реакций в клетках ели, включая вывод ионов K^+ и Cl^- , ввод Ca^{2+} и H^+ , фосфорилирование 63 kDa белка (pp63) и синтез H_2O_2 , начинающиеся через 5 мин после добавления элизитора. Но хитиназы растения, выделяемые в апопластное пространство не наносят ущерба микобионту, а эффективно инактивируют хитиновые элизиторы, выделяемые клеточными стенками клеток гриба, путем перевода их в мелкие неактивные единицы (мономеры N-ацетилглюкозамина), не являющиеся элизиторами и не связывающиеся с рецепторами. В этом случае предотвращается распознавание проникновения, не происходят защитные реакции и возможно установление симбиоза (Harrison, 1999; Martin et al., 2001).

Ответные реакции, индуцируемые элизиторами, могут ослабляться ауксинами, что предполагает взаимодействия между сигнальными каскадами элизиторов и ауксинов (Martin et al., 2001). В общем виде преодоление защитных реакций растения при формировании микоризного симбиоза можно представить следующим образом: маскировка или распад элизиторов (деградация хитиновых элизиторов микобионта растительными хитиназами); создание путем транспорта веществ к микобионту дефицита питательных веществ в инфицированной клетке (в отсутствие достаточной ассимиляции гены количественной устойчивости не экспрессируются); собственно подавление защитных реакций хозяина (физиологическое подавление грибами неизвестно, у паразитов отмечено выделение гликопептидов – супрессивов) (Hahn, Mendgen, 2001).

Образование симбиоза требует контролируемой во времени и пространстве генной активности и наличия белков, участвующих в процессах морфогенеза. Пролиферация корней и грибных гиф, необходимость адаптироваться к быстро меняющимся условиям окружающей среды (изменения pH, потоков питательных веществ и т.д.) требует большого разнообразия генных продуктов. Некоторые грибные гены (*PF6.2* из *Laccaria bicolor* и *ras* из *Pisolithus*) индуцируются до физического контакта симбионтов, подтверждая предположение о том, что растворимые элизиторы принимают участие в формировании ЭМ симбиоза на ранних стадиях. Коммуникационные гены (ген гетеротримерной ГТФазы, *ras*, гены кальмодулин-зависимой фосфопротеин-фосфатазы, серин-треонин киназы), экспрессирующиеся в 4х-дневной микоризе *Pisolithus/Eucalyptus*, составляют 13% от всех симбиотических генов (Voiblet et al., 2001).

Последовательность гена *Pisolithus*, кодирующая α -субъединицу гетеротримерной ГТФазы, Pt-Gra, очень сходна с последовательностью гена, кодирующего грибную Gra, участвующую в патогенезе (Kahmann et al., 1999). Это позволяет предполагать, что она играет аналогичную роль в ранних сигналах в симбиотическом взаимодействии. Концентрация транскриптов Gra повышается в 4х-дневной микоризе *Pisolithus/Eucalyptus* (Voiblet et al., 2001). Эта повышающая регуляция может объясняться изменениями концентраций углерода и азота (известно, что экспрессия этого гена повышается в мицелии, выращенном на богатой углеродом и бедной азотом среде). Пути сигнальной трансдукции, связывающие морфогенетические изменения симбионтов при контакте с внутриклеточными процессами, еще остаются неизученными. Возможно участие и транскрипционной и пост-трансляционной регуляций в регуляции процессов, существенных для развития симбиоза.

Взаимодействие между микобионтом ЭМ и корневой системой сопровождается рядом молекулярных изменений у обоих симбионтов. Эти события выражаются в изменении экспрессии генов, кодирующих множество белков. Все гены одинаковы и для несимбиотической, и для симбиотической стадий – нет специфичных для ЭМ генов, но наблюдаются заметные изменения генной экспрессии у обоих партнеров, что предполагает участие генов вегетативного развития в формировании симбиоза (Voiblet et al., 2001). Всего к настоящему времени известно около 100 генов, связанных с разными этапами формирования ЭМ ассоциаций. Их продукты могут участвовать в процессах узнавания, прикрепления микобионта к поверхности корня, формирования контактной зоны симбионтов, новом симбиотическом метаболизме. Основные регуляторные гены, контролирующие морфогенез в симбиозе, еще не выявлены, и биохимическая активность, связанная с некоторыми симбиоз-регулируемыми генами пока неизвестна.

Сигналы симбионтов в микоризах других типов

За исключением АМ и ЭМ, некоторые предположения о сигналах, предвещающих установление симбиоза, имеются относительно ЭрМ. Показано, что в контроле формирования ЭрМ ассоциации принимают участие клеточная стенка и слизистый чехол вокруг гиф. У наиболее агрессивных штаммов микобионтов вокруг гиф

находится более толстый слой слизи. Гифы, контактирующие с поверхностью корня также имеют более толстый слизистый слой, что позволяет предположить, что слизь участвует в адгезии и/или процессах узнавания, но точных доказательств этого нет (Cairney, Ashford, 2002). Существует предположение, что сигнальными молекулами в ЭрМ симбиозе являются углеводы, т.к. остатки маннозы в избытке встречаются в фибриллярном чехле гиф агрессивных штаммов микобионтов ЭрМ, но редки у штаммов с пониженной способностью к микоризообразованию (Straker, 1996).

Экологические функции микориз

Ранние исследования микориз фокусировались в основном на особенностях микотрофного питания отдельных видов микоризных растений, не принимая во внимание того, что помимо растения-хозяина, мицелий микоризообразующего гриба контактирует, прямо или опосредованно, с почвообитающими организмами различных эколого-трофических групп, а также с множеством органических и неорганических субстратов (Finlay, 2005). В настоящее время известно, что экологические функции микоризных ассоциаций намного шире, чем предполагалось ранее, и их влиянию подвержено не только растение, но и биогеоценоз в целом (Finlay, 2004 и мн. др.).

Микоризы и жизнеспособность растения-хозяина

Роль микоризы в жизни растения полифункциональна: показана регуляция микоризой фотосинтеза растения (увеличение интенсивности фотосинтеза до 50% под действием АМ по данным St. John, Coleman, 1983), улучшение водного режима растений и повышение устойчивости к засолению благодаря более высокому осмотическому давлению в гифах, чем в корнях, а также снижение поступления металлов в побеги растений (Read, 1984; Smith, Read, 1997).

Многочисленными экспериментами показана прямая зависимость состояния растения от степени его микоризации (Bowen, 1994 и мн. др.), но есть и противоположные данные (Jones, Smith, 2004). Измерить «пользу» или «вред» от симбиоза для каждого из партнеров крайне сложно, особенно при исследовании природных сообществ, так как единого критерия не существует (Harley, 1989). Их следует учитывать в разных масштабах

(от уровня клетки до сообщества) и на разных стадиях онтогенеза или развития сообщества. Так, то, что считается критерием благополучия растения в агроценозах не обязательно способствует успешному существованию растения в природе. Для растений выгода от симбиоза может заключаться не в приросте биомассы, а, например, в устойчивости к неблагоприятным условиям в какие-то моменты жизни и т.д. Например, более мелкие АМ, чем НМ растения засоленных почв в природных условиях более жизнеспособны, так как медленнее накапливают хлориды, вызывающие солевой шок (Jones, Smith, 2004). Будет ли микориза способствовать росту и увеличению биомассы растения, зависит от действия ряда факторов: абиотических, биотических и генетических. Так, доступность минеральных веществ может приводить к сдвигу баланса в микоризе в сторону паразитизма микобионта на растении, когда положительное влияние микоризы на рост и увеличение биомассы растения может не наблюдаться (Johnson et al., 1997; Jones, Smith, 2004; Koide, Schreiner, 1992). На примере АМ показано, что в почвах, бедных доступными для растения соединениями фосфора, зависимость растения от колонизации микобионтом выше, чем в почвах, богатых фосфором (ссылки на оригинальные данные см. в Kothamasi et al., 2001). При пониженной освещенности углерод, а не минеральные элементы почвы может стать лимитирующим фактором, что при наличии у микобионта потребности в органических соединениях ведет к переходу АМ симбиоза от сбалансированного к эксплуативному. Имеются данные о снижении микоризообразования в условиях недостаточной освещенности, но некоторыми исследователями показано повышение фотосинтетической активности при колонизации определенными видами ЭМ грибов у растений при сильном затенении (Simard et al., 1997; Treseder, 2004). Жу и Шарик определили симбиоз как «паразитизм гриба» на растении при низком уровне освещенности и «паразитизм растения» на микобионте при высоком (Zhou, Sharik, 1997). Кроме освещенности и доступности минеральных веществ, на микоризный симбиоз влияет влажность почвы и др. абиотические факторы.

Положительным или отрицательным будет ответ растения на колонизацию микобионтом, зависит также от ряда биотических факторов – влияния микроорганизмов, растений и животных различных систематических групп. Так, обильное развитие листогрызущих насекомых может снижать активность фотосинтеза у растения, что

приводит у факультативно микоризных видов растений к переходу симбиоза в эксплуативный, у облигатно микотрофных растений этот эффект не отмечен. Беспозвоночные-микофаги, выедавая мицелий, могут значительно снижать эффективность микобионта в снабжении растения минеральными веществами из почвы. При наличии рядом большого количества корней микоризных и НМ растений, между корневыми системами наблюдается конкуренция, снижающая «выгоду» от микориз для каждой особи по сравнению с растениями, растущими на больших расстояниях друг от друга. Это возможная причина того, почему на полях АМ иногда мало способствует росту растений (Johnson et al., 1997).

Исследованиями последних лет было показано, что эффективность микобионтов по способности поглощать минеральные вещества из почвы и органические из растения-хозяина может быть различной. Существуют более и менее «эксплуативные» генотипы симбионтов, что является одной из возможных причин специфичности (Egger, Hibbett, 2004). В частности, ответ растения на колонизацию АМ грибами может различаться в зависимости от штамма микобионта, также как и под действием абиотических факторов среды, конкуренции и т.д. (van der Heijden et al., 1998).

Снабжение растения элементами минерального питания: физиология микоризы и обмен веществами между симбионтами

Ранние выводы Франка (Frank, 1885) и Шталя (Stahl, 1900), о том, что растения обеспечивают микоризные грибы углеводами, а гифы грибов, распространяясь в почве или разлагающихся остатках растений, поглощают ионы фосфора, калия, кальция и др. макро- и микроэлементов и снабжают ими растения, были подтверждены современными исследованиями. К микобионту поступает от 4 до 20% от общего количества углерода растения (Johnson et al., 2002). В пределах растения углеводы транспортируются преимущественно в виде сахарозы, но микобионты микориз не могут поглощать углеводы в этой форме. Сахароза подвергается гидролизу до фруктозы и глюкозы инвертазами растения на цитоплазматической мембране клеток корня (Nehls et al., 2001; Harrison, 1999; Salzer, Hager, 1991). АМ грибы менее требовательны к количеству углеводов, это одна из причин, почему этот тип микориз доминирует среди разных групп рас-

тений. Углеводный обмен в АМ менее активен, чем в ЭМ или ЭрМ. Микобионтам ЭМ требуется больше органических соединений для «постройки» обильного мицелия и плодовых тел, поэтому их рост могут поддерживать крупные древесные растения (Harley, 1989).

Экстрематрикаральные гифы АМ способны поставлять растению до 80% фосфора и до 25% азота от общей потребности растения (Marschner, Dell, 1994). В ЭМ ассоциациях улучшение минерального питания растения еще значительнее: ЭМ корневые окончания сосны поглощают в 3,2 раза больше фосфора и в 1,8 раза больше азота, чем безмикоризная корневая система (Bowen, 1973 – цит. по Johnson et al., 1997). В мицелиальных матах *Hysterangium setchellii* при разложении подстилки высвобождается примерно вдвое больше азота и фосфора, чем в участках подстилки, незанятых ЭМ мицелием (Entry et al., 1991). Усиление поглощения минеральных веществ достигается за счет увеличения зоны контакта между корнями и почвой (мицелием эксплуатируется гораздо больший объем почвы) и выведения корневой системы за пределы зоны истощения благодаря более быстрому росту гиф сравнительно с корнями, а также перевода в доступное для растения состояние недоступных для поглощения безмикоризными растениями соединений, в том числе нерастворимых или сложных органических (Amaranthus, Perry, 1994; Harley, 1989; Read et al., 2004). Грибные гифы, более тонкие, чем корневые окончания, способны проникать в микрозоны почвы, недоступные растениям. Например, на 1 м микоризного окончания *Salix viminalis* приходится 313 м экстрематрикаральных гиф микобионта *Laccaria proxima* (Jones et al., 1990 – цит. по Bowen, 1994). Кроме того, обеспечение роста экстрематрикаральных гиф микобионта, помогающих корневой системе миновать зону истощения, требует от растения-хозяина гораздо меньших затрат энергии, чем рост корней (Harley, 1989).

За последние два десятилетия у грибов ЭМ и ЭрМ был обнаружен ферментативный аппарат, обуславливающий высокую сапротрофную активность, которая ранее считалась несвойственной симбиотрофам. Этим был положен конец неверным представлениям о сапротрофах и симбиотрофах как отдельных, четко разделенных по функциям в ценозах группировках (Hutchison, 1991; Read et al., 2004; St. John, Coleman, 1983 и др.). Впервые о том, что ЭМ микобионты способны извлекать из органических соединений почвы и подстилки вещества, необходимые

растению-хозяину, было упомянуто в работах А.Б. Франка еще в конце XIX в. (Trappe, 2005). Микобионты ЭрМ, способные к свободному существованию, поддерживались в культуре, что позволило широко изучить их функции в питании растений. Эти функции могут быть разделены на две группы: позволяющие способствовать разложению сложных органических полимеров, ускоряя разложение подстилки, и те, которые приводят к непосредственному доступу к питательным веществам (табл. 15). В первую категорию входят ферменты, способные разрушать структурные компоненты растительных остатков – кутикулу, клеточные стенки, фенольные производные, в то время как во вторую – разрушающие белки, органические фосфаты и азотсодержащие структурные компоненты грибной клеточной стенки (хитин) (Abuzinadah, Read, 1986; Cairney, Meharg, 2003; Read et al., 2004). Хитин содержит около 40% азота и является важным источником этого элемента в болотных экосистемах (Leake, Read, 1990). Фосфор находится в кислых почвах преимущественно в виде пента- и гексафосфатных солей железа и алюминия, а кроме того в виде фосфодиэфиров (нуклеиновые кислоты и фосфолипиды). Для некоторых микобионтов ЭрМ показана способность усваивать фосфор из органических источников, таких как ДНК (Leake, Miles, 1996 – цит. по Straker, 1996). Многие ферменты имеют оптимум pH в кислой зоне (3.0 – 5.5) и устойчивы к ингибированию ионами металлов, такими как Al^{3+} и Fe^{2+} , что могло сыграть важную роль в освоении Вересковыми кислых почв (Leake, Read, 1989; Read, 1984; Straker, 1996).

В отличие от микобионтов ЭрМ, ЭМ грибы гораздо более разнообразны, и подавляющее большинство их видов не поддается культивированию, что препятствует выяснению их трофического статуса. Ввиду этого их ферментативный аппарат менее исследован, и возможно делать предположения, а не заключения на основе получаемых данных. Многие ферменты и ферментные комплексы ЭМ аналогичны тем, что обнаружены у микобионтов ЭрМ, и, по-видимому, выполняют те же функции в природных условиях, что неудивительно, так как доминирующие виды доминанты бореальных лесов и Вересковые часто встречаются совместно в одних и тех же почвенных горизонтах (Hobbie et al., 2001; Read et al., 2004). Способность ЭМ грибов к деполимеризации сложных органических соединений ниже, чем у других групп грибов. Невозможность большинства микобионтов ЭМ проникать

Таблица 15. Внеклеточные ферменты грибов эрикоидной (ЭрМ) и эктомикоризы (ЭМ)* (по Read et al., 2004).

Процесс	Субстрат	Ферменты и ферментные комплексы	Тип микоризы
Разложение кутикулы Разложение растительной клеточной стенки	Кутин, липиды, воск	Эстераза жирных кислот	ЭМ
	Пектин	Полигалактуроназа	ЭМ, ЭрМ
	Целлюлоза	Целлюлаза	ЭМ, ЭрМ
	Целлобиоза	Целлобиогидролаза	ЭМ, ЭрМ
	Гемицеллюлоза	Ксиланаза и др.	ЭМ, ЭрМ
Окисление фенолов и таннинов	Монофенолы	Тирозиназа	ЭМ
	Полифенолы	Лакказа	ЭМ, ЭрМ
		Катехолоксидаза	ЭрМ
		Пероксидаза	ЭМ
Гидролиз лигнина	Лигнин	Лигназа	ЭрМ
		Мп-зависимая пероксидаза	ЭМ
Разложение белков	Белок	Кислая пероксидаза	ЭМ
		Кислая протеиназа	ЭМ, ЭрМ
Отщепление органического фосфата		Кислая фосфатаза	ЭМ, ЭрМ
		Фосфодиэстераза	ЭрМ

* В ряде случаев результаты были получены косвенными методами – обнаружением гена, ответственного за синтез данного фермента или путем наблюдения усиления роста тестовой культуры при внесении данного субстрата. Ссылки на оригинальные исследования см. в указанной работе (Read et al., 2004).

через клеточные стенки клеток растений-хозяев, возможно, частично объясняется катаболитной репрессией образования целлюлазы, происходящей из-за большого притока глюкозы от растения, но, в любом случае, целлюлазная активность ЭМ грибов всегда очень низка.

Предполагается, что у микобионтов АМ сапротрофная активность мала, но этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении, причем необходимы данные о АМ в природных сообществах, а не в агроценозах. Тем не менее, в некоторых условиях АМ грибы могут быть вовлечены в процессы разложения подстилки и поглощение аминокислот и катионов аммония. Обеспечение доступа к аммонии может иметь важное экологическое значение для растений в сообществах на кислых, богатых органическими соединениями почвах, как, например, в некоторых тропических фитоценозах (Read, Perez-Moreno, 2003). Для АМ грибов также была показана способность к утилизации органического азота, хотя влияние микоризообразователя на эффективность поглощения растением азота из органических субстратов в данном типе микориз преимущественно косвенное (Hodge, 2003).

Фосфорный обмен

Наиболее велика роль микориз в обеспечении растения-хозяина соединениями фосфора в связи с низкой лабильностью ортофосфатных ионов в почве (Azcón et al., 2001). Фосфор в почве находится в неподвижном состоянии и недоступен растениям даже при наличии градиента (например, в лесной подстилке). В фитоценозах микоризы различных типов служат одним из главных каналов экстрагирования фосфора и вовлечения его в пищевой цикл растений. АМ грибы не повышают плодородность почвы, они только увеличивают доступность питательных веществ для растений-хозяев (Kothamasi et al., 2001). У микоризных растений по сравнению с НМ значительно увеличивается поглощение фосфора (Brundrett et al., 1996; Harley, Smith, 1983 и др.). Экспериментально показано, что ЭМ тяжи способны поглощать фосфор и воду из почвы и транспортировать их на значительные расстояния (Duddridge et al., 1980). Для эвкалипта, образующего смешанные ЭМ/ АМ симбиозы, показано, что в микоризованном растении концентрация фосфора в надземной части на 40% превышает концентрацию в НМ (Brundrett et al., 1996).

Усиление поглощения микоризным растением фосфора возможно благодаря следующим механизмам: увеличения эксплуатируемого объема почвы за счет экстраматрикальных гиф микобионта; меньшего диаметра гифы сравнительно с корнем (грибные гифы примерно в 10 раз тоньше, чем корни), что ведет к увеличению площади поглощения и к большей скорости тока внутрь на единицу площади; образования полифосфатов микоризными грибами и снижения таким образом концентрации фосфора внутри гифы; образования органических кислот и фосфатаз, катализирующих высвобождение фосфора из органических комплексов (Marschner, Dell, 1994). Помимо того, фосфатазная активность микроорганизмов ризосферы микоризных растений выше, чем у НМ (Dodd et al., 1987). Мицелий АМ грибов способен усиливать поглощение растением-хозяином труднорастворимых неорганических соединений фосфора за счет синергистических взаимодействий с другими микроорганизмами (см. Микоризосфера: биотические связи микоризных грибов).

В ЭМ 80–90% фосфора накапливается в микобионте в виде полифосфатных гранул в вакуолях, а остающиеся 10–20% переходят в растение в неорганической форме – в виде ортофосфат-ионов (Harley, 1989; Read, 1984). Накапливаемый в ЭМ чехле фосфор может быть использован, если нет поступления извне. После всасывания фосфора и накопления полифосфатов происходит быстрое включение его в нуклеотиды и сахарофосфаты. Полифосфаты транспортируются, они могут образовывать механизм для взаимного обмена углеводов и фосфатов между симбионтами: углеводы (продукты фотосинтеза) фосфорилируются фосфором из полифосфатов, превращаясь в сахарофосфаты, и выделяются ортофосфат ионы. Таким образом достигается локальное снижение внутренней концентрации моносахаридов и повышение внутренней концентрации фосфата у микобионта в этих условиях внутрь пойдет сахар, а наружу фосфат (Harley, 1989). Позднее было показано, что поглощение фосфора и его транспорт к растению-хозяину зависит от доступности органических соединений растения-хозяина, транспортируемых к микобионту (Bücking, Heyser, 2003).

Для АМ симбиоза показан транспортный путь фосфора из поглощающих экстраматрикальных гиф. Поступление полифосфата во внутренний мицелий сопровождается увеличением активности полифосфат-киназы, полифосфатные гранулы исчезают из вакуолей в тонких

веточках арбускул, и освобождающиеся полифосфаты путем активного транспорта передаются от микобонта к растению через матрикс зоны контакта и далее в клетки коры корня (Harrison, 1999; Rausch, Bucher, 2002; Read, 1984). Предполагается, что транспорт фосфора из грибных гиф в апопласт контактной зоны идет путем пассивного тока через анионные каналы грибной цитоплазматической мембраны. Тем не менее, в чистых культурах ЭМ грибов отток фосфора из гиф весьма слаб, и, вероятно, что в зоне контакта создаются особые условия, способствующие выходу фосфора в апопласт. Стимуляция оттока фосфора может происходить за счет увеличения общего потока фосфора в сторону апопласта или за счет снижения реабсорбции фосфора микоризообразователем из апопласта зоны контакта. Градиент с высокой концентрацией фосфора в гифах сети Гартига и низкой в клетках коры растения-хозяина может повысить транспорт фосфора в апопласт и снизить реабсорбцию гифами. Концентрации ионов – Н, К и Са, также могут влиять на переход фосфора в апопласт. Усиливать его могут одновалентные катионы (К, Na), возможно, за счет открытия ионных каналов, а также углеводы (глюкоза усиливала транспорт фосфора из интраматрикальных гиф АМ гриба *Gigaspora margarita*) (ссылки на оригинальные исследования см. в Bücking, 2004). Было показано, что двухвалентные ионы (Са, Mg) снижают влияние одновалентных путем закрытия ионных каналов, но более поздними исследованиями влияние Са на транспорт фосфора не было подтверждено, а влияние Mg было связано с тем, что этот элемент участвует в метаболизме полифосфатов у ЭМ грибов (Harrison, 1999; Bücking, 2004). О структуре и функциональных связях белков-переносчиков фосфора и возможной пост-трансляционной регуляции активности переносчиков известно мало (Rausch, Bucher, 2002).

Азотный обмен

Поглощение и накопление азота в микоризах тесно связано с метаболизмом фосфора. Азотфиксация у Бобовых усиливается колонизацией микоризообразующими грибами, что впервые было отмечено уже в 1944 г. (Asai, 1944 – цит. по Harley, 1989). В настоящее время предполагают, что это связано с доступностью фосфора, т.к. фосфаты играют важную роль в процессе бактериальной фиксации азота. В отличие от фосфора, азот подвижен и хорошо растворим, поэтому роль микориз в его поглощении не столь заметна.

Относительно АМ получены противоречивые данные, не показано значительное увеличение поглощения азота по сравнению с НМ растениями. АМ грибы способны восстанавливать нитраты. Из-за высокой подвижности нитрат-ионов считалось, что на их поглощение микобионты АМ не влияют. Тем не менее, недавно появился целый ряд исследований с применением радиоактивных меток (^{15}N), демонстрирующих, что нитраты могут поглощаться из почвы и транспортироваться в клетки растения экстраматричными гифами АМ грибов (ссылки на оригинальные данные см. в Azcón et al., 2001).

Для ЭМ недавно отмечено небольшое увеличение поглощения азота. Азот в почве находится в трех формах: катионы аммония, органические азотсодержащие вещества и нитрат-ионы. В эвтрофных почвах, где имеется нитрат, микоризные растения поглощают азот не более активно, чем НМ (Harley, 1989). Особенно это касается АМ, которая доминирует в таких местообитаниях. В местах обитания Вересковых или широколиственных или хвойных лесах умеренной зоны нитрат обычно присутствует в малом количестве, имеется аммоний и органические азотсодержащие соединения (Read et al., 2004). В гумусированных лесных почвах мало нитрат-ионов, много катионов аммония и азота в органической форме. Катион аммония в 10 раз более подвижен, чем ортофосфат-ион, но необходим растению в количествах примерно в 10 раз больших. В кислых почвах, где низка бактериальная активность и высокое содержание фенолов, нитрат-ион заменяется на катион аммония (Harley, 1989).

Изотопным методом показано, что неорганический азот, поглощаемый микобионтом из почвы, преобразуется в аминокислоты, транспортируется из свободного мицелия в интраматричный в виде аргинина, но передается растению без углерода – в форме аммония. В соответствии с этим, гены первичной ассимиляции азота экспрессируются преимущественно в свободном мицелии, в то время как экспрессия генов, связанных с разложением аргинина, наиболее высока в интраматричном мицелии. Экспрессия генов сильно меняется в ответ на разную доступность и форму азота.

Недавними исследованиями был обнаружен грибной переносчик аминокислот (AmAAP1) из микоризы тополя с *Amanita muscaria*. Экспрессия гена, кодирующего этот белок, 10-кратно увеличивалась в отсутствие источника азота, который может быть усвоен микобионтом. Было показано высокое сродство этого переносчика к широкому

кругу субстратов, а динамика экспрессии его гена свидетельствует о том, что эта транспортная система более приспособлена к поглощению аминокислот, чем к экспорту их в растение (Buscot et al., 2000). Возможная связь между фосфорным и азотным обменом – присоединение аргинина к полифосфатам – форме фосфора, в которой он транспортируется от микобионта к растению (Govindarajulu et al., 2005).

Избыток азота в почве может изменить характер взаимоотношений между симбионтами. В ходе экспериментов с внесением удобрений, проводимых и в природных хвойных лесах и в горшечных культурах, выяснилось, что при повышенных концентрациях азота развитие микориз снижается. Наиболее вероятно, что это следствие снижения накопления продуктов фотосинтеза в корне, если ограничен синтез углеводов. У растений избыток азота может вызывать прекращение формирования из продуктов фотосинтеза запасных веществ, таких как крахмал или сахароза, а происходит их перевод в форму аминокислот для синтеза белков (Champigny, 1995 – цит. по. Buscot et al., 2000). При ограниченной фотосинтетической фиксации углерода увеличение количества азота приводит к переходу от глюконеогенеза к гликолизу. Снижение скорости образования сахарозы влияет на транспорт углерода к микоризным окончаниям, что не может не оказывать влияния на весь симбиоз (Buscot et al., 2000). Увеличение содержания азота в почве способствует снижению образования плодовых тел ЭМ грибами и снижению видового разнообразия ЭМ сообществ (Termorshuizen, Schaffers, 1987).

АМ грибы также способны снабжать растение ионами Zn и Cu (Harley, 1989; Koide, Mosse, 2004; Marschner, Dell, 1994). Относительно поглощения таких элементов как K, Ca, Mg данные немногочисленны и противоречивы. Предполагается, что ЭМ чехол частично задерживает их проникновение в кору корня (Bücking et al., 2002).

Максимально активный транспорт веществ между симбионтами в одну и другую стороны может иметь значительный временной разрыв. Например, максимальный транспорт фосфора в ЭМ происходит в короткий период сразу после колонизации, а количество переносимого углерода повышается до максимума на несколько недель позже, т.е., баланс между выгодами и затратами каждого из симбионтов в природных условиях меняется в течение года (ссылки на оригинальные данные см. в Jones, Smith, 2004).

Так, осенью потребность микобионтов ЭМ в углероде возрастает в связи с формированием крупных плодовых тел и экстраматричного мицелия (Wallander et al., 2001 и др.). Еще одним примером может служить повышенная потребность растения-хозяина в минеральных элементах в период раскрывания почек, когда возможность предоставлять микобионту органические соединения у растения ограничена (Jones, Smith, 2004).

Защита корневых систем от патогенных почвенных микроорганизмов

Защитной функции микоризы посвящено множество исследований (Marx, 1969; Кивиниеми, 1980; Graham, 1988 и мн. др.). Большинство авторов полагают, что микоризы предотвращают проникновение в корень патогенов, хотя имеются и противоположные данные. Формирование микоризы снижает поражаемость растения корневыми патогенами грибной природы, но может стимулировать инфекцию другими паразитами. Например, АМ растения повилыка заражает в большей степени, чем НМ, хотя биомасса пораженных АМ растений все равно была выше, чем у НМ, несмотря на наличие паразита. Некоторыми исследованиями показано, что фитопатогенные грибы, поражающие надземную часть растений также лучше развиваются на микоризованных растениях. Есть данные о большей поражаемости микоризных растений вирусами сравнительно с безмикоризными (Dehne, 1982). Тем не менее, в отличие от эндопаразитов АМ грибы не способствуют переносу вирусной инфекции от одного растения к другому (Jabaji-Nare, Stobbs, 1984 – цит. по Kothamasi et al., 2001). Однако, следует принимать во внимание то, что подобные исследования возможны только на растениях, выращенных в культуре и обладающих факультативными микоризами, не имеющими для растения столь большого значения, как облигатные микоризные симбиозы в природных условиях (Jones, Smith, 2004).

Защита растения-хозяина от корневых патогенов может быть обусловлена как общим улучшением состояния растения и повышением его жизнеспособности, так и осуществляться посредством ряда механизмов. До того как поглощение фосфора станет достаточным (до того, как сформирован микоризный симбиоз), корню угрожает инвазия патогенов, т.к. клеточная проницаемость возрастает за счет истощения фос-

фолипидов в мембранах и максимального выделения экссудатов. При поглощении фосфора гифами микобионта АМ увеличивается содержание фосфора в корне, снижается проницаемость мембран и сокращается количество корневых экссудатов за счет утилизации их микобионтом (Graham, 1988). Выделяют следующие механизмы, лежащие в основе защитной функции микоризы: утилизация микобионтом корневых экссудатов, привлекающих патогены в корневую систему; создание механического барьера для патогена в виде ЭМ чехла (среди корневых патогенов мало видов, способных одновременно паразитировать на грибах и обладающих специфичными ферментами); выделение микобионтами биологически активных веществ, подавляющих развитие патогена (ингибиторное влияние летучих веществ, выделяемых *Suillus*, *Rhizopogon*, *Lactarius* на *Phytophthora* и *Pythium*); индукция защитных реакций – стимуляция выработки защитных веществ (умеренная защитная реакция на внедрение микобионта – выработка хитиназ у всех типов микориз, хитозаназ и β -1,3-глюконаз у АМ, фенолов, этилена); привлечение в ризосферу растения-хозяина популяций микроорганизмов, выполняющих защитные функции* (Frey-Klett et al., 2005; Graham, 1988; Kothamasi et al., 2001; Linderman, 1988; Marx, 1969; Morandi, 1996; Newsham et al., 1995; Pozo et al., 2002; Zak, 1964).

У АМ растений ткани лигнифицированы в большей степени, чем у НМ, для предотвращения проникновения микобионта в слои ткани глубже корового. Этот же механизм может сдерживать и внедрение патогена (Dehne, 1982). Также у АМ растений в сравнении с НМ повышено содержание аминокислот, в особенности аргинина, который в смеси с корневыми экстрактами АМ растений снижает продукцию хламидоспор у фитопатогенного микромицета *Thielaviopsis basicola* (Kothamasi et al., 2001).

Прочие функции микоризы в жизни растения-хозяина

Роль микоризы в жизни растения полифункциональна (Daniell et al., 1999). Помимо отмеченных выше функций показана регуляция

* Более подробно о взаимоотношениях микобионтов с микроорганизмами в ризосфере растения-хозяина см. Микоризосфера: биотические связи микоризных грибов.

микоризой фотосинтеза растения (повышение проницаемости мезофилла для углекислого газа, увеличение концентрации хлорофилла в листьях) (Smith, Read, 1997), улучшение водного режима растений, препятствующее высыханию (Augé, 2001; Kothamasi et al., 2001) и повышение устойчивости к засолению (за счет более высокого осмотического давления в гифах грибов сравнительно с клетками корней), а также снижение поступления металлов в побеги растений (Harley, Smith, 1983; Leyval et al., 1997; Read, 1984; Straker, 1996). Микобионты ЭрМ играют важную роль в защите растений-хозяев от токсичных металлов, таких как медь и цинк, растворимость которых при низкой кислотности значительно повышается, и для растений создается угроза интоксикации. Устойчивость основана на способности микобионта встраивать металлы в свою клеточную стенку. Функциональные группы, ответственные за связывание металлов – карбоксильные остатки пектиноподобных веществ, которые создают чехлы на поверхности гиф. Интересно, что эти вещества присутствуют также и внутри клеток растения в контактной зоне, что создает большую площадь поверхности, на которой происходит встраивание металлов в комплексы (Read, 1984). Содержание токсичных металлов в почвах в высоких концентрациях может препятствовать микоризообразованию. Особым механизмом обусловлена устойчивость ЭрМ растений к загрязнению мышьяком. Арсенат, являясь аналогом фосфата, транспортируется через мембрану по фосфатному пути у многих грибов и растений. Микобионты ЭрМ способны накапливать арсенаты, но при этом восстанавливать их до арсенидов и выводить из гиф. Таким образом, гриб способен накапливать фосфаты и транспортировать их к растению, одновременно исключая токсичные вещества (Sharples et al., 2000). АМ грибы способны защищать растение от поступления токсичных металлов, абсорбируя металлы из тканей растения в свои клетки. У *Pteridium aquilinum* гифы микобионта в коре содержали металлы в больших концентрациях, чем цитоплазма растения. Такие металлы как Al, Cd, Fe, Ti были обнаружены в полифосфатных гранулах (Turnau et al., 1993).

Растения, обитающие на засоленных почвах, подвергаются физиологическому стрессу. Ионы Na^+ и Cl^- в высоких концентрациях токсичны для растения: они нарушают структуру ферментов, повреждают клеточные органеллы, ингибируют синтез белков и создают дефицит ионов. АМ

грибы способны повышать устойчивость к засолению не-галофитных растений. Возможные механизмы включают усиление синтеза растением полиолов, стимуляцию роста корней и общее улучшение питания растения (Juniper, Abbott, 1993).

Микобионты ЭрМ защищают растения также от токсичных фенольных соединений посредством перевода их в нерастворимые формы с помощью различных оксидаз (Cairney, Meharg, 2003).

Микоризы в биогеоценозах

Предоставление растению-хозяину преимущества в конкурентной борьбе.

Доминанты фитоценозов, как правило, высокомикотрофные виды. Микориза способствует их процветанию помимо повышения жизнеспособности, посредством снижения внутривидовой конкуренции за счет перераспределения веществ через мицелиальную сеть, а также путем прямого антагонизма микоризообразующих грибов и видов не-хозяев при высоком содержании грибных пропагул в почве (Allen et al., 1989; Booth, 2004; Harley, 1989; Kothamasi et al., 2001). Создавая преимущества для растений-хозяев за счет несовместимых видов, гриб-микоризообразователь гарантирует себе постоянный приток органических соединений.

Изменение в соотношении концентраций питательных веществ в виде органических или неорганических соединений может создавать преимущества в конкуренции растениям с определенным типом микориз. Например, увеличение доступности неорганического азота ослабляет конкурентные преимущества ЭМ и ЭрМ растений и создает условия для развития АМ видов растений. Этим хотя бы частично может объясняться резкое увеличение численности видов рода *Acer* во многих эвтрофицированных лесах Нидерландов. Сравнительно высокое содержание азота в листьях клена возможно способствует их быстрому разложению в подстилке, создавая условия для развития АМ растений (Ozinga et al., 1997).

При высокой плотности растений, конкуренция между микобионтами их корневых систем приводит к значительному снижению эффективности микориз в поглощении минеральных веществ из почвы, что вносит вклад в самопрореживание растений в природных популяциях (Jones, Smith, 2004; St. John, Coleman, 1983).

Роль микоризных грибов в формировании и сукцессиях растительных сообществ

Микоризные грибы принимают участие в сукцессионных изменениях сообщества, определяя их направление и влияя на видовое разнообразие растений (Gange et al., 1990). Закономерности растительной сукцессии определяются микоризной зависимостью растений и зависят от доступности микоризного инокулюма (Коваленко, 1994). Вначале нарушенные местообитания заселяются НМ растениями (например, видами семейств Brassicaceae и Polygonaceae), а затем они замещаются сначала факультативными, а затем и облигатными микотрофами. Сначала появляются, как правило, АМ растения. Сукцессия в значительной степени определяется количеством и качеством пропагул микобионтов, содержащихся в почве и созданием мицелиальных сетей, в которые вовлекается каждое вновь прорастающее растение (Kothamasi et al., 2001). Сукцессии местообитаний, потерявших растительность, но сохранивших пропагулы микоризообразователей в почве, будут зависеть от вероятности встреч симбионтов. ЭМ быстро восстанавливается после серьезных нарушений растительных сообществ, в отличие от АМ, которая за 25-30 лет не достигает исходной интенсивности (Ozinga et al., 1997). На сукцессии на вырубках, гарях и пр. сильно влияет наличие микориз в предшествующем сообществе. Сохраняющийся в почве мицелий микобионтов способствует восстановлению лесных сообществ после серьезных нарушений, а также может помогать быстрому восстановлению леса в «окнах» (Amaranthus, Perry, 1994). Типы микориз, доминирующие в сообществе на финальных стадиях сукцессии, будут различными для разных типов климата. В тропических регионах микоризные растения могут выступать в качестве пионерных видов в сообществе (Kothamasi et al., 2001).

В период формирования лесных фитоценозов происходит сукцессия микоризных грибов. Сукцессионные группировки ЭМ грибов соответствуют определенным стадиям сукцессионных рядов в конкретных местообитаниях и следуют за возрастом деревьев. Выделяют ЭМ грибы ранней и поздней стадии сукцессии, обитающие в молодых и старых лесах (Шубин, 1990). Грибы ранней стадии сукцессии образуют микоризы у сеянцев в нестерильной почве как из имеющегося в почве мицелия, так и из внесенного инокулюма (*Hebeloma*, *Paxillus*, *Suillus*, *Thelephora*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Inocybe*) (Bowen, 1994). Грибы поздней стадии

(*Leccinum*, *Cortinarius*, *Russula*, *Lactarius*, *Amanita*) в этих условиях не формируют микоризу или обеспечивают слабое микоризообразование. В естественных условиях грибы поздней стадии могут образовывать микоризы у сеянцев только вблизи старых деревьев, микоризованных этими видами, посредством мицелиальных тяжей (Шубин, 1990; Bowen, 1994).

Относительно того, в каких лесах – старовозрастных или молодых – видовое разнообразие и количество образуемых плодовых тел ЭМ грибов выше, существуют различные мнения (Frankland, 1998). Некоторые исследователи считают, что максимальное разнообразие свойственно лесам возраста 20–40 лет, когда максимален запас лесной подстилки и деревья достигают пика дефицита питательных веществ (Kost, 1992; Smith et al., 2002). С возрастом продуктивность сообщества снижается и уменьшается видовое разнообразие и активность плодоношения микобионтов. Существует и противоположное мнение, что накопление органических соединений в почве может вызвать снижение видового разнообразия ЭМ грибов (Baar, Kuiper, 1993 – цит. по Frankland, 1998). Вполне возможно, что это противоречие будет снято, если учесть сукцессионные стадии биоценозов, где были проведены различные исследования, посвященные этому вопросу. Причины сукцессии ЭМ грибов до сих пор неясны, хотя среди них могут быть накопление слоя органики и изменения в доступности азотсодержащих соединений (Goodman, Trofymow, 1998).

Микоризы определенного типа доминируют в определенных фитоценозах и различаются в разных широтах (Read, 1984; Read, Perez-Moreno, 2003). С возрастающей сезонностью климата и некоторым поверхностным высыханием почвы, хвойные деревья становятся доминантами растительных сообществ, замещая кустарники из Вересковых, хотя некоторые теневыносливые кустарнички, например, виды рода *Vaccinium*, продолжают доминировать в травяно-кустарничковом ярусе. Далее хвойные леса сменяются широколиственными с доминированием *Quercus* и *Fagus*, в то время как хвойные исключаются. Из-за сравнительно быстрого разложения подстилки из листьев этих древесных пород и их высокой основности, органический компонент в почвах сокращается и снижается кислотность. Появляются бурые лесные почвы. Среди типов микориз еще доминирует ЭМ и образуется много вегетативного мицелия микобионтов ЭМ, но его количество по градиенту сокращается. В некото-

рых буковых лесах мицелиальные соединения микоризных чехлов с почвой почти отсутствуют (Harley, Smith, 1983). Это связано с тем, что при быстром разложении листовенной подстилки нет проблемы поиска питательных веществ посредством обширной наружной мицелиальной сети. Климатические условия, наиболее благоприятные для доминирования АМ растений – быстрый оборот в почве органических соединений и высокая скорость испарения (Read, 1984).

Тип микоризы влияет на разнообразие растительного сообщества. Хвойные леса северных широт могут содержать более тысячи видов ЭМ грибов и несколько доминантных видов ЭМ растений. В тропическом листопадном лесу в Мексике с более 1000 видов растений ассоциировано менее 25 видов АМ грибов. АМ грибы более обильны в почвах с низким содержанием органических соединений по сравнению с ЭМ. В то время как микобионты ЭМ обладают высоким таксономическим разнообразием, микобионты АМ характеризуются разнообразием физиологическим. Разные виды АМ грибов могут быть активны на одном растении-хозяине в разные периоды вегетационного сезона (Read, Perez-Moreno, 2003).

Растения с ЭрМ обладают минимальным содержанием веществ в побегах, самой низкой сравнительной скоростью роста, их опад разлагается наиболее медленно. ЭМ растения обладают средней скоростью роста и содержанием веществ, опад также медленно разлагается. АМ растения обладают наиболее высокими показателями (Read et al., 2004).

Участие в круговоротах биогенных элементов и их интенсификация

Микориза – один из способов извлечения растениями из окружающей среды материальных условий для своего существования, ее посредством осуществляется ускорение миграций биогенных элементов, нужных растению. Дефицитность биогенных элементов в экосистеме компенсируется их включением в круговорот микоризой. ЭМ грибы создают эффективную силу поглощения органических соединений, предотвращая избыточное накопление продуктов фотосинтеза растениями и снова возвращая их в круговорот веществ (Setälä et al., 1999). Например, биомасса микориз *Pseudotsuga menziesii* может достигать в верхних 15 см почвы количества 11333 кг/га. Оборот веществ в мицелии происходит в 5 раз быстрее, чем в лесной подстилке, и таким образом микоризы производят большую

часть оборота органического вещества в лесных растительных сообществах (Fogel, Hunt, 1979). Возврат микоризами азота, фосфора и калия в подстилку в 4–5 раз больше, чем таковой от корней (Fogel, Hunt, 1983). В хвойных лесах Северной Америки почти 100% тонких корней первого порядка микоризованы, срок жизни этих корневых окончаний порядка 108 дней, и даже без учета обильных сетей экстрематрикулярного мицелия они составляют 56% от общей продукции ценоза (Read et al., 2004).

В почвах, где недостаточно азота и фосфора (бореальные леса, вересковые пустоши), грибы – основной двигатель процессов поглощения минеральных веществ. Посредством влияния на состав органических соединений почвы ЭМ грибы влияют на баланс поглощения и накопления углерода в почве. Так как вместе тайга и верещатники составляют около 70% поверхности суши Северного полушария, и в их почвах содержится величайший запас углерода, то климат планеты и даже ее будущее зависит от взаимоотношений растений-доминантов этих экосистем с микроорганизмами (Read et al., 2004).

В болотных почвах опад растений из сем. Вересковых – доминантов фитоценозов, содержит азота и фосфора на 75% меньше, чем опад листовенных лесов умеренных широт, для которых характерны высокие значения отношения C:N, что также снижает скорость разложения подстилки. Накопление большого количества органических соединений ведет к освобождению карбоксильных анионов и закислению почвы, ингибирующему реакции нитрификации. Таким образом, NH_4^+ становится основным источником неорганического азота (Read, 1984). При низких уровнях минерализации в почвах верещатников основная часть азота находится в составе органических молекул. Концентрация ортофосфатов в почвах такого типа крайне низка, однако, уровень органического фосфора может достигать 90% в альпийском гумусе (Straker, 1996). Ферменты микоризных грибов способны к минерализации подстилки, изменению количества и состава органических веществ. Некоторые виды ЭМ грибов осуществляют процессы выветривания (Landerweert et al., 2001). Работами А. Рослинг показано, что по меньшей мере, 50% видов ЭМ грибов, обнаруженных в подзолистых почвах на юге Швеции, приурочены исключительно к минеральным почвенным горизонтам (Rosling et al., 2003).

Обилие мицелия ЭМ грибов и микоризных окончаний в лесных почвах (до 1,2 млн. на 1 м²)

и подстилке создает значительный запас органического вещества, сопоставимый с вкладом растений. Экстратрикаральные гифы ЭМ грибов могут составлять до 30–40% общей микробной биомассы в бореальных хвойных лесах (Högberg, Högberg, 2002; Wallander et al., 2001). Вклад ЭМ грибов в круговорот углерода в лесных экосистемах очень велик. От ЭМ в почву поступает свыше 50% органического вещества (Fogel, Hunt, 1979; Dahlberg et al., 1997). В круговороте азота через корни проходит почти в 6 раз более азота, чем через подстилку (Ruess et al., 2003 – цит. по Read et al., 2004). Принимая участие в извлечении N и P из органических полимеров, ЭМ грибы увеличивают отношение C : N и C : P в подстилке и таким образом способствуют удержанию углерода в почвах (Read, Perez-Moreno, 2003). По сравнению с умеренными лесами, в бореальных подавляющее количество CO₂ почвы и большая часть ежегодного оборота питательных веществ появляется в результате процессов, происходящих в микоризных окончаниях (Read et al., 2004).

Для понимания роли микоризообразующих грибов в круговоротах веществ в экосистемах, важно учитывать их взаимоотношения с грибами-сапротрофами. Соединения, получаемые сапротрофными грибами и бактериями после смерти этих организмов становятся доступными микобионтам микориз. Прямой антагонизм микоризных грибов или их контакт с мицелием сапротрофов и последующий транспорт веществ в мицелий микоризообразователей может оказывать значительное влияние на функционирование сапротрофных сообществ (Lindahl et al., 1999). По крайней мере, *in vitro*, показано подавление симбиотрофами сапротрофных видов при совместном произрастании (Baar, Stanton, 2000).

В 1970-х гг. бытовало мнение о том, что ЭМ корни замедляют в зоне своего действия разложение подстилки путем вытеснения и подавления микобионтами ЭМ сапротрофных грибов (Gadgil, Gadgil, 1971; 1975). В настоящее время большинство исследователей не поддерживает эту точку зрения, в том числе и потому, что многими примерами подтверждена высокая сапротрофная активность самих ЭМ микобионтов. Встречаются сообщения о том, что ЭМ деревья способствуют обеднению и закислению почвы, т.к. симбионты микоризы, замыкая обмен веществами друг на друге, выводят углерод и другие элементы из круговорота в экосистеме. Очевидно, что подобный эффект наблюдался только в почвах с исходно низким содержанием питатель-

ных веществ (Harley, 1989). В круговороте углерода также активно принимает участие почвенная фауна. Плодовыми телами ЭМ грибов питаются многие позвоночные и беспозвоночные животные.

Мицелий АМ грибов в тропических и субтропических регионах часто бывает доминирующим компонентом микробного сообщества почвы, и запас органического вещества в нем может составлять от 50 до 900 кг/га (Camargo-Ricalde, 2002; Zhu, Miller, 2003). В равнинном тропическом лесу гломалин-подобные белки содержат до 3,2% общего углерода почвы и 5% азота на глубине до 10 см (Rillig et al., 2003).

Благодаря своей роли в круговороте веществ, сохраняя питательные веществ в пределах биогеоценоза, микоризы повышают продуктивность сообщества (Newman, 1988).

Интеграция сообщества в единое целое, перераспределение биогенных веществ

ЭМ – «диффузный симбиоз», т.к. у обоих партнеров остается большая часть организма, которая не связана напрямую с симбионтом и может свободно соединяться с другими, неродственными предыдущим симбионтами. Экстратрикаральный мицелий в микоризе играет важную роль в биогеохимических циклах, влияет на состав растительных сообществ и функционирование агроценозов. Микоризные мицелиальные «сети» (ММС) – наиболее динамичные и функционально разнообразные элементы симбиоза. В них, по последним исследованиям, поступает 10% или более продуктов фотосинтеза растений-хозяев. Они также составляют 20–30% биомассы микроорганизмов почвы, недоучитываемой стандартными методами. Микоризный мицелий представляет собой широкий путь сквозь почву для потоков углерода и минеральных веществ, часто насчитывающий десятки метров на 1 г почвы (Leake et al., 2004a).

Десятки видов ЭМ грибов могут находиться в корневой системе одного дерева, и, наоборот, один микобионт способен взаимодействовать со многими особями растений как одного вида, так и разных видов, так что в большинстве микоризных ассоциаций обмен происходит не между двумя симбионтами, а между значительно большим количеством особей. (Amaranthus, Perry, 1994; Barker et al., 1998; Bruns et al., 2002). Таким образом создается простейшая микоризная сеть (рис. 6а,б). Сложность ММС возрастает с увеличением числа видов микобионтов, частоты соединений и числа видов растений (Simard, Durall,

2004). Также сложность мицелиальных сетей повышается с учетом взаимодействий с другими группами почвенной биоты – бактериями, микромицетами, нематодами и пр. Так как мицелий анастомозирует и соединяет большое количество растений, транспорт воды и минеральных веществ по нему может идти во множестве направлений – к разным растениям, объединенным единой ММС (Read, 1984). Не все обмены веществами равномерны: «затраты» на некоторые симбионты выше, чем «прибыль» от них, что является возможной причиной специфичности ряда микоризных симбиозов (рис. 6а, б). Наиболее яркий пример – микогетеротрофы, в сторону которых направлены оба потока: и органических, и минеральных веществ от микобионта (рис. 6в). Возможны ситуации, когда микобионт, наиболее подходящий для роста и развития растения, в свою очередь получает наибольшую выгоду от симбиоза с совсем другим растением, и наоборот. Через ММС, объединяющие растения не только разных видов, но и разных ярусов в лесных ценозах, осуществляется транспорт углерода от растений к другим организмам (обмен с грибами-сапротрофами) или перераспределение продуктов фотосинтеза между растениями (Newman, 1988). Часто такие «микоризные сети» образуются между деревьями, образующими первый ярус в лесах, или между взрослыми деревьями первого яруса и подростом под пологом (Amaranthus, Perry, 1994; Booth, 2004; Horton, Bruns, 1998; Horton et al., 2005; Kennedy et al., 2003; Read, 1984 и др.). ММС могут охватывать площади до нескольких квадратных метров и способны перераспределять дефицитные ресурсы между особями, соединенными мицелием (Newman, 1988; Simard et al., 1997). Показано, что азотные соединения движутся по сети в сторону растений с высокой потребностью в азоте (Booth, 2004). Органические соединения движутся в основном по градиенту – в сторону растения, находящегося в затенении, и транспорт зависит от уровня частоты физического контакта корня и мицелия или частоты мицелиальных связей, степени микотрофности растений, объединенных в сеть, фенологии микориз и потребности видов микобионтов в органических соединениях (Simard et al., 1997). У одного и того же растения некоторые микоризные окончания могут быть заселены микобионтами-генералистами, другие – специфичными микобионтами, а ряд корневых окончаний может быть лишен микориз, что создает ряд путей для обмена веществами в мицелиальных сетях (Simard et al., 1997).

Эксплуативные микоризы – несомненные примеры передачи органических веществ между корневыми системами растений посредством грибного мицелия, хотя физиологический механизм завершающего этапа транспорта – от гриба к растению остается пока неизвестным, и пока не продемонстрирован перенос углерода от АМ грибов к микогетеротрофам (Bidartondo et al., 2003; McKendrick et al., 2000). Ток органических веществ через мицелий может идти от одних видов растений к другим, от взрослых деревьев к сеянцам и от отмерших растений к живым, возвращая в круговорот биомассу, минуя многие этапы цикла и предотвращая утрату веществ из ценоза (Simard, Durall, 2004). Существование таких комплексов, объединенных мицелием микоризных грибов, заставляет по-новому взглянуть на такие проблемы, как конкуренция корневых систем за питательные вещества или влияние затенения (Harley, 1989). Некоторыми исследователями оспаривается экологическая значимость переноса органических соединений, хотя для микогетеротрофных растений она несомненна (Robinson, Fitter, 1999). В случае сообщества автотрофных растений свидетельства переноса веществ через мицелий менее очевидны (Taylor, 2006). Функционирование ММС и их влияние на растения, входящие в комплекс, объединенный мицелием, является предметом дискуссии. Рядом исследователей установлено, что сеянцы ЭМ растений лучше развиваются вблизи взрослых особей того же или других ЭМ видов (Booth, 2004; Horton, 1999 и мн. др.). Однако, есть мнение, что в случае переноса органических соединений между сеянцами и взрослыми растениями, сеянцы не только не получают никаких преимуществ, но состояние их значительно ухудшается, если они связаны мицелием с взрослыми особями по сравнению с микоризными сеянцами, растущими только вместе с микобионтом (Kytöviita et al., 2003). Это может объясняться наличием группы «дорогостоящих» микобионтов ЭМ, чьи потребности в органических соединениях выше, чем у других грибов, и не могут быть удовлетворены слабо фотосинтезирующими сеянцами. В свою очередь, микобионт в большей степени поддерживает рост того фитобионта, который поставляет больше органических соединений – т.е., более крупного, взрослого растения (Taylor, 2006). Также имеются данные, свидетельствующие о том, что у сеянцев микориза формируется *de novo*: микобионты образуются из спор. В любом случае, результат взаимодействия микобионта и растения будет зависеть от условий,

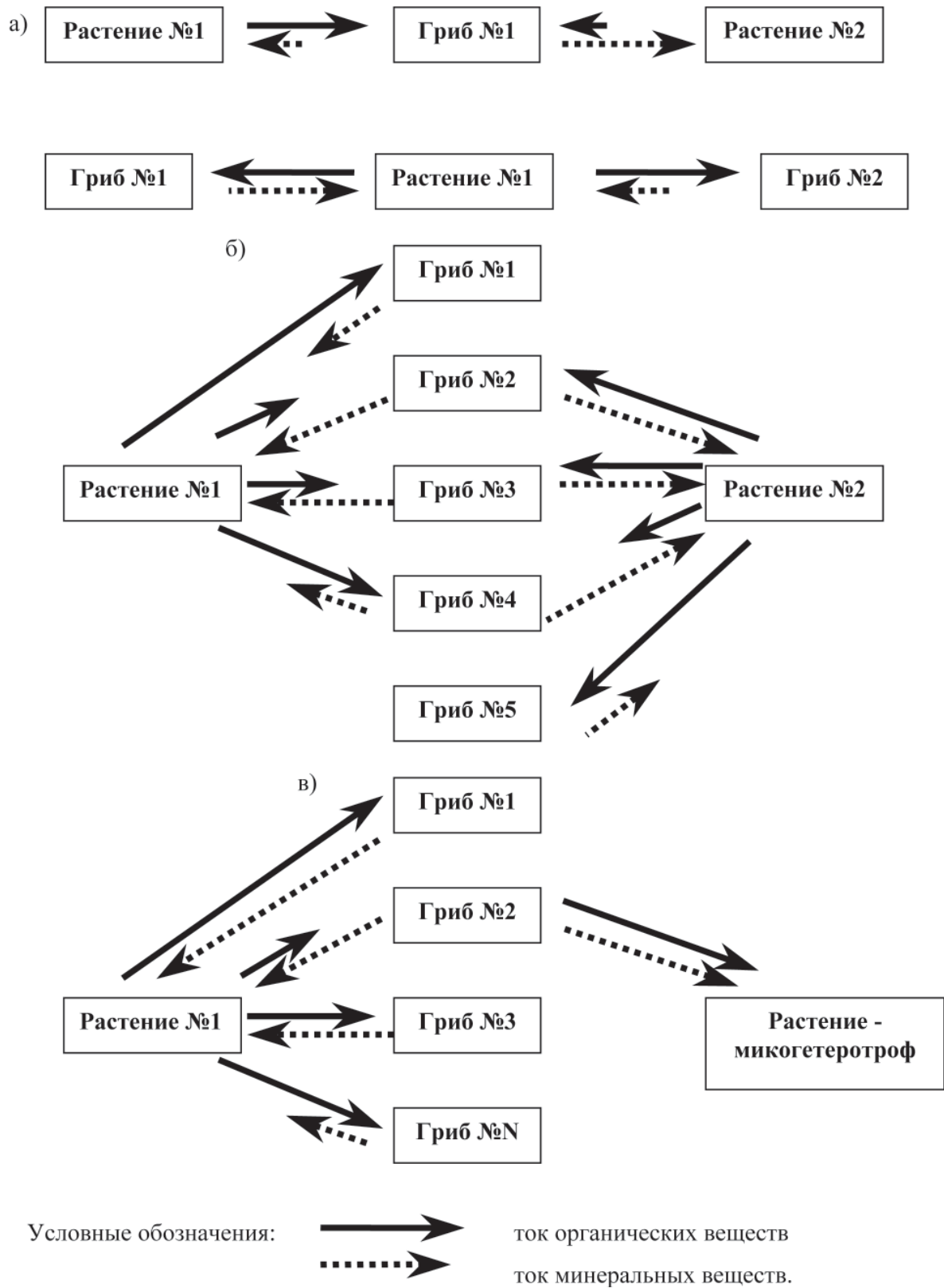


Рис.6. Модели обмена веществами в микоризных сетях (по Bruns et al., 2002)

особенно концентрации питательных веществ в субстрате, и видов симбионтов и может быть весьма различным, а также меняться на протяжении развития симбиоза. По мнению С. Симард и Д. Дюралля, несмотря на данные множества исследований о развитии семян, их состояние вблизи взрослых растений улучшается только благодаря общему повышению уровня микоризации, для которого образование ММС необязательно (Simard, Durall, 2004). Тем не менее, очевидно, что в условиях сильно нарушенных местообитаний развитие семян вне мицелиальной сети происходит крайне редко (ссылки на оригинальные данные см. в Taylor, 2006).

Межвидовые различия в реакциях ювенильных растений на «микоризные сети» могут влиять на развитие растительного сообщества, обеспечивая успешное сосуществование одних древесных пород и ограничивая развитие других. Например, для смешанного леса умеренной зоны было показано подавление ЭМ мицелием развитие АМ вида *Acer rubrum* и стимуляция развития ЭМ видов древесных пород (Booth, 2004).

Совсем недавно в поле зрения исследователей попала подземная часть сообщества ЭМ грибов. Важным вопросом является протяженность мицелиальных сетей и их непрерывность. Предполагается, что механическое разрушение мицелия микофагами – один из главных факторов, определяющих протяженность мицелиальных сетей (Taylor, 2006).

Относительно АМ был продемонстрирован транспорт значительного количества фосфора и углерода от отмирающих корней к живым растениям по объединяющему их мицелию микобионтов АМ (Kothamasi et al., 2001; Ritz, Newman, 1985). Также возможен перенос по мицелиальным сетям азота – от растений-симбионтов азотфиксаторов (Бобовых) к прочим (Haustead et al., 1988). Транспорт в АМ сетях отличается от того, что наблюдается в ЭМ, и причины этого пока неясны. Также отмечен ряд различий между данными, полученными в полевых и лабораторных исследованиях.

ММС оказывают значительное разностороннее влияние на динамику растительного сообщества. Это влияние на приживаемость семян вблизи взрослых деревьев путем более быстрой микоризации семян, интеграции их в мицелиальную сеть, поддерживаемую другими растениями или обеспечение доступа к пулу питательных веществ через ММС, восстановление видов в сообществе после нарушений, особенно при природном восстановлении бореальных и умеренных лесов,

снижение конкуренции и повышение биоразнообразия путем перераспределения органических или минеральных соединений между растениями, влияние на микобионты микориз путем изменения требований гриба к питательным веществам, изменения градиента, накопления веществ и т.д., снижение потерь веществ из экосистемы путем сохранения их в виде живой биомассы, повышение продуктивности, стабильности и устойчивости экосистемы (Simard, Durall, 2004).

Конкуренция между растениями за минеральные вещества почвы осуществляется не между отдельными особями или видами растений, а между растениями, находящимися в единой ММС. Успех в конкуренции определяется скорее эффективностью микосимбиотрофии, чем взаимоотношениями растений (Brundrett, 1991). Микоризы снижают конкуренцию и приносят стабильность в сообщество, влияют на его разнообразие и видовой состав (Camargo-Ricalde, 2002; Rillig, 2004 и мн. др.). Предполагают, что направленность и сила этого воздействия зависит от того, насколько высокомикотрофны доминанты сообщества и прочие виды растений (Urcelay, Díaz, 2003). Возрастающее разнообразие микобионтов приводит к повышению видового разнообразия растений в сообществе и увеличению его продуктивности (Allen et al., 1995; Amaranthus, Perry, 1994; Ozinga et al., 1997; van der Heijden et al., 1998).

Микоризосфера: биотические связи микоризных грибов

Экссудаты корней содержат значительные количества низкомолекулярных органических соединений (аминокислоты, сахара, органические кислоты), привлекающие в корневую зону различные микроорганизмы и создающие в прикорневой зоне специфические условия обитания. Лоренц Хилтнер впервые обратил внимание на резкое увеличение численности микроорганизмов вблизи корней растений и в 1904 г. ввел термин «ризосфера» (Hiltner, 1904). Ризосферу можно определить как непосредственную зону влияния корневой системы. Позже было установлено повсеместное распространение этого явления, и увеличение количества микроорганизмов около корней растений получило название «ризосферный эффект». Хилтнер установил, что численность бактерий и грибов увеличивается в ризосфере в 5–20 раз, а актиномицетов – в 2–12 раз (Hiltner, 1904). Корни обеспечивают микробиоту водой, питательными веществами (углеводами, аминокислотами, витаминами и др.), дают укры-

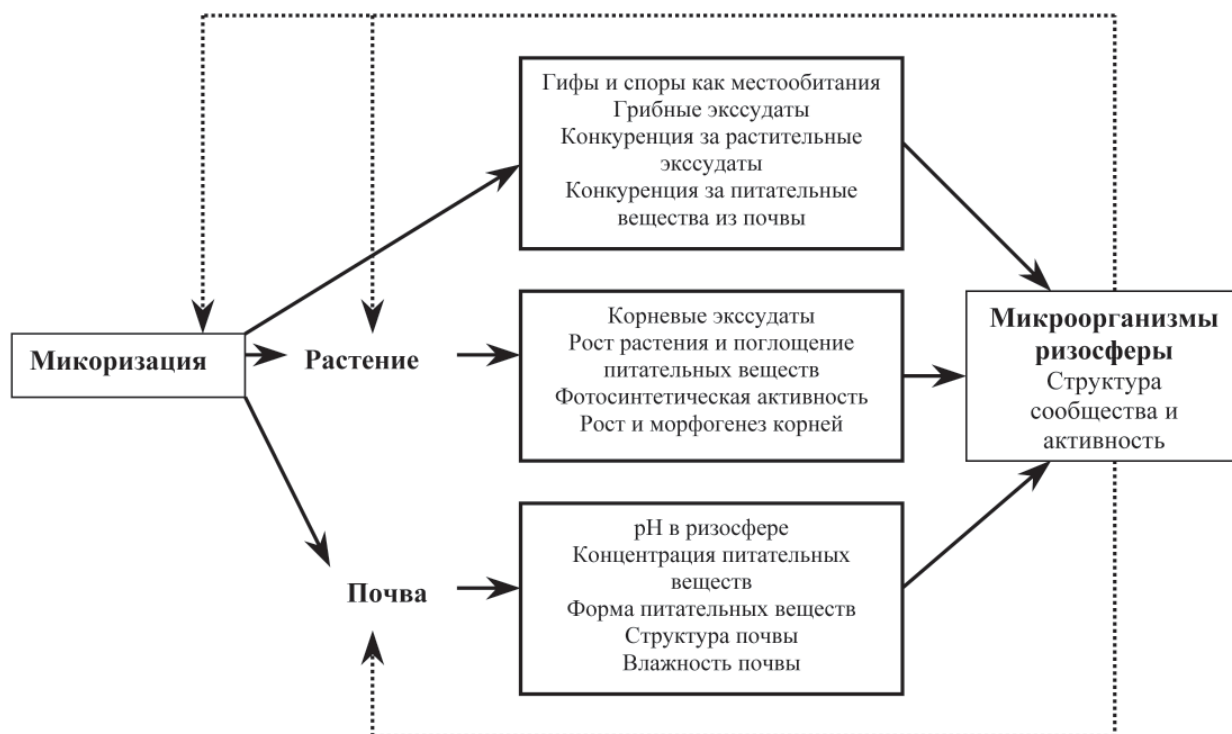


Рис.7. Прямые и косвенные эффекты микорризообразования на структуру сообществ и активность микроорганизмов ризосферы (по Timonen, Marschner, 2005).

тие, обеспечивают аэрацию окружающей почвы, способствуют продвижению грибов и бактерий в толще почвы (Curl, Truelove, 1986). Корневая система и мицелий представляют собой континуум в почве, поэтому невозможно исследовать ризосферу, не принимая во внимание грибы-микорризообразователи. Таким образом, концепция ризосферы должна быть преобразована в случае большинства наземных растений в концепцию микорризосферы (Timonen, Marschner, 2005).

Понятие о микорризосфере было сформулировано в 1970-х гг. (Rambelli, 1973) по аналогии с ризосферой (Hiltner, 1904) и гифосферой – зоной влияния грибного мицелия (Staněk, 1984; Thornton, 1956). Существуют различные концепции микорризосферы. В 1958 г. появился термин «микорризосфера», которым обозначался «весь объем органических почвенных горизонтов, претерпевающий влияние микорризной ассоциации, включая прилегающую почву, на которую воздействуют экстраматрические гифы микобионта» (Rawlings, 1958). Другая концепция – микорризосфера как зона непосредственного влияния ЭМ чехла была предложена в 1967г. (Foster, Marks, 1967). По мнению Р. Саммербелла микорризосфера *sensu* Foster, Marks (1967) стала устоявшимся термином, тогда как термин,

предложенный Роулингом использовался мало (Summerbell, 2005). Тем не менее, в современных работах встречается употребление термина «микорризосфера» в смысле Rawlings (1958) (Filion et al., 1999) для обозначения общего объема почвы, претерпевающей влияние АМ ассоциации. Саммербелл предлагает пользоваться термином «микорризосфера» *sensu* Foster, Marks (1967) и термином «симбиоризосфера» для обозначения всего объема почвы (в широком понимании, включая растительные остатки), на который влияет присутствие микорризованной корневой системы (Summerbell, 2005).

Микорризосфера состоит из корня, гиф непосредственно связанного с ним микобионта, ассоциированных с ними микроорганизмов и почвы с их влияниями. Корни растений – доминирующий компонент этого сообщества, но многие ризосферные функции на самом деле выполняются либо усиливаются ассоциированными микроорганизмами (рис. 7). Микробное сообщество осуществляет большинство процессов перевода питательных веществ в доступное состояние и их поглощения. Ризосферные микроорганизмы играют главную роль в защите от корневых патогенов, участвуют в поддержании структуры почвы и удержании воды и питательных веществ.



Рис. 8. Микоризные ассоциации как мультитрофный симбиотический комплекс (по Brundrett et al., 1996).

Большинство организмов, выполняющих эти важнейшие функции до сих пор неизвестно. Микоризосферу можно определить как «зону влияния» микоризованного корня: корневой системы растения и свободного мицелия микобионта, т.е. влияние микоризосферы сочетает ризосферный и гифосферный эффекты (рис. 8). Гифосфера в данном случае состоит из свободного мицелия микоризных грибов, ассоциированных с ним микроорганизмов и окружающей почвы.

Колонизация микобионтом изменяет метаболизм корней растения-хозяина и, следовательно, количество и состав корневых экссудатов, выделяемых в почву. Грибы-микоризообразователи уменьшают приток корневых экссудатов в ризосферу путем отбора углеводных соединений непосредственно из клеток корней, до того как они достигнут почвы. В случае АМ в ходе проведения экспериментов различными исследователями были получены противоречивые данные: как подтверждающие вышесказанное, так и демонстрирующие отсутствие влияния микоризации на выделение экссудатов (Timonen, Marschner, 2005). ЭМ симбиоз *Laccaria laccata* оказывал различное действие в зависимости от вида растения-хозяина. В ходе обмена веществами между симбионтами микориз происходит изменение состава сахаров, аминокислот и других органических кислот в корневых экссудатах (Laheurte et al., 1990;

Rambelli, 1973). Вблизи микоризных корней меняются обменные процессы в популяциях микроорганизмов, т.к. в обмен включается еще и гриб-микоризообразователь (Мантейфель и др., 1950). Углеводы растения частично переходят в специфичные для грибов соединения, такие как трегалоза, маннит, арабит (Söderström et al., 1988). Эти и прочие (молочная, щавелевая кислоты) метаболиты грибов, в свою очередь оказывают влияние на микоризосферу.

Микоризосфера предоставляет гораздо больше типов местообитаний, в том числе и уникальных, сравнительно с ризосферой *per se*. Например, ЭМ включает местообитания от зон контакта симбионтов до представленных исключительно грибными гифами микоризных чехлов и свободного мицелия. Многие из этих местообитаний неблагоприятны для почвенной биоты ввиду высоких концентраций органических кислот и вторичных метаболитов как грибного, так и растительного происхождения, но наличие большого количества доступных питательных веществ в виде экссудатов и продуктов лизиса, выделяемых симбионтами, предоставляет определенные преимущества. Кроме того, корни и структуры микобионта обладают поверхностями для прикрепления, а также закрытыми компартментами, где микроорганизмы защищены от выедания и засухи. Так как гифальные тяжи микоризных грибов соединяют корневые системы разных особей и видов растений, а также грибные скопления из различных почвенных местообитаний, они способствуют распространению микроорганизмов в почве и между корнями растений (Johansson et al., 2004; Timonen, Marschner, 2005). Физические, биохимические и микробиологические характеристики ризосферы и микоризосферы сильно различаются, что не может не влиять на состав и численность микробных сообществ в прикорневой зоне (Graham, 1988; Harley, 1948). Свободный мицелий микоризных грибов способствует агрегации почвенных частиц и модифицирует почвенную структуру, в отличие от ризосферы. В этих агрегатах обнаружены микромицеты, бактерии, актиномицеты и цианобактерии. Благодаря морфологическим изменениям, которые претерпевает корень в случае ЭМ, например, интенсификации ветвления, объем микоризосферной почвы больше, чем ризосферной. Экстраметрические гифы трофически зависят от растения, но на их биомассу оказывают влияние микроорганизмы почвы и эдафические факторы, такие как pH, структура и плодородность почвы (Linderman, 1988).

Микоризосфера – ее состав и функции – весьма важны для выживания и поддержания устойчивости практически всех наземных фитоценозов. К сожалению, ввиду недоступности корней и прикрепленных к ним гиф, изучение интактной микоризосферы затруднительно. Микоризные грибы взаимодействуют с широким кругом прочих почвообитающих организмов. Эти взаимоотношения могут иметь стимулирующий или ингибиторный характер, некоторые из них представляют собой конкуренцию, другие могут быть мутуалистическими. Влияние прослеживается на всех стадиях жизненного цикла грибов-микоризообразователей: от динамики численности спор (выедание, распространение, влияние на прорастание), через стадии колонизации корня до роста экстрематрикальных гиф (Fitter, Garbaye, 1994). Микоризосферные сообщества очень сложны, включают представителей почти всех царств, и большинство этих организмов остается пока неизвестным. Взаимодействия с микробными сообществами представляют большой интерес, т.к. некоторые микроорганизмы, ассоциированные с микоризой, могут дополнять ее функции (азотфиксирующие и растворяющие фосфаты бактерии). Актиномицеты вносят значительный вклад в круговорот сложных биополимеров, таких как лигноцеллюлоза, гемицеллюлоза, пектин, кератин, хитин. В настоящее время микоризу воспринимают не как симбиоз двух партнеров – гриба и растения – а как мультитрофный симбиотический комплекс, включающий также сопутствующие микроорганизмы (Frey-Klett et al., 2005).

Внутри этих сообществ существуют многоуровневые взаимоотношения между организмами и связи каждого из них с условиями окружающей среды. Изучение видового состава микоризосфер и их физиологических функций все еще находится на начальном этапе, но в настоящее время продвигается значительно быстрее, в том числе, благодаря применению новых методов исследования. Наиболее изученными являются микоризосферы АМ и ЭМ ассоциаций.

Бактерии и актиномицеты в микоризосфере

Наряду с грибами – микоризообразователями бактерии являются наиболее хорошо изученной группой биоты микоризосферы. Многими исследователями отмечено резкое повышение численности бактерий и актиномицетов в микоризосфере, как и в ризосфере, и выявлены различия в составе микробных сообществ в этих

двух местообитаниях (Bowen, Theodorou, 1979; Heinonsalo et al., 2000; 2001; Katznelson et al., 1962; Neal et al., 1964; Timonen et al., 1998 и др.). Считается, что экссудаты грибных гиф – преимущественный источник питательных веществ для бактерий, населяющих мицелий, микоризные окончания и плодовые тела грибов (Nurmiaho-Lassila et al., 1997; Danell et al., 1993; Rillig, 2004 и др.). Для микоризосферных бактерий показано участие в поглощении растением питательных веществ, стимуляция роста и защита растений от патогенов, а также фиксация азота. Среди бактерий в микоризосфере заметно увеличивается численность аммонификаторов (десятикратно), сахаролитиков и флуоресцентных псевдомонад (Katznelson et al., 1962).

Группа бактерий, стимулирующих формирование микоризы, получила название МНВ (mycorrhization helper bacteria – бактерии – помощники микоризации) (Garbaye, 1994; Gerič et al., 2000 и др.). МНВ бактерии относятся к различным группам и родам бактерий: Proteobacteria (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*), Firmicutes (*Bacillus*, *Paenibacillus*), Actinomycetes (*Rhodococcus*, *Streptomyces*) (Bending et al., 2002; Poole et al., 2001). Также описана стимуляция микоризообразования представителями рода *Arthrobacter* (Różycki et al., 1994). Специфичность эффекта МНВ варьирует в зависимости от штамма (Danell et al., 1993; Frey-Klett, Garbaye, 2005). Существует предположение, что некоторые штаммы бактерий высокоспецифичны к микобионту (Khetmalas et al., 2002; Varese Luppi-Mosca, 1996). Недавними исследованиями продемонстрировано, что один и тот же изолят *Pseudomonas montelli* способствовал формированию и ЭМ (*Acacia holosericea* и *Pisolithus* или *Scleroderma*) и АМ симбиоза (*Glomus intraradices*) (Duponnois, Plenchette 2003). Известно также, что эффект бактерий может зависеть от вида микобионта, например, штамм *Streptomyces*, выделенный из микоризосферы ели и *Amanita muscaria*, *in vitro* способствовал росту *Amanita muscaria* и *Suillus bovinus*, и в то же время ингибировал рост *Hebeloma cylindrosporum* и не оказывал влияния на рост *Paxillus involutus* (Dahm et al., 1988; Schrey et al., 2005). Интересно, что для *Streptomyces in vitro* показан ингибиторный эффект в отношении фитопатогенных грибов *Heterobasidion annosum* и *Armillaria obscura*. В ряде случаев положительное влияние бактерий ризосферы на рост и развитие растения никак не связано с микоризацией и грибами (Cairney, Meharg, 2002).

Дж. Гарбае предположил ряд механизмов, лежащих в основе эффекта МНВ: влияние на восприимчивость корней растения-хозяина к микобионту; влияние на взаимное узнавание симбионтов и их физический контакт; влияние на выживание и рост микобионта; влияние на физико-химические свойства почвы; влияние на прорастание спор микобионта (Garbae, 1994). Прямое воздействие бактерий на восприимчивость корней к микобионту было продемонстрировано неоднократно, однако наиболее значительным эффектом МНВ считается положительное влияние бактерий на пресимбиотический рост и развитие микоризообразующих грибов в почве (Founoune et al., 2002; Schrey et al., 2005). На молекулярном уровне этот механизм, вероятно, зависит от модификации эффективности усвоения мицелием питательных веществ и регуляции клеточного цикла (например, пролиферации гиф) бактериями. К настоящему времени мало известно о сигнальных молекулах, выделяемых МНВ и грибных факторах, узнающих эти сигналы, также как и о грибных генах, ответственных за взаимодействие с бактериями. Есть данные о том, что *Nod* – факторы бактерий задействованы в МНВ-эффекте *Bradyrhizobium japonicum* на АМ *Glomus mosseae* и сои. Кроме того, обнаружена последовательность, кодирующая мРНК, которая пятикратно снижала экспрессию при инокуляции *Glomus mosseae* штаммом *Bacillus subtilis*, который стимулирует рост гиф *G. mosseae*. Транскрипт относился к высококонсервативному гену, кодирующему многофункциональный белок пероксиомного β-окисления, который может принимать участие в катаболизме длинноцепочечных жирных кислот во время пресимбиотического гифального роста (ссылка на оригинальные данные см. в Frey-Klett, Garbae, 2005). Еще меньше известно о взаимоотношениях с бактериями ЭМ грибов. Для них не идентифицированы гены, на экспрессию которых влияют МНВ, хотя факт подобного влияния отмечен, например, в ассоциации *Streptomyces* с ЭМ, образованной *Amanita muscaria* (Becker et al., 1999; Schrey et al., 2005). Хотя только 38% генов, регулируемых симбиозом с бактериями, кодировали белки с известными функциями, среди них обнаружены те, которые отвечают за сигнальную трансдукцию, первичный метаболизм, рост клеток и реакции на стресс, что согласуется с фенотипическим положительным влиянием изолятов *Streptomyces* на рост гиф микобионта *in vitro*. У *Amanita muscaria* был обнаружен ген *AmCyp40*, кодирующий циклофилин – белок, принимаю-

щий участие в сигнальной трансдукции, который также может быть вовлечен в регуляцию пролиферации клеток при усилении МНВ гифального роста микобионта *in vitro* (Schrey et al., 2005). Возможно, что этот ген – ключевой во взаимоотношениях ЭМ гриба и бактерий-помощников.

Бактерии эктомикоризосферы впервые были обнаружены в начале 1960-х гг., и с тех пор данные о видовом составе и распределении различных групп бактерий в микоризосфере древесных пород в природных условиях, почвах питомников и микрокосмах накапливаются крайне медленно (Katznelson et al., 1962; Garbae, 1994; Timonen et al., 1998). В зависимости от условий и вида, ЭМ грибы способны как подавлять, так и стимулировать бактериальную активность. Микоризосферы одних видов ЭМ грибов поддерживают популяции различных видов бактерий с высокой численностью, других – подавляют их развитие (Великанов, Сидорова, 1997; Nurmiaho-Lassila et al., 1997). Для ЭМ *Pinus sylvestris* продемонстрировано, что плотность популяций бактерий повышается во внутренних слоях микоризосферы, возможно, из-за большего количества доступных углеводов. К этим местообитаниям приурочены виды родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*, в то время как распределение видов *Bacillus* оказалось более монотонным во всей микоризосфере (Timonen et al., 1998).

В эктомикоризосфере идет отбор штаммов флуоресцентных псевдомонад со свойствами, полезными симбионтам. ЭМ в значительной степени влияет на популяции флуоресцентных псевдомонад (Frey-Klett et al., 2005). Показано, что эффект эктомикоризосферы на численность популяций флуоресцентных псевдомонад зависит не от роста корней, а от присутствия ЭМ гриба, более точно, его экстраметрического мицелия. При исследовании бактериальных сообществ в ризосфере *Acacia auriculiformis* после инокуляции ЭМ грибом *Pisolithus albus* были выявлены изменения популяций флуоресцентных псевдомонад, которые не происходили в ризосфере без микобионта при внесении удобрений, «симулирующих» влияние ЭМ на питание растения (Assigbetse et al., 2005). Что касается структуры популяции, то на примере ЭМ *Pseudotsuga menziesii* и *Laccaria bicolor* показано, что микобионт значительно модифицирует метаболическое разнообразие почвенных флуоресцентных псевдомонад. Штаммы, выделенные из микоризы, отличались от обитающих в свободной почве предпочтительным усвоением углеводов, особенно, трегалозы. Так как трегалоза – углевод, накап-

ливающийся в мицелии *Laccaria bicolor* и редко отмечаемый у растений, было сделано предположение, что в микоризосфере идет отбор штаммов, способных к утилизации этого субстрата (Frey et al., 1997). До настоящего времени остается неизвестным, способно ли растение селективно благоприятствовать развитию наиболее полезных для себя сообществ микроорганизмов (Denison et al., 2003).

Интерес представляет вопрос, касающийся отбора штаммов бактерий в микоризосфере и его возможных механизмов. Предполагали, что выделение грибами растворимых углеводов (трегалоза) и полиолов (маннит) – возможный механизм подобного отбора ЭМ грибами (Frey et al., 1997 и др.). Способность разлагать трегалозу характерна для штаммов бактерий, ассоциированных с ЭМ, но редко встречается у свободных почвенных бактерий (Danell et al., 1993). В плодовых телах *Cantharellus cibarius* также доминируют флуоресцентные псевдомонады, способные к разложению трегалозы, но имеются данные и о высокой трегалозной активности штаммов *Pseudomonas*, выделенных из свободной почвы (Rangel-Castro et al., 2002).

Органические кислоты также могут иметь значение в отборе бактерий в микоризосфере. Свободные гифы ЭМ грибов выделяют органические кислоты, в особенности, щавелевую кислоту, соли которой способны усваивать бактерии-оксалотрофы.

До сих пор доступно мало информации о количестве и составе органических соединений в экссудатах гиф (Johansson et al., 2004). Необходимы дополнительные исследования, свидетельствующие о том, что возрастание численности бактерий и отбор их в гифо- и микоризосфере определяются субстратом. Некоторыми из недавних исследований не подтверждается, что ЭМ мицелий стимулирует развитие бактерий посредством выделения органических соединений. Более того, для АМ показано, что эффект выделений на бактериальные популяции скорее качественный (изменение видовой и штаммовой структуры сообщества), чем количественный (Andrade et al., 1997).

Наряду с прямым влиянием микобионта на микоризосферные бактериальные сообщества, могут наблюдаться и косвенные воздействия. Например, посредством стимуляции роста корней растения-хозяина, изменения количеств и состава корневых экссудатов и структуры окружающей почвы (Rillig, 2004; Johansson et al., 2004). АМ грибы стимулируют образование клу-

беньков и азотфиксацию у Бобовых. Увеличиваемое микобионтами поступление фосфора в растение благоприятствует работе бактериальной нитрогеназы (Johansson et al., 2004).

Помимо экссудатов, компоненты которых способны усваивать бактерии, корни также важны для транспорта бактерий, особенно ассоциированных с растениями. Бактерии могут колонизировать новое растение путем переноса с помощью грибных гиф, например для *Rhizobium leguminosarum* показана способность прикрепляться к гифам АМ гриба *Gigaspora margarita* (Bianciotto et al., 1996b). Тем не менее, этот способ транспорта подразумевает активный рост или движение бактерий вдоль гифы, т.к. зрелые участки гиф не движутся к корням, а апикально растут в их сторону.

Широко известно, что ЭМ грибы усиливают поглощение фосфора растением. Это объясняют способностью мицелия проникать в недоступные для корней зоны почвы и его высокой фосфатазной активностью. Но нередкими являются случаи, когда перевод фосфатов в растворимую, доступную для растения форму осуществляется не напрямую микобионтом, а является ассоциативным и осуществляется бактериями, которые обычно обитают в зоне микоризосферы. Многие изоляты флуоресцентных псевдомонад, выделенных из микоризосферы, обладают способностью к растворению неорганического фосфата в противоположность тем изолятам, которые выделялись из почвы без корней. Показано, что некоторые фосфат-растворяющие штаммы бактерий действуют синергистически с микоризными грибами, обеспечивая растение-хозяин фосфором. Также осуществляется транспорт в растение ионов железа – за счет образующих сидерофоры ассоциативных бактерий микоризосферы. Показано, что микоризные растения содержат больше железа, чем НМ (Frey-Klett et al., 2005).

В плодовых телах ЭМ грибов различных видов была отмечена нитрогеназная активность благодаря присутствию азотфиксирующих бактерий (Li, Hung, 1987; Rangel-Castro et al., 2002). Некоторыми авторами показано, что азотфиксация более активно идет в зоне микоризосферы (преимущественно, род *Pseudomonas*), но в природных фитоценозах очень трудно различить вклад свободных почвенных и ассоциативных азотфиксаторов (Linderman, 1988; Rózycki et al., 1999). Другими исследователями не обнаружены различия в нитрогеназной активности между почвенными и микоризосферными бактериями (флуоресцентные псевдомонады) (Frey-Klett

et al., 2005). Показано, что бактерии-азотфиксаторы ассоциированы с ЭМ *Pseudotsuga menziesii* и *Rhizopogon vinicolor* (Li et al., 1992). Дыхание микоризного комплекса (микобионта, корней и сопутствующих микроорганизмов) создает микроаэрофильные условия, в которых возможна азотфиксация. Было сделано предположение о мутуалистической природе этого симбиоза, при котором бактерии снабжают гриб азотом, в свою очередь, утилизируя экссудаты гиф. Азотфиксирующие бактерии были также обнаружены в АрМ (Filipi et al., 1995 – цит. по de Boer et al., 2005). Данные о том, насколько важным источником азота для грибов являются азотфиксирующие бактерии, тем не менее, пока не получены.

Антагонистический эффект микориз по отношению к почвенным корневым патогенам также в ряде случаев определяется микроорганизмами микоризосферы. Многие бактерии микоризосферы проявляют антагонистическое действие на корневые патогены (*Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*) (Bowen, Theodorou, 1979; Johansson et al., 2004). В микоризосфере *Pseudotsuga menziesii* и *Laccaria bicolor* отбирались штаммы *Pseudomonas fluorescens*, имеющие более широкий спектр антибиотической активности, чем почвенные бактерии (Frey et al., 1997). И, напротив, токсичные бактериальные метаболиты, такие как цианиды, в большей степени продуцируются штаммами из свободной почвы, а не микоризосферы (Frey et al., 1997; Frey-Klett et al., 2005). Вероятно, что бактерии с метаболитами, вредными для грибов-микобионтов ЭМ, подавляются в микоризосфере. Флуоресцентные псевдомонады, обитающие в микоризосфере, продуцируют также ряд прочих антимикробных метаболитов: флороглюцинолы, феназины, пиолотеорин и пирролнитрит, которые и лежат в основе их антагонистического действия на фитопатогены (Dowling, O’Gara, 1994). Но выделением этих веществ не ограничивается антагонистическая активность флуоресцентных псевдомонад, т.к. штаммы, выделенные из микоризосферы и не продуцирующие указанные соединения, тем не менее выполняют функцию защиты корневой системы от патогенов (Frey-Klett et al., 2005).

Некоторые авторы предполагают, что АМ растения способны более эффективно противостоять патогенам благодаря улучшению посредством микоризы процессов поглощения питательных веществ, но существуют данные, противоречащие этой теории. Показано, что даже в тех случаях, когда АМ не улучшает фосфорный обмен растения, она все равно выполняет функ-

ции защиты от фитопатогенных микромицетов (Newsham et al., 1995 и др.). Даже присутствие АМ растений снижает поражаемость патогенами НМ растений, находящихся поблизости. Часто очень трудно разграничить прямое воздействие микоризосферных микроорганизмов на патогены и косвенное влияние микоризы, повышающей жизнеспособность растения.

Некоторые бактерии, выделяемые из почвы, ЭМ или плодовых тел ЭМ грибов, могут существенно улучшать рост этих грибов *in vitro* (Bowen, Theodorou, 1979; Garbaye, Bowen, 1989; Founoune et al., 2002). О распределении этих бактерий между свободной почвой, микоризосферной почвой и микоризами пока ничего не известно. По данным П. Фрей-Клетта, изоляты бактерий, способствующие росту и развитию различных видов ЭМ грибов, в достоверно большем количестве присутствовали в свободной почве, сравнительно с микоризосферой. Это предполагает, что почва служит резервуаром бактерий, благотворно влияющих на пресимбиотический рост микобионтов ЭМ до микоризообразования (Frey et al., 1997; Frey-Klett et al., 2005). Возможно также и отрицательное влияние бактерий – подавление роста ЭМ грибов, объясняемое конкуренцией за субстрат и антагонизмом антибиотического характера со стороны бактерий (Bowen, Theodorou, 1979). Существует и антагонизм со стороны микобионта – в случае АМ гриба *Glomus intraradices* это прямое воздействие, т.к. проявляется не только в ризосферной, но и в гифосферной зоне (Wamberg et al., 2003).

Уже в ранних исследованиях было продемонстрировано, что АМ грибы лучше прорастают в присутствии бактерий (Mosse, 1959). Позже было выяснено, что споры АМ грибов не прорастают в стерильной почве, а при поверхностной стерилизации спор процент прорастания резко снижается. С поверхности спор были выделены бактерии – представители родов *Pseudomonas* и *Corynebacterium*, которые стимулировали прорастание спор (Mayo et al., 1986). И напротив, присутствие некоторых почвенных бактерий может ингибировать прорастание или образование спор АМ грибов (Tommerup, 1985).

Микоризованные корни представляют собой экологическую нишу для различных микроорганизмов (Cairney, Meharg, 2002). Некоторые ризосферные бактерии плотно облепляют грибные гифы, другие напрямую связаны с поверхностью корня (Bianciotto, Bonfante, 2002). В отличие от других групп эукариотических организмов, для грибов наличие эндосимбиотических бактерий – редкий случай. Внутриклеточные структуры,

Таблица 16. Бактерии, ассоциированные с микоризообразующими грибами
 (по De Boer et al., 2005)

Вид микобионта и тип микоризы	Поверхность, заселяемая бактериями	Доминирующие роды и группы бактерий
<i>Suillus grevillei</i> (ЭМ)	Внутренняя часть плодового тела	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>Suillus luteus</i> (ЭМ с <i>Pinus sylvestris</i>)	Микоризное окончание	<i>Bacillus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Pseudomonas</i>
<i>Lactarius rufus</i> (ЭМ с <i>Pinus sylvestris</i>)	Микоризное окончание (после поверхностной стерилизации)	<i>Burkholderia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Paenibacillus</i>
<i>Lactarius spp.</i> (ЭМ с <i>Fagus sylvatica</i>)	ЭМ чехол	α -, β -, γ -протеобактерии
<i>Cantharellus cibarius</i> (ЭМ)	Внутренняя часть плодового тела	<i>Pseudomonas</i>
<i>Glomus clarum</i> (АМ)	Споры	<i>Bacillus</i>
<i>Glomus dussii</i> (АМ)	Гифы	<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Arthrobacter</i>

Условные обозначения см. в тексте.

напоминающие бактериальные клетки (BLO – bacteria-like organisms), впервые были отмечены в 1970-х гг. Долгое время изучение этих структур, часто обнаруживаемых в цитоплазме АМ грибов, включая выявление их прокариотной природы, было заторможено тем, что эти бактерии не выделялись в культуру (Bianciotto et al., 1996; 2003; Bianciotto, Bonfante, 2002). Только соединение морфологических исследований с применением электронной микроскопии с молекулярными анализами позволило выяснить, что эти организмы действительно являются палочковидными Грам-отрицательными бактериями и начать изучение их симбиоза с АМ грибами (Bianciotto et al., 1996b). Впервые выделенный из мицелия *Gigaspora margarita* бактериальный эндосимбионт был отнесен к роду *Burkholderia* (Bianciotto et al., 1996b). Когда были получены данные о других эндосимбиотических бактериях грибов сем. Gigasporaceae, был предложен новый таксон «*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*» (Bianciotto et al., 2003). Было показано, что эндобактерии широко распространены в сем. Gigasporaceae, и сделано предположение, что они являются постоянным элементом цитоплазмы АМ грибов. Спора *Gigaspora margarita* содержит около 130 тыс. живых бактерий (Genre et al., 2004). Предварительные результаты демонстрируют, что бактерии переходят от одного поколения грибов к следующему путем вертикального переноса. Дальнейшими исследованиями показано наличие эндосимбионтов и у представителей других семейств отд. Glomeromycota. Функциональная значимость эндосимбионтов пока неясна, так как попытки их культивирования до сих пор остаются безуспешными. Среди бактериальных генов наиболее интересными представ-

ляются те, которые могут принимать участие в поглощении минеральных веществ (например, предполагаемый оперон фосфатных переносчиков *pst*), в колонизации гриба бактериальными клетками (*vac*) и в хемотаксисе (Genre et al., 2004).

Точно известно, что эндосимбионты не оказывают негативного действия на способность АМ микобионтов к формированию микоризных ассоциаций. Близкое филогенетическое родство бактерий из географически удаленных штаммов и из разных видов АМ грибов может свидетельствовать о том, что приобретение грибами эндосимбионтов – уникальное событие, произошедшее на уровне предковой формы, и далее симбиоз распространялся путем вертикального переноса (Genre et al., 2004). Внедрение эндосимбионта осуществляется, по-видимому, путем лизиса бактерией кончиков гиф (Levy et al., 2003).

Эндосимбиотические бактерии свойственны не только микобионтам АМ. Наличие эндосимбионтов показано для некоторых ЭМ базидиомицетов и аскомицетов (*Laccaria*, *Morchella*, *Tuber*) (Barbieri et al., 2002; Bertaux et al., 2003; Buscot 1994). Интересно, что только эндобактерии ЭМ грибов принадлежат к родам, которые способны гидролизовать полимеры грибной клеточной стенки (например, *Paenibacillus*, *Cytophaga*) (Bertaux et al., 2003). Среди поддающихся культивированию бактерий, населяющих микоризосферу и гифосферу ЭМ грибов, доминируют виды родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* (de Boer et al., 2005; Khetmalas et al., 2002) (табл. 16). Что касается ЭМ грибов, то на примере вида *Suillus bovinus* показано, что бактерии способны внедряться внутрь клеток чехла и сети Гартига, но пока неясно, имеет ли место эн-

досимбиоз, или оппортунистическая инфекция. При изучении другого симбиотрофа – *Lactarius rubrocinctus* – бактерии обнаруживались внутри клеток только в поврежденных гифах чехла, что свидетельствует в пользу мнения об инфекции. Есть данные о целом ряде Грам-положительных протеобактерий и Грам-отрицательных бактерий, ассоциированных с ЭМ грибными структурами, но подобные ассоциации значительно различаются в зависимости от вида ЭМ гриба и условий почвы (Cairney, Meharg, 2002). Для ЭМ бука и *Lactarius vellereus* или *L. subdulcis* было показано доминирование на микоризных чехлах представителей α -, β - и γ -протеобактерий, но функции этих микроорганизмов в эктомикоризосфере неизвестны (Mogge et al., 2000). Тип влияния микоризообразователя на микробиоту также может быть различен (Великанов, Сидорова, 1997). В некоторых условиях и для некоторых видов ЭМ грибов присутствие гриба снижает активность почвенных бактерий, в других случаях (например, при внесении в почву минеральных веществ), присутствие ЭМ гриба усиливает бактериальную активность. Негативный эффект может быть вызван конкуренцией за питательные вещества почвы или антибиотическим действием ЭМ гриба, а положительный – использованием бактериями грибных метаболитов. Присутствие некоторых видов ЭМ грибов способно количественно менять состав бактериальных сообществ почвы. Хорошо известным примером такого высокоаллелопатичного вида, значительно влияющего на численность и почвообитающих бактерий и микромицетов, является матсутакэ (*Tricholoma matsutake* (S.Ito et Imai) Singer). Этот вид образует «сиро» – «замок», строго ограниченную зону, занимаемую колонией, в которой наблюдается почти полное исчезновение почвенных бактерий и актиномицетов, а численность и видовой состав микромицетов значительно сокращаются (Ohara, Namada, 1967). Близкие виды (*T. fulvocastaneum*, *T. bakamatsutake*, *T. caligatum*) оказывают сходный, но менее выраженный эффект на микробиоту окружающей почвы. Аналогичное влияние – снижение в гифосфере и микоризосфере численности бактерий и микромицетов было показано для ЭМ вида *Paxillus involutus* (Великанов, Сидорова, 1998).

Бактерии в микоризосферах АМ и ЭМ изучены достаточно подробно, а относительно бактерий ОМ и ММ имеется небольшое количество данных. Ассоциированные с корнями Орхидных бактерии оказывают влияние на прорастание

семян растений путем выделения фитогормона ауксина (Wilkinson et al., 1994). На подземных корнях наземной орхидеи *Calanthe vestita* отмечены бактерии из родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium* и *Pseudomonas*, а на воздушных корнях эпифитов – представители родов *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Xanthomonas*. У Орхидных, занимающих различные природные местообитания (субстратные и воздушные корни), разнообразие бактерий отличается. Для наземного вида *Calanthe vestita* характерен комплекс микроорганизмов, отличный от микробиоты почвы (Цавкелова и др., 2001). Кроме того, на подземных корнях наземных видов, как и на воздушных корнях эпифитов, были обнаружены популяции цианобактерий, преимущественно представителей рода *Nostoc* (Цавкелова и др., 2003 а, б). Ассоциативные цианобактерии населяют ризоплану и веламен воздушных корней и ризоплану субстратных корней эпифитных Орхидных. Преобладают представители рода *Nostoc*, на поверхности воздушных корней также встречаются виды *Anabaena*, *Calothrix*, а субстратных – *Oscillatoria*, *Lyngbia*, *Phormidium*, *Plectonema*. При этом качественный и количественный состав ассоциативных цианобактерий зависит от условий произрастания или культивирования Орхидных. Воздушные корни эпифитов и субстратные корни наземных видов различаются по составу цианобактерий. Воздушные корни эпифитных орхидей заселяются ассоциативными цианобактериями активнее, чем субстратные (Цавкелова и др., 2003 а). Бактериальные сообщества микоризосферы ОМ, вероятно различаются у разных родов Орхидных и в разное время года (Timonen, Marschner, 2005). Относительно ММ известно, что бактерии населяют поверхности микоризных чехлов, но таксономический состав их пока неизвестен.

Вместе со специфичными для микоризосферы и гифосферы бактериями в этих местообитаниях встречаются и обычные для почвы виды. Кроме того, условия почвы также оказывают влияние на состав бактериальных популяций, ассоциированных с грибами. Очевидно, что возможность нахождения определенного вида бактерий в микоризосфере зависит от его обилия в бактериальном сообществе почвы, т.к. одни и те же виды грибов-микоризообразователей в почвах различных типов ассоциированы с разными видами бактерий, хотя несомненно, что селективная функция микоризосферы в отношении бактерий очень велика (Bending et al., 2002).

Грибы в микоризосфере

Помимо грибов-микоризообразователей в состав микобиоты микоризосферы входят также почвообитающие микромицеты, связи которых с микоризами изучены недостаточно, особенно в природных условиях. В ряде исследований были рассмотрены вопросы взаимоотношения микоризных грибов с патогенными микромицетами. Наиболее часто отмечают антагонистическое взаимодействие с такими корневыми патогенами как виды родов *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, доминирующими на НМ корнях, но резко снижающими численность в микоризосфере, а также привлечение в микоризосферу непатогенных микромицетов-антагонистов патогенов (Кивиниemi, 1980; Katznelson et al., 1962; Marx, 1969; Timonen, Marschner, 2005 др.). Экстракт АМ гриба *Glomus intraradices* подавляет прорастание спор патогена *Fusarium oxysporum*, но стимулирует прорастание непатогенного вида *Trichoderma harzianum* (Filion et al., 1999). Для ЭМ гриба *Laccaria laccata* показан антагонизм в отношении микромицетов *Mucor hiemalis f. hiemalis* и *Trichoderma virens*. При совместном культивировании рост мицелия *L. laccata* ингибировал развитие микромицетов, которые развивались на НМ корнях значительно активнее, чем на микоризованных (Werner et al., 2002; 2003). Такое влияние грибов-микоризообразователей на патогенные микромицеты может быть обусловлено рядом факторов: снижением выделения сахаров, привлекающих патогены, в процессе колонизации микоризообразователями; физическим исключением патогенов с поверхности корня присутствием микоризного гриба; прямым фунгицидным действием метаболитов микоризообразователя; усилением защитных реакций растения, заселяемого микобиотом; улучшением общего состояния растения.

Известно, что мицелий ЭМ базидиомицетов оказывает сильное влияние на видовой состав и обилие микромицетов в лесных почвах и подстилке. По данным Л.Л. Великанова и И.И. Сидоровой, такие виды как *Cantharellus cibarius*, *Boletus edulis*, *Amanita phalloides*, *A. muscaria*, *Lactarius mitissimus*, вызывали снижение видового разнообразия микромицетов с различной силой воздействия. Кроме снижения численности, эффект гифосферы проявлялся в изменении состава доминантных видов микромицетов (Великанов, Сидорова, 1998).

Специфичность каких-либо видов микромицетов к ЭМ древесных растений – вопрос, остающийся открытым. Ответ на него весьма важен, так как он объяснил бы регуляторное действие мико-

ризного чехла на популяции микромицетов в ризосфере. По мнению Р. Саммербелла, ни один из видов, выделенных из ЭМ *Pseudotsuga menziesii*, не обладает высокой степенью специфичности к микоризному чехлу, а комплекс видов, присутствующий в микоризосфере, во многом сходен с ризосферным сообществом (Summerbell, 1987; 2005). Он полагает, что микоризосфера как местообитание не имеет большого значения в определении структуры популяций почвообитающих микромицетов. Эдафические факторы и условия сообществ микроорганизмов более важны, но микоризосферный эффект, вызываемый некоторыми симбионтами ЭМ на занимаемом ими пространстве почвы, в некоторых случаях показан и заслуживает дальнейшего изучения. Однако следует заметить, что, как уже было упомянуто, Р. Саммербелл трактует микоризосферу как зону влияния только микоризного чехла, не учитывая свободный мицелий, являющийся продуцентом ряда биологически активных веществ, непосредственно контактирующий с почвообитающими грибами и бактериями, влияние которых до сих пор изучено недостаточно, особенно в природных условиях (Summerbell, 2005).

В то же время существуют и противоположные данные – многие исследователи полагают, что на поверхности ЭМ складываются особые сообщества микромицетов, отличные как от сообществ ризосферы НМ корня, так и от свободной почвы, а также различаются в зависимости от вида микобионта (Katznelson et al., 1962; Neal et al., 1964; Varese, Luppi-Mosca, 1996). Основной тенденцией количественного влияния микоризосферы на почвообитающие микромицеты является снижение их численности (Великанов, Сидорова, 1997; Katznelson et al., 1962; Neal et al., 1964).

Помимо микромицетов, мицелий грибов-микоризообразователей в почвах взаимодействует с мицелием макромицетов других эколого-трофических групп. Мицелии сапротрофов и симбиотрофов сосуществуют в органических горизонтах лесных почв, но до сих пор мало известно об их взаимоотношениях. Имеются сведения об их антагонизме, приводящем к снижению колонизации ЭМ грибами корневой системы. Сапротрофные и ЭМ грибы встречаются в одних и тех же почвенных горизонтах, принадлежат к одним и тем же таксонам и обе группы способны усваивать органические соединения из подстилки, поэтому конкуренция между ними за корни растений вполне возможна (Shaw et al., 1995). Исход конкурентной борьбы будет зависеть от жизнеспособности грибных про-

пагул, скорости роста гиф и итога взаимодействия встретившихся мицелиальных фронтов (переплетение гиф без заметного влияния друг на друга, вытеснение одного вида другим или взаимное подавление роста обоих мицелиев). Какой из мицелиев будет оказывать подавляющее действие – видоспецифично, имеются противоречивые данные, но большинство из них получено в ходе исследований в микрокосмах (Cairney, Meharg, 2002). Другим аспектом взаимоотношений этих групп грибов является то, что сапротрофные грибы включаются в общий оборот питательных веществ микотрофных растений, т.к., как уже было упомянуто, ЭМ грибы могут получать элементы питания непосредственно от сапротрофов (Lindahl, 2000).

Прочие группы организмов в микоризосфере

Недавно в микоризосфере были обнаружены археи (Bomberg et al., 2003). Предполагают, что их разнообразие определяется видом микобионта, а также расположением в микоризосфере. В какой мере археи взаимодействуют с остальной биотой этого местообитания, пока не выяснено. Возможно, археи способны изменять условия в микоризосфере путем выделения метана и антибиотиков и фиксации азота.

Сообщества простейших, формирующиеся в микоризосфере, качественно и количественно различаются в зависимости от видов растения-хозяина и микобионта. Они связаны в основном с бактериальным компонентом микоризосферы, но ввиду сложности и многочисленности связей между корнями растения, микоризообразующими грибами и бактериальными сообществами, а также влияния абиотических факторов, положение простейших в микоризосфере не вполне ясно (Timonen, Marschner, 2005; Wamberg et al., 2003). Относительно АМ было выявлено, что влияние микоризации на популяции простейших зависит от физиологического статуса растения. У быстро растущих молодых растений колонизация АМ грибом снижает плотность популяции простейших, в то время как в период цветения микоризация влияет противоположным образом или не оказывает влияния. В эктомикоризосфере тип влияния на простейших может определяться видом ЭМ гриба (Ingham, Massicotte, 1994). Например, *Paxillus involutus* в микоризосфере хвойных снижает численность амёб и жгутиконосцев, а *Lactarius rufus* и *Suillus bovinus* действуют противоположно. Сообщества простейших могут оказывать влияние на сукцессии ЭМ грибов в корневых системах различных растений-хозяев пу-

тем выедания или переноса определенных видов бактерий или путем влияния на минерализацию азотных соединений в микоризосфере (Ingham, Massicotte, 1994).

На сообщества микоризосферы также оказывают значительное влияние почвенные животные, такие как нематоды, клещи и дождевые черви (Cromack et al., 1988). Они питаются корнями и гифами, охотятся на ассоциированные с корневой системой микроорганизмы, а также могут наносить серьезные повреждения мицелиальной сети (Timonen, Marschner, 2005). Путем выедания гиф почвенная фауна может регулировать развитие ЭМ симбиоза. Даже существенное сокращение почвенными животными количества ЭМ мицелия не приносит серьезного вреда микоризной ассоциации. Возможно, что трансформация соединений азота, осуществляемая почвенной фауной, компенсирует уменьшение количества ЭМ грибов (Fitter, Garbaye, 1994; Setälä, 1995). Млекопитающие могут играть значительную роль в распространении спор ЭМ грибов, особенно, видов с гипогейными плодовыми телами, а спорами АМ грибов питаются многие группы почвообитающих беспозвоночных (дождевые черви, ногохвостки и ряд других членистоногих) (Fitter, Garbaye, 1994; Camargo-Ricalde, 2002; Klironomos, Moutoglou, 1999). Споры сохраняют способность к прорастанию после прохождения через пищевой тракт. Споры также подвергаются паразитизму со стороны хитридиевых грибов и некоторых амёб, и можно предполагать, что эти паразитические организмы играют важную роль в регуляции численности спор микоризных грибов (Fitter, Garbaye, 1994). Почвенные клещи – представители надсем. Cryptostigmata – часто являются специализированными микофагами, и среди них есть виды, приуроченные к свободному микоризному мицелию. Также показано значительное выедание гиф *Glomus fasciculatus* ногохвостками космополитного вида *Folsomia candida* (Warnock et al., 1982 – цит. по St. John, Coleman, 1983).

Потенциальная конкуренция между нематодами и микоризообразующими грибами за органические соединения и другие питательные вещества приводит к подавлению инфекции нематодами и их способности к размножению (Graham, 1988). Личинки нематоды рода *Meloidogyne* проникают в микоризованные корни так же, как и в НМ, но дальнейшее их развитие и размножение ингибируется микобионтом, что предполагает наличие антагонизма нематоды и гриба только внутри корня. Но имеются также данные, свидетельствующие о том, что микори-

зованные растения поражаются нематодами в большей степени, чем НМ: колонизация микобионтом повышает жизнеспособность растения, но не его устойчивость к патогену. Принимая во внимание наблюдения, что формирование галл в корневой системе сои, вызванное *Meloidogyne incognita*, снижается только в тех участках корня, где находится микобионт, можно заключить, что антагонистическое действие микобионта прямое и локальное, а защитные механизмы растения в данном случае симбиозом не затронуты (Fitter, Garbaye, 1994). Имеются данные о повышении АМ грибами устойчивости растения-хозяина к поражению корневой системы нематодами, но, в свою очередь, нематоды могут подавлять развитие арбускул и спор микобионтов АМ (Pinochet et al., 1996).

АМ влияет на рост, размножение и смертность листогрызущих насекомых. Показано снижение массы, замедление развития и повышение смертности личинок насекомых, питающихся АМ сравнительно с безмикоризными растениями (Rabin, Rasovsky, 1995). Механизмы, лежащие в основе защиты, пока неизвестны и не выяснено, оказывает ли АМ влияние на листогрызущих позвоночных.

Еще одно взаимодействие ЭМ грибов с животными заключается в образовании так называемого «очищающего симбиоза». Группа ЭМ грибов, «аммиачные грибы» (*Hebeloma* spp., *Laccaria* spp.) способна усваивать азотсодержащие соединения из субстратов, выделяющих аммиак при разложении, таких как моча, фекалии, трупы мелких млекопитающих. Предполагается, что животные, рядом с норами которых формируют ЭМ «аммиачные грибы», получают выгоду от этого симбиоза, так как ЭМ мицелий переносит продукты распада их останков и остатков жизнедеятельности. Эти животные не питаются грибами, не связаны напрямую с растениями, и ЭМ предоставляет им возможность очистки местобитаний (Sagara, 1995).

Микроорганизмы микоризосферы могут конкурировать за питательные вещества, но также и дополнять функции друг друга (рис. 7). Примером синергизма микроорганизмов микоризосферы можно считать получение питательных веществ. У растений имеются эффективные механизмы для экстракции и поглощения питательных веществ, такие как органические кислоты и транспортные молекулы. У грибов-микоризообразователей к этому добавляются более широкая область охвата питательных веществ, способность к проникновению в поч-

венные поры, экссудаты и ферментативная активность (Read, Perez-Moreno, 2003) (табл.15). Помимо растений и грибов-микоризообразователей, в обмене веществами в микоризосфере участвуют бактерии. Они играют особенно важную роль в экстрагировании фосфора и катионов металлов из недоступных растениям соединений. Так, высвобождающиеся в результате бактериального выветривания слюд и нерастворимых фосфатов катионы и фосфат-анионы были обнаружены в микоризосферах и АМ и ЭМ, что демонстрирует синергистические взаимоотношения между бактериями и микоризными грибами в поглощении питательных веществ (Timonen, Marschner, 2005). Среди микоризосферных бактерий имеются и азотфиксаторы, заселяющие клубеньки на корнях растений или непосредственно микоризы (Li, Hung, 1987). Например, нормальное образование клубеньков у Бобовых может зависеть от присутствия микоризообразующих грибов, что впервые было показано Асаи уже в 1944г., а затем подтверждено данными многих других исследователей (Asai, 1944 – цит. по Koide, Mosse, 2004). Существуют многочисленные данные об усилении ростовых процессов растения и процессов микоризации в тройственных системах «растение-микоризообразующий гриб-азотфиксирующие бактерии» (Chanway, Holl, 1991 и мн.др.).

Состоящие из множества видов микоризосферные сообщества микроорганизмов могут играть очень важную роль в выживании растений (особенно долгоживущих древесных форм) при изменении условий окружающей среды. Физиологические особенности микроорганизмов могут изменяться сравнительно быстро, что снижает потенциально вредное для менее пластичных растений воздействие изменений в биогеоценозе. Различные сообщества микроорганизмов микоризосферы и гифосферы также позволяют растениям более эффективно использовать различные типы микрозон в почве.

Изменение условий окружающей среды

Микоризосфера оказывает влияние на структуру почвы и на микро-, и на макроскопическом уровне. Косвенное воздействие грибов-микоризообразователей на растительные и микробные сообщества может заключаться в модификации условий окружающей среды. Некоторые ЭМ грибы образуют экстратрикаральные разветвленные мицелиальные тяжи, которые пронизывают почву и подстилку на расстоянии до 40 см и более (*Rhizopogon luteolus*, *Suillus bovinus*, *Hebeloma*

crustuliniforme). Другие формируют плотные мицелиальные маты в подстилке (*Gautieria monticola*, *Hysterangium setchellii*) (Bowen, 1994; Entry et al., 1991). Эти структуры способны значительно изменять условия местообитания и активность микроорганизмов почвы и подстилки благодаря наличию комплекса экзоферментов и разнообразных вторичных метаболитов. Например, скорость разложения хвойного опада и микробная активность в мицелиальных матах *Hysterangium setchellii* в 4,0 и 1,1, соответственно, раза выше, чем в окружающей почве. Мицелий *Hysterangium setchellii* выделяет большое количество щавелевой кислоты, которая образует комплексы с Al и Fe, переводит питательные вещества в растворимое состояние и концентрирует их в гифах (Entry et al., 1991). Микоризосфера влияет на состав и концентрацию органических кислот в почве и, соответственно, на круговороты питательных веществ (Read, Perez-Moreno, 2003). Эти механизмы перевода веществ в подвижное состояние вкупе с передвижением воды в почве – одни из основных факторов, определяющих перемещение элементов по почвенному профилю. Корни и грибы-микоризообразователи также участвуют в переносе веществ на значительные расстояния, создавая горизонтальный ток веществ через почву. Кроме того, ЭМ грибы способны осуществлять биогеохимическое выветривание минералов путем выделения органических кислот (Landerweert et al., 2001).

АМ грибы способны изменять структуру почвы, но механизмы их воздействия пока недостаточно изучены (Rillig, 2004). Экстраметрические гифы микобионтов АМ участвуют в стабилизации микроагрегатов почвы путем связывания почвенных частиц и накопления органических соединений. Агрегация позволяет поддерживать пористую, но устойчивую структуру почвы и предотвращать эрозию. Одно из важнейших соединений, выделяемых гифами АМ грибов – гликопротеин гломалин (Rillig, Steinberg, 2002; Rillig et al., 2003). Биохимическая природа гломалина пока неизвестна, но показано, что изменение его количества в почве коррелирует с изменениями в агрегации почвы. Гломалин представляет собой весьма устойчивое вещество и остается в почве даже после гибели гриба-продуцента (Steinberg, Rillig, 2003). Помимо этого, симбиотические бактерии, выделяемые из мицелия АМ грибов (*Paenibacillus spp.*), также могут способствовать агрегации почвы (ссылки на оригинальные исследования см. в Rillig, 2004).

История возникновения и эволюция типов микориз

Согласно данным палеоботаники, высшие растения были микотрофны с момента их возникновения. Наиболее древние палеонтологические свидетельства существования микориз известны из ризоидов первых сосудистых растений, но весьма вероятно, что эти ассоциации впервые возникли в талломах мохообразных наземных растений. Предполагают, что первые наземные растения были сходны с современными печеночными мхами с горизонтальным талломом и отдельными гаметофитным и спорофитным поколениями. АМ грибы – одни из немногих, сохранившихся в виде фоссилий (Selosse, Le Tacon, 1998). Палеонтологические доказательства их существования датируются ордовикским периодом (около 470 млн. л. назад) (Redecker et al., 2000a) (табл. 17). Древнейший тип микориз – АМ: обнаруженные структуры, напоминающие гифы, арбускулы и везикулы современных АМ грибов, датируются девонским и ордовикским периодами (Taylor, 1990; Taylor, Osborn, 1996; Redecker, 2000). Сапротрофные грибы – наиболее вероятные потенциальные микобионты, т.к. их ферментативный аппарат пригоден для проникновения через растительные клеточные стенки (Taylor, 1990). Тем не менее, возможен и иной путь: рассматриваемый иногда как протолишайник *Geosiphon* – почвенный гриб с эндосимбиотическими цианобактериями (Schüssler, Kluge, 2000 – цит. по Brundrett, 2002). Филогенетические исследования, основанные на данных о последовательности 18S рДНК малой субъединицы, показали, что *Geosiphon* – примитивный представитель гломусовых грибов (Schüssler et al., 2001). Таким образом, многие черты первых микотрофных ассоциаций могли развиваться в более ранних симбиозах с участием цианобактерий. Третий возможный путь эволюции заключается в происхождении гломусовых грибов от эндофитов водных растений-предшественников наземных, но среди современных морских водорослей подобные симбиозы неизвестны. Происхождение гломусовых грибов от паразитических организмов маловероятно, т.к. они не родственны никаким грибам-паразитам, обнаруженным в фоссилиях ранних наземных растений (Brundrett, 2002).

Сейчас предполагают, что пор. Glomerales и АМ возникли в ордовике (470–460 млн. л. назад) – во время освоения суши первыми наземными растениями, а наличие в ордовике двух далеко разошедшихся друг от друга (на уровне семейств)

Таблица 17. Микоризный статус основных эволюционных линий растений с приблизительными сроками возникновения по данным палеонтологии и молекулярной филогении растений (по Brundrett, 2002).

Период	Растения	Микоризы
Ордовик (476 млн. л. назад)	Печеночные мхи	АМ-подобные без арбускул в талломе
Силур (415 – 425 млн. л. назад) – до настоящего времени	Мхи	Корней нет, НМ или с гломусовыми эндофитами
Ранний девон (400 млн. л. назад)	<i>Aglaophyton major</i> : древнее наземное растение неясного родства	АМ-подобные арбускулы в специализированной меристеме ризома
Девон (395 млн. л. назад) – до настоящего времени	Плауны: <i>Lycopodium</i> , <i>Selaginella</i>	АМ в спорофитах, подземные гаметофиты могут участвовать в эксплуативных ассоциациях
	Хвощи: <i>Equisetum</i>	<i>Equisetum</i> – факультативная АМ или НМ
Средний девон (385 млн. л. назад) – до настоящего времени	Хвощи, плауны, папоротникообразные, папоротники	Первые растения с корнями, напоминающими современные АМ (иногда факультативные с тонкими корнями с корневыми волосками)
	Цикадовые	АМ
Триас (215 – 235 млн. л. назад)	Цикадовые из Антарктики (<i>Antarcticycas</i> sp.)	Древнейшая ископаемая АМ в корнях
Пермь (265 млн. л. назад) – до настоящего времени	Гинкговые: <i>Ginkgo</i>	Древесные формы с АМ
	Триас (235 млн. л. назад) – до настоящего времени	
Ранняя юра (190 млн. л. назад) – до настоящего времени	Хвойные Северного полушария (кроме Pinaceae): Cupressaceae, Taxodiaceae, Taxales	<i>Welwitschia</i> – АМ
	Gnetales: <i>Ephedra</i> , <i>Gnetum</i> , <i>Welwitschia</i>	
Ранний мел (120 млн. л. назад) – до настоящего времени	Хвойные из Pinaceae: <i>Larix</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , <i>Tsuga</i>	Древесные формы с ЭМ
	Покрытосеменные	см. табл. 5
Мел (100 млн. л. назад) – до настоящего времени	Fagales: Betulaceae, Casuarinaceae, Fagaceae, Juglandaceae, Myricaceae, Nothofagaceae	Единая линия древесных форм или кустарников с ЭМ (иногда также с АМ)
	НМ семейства: Proteaceae, Cyperaceae, Restionaceae	Древнейшие известные фоссилии растений с НМ корнями
	Orchidaceae	ОМ: оценка возраста по биогеографии и филогенетике
Поздний мел, эоцен – до настоящего времени (90 – 30 млн. л. назад)	Caesalpiniaceae, Fabaceae, Mimosaceae, Salicaceae, Tiliaceae	Несколько самостоятельных ЭМ линий
Поздний мел (80 млн. л. назад)	Ericales	Древнейшие известные фоссилии растений с ЭрМ

Условные обозначения см. в тексте.

линий отд. Glomeromycota отодвигает сроки его формирования до 600 млн. лет назад (Каратыгин, Снегиревская, 2004; Selosse, Le Tacon, 1998). Предполагается, что АМ грибы старше, чем наземные растения (Redecker et al., 2000b). Вопрос о том, какой из типов АМ, *Arum*- или *Paris*-тип возник раньше, пока остается без ответа. *Paris*-тип более характерен для Мохообразных, Папоротникообразных и Голосеменных, и поэтому может считаться исходной формой АМ. С другой стороны, можно предполагать, что *Paris*-тип является эволюционно более продвинутым, т.к. позволяет растению в большей степени контролировать микобионт и встречается в большинстве эксплуативных микориз (Bidartondo, 2005; Imhof, 1999).

ЭМ – более молодой симбиоз, возникший из сапротрофии, по разным датировкам, 200–130 млн. л. назад (юра – мел), в процессе коэволюции базидиомицетов с Голосеменными (Selosse, Le Tacon, 1998). Разные таксономические группы базидиомицетов в процессе эволюции неоднократно приобретали и утрачивали ЭМ свойства. Предполагают происхождение агарикоидных базидиомицетов от ксилотрофных предков, и две крупнейшие группы микобионтов ЭМ – *Boletales* и *Russulales* – являются сестринскими по отношению к большинству прочих агарикоидных (Moncalvo et al., 2000). Приобретение способности формировать ЭМ должно было стать решающим этапом в эволюции агарикоидных базидиомицетов. Палеонтологических свидетельств эволюции макромицетов очень мало, предполагается, что быстрая радиация их групп происходила в меловом периоде, когда растения, входящие в ЭМ ассоциации приобрели большое значение. В это время предположительно возникли *Cortinariaceae*, *Boletales*, *Amanitaceae* и *Russulaceae*. Дальнейшее расхождение этой группы грибов происходит и в наше время под влиянием растущей специфичности в отношении растения-хозяина и местообитания. ЭМ базидиомицеты полифилетичны и перемешаны с сапротрофами, от которых, по всей вероятности ведут свое происхождение (Hibbett et al., 2000). Утраты и приобретения ЭМ статуса происходили независимо на множестве линий (Bruns, Shefferson, 2004; Hibbett et al., 2000; Moncalvo et al., 2000). При этом возможен возврат к сапротрофии, но не к паразитизму, т.к. более вероятен возврат к статусу, к которому уже произошла адаптация (Malloch, 1987). У аскомицетов ЭМ независимо возникала 4–5 раз (LoBuglio et al., 1996). Эти данные согласуются с полученными Луццони,

чьи исследования филогении аскомицетов позволяют предполагать, что лишайниковый мутуализм характеризуется множеством приобретений и утрат симбиотического статуса и также обратим (Lutzoni et al., 2001). Полифилетичное происхождение ЭМ грибов предполагает значительное функциональное разнообразие в пределах этой группы (Hibbett et al., 2000; Moncalvo et al., 2000).

Как и линии микобионтов, различные линии Покрытосеменных растений приобретали ЭМ независимо друг от друга, и сходные структуры ЭМ считают результатом конвергенции. Для сем. *Pinaceae* не показано наличие общего предка с Покрытосеменными растениями, и базальные группы Цветковых, такие как Магнолиды, не содержат ЭМ видов (табл. 5) (Bruns, Shefferson, 2004). Эпидермальная сеть Гартига возникла у большинства ЭМ Покрытосеменных, возможно, из-за наличия экзодермиса, предотвращающего проникновение гиф. У Голосеменных этот слой отсутствует, но на морфологию их микоризы могло повлиять и отсутствие четко выраженного эпидермального слоя (Brundrett, 2002). Предполагается множество утрат ЭМ статуса у Покрытосеменных. В настоящее время считается, что существует минимум 12 независимых групп Покрытосеменных, содержащих ЭМ виды. Некоторые из этих групп полифилетичны, и включают несколько линий, в которых могли происходить независимые приобретения и утраты (Bruns, Shefferson, 2004). Тем не менее, конвергенция ЭМ кажется маловероятной, т.к. это значит, что морфологически сложные структуры зоны Гартига, чехла и т.д. «изобретались» неоднократно заново. Поэтому есть тенденция объяснения наличия независимых линий множественными утратами. Это объяснение не позволяет полностью уйти от конвергентных приобретений ЭМ растениями, но существенно снижает частоту этих событий. Параллельные утраты сложных структур более вероятны, чем их приобретения, но в этом случае и растению и грибу потребовались бы иные каналы поступления минеральных или органических веществ. Предполагается, что у микобионтов ЭМ 9 раз происходила утрата симбиотрофии (Hibbett et al., 2000). Но, во-первых, несомненные примеры конвергенции широко известны у грибов, а доказательства утраты симбиотрофии (наличие НМ таксона, близкородственного ЭМ) не представлены, а, во-вторых, приобретение ЭМ могло стать колоссальным экологическим преимуществом, приведшим к быстрой радиации видов микобионтов во время развития растений-хозяев и

расширения их ареалов, что невозможно в случае сапротрофии – уже хорошо разработанной к тому времени жизненной стратегией, где конкуренция была высока (Bruns, Shefferson, 2004). Такая ситуация могла сложиться в меловом периоде, когда развивались Хвойные и многие линии Покрытосеменных, и на стыке эоцена и олигоцена, когда представители этих групп растений стали доминировать в лесах Северного полушария. Активная радиация многих независимых линий ЭМ грибов началась примерно в это же время (25–60 млн. л. назад) (Bruns et al., 1998). Возврат к сапротрофии не дал бы такого результата, т.к. не предоставлял новую экологическую нишу: к моменту появления симбиотрофии сапротрофия уже существовала (Verbee, Taylor, 1993).

Микоризы других групп растений возникли, предположительно, одновременно с линиями растений-хозяев, к примеру, происхождение ЭрМ, как и Вересковых, по палеонтологическим свидетельствам датируется меловым периодом (80–70 млн. л. назад). По данным об эволюции аскомицетов (палеонтологические свидетельства и молекулярные часы), предполагают, что ЭрМ у предковых для пор. *Ericales* форм возникла в раннем мелу около 140 млн. л. назад (Cullings, 1996). Неясно, существовали ли микобионты ЭрМ изначально как почвообитающие сапротрофы, или симбионты растений. Так как они менее зависимы от растений, чем микобионты АМ или ЭМ, способность образовывать микоризные ассоциации не была основной движущей силой их эволюции (Brundrett, 2002).

Эволюция микотрофии пор. *Ericales* достаточно сложна: от АМ предка к ЭМ, а затем АрМ с кульминацией в ЭрМ и микогетеротрофной ММ. Представители сем. *Ericaceae*, растущие на Гавайях, вновь приобрели АМ, в основном по причине отсутствия микобионтов ЭрМ (Koske et al., 1990).

Исходным типом микоризы является АМ, из него напрямую или опосредованно выводятся все остальные (рис. 9). Наиболее часто встречаются переходы от АМ к факультативной АМ, а затем к НМ статусу, или к двойным АМ/ЭМ ассоциациям, а затем к ЭМ. Обратная ситуация, когда ЭМ или НМ растения приобретают АМ, достаточно необычна. Тем не менее, в эволюционных линиях НМ растений может происходить возврат к первоначально микоризному статусу. Некоторые группы растений, начав формировать микоризы одного типа, в дальнейшем дивергировали на несколько отдельных микоризных типов. Например, многие АМ растения близкородственны

НМ или ЭМ растениям, а в пределах некоторых семейств присутствуют очень сложные микоризные ассоциации. Одни и те же гены растений принимают участие в регуляции азотфиксации в клубеньках и микоризообразования, возможно, что некоторые из этих механизмов универсальны для различных типов микориз (Vècard et al., 2004). Многие линии микогетеротрофных растений произошли от предков с АМ, АрМ или ОМ.

ОМ возникла как минимум 100 млн лет назад и продолжает эволюционировать и в настоящее время – происходит вовлечение в симбиоз новых филогенетических линий грибов (см. табл. 11). Возможно, что Орхидные ведут свое происхождение от предка с частично эксплуативной АМ.

Важнейшая эволюционная тенденция – усиливающийся контроль микобионта растением (ограничение пространства корня, заселяемого грибом) и усложнение зоны контакта симбионтов, а также возрастание специфичности микобионта. Ярким примером служит ОМ, где способность растения контролировать микобионт очень высока. Другая тенденция – к независимости от микобионта (факультативные микоризы). В эволюционном континууме два полюса представляют эксплуативные и факультативные микоризы, а сбалансированные (мутуалистические) занимают срединное положение.

Эволюция морфологии корневых систем растения во многом определяется необходимостью контроля микобионта и ограничения его распространения в тканях растения. Кульминация этого процесса наблюдается у микогетеротрофов с редуцированной корневой системой и эксплуативными микоризами. Эксплуативные микоризы, скорее всего, являются эволюционным тупиком в силу высокой специфичности микогетеротрофных растений к микобионтам и местобитаниям и безвозвратной утраты хлорофилла (Bidartondo, 2005 и др.). Также характерна тенденция к утрате лигнифицированных тканей, как у представителей пор. *Ericales*, ставших травянистыми. Необходимость наличия зеленого растения для поддержания симбиоза также объясняет, почему микогетеротрофы не занимают доминирующее положение в природных растительных сообществах.

С эволюционной позиции можно выделить 4 категории микоризообразующих грибов: синхронного происхождения с наземными растениями; синхронного происхождения с Покрытосеменными растениями; недавно вступившие в образование ассоциаций; не коэволюционировавшие с растениями (см. табл. 9). Гломусовые

грибы – уникальная группа, монофилетичная по происхождению, совместно эволюционировавшая с наземными растениями в течение всего периода их существования. Эволюционировала эта группа крайне медленно – структуры современных гломусовых грибов мало отличаются от древнейших ископаемых. Возможно, что эти грибы коэволюционировали с почвами в большей степени, чем с растениями-хозяевами. Их жизненная стратегия рассчитана на очень долгий период, и заключается в гибкости по отношению к условиям окружающей среды, как современным, так и будущим. Другие микоризные грибы полифилетичны по происхождению и конвергировали в процессе эволюции. Существует корреляция между зависимостью микоризного гриба от растения-хозяина и возрастом микоризной ассоциации (Brundrett, 2002). АМ и многие ЭМ не могут существовать без растения, в то время как микобионты других типов микориз способны к самостоятельному существованию.

Микоризные грибы, высокоспецифичные к хозяину, следовали за эволюцией растений, а менее специфичные развивались более независимо. ЭМ грибы эволюционировали быстрее, чем растения-хозяева, что выражается в большом разнообразии таксонов микобионтов и ЭМ структур. Микобионты ЭрМ и ОМ способны существовать без растения-хозяина и включают недавно вовлеченные в симбиоз линии почвообитающих грибов. Если эти микобионты, относимые к категории З, в первую очередь функционируют как сапротрофы или паразиты, растения могли не влиять на их эволюцию.

В настоящее время эволюция микориз продолжается: новые линии грибов и растений вовлекаются в симбиозы (рис. 9). В некоторых семействах Покрытосеменных (Myrtaceae, Fabaceae) одновременно присутствуют НМ растения и микоризы смешанных типов (АМ и ЭМ, или одновременно присутствуют АМ и кластерные корни, свойственные НМ растениям). АМ у растений с двойными АМ/ЭМ ассоциациями может быть реликтовой (в силу неспособности растения полностью избавиться от микобионта), функциональной (обеспечивать растению больший доступ к питательным веществам) или механизмом для случаев, когда инокулюм ЭМ микобионта ограничен). Примером последнего варианта может служить то, что доля АМ в смешанных ассоциациях становится значительной, когда растение находится в нарушенных местообитаниях, на переувлажненных почвах или у семян (Chen et al., 2000 и др.).

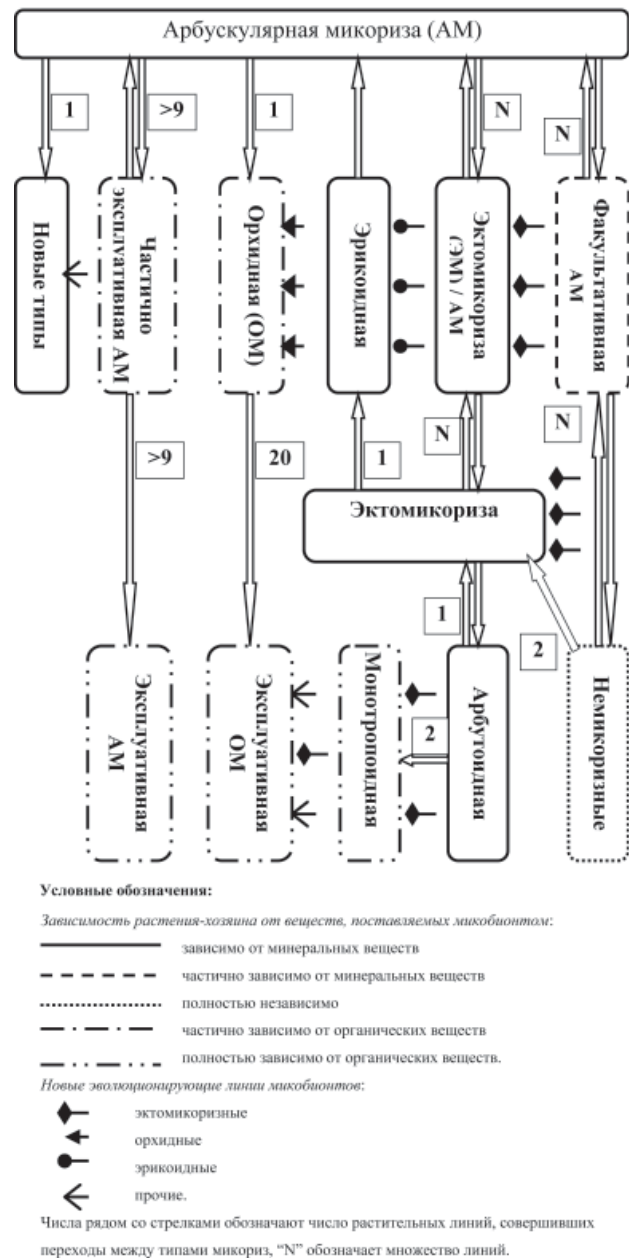


Рис. 9. Эволюция типов микориз (по Brundrett, 2002).

Таким образом, наиболее вероятно, что эволюция микоризных ассоциаций шла в сторону усиления контроля растения над микобионтом и специфичности симбиозов, т.е. от эндوفитных грибов к сбалансированным, а далее к эксплуативным микоризам (Brundrett, 2002). Усложнение зоны контакта между симбионтами, вероятно, преследовало цель предотвратить мошенничество со стороны партнера по симбиозу, и первично контролировалось растением – слу-

чаи паразитизма гриба в микоризах очень редки в природных условиях. Паразитизм растения встречается у микогетеротрофов, но виды-доминанты природных экосистем образуют сбалансированные микоризы, т.к. их процветание зависит от успешного развития микобионтов. У некоторых групп растений переход от авто- к гетеротрофии происходил постепенно, но бесхлорофильные мутанты Орхидных совершили этот переход за один шаг (Rasmussen, 1995).

Эндофитные ассоциации повсеместно встречаются у растений, и могли быть первоисточником микоризного симбиоза. Вначале они были случайны, и оба партнера не утратили способности существовать по отдельности. Грибы-эндофиты получили ряд преимуществ: доступ к экссудатам растения, наиболее быстрый доступ к органическим веществам после гибели растения-хозяина, а также уход от конкуренции, выедания и паразитизма со стороны других почвенных обитателей. Микофильные грибы, сходные с теми, которые в настоящее время паразитируют на АМ грибах, существовали уже в палеозое (Brundrett, 2002). Первые наземные растения находились на открытых пространствах и в атмосфере, более богатой углекислым газом, чем современная, что подразумевает большие возможности для фотосинтеза и накопления органических соединений, выделяемых в виде экссудатов (Raven, Edwards, 2001). Эти растения имели достаточно слабую структуру, и должны были иметь высокую проницаемость для поглощения воды и минеральных веществ. Они могли быть весьма привлекательны для почвенных грибов, как современные Мохообразные. Самые первые эндофиты могли не приносить пользу растению, но в дальнейшем отбор благоприятствовал микофитным ассоциациям, «выгодным» растениям. Палеозойские фоссилии растений содержат предположительно паразитические грибы, и первичной функцией эндофитов могла быть защита растения от более опасных грибов (Taylor, Osborn, 1996).

Первой ступенью эволюции микобионта от эндофита к микоризообразователю должна быть специализация к более эффективному поглощению веществ растения-хозяина, превратившаяся со временем в зависимость от растения как источника энергии. Первые наземные растения обитали на почвах, не более плодородных, чем современные, и доступность минеральных веществ была значительно ниже, чем в водных местообитаниях, где развивались растения. Грибы, освоившие сушу раньше, к тому времени уже успели выработать эффективные механизмы для поглощения

минеральных веществ. Возможно, что почвенные грибы накапливали минеральные вещества в количествах, больших, чем нужно для немедленного употребления. Например, *Geosiphon* – подобные грибы могли обильно запастись азотом, получаемый от симбиотических азотфиксаторов (Schüssler, Kluge, 2000 – цит. по Brundrett, 2002). Первые обменные процессы могли происходить в контактной зоне, где некоторые клетки эндофита стали более проницаемыми. Обратной стороной повышения проницаемости стала утечка некоторых веществ из грибной клетки, но так как касалась она в первую очередь тех веществ, которые были в избытке, отбора в направлении предотвращения утраты не происходило. Напротив, более вероятен очень жесткий отбор в направлении усовершенствования механизмов, улучшающих поглощение недостающих питательных элементов – функций мембраны и структуры клеточной стенки – т.е., развития зоны контакта между симбионтами (Smith, Read, 1997). Обычно в микоризных ассоциациях метаболическая активность клеток гриба и растения-хозяина в контактной зоне синхронизирована. Контактная зона быстро появляется, недолго функционирует, а затем исчезает. Непродолжительность срока существования зоны контакта могла возникнуть как защитный механизм для ограничения затрат на симбиоз в случае, если он не приносит пользы. Сбалансированные микоризы возникли на растительных органах, развивавшихся, в частности, как специализированные местообитания для грибов путем увеличения эффективности и/или ограничения расширения микоризной ассоциации.

Пережаривание или разрушение гиф, постоянно наблюдаемое в АМ и ОМ, могло возникнуть как защитная реакция на патогенные грибы. В сбалансированных микоризах этот процесс не играет важной роли в обмене веществами между симбионтами, но может быть более важен в эксплуативных микоризных ассоциациях. Возможно, ранние микоризы, до появления двустороннего обмена, предполагали пережаривание микобионта.

М. Брандретт предполагает такую последовательность событий, приведших к формированию сбалансированных микориз из эндофитных ассоциаций:

1. Адаптация гиф к эффективному поглощению веществ из растения привела к оттоку минеральных веществ к хозяину.
2. Растения с микобионтами более эффективно поглощали недостающие минеральные вещества посредством гиф, чем иными способами.

3. Растения выработали механизмы для различения микоризных грибов и патогенных.

4. Специализированные клетки гриба и растения развились в контактную зону, где происходил обмен.

5. Растения начали переваривать стареющие внутриклеточные грибные структуры.

6. Увеличилась способность грибных гиф к поглощению из почвы минеральных веществ, лимитирующих рост растения.

7. Растение становится облигатно микоризным и зависимым от гриба при росте в почвах обычной плодородности.

8. Гриб становится полностью зависимым от растения как источника питательных веществ.

9. Растения эволюционируют в направлении большей эффективности микоризообразования (Brundrett, 2002).

Третья предполагаемая стадия эволюции микоризы заключается в «тонкой настройке» морфологии и физиологии органов растения для усиления контроля над микобионтом. Это направление достигает кульминации у микогетеротрофов, полностью зависящих от гриба как источника и минеральных веществ и энергии и не приносящих, вероятно, микобионту никакой пользы. Таким образом в эволюционном континууме типов микориз в центре находятся сбалансированные типы, а полюса представлены эксплуативными и факультативными микоризами.

Взаимоотношения симбионтов в микоризах были и остаются предметом дискуссии. Они включают в себя весь возможный спектр взаимодействий от обоюдной выгоды до взаимного угнетения. Тем не менее, большинство растений образует микоризу, несмотря на то, что теоретические модели симбиоза предполагают конфликт интересов партнеров, каждый из которых совершенствует механизмы для предотвращения обмана со стороны другого (Herre et al., 1999). На вопросы экологии «Кто они?» и «Где они?» относительно большинства грибов-микоризообразователей ответы уже получены, теперь нужно найти ответ на вопрос «Что они делают, и как они делают это?»

Список литературы

Великанов Л.Л., Сидорова И.И. Регуляция высшими базидиомицетами структуры мико- и микробиоты почв и подстилки лесных экосистем. I. Влияние базидиомицетов на численность грибов и бактерий // Микол. и фитопатол. 1997. Т. 31. № 4. С. 20 – 26.

Великанов Л.Л., Сидорова И.И. Регуляция высшими базидиомицетами структуры мико- и микробиоты почв и подстилки лесных экосистем. II. Влияние базидиомицетов на видовое разнообразие почвенных микромицетов // Микол. и фитопатол. 1998. Т. 32. № 1. С. 33 – 36.

Горбунова Н.П. Анатомическое строение микориз растений // Труды конференции по микотрофии растений. М., АН СССР, 1955. С. 182 – 193.

Доминик Т. Классификация микориз // Микориза растений п/ ред Лобанова Н.В. М., Наука, 1963. С. 245-260.

Каменский Ф.М. О симбиотическом соединении мицелия грибов с корнями высших растений // Тр. СПб об-ва естествоиспытателей. 1886. Т. 17. № 34.

Каратыгин И.В. Коэволюция грибов и растений. СПб., Наука, 1993. С. 119.

Каратыгин И.В., Снегиревская Н.С. Палеонтологические свидетельства о происхождении основных таксономических групп грибов // Микол. и фитопатол. 2004. Т. 38. № 5. С. 15-32.

Катенин А.Е. Принципы классификации эктотрофных микориз // Ученые записки ПГПИ. 1968. Т. 64. С. 224 – 227.

Келли А. Микотрофия у растений. М., Наука, 1952. С. 238.

Кивиниеми С.Н. О взаимоотношениях микоризных грибов между собой и с грибами других экологических групп // Микоризные грибы и микоризы лесообразующих пород Севера. Петрозаводск, Наука, 1980. С. 45 – 64.

Коваленко А.Е. Эктотрофные микоризы: ценологический аспект // Микол. и фитопатол. 1994. Т. 28. № 3. С. 84 – 89.

Мантейфель А.А., Жукова А.И., Демьянова Е.К. Изучение микрофлоры ризосферы дуба // Микробиология. 1950. Т. 19. С. 547 – 556.

Селиванов И.А. Вопросы терминологии и классификации микориз и микоризоподобных образований // Учен. зап. Перм. гос. пед. ин-та. 1973. Т. 112. С. 3-44.

Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. М., Наука, 1981. С. 231.

Цавкелова Е.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Ассоциативные цианобактерии, выделенные с корней эпифитных ор-

- хидей // Микробиология. 2003а. Т. 72. С. 105-110.
- Цавкелова Е.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Особенности локализации ассоциативных цианобактерий на корнях эпифитных орхидей // Микробиология. 2003б. Т. 72. С. 99-104.
- Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Микробиота поверхности корней орхидных // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 567–573.
- Шубин В.И. Макромицеты-симбиотрофы лесных фитоценозов таежной зоны и их использование. Л., Наука, 1990. С. 197.
- Шубин В.. Экологические ниши и сукцессии макромицетов-симбиотрофов в лесных экосистемах таежной зоны. 1.Экологические ниши // Микол. и фитопатол. 1998. Т. 32. № 6. С. 32 – 37.
- Abuzinadah R.A., Read D.J. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi // New Phytol. 1986. Vol. 103. P. 481-493.
- Agerer R. Colour atlas of ectomycorrhizae. Schwäbisch Gmünd: Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger. 1987 – 1996.
- Agerer R. Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification // Varma A., Hoek B. (eds.) Mycorrhiza. Berlin, Springer Verlag. 1995. P. 685-734.
- Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi // Nature. 2005. Vol. 435. № 9. P. 824-827.
- Albrecht C., Burgess T., Dell B., Lapeyrie F. Chitinase and peroxidase activities are induced in *Eucalyptus* roots according to aggressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. // New Phytol. 1994. Vol. 127. P. 217-222.
- Allen E.B., Allen M.F., Helm D.J., Trappe J.M., Molina R., Rincon E. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity // Plant & Soil. 1995. Vol. 170. P. 47-62.
- Allen M.F., Allen E.B., Friese C.F. Responses of the non-mycotrophic plant *Salsola kali* to invasion by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi // New Phytol. 1989. Vol. 111. P. 45-49.
- Amaranthus M.A., Perry D.A. The functioning of ectomycorrhizal fungi in the field: linkages in space and time // Plant & Soil. 1994. Vol. 159. № 1. P. 133 – 140.
- Andrade G., Mihara K.L., Linderman R.G., Bethlenfalvay G.J. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi // Plant & Soil. 1997. Vol. 192. P. 71-79.
- Ashford A.E., Allaway W.G. A sheathing mycorrhiza on *Pisonia grandis* R.Br. (Nyctaginaceae) with development of transfer cells rather than a Hartig net // New Phytol. 1982. Vol. 90. P. 511-519.
- Assigbetse K., Gueye M., Thioulouse J., Duponnois R. Soil bacterial diversity responses to root colonization by an ectomycorrhizal fungus are not root-growth-dependent // Microb. Ecol. 2005. Vol. 50. P. 350-359.
- Augé R.M. Water relations, drought and vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis // Mycorrhiza. 2001. Vol. 11. P. 3-42.
- Azcón R., Ruiz-Lozano J.M., Rodríguez R. Differential contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to plant nitrate uptake (¹⁵N) under increasing N supply to the soil // Can. J. Bot. 2001. Vol. 79. P. 1175-1180.
- Baar J., Kuypers T.W. Litter removal in forest and effect on mycorrhizal fungi // Pegler D.N., Boddy L., Ing B., Kirk P.M. (eds.) Fungi of Europe: investigation, recording and conservation. Royal Botanic Gardens. Kew.1993. P. 275-286.
- Baar J., Stanton N.L. Ectomycorrhizal fungi challenged by saprotrophic basidiomycetes and soil microfungi under different ammonium regimes in vitro // Mycol. Res. 2000. Vol. 104. P. 691-697.
- Barbieri E., Riccioni G., Pisano A., Sisti D., Zeppa S., Agostini D., Stocchi V. Competitive PCR for quantification of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylum bacterium associated with the *Tuber borchii* Vittad. mycelium // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 6421-6424.
- Barker S.J., Tagu D., Delp G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses // Plant Physiol. 1998. Vol. 116. P. 1201-1207.
- Baxter J.W., Pickett S.T.A., Carreiro M.M., Dighton J. Ectomycorrhizal diversity and community structure in oak forest stands exposed to contrasting anthropogenic impacts // Can. J. Bot. 1999. Vol. 77. P. 771-782.
- Bècard G., Doude D.D., Pfeffer P. E. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols // Appl. Environ. Microbiol. 1992. Vol. 58. P. 821-825.
- Bècard G., Kosuta S., Tamasloukht M., Séjalon-Delmas N., Roux C. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction // Can. J. Bot. 2004. Vol. 82. P. 1186-1197.
- Bècard G., Piché Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis // Appl. Environ. Microbiol. 1989. Vol. 55. P. 2320-2325.
- Bècard G., Piché Y., Fortin J.A. Some aspects on the biotrophy of VAM fungi // Agric. Ecosyst. & Environ. 1989. Vol. 29. P. 29-33.
- Bècard G., Taylor L.P., Doude D.D., Pfeffer P. E., Doner L.W. Flavonoids are not necessary plant signals in arbuscular mycorrhizal symbiosis // Mol. Plant-Microbe Interact. 1995. Vol. 8. P. 252-258.

Beck-Nielsen D., Madsen T.V. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in aquatic macro-phytes from lakes and streams // *Aquatic Botany*. 2001. Vol. 71. P. 141-148.

Becker D.M., Bagley S.T., Podila G.K. Effects of mycorrhizal-associated streptomycetes on growth of *Laccaria bicolor*, *Cenococcum geophilum* and *Armillaria* species and on gene expression in *Laccaria bicolor* // *Mycologia*. 1999. Vol. 91. P. 33-40

Bending G.D., Poole E.J., Whipps J.M., Read D.J. Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002. Vol. 39. P. 219 – 227.

Berbee M.L., Taylor J.W. Dating the evolutionary radiations of true fungi // *Can. J. Bot.* 1993. Vol. 71. P. 1114-1127.

Bernard N. Recherches expérimentales sur les orchidées. La germination des orchidées // *Revue Générale de Botanique*. 1904. T. 16. P. 405-451, 458-475.

Bernard N. L'èvolution dans la symbiose des Orchidées et leur champignons commensaux // *Ann. Sci. Nat. Bot.* 1909. T. 9. Ser. 9. P. 1-196.

Bertaux J., Schmid M., Chemidlin Prevost-Boure N., Churin J.L., Hartmann A., Garbaye J., Frey-Klett P. In situ identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 4243-4248.

Beyrle H.F., Smith S.E., Peterson R.L., Franco C.M.M. Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and Glyphosate in modifying the responses // *Can. J. Bot.* 1995. Vol. 73. P. 1128-1140.

Bianciotto V., Bandi C., Minerdi D., Sironi H., Tichy V., Bonfante P. An obligately endosymbiotic fungus itself harbors obligately intracellular bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996a. Vol. 62. P. 3005-3010.

Bianciotto V., Bonfante P. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria // *Antonie Leeuwenhoek*. 2002. Vol. 81. P. 365-375.

Bianciotto V., Lumini E., Bonfante P., Vandamme P. «*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*», an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. Vol. 53. P. 121-126.

Bianciotto V., Minerdi D., Perotto S., Bonfante P. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria // *Protoplasma*. 1996b. Vol. 193. P. 123-137.

Bidartondo M.I. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy // *New Phytol.* 2005. Vol. 167. P. 335-352.

Bidartondo M.I., Bruns T.D. Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread

phylogenetic and geographic structure // *Mol. Ecol.* 2001. Vol. 10. P. 2285-2295.

Bidartondo M.I., Bruns T.D. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups // *Mol. Ecol.* 2002. Vol. 11. P. 557-569.

Bidartondo M.I., Bruns T.D., Weiss M., Sérgio C., Read D.J. Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort // *Proc. R. Soc. Lond.* 2003. Vol. 270. P. 835-842.

Bidartondo M.I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T.D., Read D.J. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees // *Proc. Roy. Soc.* 2004. Vol. 271. P. 1799–1806.

Bidartondo M.I., Ek H., Wallander H., Söderström B. Do nutrient additions alter carbon sink strength of ectomycorrhizal fungi? // *New Phytol.* 2001. Vol. 151. P. 543-550.

Bidartondo M.I., Kretzer A.M., Pine E. M., Bruns T.D. High root concentration and uneven ectomycorrhizal diversity near *Sarcodes sanguinea* (Ericaceae): A cheater who stimulates its victims? // *Amer. J. Bot.* 2000. Vol. 87. P. 1783-1788.

Bidartondo M.I., Redecker D., Hijri I., Wiemken A., Bruns T.D., Dominguez L., Sérsic A., Leake J.R., Read D.J. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi // *Nature*. 2002. Vol. 419. P. 389-392.

Blancaflor E.B., Zhao L.M., Harrison M.J. Microtubulae organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme* // *Protoplasma*. 2001. Vol. 217. P. 154-165.

Bomberg, M., Jurgens G., Saano A., Sen R., Timonen S. PCR nested detection of Archaea in defined compartments of pine mycorrhizospheres developed in boreal forest humus microcosms // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003. Vol. 43. P. 163-171.

Bonfante P. Plants, mycorrhizal fungi and endobacteria: a dialog among cells and genomes // *Biol. Bull.* 2003. Vol. 204. P. 215-220.

Bonfante P., Perotto S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants // *New Phytol.* 1995. Vol. 130. P. 3-21.

Booth M.G. Mycorrhizal networks mediate overstorey – understorey competition in a temperate forest // *Ecol. Letters*. 2004. Vol. 7. P. 538-546.

Bowen G.D. Mineral nutrition of ectomycorrhizae // Marks G.D., Kozlowski T.T. (eds.). *Ectomycorrhizae, their ecology and physiology*. London, New York. Academic Press. 1973. P. 151.

Bowen G.D. The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning // *Plant & Soil*. 1994. Vol. 159. P. 61-67.

- Bowen G.D., Theodorou C.* Interaction between bacteria and ectomycorrhizal fungi // *Soil Biol. Biochem.* 1979. Vol. 11. № 2. P. 119 – 126.
- Bronstein J.L.* Conditional outcomes in mutualistic interactions // *Trends Ecol. Evol.* 1994. Vol. 9. P. 214-217.
- Bronstein J.L.* The exploitations of mutualisms // *Ecol. Lett.* 2001. Vol. 4. P. 277-287.
- Brundrett M.C.* Mycorrhizas in natural ecosystems // *Advances in Ecological Research.* 1991. Vol. 21. P. 171-313.
- Brundrett M.C.* Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants // *New Phytol.* 2002. Vol. 154. P. 275-304.
- Brundrett M.C.* Diversity and classification of mycorrhizal associations // *Biol. Rev.* 2004. Vol. 79. P. 473-495.
- Brundrett M.C., Bougher N., Dell B., Grave T., Malajczuk N.* Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra. 1996. P. 374.
- Bruns T.D., Bidartondo M.I.* Molecular windows into the below-ground interactions of ectomycorrhizal fungi // *Mycologist.* 2002. Vol. 16. №2. P. 47-50.
- Bruns T.D., Bidartondo M.I., Taylor D.L.* Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do exceptions tell us? // *Integ. and Comp. Biol.* 2002. Vol. 42. P. 352-359.
- Bruns T.D., Shefferson R.P.* Evolutionary study of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions // *Can. J. Bot.* 2004. Vol. 82. P. 1122-1132.
- Bruns T.D., Szaro T.M., Gardes M., Cullings K.W., Pan J.J., Taylor D.L., Horton T.R., Kretzer A., Garbelotto M., Li Y.* A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis // *Mol. Ecol.* 1998. Vol. 7. P. 257-272.
- Bücking H.* Phosphate absorption and efflux of three ectomycorrhizal fungi as affected by external phosphate, cation and carbohydrate concentrations // *Mycol. Res.* 2004. Vol. 108(6). P. 599-609.
- Bücking H., Heyser W.* Uptake and transfer of nutrients in ectomycorrhizal associations: interactions between photosynthesis and phosphate nutrition // *Mycorrhiza.* 2003. Vol. 13. P. 59-69.
- Bücking H., Kuhn A.J., Schröder W.H., Heyser W.* The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium and potassium into the root cortex? // *J. Exp. Bot.* 2002. Vol. 53. P. 1659-1669.
- Burges A.* On the significance of mycorrhiza // *New Phytol.* 1936. Vol. 35. P. 117-131.
- Buscot F.* Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (Fr.) Boudier with *Picea abies* (L.) Karst. // *Mycorrhiza.* 1994. Vol. 4. P. 223 – 232.
- Buscot F., Munch J.C., Charcosset J.Y., Gardes M., Nehls U., Hampp R.* Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems // *FEMS Microbiol. Rev.* 2000. Vol. 24. P. 601-614.
- Cairney J.W.G., Ashford A.E.* Biology of mycorrhizal associations of epacrids (Ericaceae) // *New Phytol.* 2002. Vol. 154. P. 305-326.
- Cairney J.W.G., Meharg A.A.* Interactions between ectomycorrhizal fungi and soil saprotrophs: implications for decomposition and degradation of organic pollutants in the rhizosphere // *Can. J. Bot.* 2002. Vol. 80. P. 803-809.
- Cairney J.W.G., Meharg A.A.* Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions // *Eur. J. Soil Sci.* 2003. Vol. 54. P. 735-740.
- Camargo-Ricalde S.L.* Dispersal, distribution and establishment of arbuscular mycorrhizal fungi: a review // *Bol. Soc. Bot. Méx.* 2002. Vol. 71. P. 33-44.
- Chambers S.M., Sharples J.M., Cairney J.W.G.* Towards a molecular identification of the *Pisonia* mycobiont // *Mycorrhiza.* 1998. Vol. 7. P. 319-321.
- Chambers S.M., Williams P. G., Seppelt R.D., Cairney J.W.G.* Molecular identification of a *Hymenoscyphus* sp. from rhizoids of the leafy liverwort *Cephaloziella exiliflora* in Australia and Antarctica // *Mycol. Res.* 1999. Vol. 103. P. 286-288.
- Champigny M.L.* 1995. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants // *Photosynth. Res.* Vol. 46. P. 117-127.
- Chanway C.P., Holl F.B.* Biomass increase and associative nitrogen fixation of mycorrhizal *Pinus contorta* seedlings inoculated with a plant growth promoting *Bacillus* strain // *Can. J. Bot.* 1991. Vol. 69. P. 507-511.
- Chen Y.L., Dell B., Brundrett M.C.* Effects of ectomycorrhizas and vesicular-arbuscular mycorrhizas alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla* // *New Phytol.* 2000. Vol. 146. P. 545-556.
- Comandini O., Rinaldi A.C.* Together but not forever: ectomycorrhizal symbiosis is an unstable affair // *Mycol. Res.* 2001. Vol. 150. P. 130 – 131.
- Cromack J.K., Fichter B.L., Moldenke A.M., Entry J.A., Ingham E.R.* Interactions between soil animals and ectomycorrhizal fungal mats // *Agric. Ecosyst. & Environ.* 1988. Vol. 24. P. 161-168.
- Cullings K.W.* Single phylogenetic origin of ericoid mycorrhizae within Ericaceae // *Can. J. Bot.* 1996. Vol. 74. P. 1896-1909.
- Cullings K.W., Szaro T.M., Bruns T.D.* Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal epiparasites // *Nature.* 1996. Vol. 379. P. 63-66.
- Curl E.A., Truelove B.* The Rhizosphere. Berlin, Springer-Verlag. 1986. P. 228.

- Currah R.S., Zelmer C.D., Hambleton S., Richardson K.A. Fungi from orchid mycorrhizas // Arditti J., Pridgeon A.M. (eds.) *Orchid biology: reviews and perspectives*. Kluwer, Boston, 1997. Vol. VII. P. 117-170.
- Dahlberg A., Stenlid J. Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal populations // *Can. J. Bot.* 1995. Vol. 73. Suppl. 1. P. 1222 – 1230.
- Dahlberg A., Jonsson L., Nylund J-E. Species diversity and distribution of biomass above- and below-ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in South Sweden // *Can. J. Bot.* 1997. Vol. 75. 1323-1335.
- Dahm H., Strzelczyk E., Ciesielska A. The effect of ectomycorrhizal fungi and bacteria on pine seedlings // *Acta Mycologica*. 1988. Vol. 33. № 1. P. 25 – 36.
- Danell E., Alström S., Ternström A. *Pseudomonas fluorescens* in association with fruit bodies of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius* // *Mycol. Res.* 1993. Vol. 97. P. 1148-1152.
- Daniell T.J., Hodge A., Young J.P.W., Fitter A. How many fungi does it take to change a plant community? // *Trends Plant Sci.* 1999. Vol. 4. № 3. P. 81-82.
- De Boer W., Folman L.B., Summmerbell R.C., Boddy L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. Vol. 29. P. 795-811.
- Dehne H.W. Interaction between vesicular mycorrhizal fungi and plant pathogens // *Phytopathology*. 1982. Vol. 72. P. 1115-1119.
- Dell B., Malajczuk N., Grove T.S., Thompson G.T. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. IV. Ectomycorrhizas in the sporocarps of the hypogeous fungi *Mesophellia* and *Castorium* in eucalypt forests of Western Australia // *New Phytol.* 1990. Vol. 114. P. 449-456.
- Denison R.F., Bledsoe C., Kahn M., O'Gara F., Simms E.L., Thomashow L.S. Cooperation in the rhizosphere and the "free rider" problem // *Ecology*. 2003. Vol. 84. P. 838-845.
- Dijk E., Willems J.H., van Andel J. Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species // *Acta Bot. Neerlandica*. 1997. Vol. 46. P. 339-363.
- Dodd J.C., Burton C.C., Burns R.G., Jeffries P. Phosphatase activity associated with the roots and rhizosphere of plants infected with arbuscular mycorrhizal fungi // *New Phytol.* 1987. Vol. 107. P. 163-172.
- Douds D.D. A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA – transformed carrot roots // *Mycorrhiza*. Vol. 7. 1997. P. 57-61.
- Dowling D.N., O'Gara F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease // *Tibtech*. 1994. Vol. 12. P. 133-141.
- Duckett J.G., Read D.J. Ericoid mycorrhizas and rhizoid-ascomycete associations in liverwort share the same mycobiont: isolation of the partners and resynthesis of the associations *in vitro* // *New Phytol.* 1995. Vol. 129. P. 439-447.
- Duckett J.G., Renzaglia K.S., Pell K. A light and electron microscope study of rhizoid-ascomycete associations and flagelliform axes in British hepatics with observations on the effects of the fungi on host morphology // *New Phytol.* 1991. Vol. 118. P. 233-257.
- Duddridge J.A. Specificity and recognition in mycorrhizal associations // Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds.) *Mycorrhizae: physiology and genetics*, 1st ESM. Paris, INRA. 1986. P. 521-525.
- Duddridge J.A., Malibari A., Read D.J. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport // *Nature*. 1980. Vol. 287. P. 834-836.
- Duddridge J.A., Read D.J. An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Monotropa hypopitys* L. // *New Phytol.* 1982. Vol. 92. P. 203-214.
- Duponnois R., Plenchette C. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species // *Mycorrhiza*. 2003. Vol. 13. P. 85-91.
- Egger K.N., Hibbett D.S. The evolutionary implications of exploitation in mycorrhizas // *Can. J. Bot.* 2004. Vol. 82. P. 1110 – 1121.
- Entry J.A., Rose C.L., Cromack K. Litter decomposition and nutrient release in ectomycorrhizal mat soils of a Douglas-fir ecosystem // *Soil Biol. Biochem.* 1991. Vol. 23. P. 285-290.
- Filion M., StArnaud M., Fortin J.A. Direct interaction between arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms // *New Phytol.* 1999. Vol. 141. P. 525-533.
- Filipi C., Bagnoli G., Giovannetti M. Bacteria associated to arbutoid mycorrhiza in *Arbutus unedo* L. // *Symbiosis*. 1995. Vol. 18. P. 57-68.
- Finlay R.D. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles // *Mycologist*. 2004. Vol. 18. № 2. P. 91-96.
- Finlay R.D. Mycorrhizal symbiosis: myths, misconceptions, new perspectives and future research priorities // *Mycologist*. 2005. Vol. 19. № 3. P. 90-95.
- Fitter A.H., Garbaye J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms // *Plant & Soil*. 1994. Vol. 159. № 1. P. 123 – 132.
- Fitter A.H., Gilligan C.A., Hollingworth K., Kleczkowski A., Twyman R.M., Pitchford J.W. Biodiversity and ecosystem function in soil // *Functional Ecology*. 2005. Vol. 19. P. 369-377.
- Fogel R., Hunt G. Fungal and arboreal biomass in a Western Oregon Douglas-fir ecosystem: distribution patterns and turnover // *Can. J. Forest Res.* 1979. Vol. 9. P. 245 – 256.

- Fogel R., Hunt G. Contribution of mycorrhizae and soil fungi to nutrient cycling in a Douglas-fir ecosystem // *Can. J. For. Res.* 1983. Vol. 13. P. 219 – 232.
- Foster R.C., Marks G.C. Observations on the mycorrhizas of forest trees. II. The rhizosphere of *Pinus radiata* D. Don. // *Austral. J. Biol. Sci.* 1967. Vol. 20. P. 915-926.
- Founoune H., Duponnois R., Bâ A.M., Sall S., Branget I., Lorquin J., Neyra M., Chotte J.L. Mycorrhiza helper bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus albus* // *New Phytol.* 2002. Vol. 153. P. 81-89.
- Frank A.B. Neue Mittheilungen über die Mykorrhiza der Bäume u. der *Monotropa hypopitys* // *Ber. d. d. bot.* 1885. Ges. 3. XXVII.
- Frank A.B. Über neue Mykorrhizaformen // *Ber. d. d. bot.* 1887. Ges. 5. S. 395-409.
- Frankland J.C. Fungal succession – unravelling the unpredictable // *Mycol. Res.* 1998. Vol. 102. P. 1 – 15.
- Frey P., Frey-Klett P., Garbaye J., Berge O., Heulin T. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with Douglas fir – *Laccaria bicolor* mycorrhizosphere // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63. P. 1852-1860.
- Frey-Klett P., Chavatte M., Clausse M.-L., Courrier S., Le Roux C., Raaijmakers J., Martinotti M.-G., Pierrot J.-C., Garbaye J. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads // *New Phytol.* 2005. Vol. 165. P. 317–328.
- Frey-Klett P., Garbaye J. Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions // *New Phytol.* 2005. Vol. 168. P. 4-8.
- Fries N., Serck-Hanssen K., Häll Dimberg L., Theander O. Abietic acid an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae) // *Exp. Mycol.* 1987. Vol. 11. P. 360-363.
- Gadgil R.L., Gadgil P. D. Mycorrhiza and litter decomposition // *Nature.* 1971. Vol. 233. P. 133.
- Gadgil R.L., Gadgil P. D. Suppression of litter decomposition by mycorrhizal roots of *Pinus radiata* // *N.Z. J. For. Sci.* 1975. Vol. 5. P. 33-41.
- Gadkar V., David-Schwartz R., Kunik T., Kapulnik Y. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition // *Plant Physiol.* 2001. Vol. 127. P. 1493-1499.
- Gallaud I. Études sur les mycorrhizes endotrophes // *Rev. Gén. Bot.* 1905. Vol. 17. P. 7-48, 66-85, 123-136, 223-239, 313-325, 423-433, 479-496.
- Gange A.C. On the relation between arbuscular mycorrhizal colonization and plant “benefit” // *Oikos.* 1999. Vol. 87. P. 615-621.
- Gange A.C., Brown V.K., Farmer L.M. A test of mycorrhizal benefit in early successional plant community // *New Phytol.* 1990. Vol. 15. P. 85-91.
- Garbaye J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis // *New Phytol.* 1994. Vol. 128. P. 197-210.
- Garbaye J., Bowen G.D. Stimulation of mycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas // *New Phytol.* 1989. Vol. 112. P. 383-388.
- Gardes M. An orchid-fungus marriage – physical promiscuity, conflict and cheating // *New Phytol.* 2002. Vol. 154. P. 4-6.
- Gardes M., Bruns T.D. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views // *Can. J. Bot.* 1996. Vol. 74. P. 1572 – 1583.
- Gargas A., Depriest P. T., Grube M., Tehler A. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny // *Science.* 1995. Vol. 268. P. 1492-1495.
- Gäumann E. New data on the chemical defence reactions of orchids // *Acad. Sci. (Paris).* 1960. Vol. 250. P. 1944-1947.
- Gay G., Reddy M.S., Pandey A.K., Melayah D., Raffier C., Charvet-Candela V., Hitchin S., Debaud J.C., Marmeisse R. Role of fungal auxin in the ectomycorrhizal symbiosis // *Biology of plant-microbe interactions.* 2004. Vol. 4. P. 398-401.
- Genre A., Bianciotto V., Jargeat P., Lumini E., Uetake Y., Becard G., Bonfante P. Arbuscular mycorrhizal fungi harbor endocellular bacteria // *Biology of plant-microbe interactions.* 2004. Vol. 4. P. 445-446.
- Gerič B., Rupnik M., Kraigher H. Isolation and identification of mycorrhization helper bacteria in Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. // *Phyton.* 2000. Vol. 40. № 4. P. 65 – 70.
- Gianinazzi-Pearson V., Arnould C., Oufattole M., Arango M., Gianinazzi S. Differential activation of H⁺ – ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco // *Planta.* 2000. Vol. 211. P. 609-613.
- Gianinazzi-Pearson V., Brechenmacher L., Weidmann S., Sanchez L. Molecular dialogue in arbuscular mycorrhiza: exploring the symbiotic cell programme // *Biology of plant-microbe interactions.* 2004. Vol. 4. P. 453-459.
- Giovanetti M., Sbrana C. Meeting a non-host: behaviour of AM fungi // *Mycorrhiza.* 1998. Vol. 8. P. 123-130.
- Giovanetti M., Sbrana C., Avio L., Citernes A.S., Logi C. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages // *New Phytol.* 1993. Vol. 125. P. 587-593.
- Goodman D.M., Trofymow J.A. Comparison of communities of ectomycorrhizal fungi in old-growth and mature stands of Douglas-fir at two sites on south-

ern Vancouver Island // Can. J. For. Res. 1998. Vol. 28. P. 574 – 581.

Govindarajulu M., Pfeiffer P. E., Jin H., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bücking H., Lammers P. J., Shachar-Hill Y. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis // Nature. 2005. Vol. 435. P. 819-823.

Graham J.H. Interactions of mycorrhizal fungi with soilborne plant pathogens and other organisms // Phytopathology. 1988. Vol. 78. P. 365-366.

Guidot A., Debaut J.-C., Effosse A., Marmeisse R. Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus // New Phytol. 2003. Vol. 161. P. 539 – 547.

Hadley G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza // New Phytol. Vol. 69. P. 1015-1023.

Hadley G. Orchid mycorrhiza // In Arditti J. (ed.) Orchid biology: reviews and perspectives II. Cornell University Press. Ithaca, NY. 1982. P. 83-118.

Hahn M., Mendgen K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces // Curr. Opin. Plant Biol. 2001. Vol. 4. P. 322-327.

Harley J.L. Mycorrhiza and soil ecology // Biol. Rev. 1948. Vol. 23. P. 127-158.

Harley J.L. The fourth benefactors' lecture. The significance of mycorrhiza // Myc. Res. 1989. Vol. 92. P. 129-139.

Harley J.L., Smith S.E. Mycorrhizal symbiosis. N.Y., Academic Press, 1983. P. 484.

Harrington T.J., Mitchell D.T. Colonization of root systems of *Carex flacca* and *C. pilulifera* by *Cortinarius (Dermocybe) cinnamomeus* // Mycol. Res. 2002. Vol. 106. P. 452-459.

Harrison M.J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. Vol. 50. P. 361-389.

Harrison M.J., Dewbre G.R., Liu J.Y. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi // Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 2413-2429.

Haystead A., Malajczuk N., Grove T.S. Under-ground transfer of nitrogen between pasture plants infected with vesicular arbuscular mycorrhizal fungi // New Phytol. 1988. Vol. 108. P. 417-423.

Heinonsalo J., Jørgensen K.S., Haahtela K., Sen R. Effects of *Pinus sylvestris* root growth and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils // Can. J. Microbiol. 2000. Vol. 46. P. 451-464.

Heinonsalo J., Jørgensen K.S., Sen R. Microcosm-based analyses of Scots pine seedling growth, ectomycorrhizal fungal community structure and bacterial

carbon utilization profiles in boreal forest humus and underlying illuvial mineral horizons // FEMS Microbiol. Ecol. 2001. Vol. 36. P. 73 – 84.

Herre E.S., Knowlton N., Mueller U.G., Rechner S.A. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation // Trends Ecol. Evol. 1999. Vol. 14. P. 49-53.

Hibbett D.S., Gilbert L.-B., Donoghue M.J. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes // Nature. 2000. Vol. 407. P. 506-508.

Hiltner L. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache // Arb. Dtsch. Lanwirt 1904. Ges. 98. S. 59-78.

Hobbie E.A., Weber N.S., Trappe J.M. Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence // New Phytol. 2001. Vol. 150. P. 601 – 610.

Hodge A. Plant nitrogen capture from organic matter as affected by spatial dispersion, interspecific competition and mycorrhizal colonization // New Phytol. 2003. Vol. 157. P. 303-314.

Högberg M.N., Högberg P. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil // New Phytol. 2002. Vol. 154. P. 791-795.

Horton T.R. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale // Plant & Soil. 2002. Vol. 244. P. 29 – 39.

Horton, T.R., Bruns T.D. Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*) // New Phytol. 1998. Vol. 139. P. 331 – 339.

Horton, T.R., Bruns T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box // Mol. Ecol. 2001. Vol. 10. P. 1855-1871.

Horton, T.R., Bruns T.D., Parker V.T. Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment // Can. J. Bot. 1999. Vol. 77. P. 93-102.

Horton, T.R., Molina R., Hood K. Douglas-fir ectomycorrhizae in 40- and 400-year-old stands: mycobiont availability to late successional western hemlock // Mycorrhiza. 2005. Vol. 15. P. 393-403.

Hutchison L.J. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America // Mycotaxon. 1991. Vol. XLII. P. 387 – 504.

Hutton B.J., Dixon K.W., Sivasithamparam K. Erioid endophytes of Western Australian heaths (Epacridaceae) // New Phytol. 1994. Vol. 127. P. 557-566.

Imhof S. Root morphology, anatomy and mycotrophy of achlorophyllous *Voyria aphylla* (Jacq.) Pers. (Gentianaceae) // Mycorrhiza. 1999. Vol. 9. P. 33-39.

- Ingham E.R., Massicotte H.B. Protozoan communities around conifer roots colonized by ectomycorrhizal fungi // Mycorrhiza. 1994. Vol. 5. P. 53 – 61.
- Jabaji-Hare S.H., Stobbs L.W. Electron microscopic examination of tomato roots coinfecting with *Glomus* sp. and tobacco mosaic virus // Phytopathology. 1984. Vol. 74. №3. P. 277-279.
- Johansson J.F., Paul L.R., Finlay R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. Vol. 48. P. 1-13.
- Johnson D., Leake J.R., Ostle N., Ineson P., Read D.J. *In situ* (CO₂)-C-13 pulse-labelling of upland grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil // New Phytol. 2002. Vol. 153. P. 327-334.
- Johnson N.C., Graham J.H., Smith F.A. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum // New Phytol. 1997. Vol. 135. P. 575-585.
- Jones M.D., Durall D.M., Tinker P.B. Phosphorus relationships and production of extramatrical hyphae by two types of willow ectomycorrhizas at different soil phosphorus levels // New Phytol. 1990. Vol. 115. P. 259-267.
- Jones M.D., Smith S.E. Exploring functional definitions of mycorrhizas: are mycorrhizas always mutualisms? // Can. J. Bot. 2004. Vol. 82. P. 1089-1109.
- Juniper S., Abbott L. Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity // Mycorrhiza. 1993. Vol. 4. P. 45-57.
- Kahmann R., Basse C., Feldbrügge M. Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem // Current Opinion in Microbiology. 1999. Vol. 2. P. 647-650.
- Kamiński F. Die Vegetationsorgane der *Mono-tropa hypopitys* L. // Bot. Zeit. 1881. Ges. 29. S. 457-461.
- Katznelson H., Rouatt J.W., Peterson E.A. The rhizosphere effect of mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of yellow birch seedlings // Can. J. Bot. 1962. Vol. 40. P. 257 – 276.
- Kendrick B. The Fifth Kingdom. Focus Information Group, Newburyport, MA., 2001. P. 373.
- Kennedy P. G., Izzo A.D., Bruns T.D. There is high potential for the formation of common mycorrhizal networks between understorey and canopy trees in a mixed evergreen forest // J. Bot. 2003. Vol. 91. P. 1071–1080.
- Khetmalas M.B., Egger K.N., Massicotte H.B., Tackaberry L.E., Clapperton M.J. Bacterial diversity associated with subalpine fir (*Abies lasiocarpa*) ectomycorrhizae following wildfire and salvage-logging in central British Columbia // Can. J. Microbiol. 2002. Vol. 48. P. 611 – 625.
- Klironomos J.N., Moutoglis P. Colonization of non-mycorrhizal plants by mycorrhizal neighbours as influenced by the collembolan *Folsomia candida* // Biol. Fertil. Soils. 1999. Vol. 29. P. 277-281.
- Koide R.T., Mosse B. A history of research on arbuscular mycorrhiza // Mycorrhiza. 2004. Vol. 14. P. 145-163.
- Koide R.T., Schreiner R.P. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis // Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 1992. Vol. 43. P. 557-581.
- Koide R.T., Shumway D.L., Stevens C.M. Soluble carbohydrates of red pine (*Pinus resinosa*) mycorrhizas and mycorrhizal fungi // Mycol. Res. 2000. Vol. 104. P. 834-840.
- Koide R.T., Xu B., Sharda J. Contrasting below-ground views of an ectomycorrhizal fungal community // New Phytol. 2005. Vol. 166. P. 251-262.
- Koske R.E., Gemma J.N., Englander L. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in Hawaiian Ericales // Am. J. Bot. 1990. Vol. 77. P. 64-68.
- Kost G. Macrofungi on soil in coniferous forests // Fungi in vegetation science. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1992. P. 79 – 112.
- Kosuta S., Chabaud M., Loughon G., Gough C., Denarie J., Barker D.G., Becard G. Diffusible factors from arbuscular mycorrhizal fungi elicit early nodulin gene expression in *Medicago truncatula* // Biology of plant-microbe interactions. 2004. Vol. 4. P. 347-350.
- Kothamasi D., Kuhad R.C., Babu C.R. Arbuscular mycorrhizae in plant survival strategies // Tropical Ecology. 2001. Vol. 42. № 1. P. 1-13.
- Kristiansen K.A., Taylor D.L., Kjoller R., Rasmussen H.N., Rosendahl S. Identification of mycorrhizal fungi from *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) based on PCR, SSCP and sequencing of mitochondrial ribosomal LsDNA from single pelotons // Mol. Ecol. 2001. Vol. 10. P. 2089-2093.
- Kytöviita M.M., Vestberg M., Tuom J. A test of mutual aid in common mycorrhizal networks: established vegetation negates benefit in seedlings // Ecology. 2003. Vol. 84. P. 898-906.
- Laheurte F., Leyval C., Berthelin J. Root exudates of maize, pine and beech seedlings influenced by mycorrhizal and bacterial inoculation // Symbiosis. 1990. Vol. 9. P. 111-116.
- Lan J., Xu J.T., Li J.S. Study on symbiotic relation between *Gastrodia elata* and *Armillariella mellea* by autoradiography // Acta Mycol. Sin. 1994. Vol. 13. P. 219-222.
- Landerweert R., Hoffland E., Finlay R.D., Kuypers T.W., van Breemen N. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals // Trends Ecol. Evol. 2001. Vol. 16. P. 248-254.
- Landeweert R., Leeftang P., Kuypers T.W., Hoffland E., Rosling A., Wernars K., Smith E. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69. P. 327 – 333.

- Landwehr M., Hildebrandt U., Wilde P., Nawrath K., Tóth T., Biró B., Bothe H.* The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils // *Mycorrhiza*. 2002. Vol. 12. P. 199-211.
- Le Quéré A., Schützendübel A., Rajashekar B., Canbäck B., Hedh J., Erland S., Johansson T., Tunlid. A.* Divergence in gene expression related to variation in host specificity of an ectomycorrhizal fungus // *Mol. Ecol.* 2004. Vol. 13. P. 3809–3819.
- Leake J.R., Miles W.* Phosphodiesterases as mycorrhizal P sources. I. Phosphodiesterase production and the utilization of DNA as a phosphorus source by the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae* // *New Phytol.* 1996. Vol. 132. P. 435-443.
- Leake J.R.* The biology of myco-heterotrophic ("saprophytic") plants // *New Phytol.* 1994. Vol. 127. P. 171-216.
- Leake J., Johnson D., Donnelly D., Muckle G., Boddy L., Read D.* Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning // *Can. J. Bot.* 2004a. Vol. 82. P. 1016 – 1045.
- Leake J.R., McKendrick S.L., Bidartondo M., Read D.J.* Symbiotic germination and development of the myco-heterotroph *Monotropia hypopitys* in nature and its requirement for locally distributed *Tricholoma* spp. // *New Phytol.* 2004b. Vol. 163. P. 405-423.
- Leake J.R., Read D.J.* The effect of phenolic compounds on nitrogen mobilization by ericoid mycorrhizal systems // *Agric. Ecosyst. & Environ.* 1989. Vol. 29. P. 225-236.
- Leake J.R., Read D.J.* Chitin as nitrogen source for mycorrhizal fungi // *Mycol. Res.* 1990. Vol. 94. P. 993-994.
- Levy A., Chang B.J., Abbott L.K., Kuo J., Harnett G., Inglis T.J.* Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 6250-6256.
- Leyval C., Turnau K., Hasekwardter K.* Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects // *Mycorrhiza*. 1997. № 7. P. 139-153.
- Li C.Y., Hung L.L.* Nitrogen-fixing (acetylene-reducing) bacteria associated with ectomycorrhizae of Douglas-fir // *Plant & Soil*. 1987. Vol. 98. P. 425-428.
- Li C.Y., Massicotte H.B., More L.V.H.* Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae // *Plant & Soil*. 1992. Vol. 140. P. 35-40.
- Lindahl B.* Ectomycorrhizal fungi raid saprotrophic ones // *Mycol. Res.* 2000. Vol. 104. P. 386-387.
- Lindahl B., Stenlid J., Olsson S., Finlay R.* Translocation of P-32 between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems // *New Phytol.* 1999. Vol. 144. P. 183-193.
- Linderman R.G.* Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora : the mycorrhizosphere effect. // *Phytopathology*. 1988. Vol. 78. P. 366 – 371.
- LoBuglio K.F., Berbee M.L., Taylor J.W.* Phylogenetic origins of the asexual mycorrhizal symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and other mycorrhizal fungi among Ascomycetes // *Mol. Phylog. Evol.* 1996. Vol. 6. P. 287-294.
- Lutzoni F., Pagel M., Reeb V.* Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors // *Nature*. 2001. Vol. 411. P. 937-940.
- Malloch D.* The evolution of mycorrhizae // *Can. J. Plant Pathol.* 1987. Vol. 9. P. 398-402.
- Martin F., Duplessis S., Ditengou F., Lagrange H., Voiblet C., Lapeyrie F.* Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes // *New Phytol.* 2001. Vol. 151. P. 145 – 154.
- Marschner H., Dell B.* Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis // *Plant & Soil*. 1994. Vol. 159. P. 89 – 102.
- Martin F., Duplessis S., Ditengou F., Lagrange H., Voiblet C., Lapeyrie F.* Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes // *New Phytol.* 2001. Vol. 151. P. 145 – 154.
- Martin F., Laurent P., de Carvalho D., Voiblet C., Balestrini R., Bonfante P., Tagu D.* Cell wall proteins of the ectomycorrhizal Basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function and expression in symbiosis // *Fungal Genet. Biol.* 1999. Vol. 27. P. 161-174.
- Marx D.H.* The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria // *Phytopathology*. 1969. Vol. 59. P. 153 – 163.
- Massicotte H.B., Melville L.H., Peterson R.L., Luo-ma D.L.* Anatomical aspects of field ectomycorrhizas on *Polygonum viviparum* (Polygonaceae) and *Kobresia bellardii* (Cyperaceae) // *Mycorrhiza*. 1998. Vol. 7. P. 287-292.
- Masuhara G., Katsuya K.* Mycorrhizal differences between genuine roots and tuberous roots of adult plants of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* (Orchidaceae) *in vitro* // *Bot. Magazine Tokyo*. 1992. Vol. 105. P. 453-460.
- Masuhara G., Katsuya K.* *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae) // *New Phytol.* 1994. Vol. 127. P. 711-718.
- Mayo K., Davis R.E., Motta J.* Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria // *Mycologia*. 1986. Vol. 78. P. 26-431.

- McCormick M.K., Whigham D.F., O'Neill J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids // *New Phytol.* 2004. Vol. 163. P. 425-438.
- McKendrick S.L., Leake J.R., Read D.J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections // *New Phytol.* 2000a. Vol. 145. P. 539-548.
- McKendrick S.L., Leake J.R., Taylor D.L., Read D.J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* Chatel and characterisation of its mycorrhizal fungi // *New Phytol.* 2000b. Vol. 145. P. 523-537.
- McKendrick S.L., Leake J.R., Taylor D.L., Read D.J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Neottia nidus-avis* (L.) Rich and characterisation of its mycorrhizal fungi // *New Phytol.* 2002. Vol. 154. P. 233-247.
- Melin E. Physiology of mycorrhizal relations in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1953. Vol. 4. P. 325 – 346.
- Miller O.K. Ectomycorrhizae in the Agaricales and Gasteromycetes // *Can. J. Bot.* 1983. Vol. 61. P. 909 – 916.
- Mogge B., Loferer C., Agerer R., Hutzler P., Hartmann A. Bacterial community structure and colonization patterns of *Fagus sylvatica* L. ectomycorrhizospheres as determined by fluorescence *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy // *Mycorrhiza.* 2000. Vol. 9. P. 271-278.
- Molina R., Massicotte H., Trappe J.M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications // Allen M.F. (Ed.) *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*, N.Y., Chapman and Hall, 1992. P. 357-423.
- Moncalvo J.-M., Lutzoni F.M., Rehner S.A., Johnson J., Vilgalys R. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences // *System. Biol.* 2000. Vol. 49. P. 278-305.
- Monreal M., Berch S.M., Berbee M. Molecular diversity of ericoid mycorrhizal fungi // *Can. J. Bot.* 1999. Vol. 77. P. 1580-1594.
- Morandi D. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions and their potential role in biological control // *Plant & Soil.* 1996. Vol. 85. P. 241-251.
- Morton J.B., Redecker D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters // *Mycologia.* 2001. Vol. 93. P. 181-195.
- Mosse B. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza // *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1959. Vol. 42. P. 273-286.
- Muthukumar T., Udaiyan K., Shanmughavel P. Mycorrhiza in sedges – an overview // *Mycorrhiza.* 2004. Vol. 14. P. 65-77.
- Neal J.L., Bollen W.B., Zak B. Rhizosphere microflora associated with mycorrhizae of Douglas-fir // *Can. J. Microbiol.* 1964. Vol. 10. № 2. P. 259 – 266.
- Nehls U., Mikolajewski S., Hampp R. Sugar and nitrogen-dependent regulation of an *Amanita muscaria* phenylalanine ammonium lyase gene // *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181. P. 1931-1933.
- Nehls U., Mikolajewski S., Magel E., Hampp R. Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control // *New Phytol.* 2001. Vol. 150. P. 533-541.
- Neuhauser C., Fargione J.E. A mutualism-parasitism continuum model and its application to plant-mycorrhizae interactions // *Ecol. Model.* 2004. Vol. 177. P. 337 – 352.
- Newman E.I. Mycorrhizal links between plants: their functioning and ecological significance // *Advances in Ecological Research.* 1988. Vol. 18. P. 243-270.
- Newman E.I., Reddell P. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants // *New Phytol.* 1987. Vol. 106. P. 745-751
- Newsham K.K., Fitter A.H., Watkinson A.R. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field // *J. Ecol.* 1995. Vol. 83. P. 991-1000.
- Nielsen K.B., Kjoller R., Olsson P. A., Schweiger P.F., Andersen F. Ø., Rosendahl S. Colonization and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* and *Lobelia dortmanna* in Southern Sweden // *Mycol. Res.* 2004. Vol. 108. P. 616-625.
- Nilsen E.T., Walker J.F., Miller O.K., Semones S.W., Lei T.T., Clinton B.D. Inhibition of seedling survival under *Rhododendron maximum* (Ericaceae): could allelopathy be a cause? // *Am. J. Bot.* 1999. Vol. 86. P. 1597-1605.
- Nurmiaho-Lassila E.-L., Timonen S., Haahtela K., Sen R. Bacterial colonisation patterns of intact Scots pine mycorrhizospheres in dry pine forest soil // *Can. J. Microbiol.* 1997. Vol. 43. P. 1017-1035.
- Ohara H., Hamada M. Disappearance of bacteria from the zone of active mycorrhizas in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Singer // *Nature.* 1967. Vol. 213. P. 528 – 529.
- Ozinga W.A., Van Andel J., McDonnell-Alexander M.P. Nutritional soil heterogeneity and mycorrhiza as determinants of plant species diversity // *Acta Bot. Neerl.* 1997. Vol. 46. P. 237-254.

- Peterson R.L., Bonfante P., Faccio A., Uetake Y. The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells // *Can. J. Bot.* 1996. Vol. 74. P. 1861-1870.
- Peterson R.L., Massicotte H.B. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces // *Can. J. Bot.* 2004. Vol. 82. P. 1074-1088.
- Peyronel B., Fassi B., Fontana A., Trappe J.M. Terminology of mycorrhizae // *Mycologia.* 1969. Vol. 61. P. 410-411.
- Pinochet J., Calvet C., Camprub R.A., Fernandez C. Interactions between migrating endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops – a review // *Plant & Soil.* 1996. Vol. 185. P. 183-190.
- Poole E.J., Bending G.D., Whipps J.M., Read D.J. Bacteria associated with *Pinus sylvestris* – *Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro* // *New Phytol.* 2001. Vol. 151. P. 743 – 751.
- Pozo M.J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J.M., Azcón-Aguilar C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants // *J. Exp. Bot.* 2002. Vol. 53. P. 525-534.
- Rabin L.B., Pacovsky R.S. Reduced larval growth of two Lepidoptera (Nocturidae) on excised leaves of soybean infected with a mycorrhizal fungus // *Journal of Economic Entomology.* 1995. Vol. 78. P. 1358-1363.
- Rainey P. B., Cole A.L.J., Fermor T.R., Wood D.A. A method system for examining involvement of bacteria in basidiome initiation of *Agaricus bisporus* // *Mycol. Res.* 1990. Vol. 94. P. 191-195.
- Rambelli A. The rhizosphere of mycorrhizae // Marks G.L., Koslowski T.T. (eds) *Ectomycorrhizae*, N.Y., Academic Press, 1973. P. 299-343.
- Rangel-Castro J.I., Levenfors J.J., Danell E. Physiological and genetic characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with *Cantharellus cibarius* // *Can. J. Microbiol.* 2002. Vol. 48. P. 739 – 748.
- Rasmussen H.N. *Terrestrial orchids. From seed to mycotrophic plant.* Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- Rasmussen H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza // *Plant & Soil.* 2002. Vol. 244. P. 149-163.
- Rasmussen H.N., Whigham D.F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application to terrestrial orchids // *Am. J. Bot.* 1993. Vol. 80. P. 1374-1378.
- Rausch C., Bucher M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants // *Planta.* 2002. Vol. 216. P. 23-37.
- Raven J.A., Edwards D. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance // *J. Exp. Bot.* 2001. Vol. 52. P. 381-401.
- Rawlings G.B. Some practical aspects of forest mycotrophy // *New Zealand Society of Soil Science Proceedings.* 1958. Vol. 3. P. 41-44.
- Rayner M.C. Note on the ecology of mycorrhiza // *J. Ecol.* 1928. Vol. 16. P. 418-419.
- Read D.J. The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots // In: Jennings D.H., Rayner A.D.M. (ed.). *The ecology and physiology of the fungal mycelium.* Cambridge, Cambridge University Press, 1984. P. 215 – 240.
- Read D.J., Duckett J.G., Francis R., Ligrone R., Russell A. Symbiotic fungal associations in “lower” land plants // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2000. Vol. 355. P. 815-831.
- Read D.J., Leake J.R., Perez-Moreno J. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes // *Can. J. Bot.* 2004. Vol. 82. P. 1243-1263.
- Read D.J., Perez-Moreno J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? // *New Phytol.* 2003. Vol. 157. P. 475-492.
- Redecker D., Kodner R., Graham L.E. Glomalean fungi from the Ordovician // *Science.* 2000a. Vol. 289. P. 1920-1921.
- Redecker D., Morton J.B., Bruns T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) // *Mol. Phylog. Evol.* 2000b. Vol. 14. P. 276-284.
- Redecker D. New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record // *Research in Microbiology.* 2002. Vol. 153. P. 125-130.
- Redecker D., Kodner R., Graham L.E. *Palaeoglomus grayi* from the Ordovician // *Mycotaxon.* 2002. Vol. 84. P. 33-37.
- Rillig M.C. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes // *Ecol. Letters.* 2004. Vol. 7. P. 740-754.
- Rillig M.C., Steinberg P. D. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? // *Soil Biol. Biochem.* 2002. Vol. 34. P. 1371–1374.
- Rillig M.C., Ramsey P. W., Morris S., Paul E.A. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change // *Plant & Soil.* 2003. Vol. 253. P. 293–299.
- Ritz K., Newman E.I. Evidence for rapid cycling of phosphorus from dying roots to living plants // *Oikos.* 1985. Vol. 45. P. 174-180.
- Roberts K.J., Anderson R.C. Effect of Garlic Mustard [*Alliaria petiolata* (Beib. Cavara et Grande)] extracts on plants and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi // *American Midland Naturalist.* 2001. Vol. 146. P. 146-152.
- Robinson D., Fitter A.H. The magnitude and con-

- trol of carbon transfer between plants linked by a common mycorrhizal network // J. Exp. Bot. 1999. Vol. 50. P. 9-13.
- Rosling A., Landerweert R., Lindahl B.D., Larsson K.-H., Kuyper T.W., Taylor A.F.S., Finlay R.D. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol profile determined by morphotyping and genetic verification // New Phytol. 2003. Vol. 159. P. 775-783.
- Rózycki H., Dahm H., Strzelczyk E., Li C.Y. Diazotrophic bacteria in root-free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.) // Appl. Soil Ecol. 1999. Vol. 12. P. 239-250.
- Rózycki H., Kampert M., Strzelczyk E., Li C.Y., Perry D.A. Effect of different soil bacteria on mycorrhizae formation in scot's pine (*Pinus sylvestris* L.) – *in vitro* studies // Fol. Forest Polon. 1994. Vol. 36. P. 91-102.
- Ruess R.W., Hendrick R.L., Burton A.J., Pregitzer K.S., Sveinbjornsson B., Allen M.F., Maurer G.E. Coupling fine root dynamics with ecosystem carbon cycling in black spruce forests of interior Alaska // Ecol. Monographs. 2003. Vol. 73. № 4. P. 643-662.
- Ruinen J. Epiphytosis as second view of epiphytism // Annales Bogorienses. 1953. Vol. 1. P. 53-158.
- Sagara N. Association of ectomycorrhizal fungi with decomposed animal wastes in forest habitats: a cleaning symbiosis? // Can. J. Bot. 1995. Vol. 73 (Suppl. 1). P. S1423 – S1433.
- Sakakibara S.M., Jones M.D., Gillespie M., Hagerman S.M., Forrest M.E., Simard S.W., Durall D.M. A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis // Mycol. Res. 2002. Vol. 106. P. 868-878.
- Salmia A. Endomycorrhizal fungus in chlorophyll-free and green forms of the terrestrial orchid *Epipactis helleborine* // Karstenia. 1988. Vol. 28. P. 3-18.
- Salmia A. Features of endomycorrhizal infection of chlorophyll-free and green forms of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae) // Ann. Bot. Fenn. 1989. Vol. 26. P. 15-26.
- Salzer P., Elfstrand M., Wiemken A., Boller T. A mycorrhiza-inducible plant chitinase accelerates the life cycle of arbuscular mycorrhizal fungi // Biology of plant-microbe interactions. 2004. Vol. 4. P. 464-467.
- Salzer P., Hager A. Sucrose utilization of the ectomycorrhizal fungi *Amanita muscaria* and *Hebeloma crustuliniforme* depends on the cell wall-bound invertase activity of their host *Picea abies* // Dot. Acta. 1991. Vol. 104. P. 439-445.
- Sanders F.E., Tinker P. B. Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* mycorrhizas // Nature 1971. Vol. 233. P. 278-279.
- Schrey S.D., Schellhammer M., Ecke M., Hampp R., Tarkka M.T. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria* // New Phytol. 2005. Vol. 168. P. 205-216.
- Schüßler A., Kluge M. 2000. Geosiphon pyriforme, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research // In: Hoek B. (ed.). The mycota. IX. Fungal associations. Berlin, Germany. Springer Verlag. 2000. P. 151-161.
- Schüssler A. *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus* // Mycorrhiza. 2000. Vol. 10. P. 15-21.
- Schüssler A., Schwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution // Mycol. Res. 2001. Vol. 105. P. 1413-1421.
- Selosse M.-A., Bauer R., Moyersoen B. Basal hymenomycetes belonging to the *Sebacinaceae* are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees // New Phytol. 2002a. Vol. 155. P. 183-195.
- Selosse M.-A., Le Tacon F. The land flora: a phototroph-fungus partnership? // Tree. 1998. Vol. 13. № 1. P. 15-20.
- Selosse M.-A., Weiss M., Jany J.-L., Tillier A. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* and neighbouring tree ectomycorrhizae // Mol. Ecol. 2002b. Vol. 11. P. 1831-1844.
- Setälä H. Growth of birch and pine seedlings in relation to grazing by soil fauna on ectomycorrhizal fungi // Ecology. 1995. Vol. 76. P. 1844-1851.
- Setälä H., Kulmala P., Mikola J., Markkola A.M. Influence of ectomycorrhiza on the structure of detrital food webs in pine rhizosphere // Oikos. 1999. Vol. 87. № 1. P. 113 – 122.
- Sharples J.M., Meharg A.A., Chambers S.M., Cairney J.W.G. Symbiotic solution to arsenic contamination // Nature. 2000. Vol. 404. P. 951-952.
- Shaw T.M., Dighton J., Sanders P. E. Interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on agar and in association with seedlings of lodgepole pine (*Pinus contorta*) // Mycol. Res. 1995. Vol. 99. P. 159 – 165.
- Simard S.W., Durall D.M. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance // Can. J. Bot. 2004. Vol. 82. P. 1140-1165.
- Simard S.W., Perry D.A., Jones M.D., Myrold D.D., Durall D.M., Molina R. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field // Nature. 1997. Vol. 388. P. 579-582.
- Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. London, Academic Press, 1997. P. 605.
- Smith J.E., Molina R., Huso M.M.P., Luoma D.L., McKay D., Castellano M.A., Lebel T., Valachovic Y. Species richness, abundance and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in

- young, rotation-age and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, U.S.A. // *Can. J. Bot.* 2002. Vol. 80. P. 186-204.
- Smreciu E.A., Currah R.S.* Symbiotic seed germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe // *Lindleyana*. 1989. Vol. 1. P. 6-15.
- Söderström B., Finlay R.D., Read D.J.* The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. IV. Qualitative analysis of carbohydrate contents of mycelium interconnecting host plants // *New Phytol.* 1988. Vol. 109. P. 163-166.
- St. John T.V., Coleman D.C.* The role of mycorrhizae in plant ecology // *Can. J. Bot.* 1983. Vol. 61. P. 1005-1014.
- Stahl E.* Der Sinn der Mykorrhizebildung // *Jahrb. f. Wiss. Bot.* 1900. Ges. 34. S. 539.
- Staněk M.* Mikroorganismy v hyfosféře hub. I. Úvod // *Česká Mykologie*. 1984. R. 38. S. 1-10.
- Steinberg P. D., Rillig M.C.* Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin // *Soil Biol. Biochem.* 2003. Vol. 35. P. 191-194.
- Straker C.J.* 1996. Ericoid mycorrhiza: ecological and host specificity // *Mycorrhiza*. 1996. Vol. 6. P. 215-225.
- Summerbell R.C.* Microfungi associated with the mycorrhizal mantle and adjacent microhabitats within the rhizosphere of black spruce // *Can. J. Bot.* 1989. Vol. 67. P. 1085 – 1095.
- Summerbell R.C.* 2005. Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce, *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: influence of site factors on fungal distributions // *Studies in Mycology*. 2005. Vol. 53. P. 121-145.
- Tagu D., Martin F.* Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhizal development // *New Phytol.* 1996. Vol. 133. P. 73-85.
- Tagu D., Lapeyrie F., Martin F.* The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development // *Plant & Soil*. 2002. Vol. 244. P. 97-105.
- Tamasloukht B., Séjalon-Delmas N., Kluver A., Roux C., Bécard G., Franken C.* Root factor induce mitochondrial-related-gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* // *Planta Physiol.* 2003. Vol. 131. P. 1468-1478.
- Taylor A.F.S.* Common mycelial networks: lifelines and radical addictions // *New Phytol.* 2006. Vol. 169. P. 6-8.
- Taylor D.L.* Myco-heterotroph fungus marriages – is fidelity over-rated? // *New Phytol.* 2004. Vol. 163. P. 217-221.
- Taylor D.L., Bruns T.D.* Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two non-photosynthetic orchids // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. Vol. 94. P. 4510-4515.
- Taylor D.L., Bruns T.D.* Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the cheating orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana* // *Mol. Ecol.* 1999. Vol. 8. P. 1719-1732.
- Taylor D.L., Bruns T.D., Hodges S.A.* Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid // *Proc. R. Soc. Lond.* 2004. Vol. 271. P. 35-43.
- Taylor D.L., Bruns T.D., Leake J.R., Read D.J.* Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants // van der Heijden M.G.A., Sanders I. (eds.). *Mycorrhizal ecology. Ecological studies*. Berlin, Springer-Verlag, 2002. Vol. 157. P. 375-413.
- Taylor T.N.* Fungal associations in the terrestrial paleoecosystems // *Tree*. 1990. Vol. 5. № 1. P. 21-25.
- Taylor T.N., Osborn J.M.* The importance of fungi in shaping the paleoecosystem // *Review of Paleobotany and Palynology*. 1996. Vol. 90. P. 249-262.
- Terashita T., Chuman S.* Fungi inhabiting wild orchids in Japan. 4. *Armillariella tabescens*, a new symbiont of *Galeola septentrionalis* // *Trans. Myc. Soc. Japan*. 1987. Vol. 28. P. 154-154.
- Termorshuizen A., Schaffers A.* Decline of carpophores of mycorrhizal fungi in stands of *Pinus sylvestris* L. in the Netherlands: possible causes // *Nova Hedwigia*. 1991. Vol. 53. P. 267-289.
- Thornton H.G.* The ecology of microorganisms in soil // *Proc. Roy. Soc.* 1956. B145. P. 364-374.
- Timonen S., Jorgensen K.S., Haahtela K., Sen R.* Bacterial community structure at defined locations of *Pinus sylvestris* – *Suillus bovinus* and *Pinus sylvestris* – *Paxillus involutus* mycorrhizospheres in dry pine forest humus and nursery peat // *Can. J. Microbiol.* 1998. Vol. 44. P. 449 -513.
- Timonen S., Marschner P.* Mycorrhizosphere concept // Mukerji K.G., Manoharachary C., Singh J. (eds.). *Microbial activity in the rhizosphere*. Berlin, Springer Verlag, 2005. P. 349.
- Tommerup I.C.* Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil // *Trans. Br. Myc. Soc.* 1985. Vol. 85. P. 267-278.
- Toth R., Doane C., Bennett E., Alexander T.* Correlation between host-fungal surface areas and percent colonization in VA mycorrhizae // *Mycologia*. 1990. Vol. 82. P. 519-522.
- Trappe J.M.* Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint // Safir G.R. (ed). *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1987. P. 5-25.
- Trappe J.M.* A.B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory // *Mycorrhiza*. 2005. Vol. 15. P. 277-281.
- Treseder K.K.* 2004. A meta-analysis of mycorrhiz-

- al responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies // *New Phytol.* 2004. Vol. 164. P. 347-355.
- Trudell S.A., Rygielwicz P. T., Edmonds R.L. Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants // *New Phytol.* 2003. Vol. 160. P. 391-401.
- Turnau K.I., Kottke I., Oberwinkler F. Elemental localization in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. collected from experimental plots treated with Cd dust // *New Phytol.* 1993. Vol. 123. P. 313-324.
- Uetake Y., Peterson R.L. Changes in actin filament arrays in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis*, induced by the symbiotic fungus *Ceratobasidium cornigerum* // *Can. J. Bot.* 1997. Vol. 75. P. 1661-1669.
- Uetake Y., Peterson R.L. Association between microtubules and symbiotic fungal hyphae in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis* // *New Phytol.* 1998. Vol. 140. P. 715-722.
- Urcelay C., Díaz S. The mycorrhizal dependence of subordinates determines the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant diversity // *Ecol. Lett.* 2003. Vol. 6. P. 388-391.
- van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglou P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity // *Nature.* 1998. Vol. 396. P. 69-72.
- Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T.J., Watson I.J., Duck J.M., Fitter A.H., Young J.P. W. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem // *Mol. Ecol.* 2002. Vol. 11. P. 1555-1564.
- Varese G.C., Luppi-Mosca A.M. Surface and inner microfungus communities of *Fagus sylvatica* L. ectomycorrhizae // Szaro T.M., Bruns T.D. (eds.) *First International Conference on Mycorrhizae.* Springer Verlag, Berkeley, California. 1996. P. 121.
- Vierheilig H., Bennett R., Kiddle G., Kaldorf M., Ludwig-Müller J. 2000. Differences in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate containing species // *New Phytol.* Vol. 146. P. 343-352.
- Villareal-Ruiz L., Anderson I.C., Alexander I.J. Interaction between an isolate from the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium* // *New Phytol.* 2004. Vol. 164. P. 183-192.
- Voiblet C., Duplessis S., Encelot N., Martin F. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*/ *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs // *Plant Journal.* 2001. Vol. 25. P. 181-191.
- Vreeland P., Kleiner E.F., Vreeland H. Mycorrhizal symbiosis of *Sarcodes sanguinea* // *Environmental and Experimental Botany.* 1981. Vol. 21. P. 15-25.
- Walker J.F., Miller O.K., Lei T., Semones S., Nilsen E., Clinton B.D. Suppression of ectomycorrhizae on canopy tree seedlings in *Rhododendron maximum* L. (Ericaceae) thickets in the southern Appalachians // *Mycorrhiza.* 1999. Vol. 9. P. 49-56.
- Wallander H., Nilsson L.O., Hagerberg D., Bååth E. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field // *New Phytol.* 2001. Vol. 151. P. 753 – 760.
- Wamberg C., Christensen S., Jacobsen I., Müller A.K., Sorensen S.J. The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*) // *Soil Biol. Biochem.* 2003. Vol. 35. P. 1349-1357.
- Warnock A.J., Fitter A.H., Usher M.B. The influence of a springtail *Folsomia candida* (Insecta, Collembola) on the mycorrhizal association of leek *Allium porrum* and the vesicular-arbuscular mycorrhizal endophyte *Glomus fasciculatus* // *New Phytol.* 1982. Vol. 90. P. 285-292.
- Werner A., Zadworny M. *In vitro* evidence of mycoparasitism of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* against *Mucor hiemalis* in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* // *Mycorrhiza.* 2003. V. 13. P. 41 – 47.
- Werner A., Zadworny M., Idzikowska K. Interaction between *Laccaria laccata* and *Trichoderma virens* in co-culture and in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* grown *in vitro* // *Mycorrhiza.* 2002. V. 12. P. 139 – 145.
- Wilkinson K.G., Dixon K.W., Sivasithamparan K., Ghisalberti E.L. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria // *Plant & Soil.* 1994. Vol. 159. P. 291-295.
- Yamada A., Katsuya K. The disparity between the number of ectomycorrhizal fungi and those producing fruit bodies in a *Pinus densiflora* stand // *Mycol. Res.* 2001. Vol. 105. P. 957-965.
- Yu T.E.J.-C., Egger K.N., Peterson R.L. Ectomycorrhizal associations – characteristics and functions // *Mycorrhiza.* 2001. Vol. 11. P. 167-177.
- Zak B. Role of mycorrhizae in root disease // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1964. Vol. 2. P. 377-392.
- Zelmer C.D., Cuthbertson L., Currah R.S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms // *Mycoscience.* 1996. Vol. 37. P. 439-448.
- Zhou M., Sharik T.L. Ectomycorrhizal associations of northern red oak (*Quercus rubra*) seedlings along an environmental gradient // *Can. J. For. Res.* 1997. Vol. 27. P. 1705-1713.
- Zhu Y.G., Miller R.M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems // *Trends Plant Sci.* 2003. Vol. 8. P. 407-409.

О.Е. Марфенина, Г.М. Фомичева

ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ В СРЕДЕ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ

Большое внимание микологов и медиков в последние десятилетия привлекают грибы, опасные для здоровья человека. В настоящее время в мире активно проводятся исследования как по описанию состава и свойств таких видов, так и по оценке их распространения и условий развития.

Опасные для человека свойства грибов, например, образование микотоксинов, вызывающих отравления людей, были известны еще с древних времен (Курсанов, Комарницкий, 1945). Однако только с середины XX века было активно начато изучение грибов – возбудителей первичных и оппортунистических микозов (Аравийский и др., 2004; Сергеев, Сергеев, 2003), а также вызывающих аллергии у человека.

Сейчас как основные опасные для здоровья человека (*medically important fungi*) рассматриваются грибы, которые могут обладать: 1) патогенными, 2) токсичными, 3) аллергенными свойствами. К настоящему времени имеются многочисленные литературные данные по нахождению таких видов в различных условиях, однако до сих пор нет попыток провести комплексный анализ распространения этих грибов в

зависимости от природных экологических условий и современных антропогенных факторов, влияющих на развитие грибов, а так же от типа местообитания человека.

Основной целью данного обзора мы видим анализ закономерностей распространения потенциально патогенных мицелиальных грибов в современной биосфере в основных местах обитания человека. Но так как некоторые виды грибов могут обладать не одним, а несколькими опасными для человека свойствами, (например, *Aspergillus flavus*, может проявлять патогенные, микотоксичные и аллергенные свойства), то мы приводим ряд сведений и по распространению аллергенных и микотоксичных грибов.

Патогенные для человека мицелиальные грибы в своем большинстве относятся к микроскопическим, так называемым, митоспоровым (несовершенным) грибам, у которых выявлено размножение только бесполоыми спорами или мицелием. Некоторые из этих грибов кроме мицелиальной могут иметь и дрожжевую стадию (Аравийский и др., 2004; Hoog de et al., 2000).

Долгое время основное внимание, как возбудителям грибных заболеваний человека, уделялось сравнительно небольшой специализированной группе первичных патогенов, которые могут вызывать заболевания у относительно здоровых людей. Длительность сохранения большинства первичных патогенов во внешней среде невелика, зависит от присутствия хозяина (человека или животного) и возможности его поражения. Но среди них имеются и виды, которые могут длительно сохраняться в окружающей среде и в соответствующей ситуации заражать человека (Мюллер, Леффлер, 1995).

До сих пор меньше известно о свойствах и закономерностях распространения потенциально патогенных грибов. Потенциально патогенными называют грибы, которые, с одной стороны, могут длительно сохраняться и развиваться во внешней среде, а с другой, вызывать микозы человека. Из-за такой лабильности свойств потенциально патогенные грибы часто называют – «оппортунистическими» (Елинов, 2004). Объем этой группы грибов (дрожжей и мицелиальных грибов) сейчас оценивают в 350-400 видов (Hoog de et al., 2000, Озерская, 2006, в печати). Эти списки пополняются приблизительно 10 новыми видами в год.

Потенциально патогенные грибы могут быть причиной так называемых «вторичных» микозов, то есть грибковых инфекций, которые вероятнее могут развиваться у людей, уже имеющих серьезное первичное заболевание. Наиболее подвержены вторичным микозам люди, страдающие различными формами иммунодефицита. Если подавляющее большинство потенциальных возбудителей вторичных микозов, попав в организм здоровых людей, не находят подходящих для себя условий или не выдерживает защитных реакций организма человека и, в результате, инфекция не развивается, то у людей, у которых защитные функции подавлены, возможность возникновения грибной инфекции существенно выше. Причинами иммунодефицитных состояний человека, при которых наиболее часто наблюдается развитие вторичных микозов, могут быть: СПИД, заболевания системы крови, рак, радиационное поражение, ожоги, терапия антибиотиками, кортикостероидами, различные ослабленные состояния и т.д. (Аравийский и др., 2004; Howard, 2002 и др.). Распространение в мире оппортунистических микозов может быть непосредственно связано с увеличением числа иммунодепрессивных людей, наиболее восприимчивым к грибковым инфекциям.

Часть вторичных микозов вызывается не мицелиальными, а дрожжевыми грибами. Среди дрожжевых наиболее распространены инфекции, вызываемые дрожжами рода *Candida* (Сергеев, Сергеев, 2001). В последнее годы увеличивается число регистрируемых случаев вторичных микозов, вызванных потенциально патогенными грибами, имеющими развитый мицелий (*filamentous fungi*). Хотя уровень заражения мицелиальными грибами до сих пор не определен и 10 лет тому назад в год, в среднем, регистрировалось до 500 случаев оппортунистических микозов на 1 млн. человек (Muller, 1997), тем не менее, опасность для здоровья людей со стороны потенциально патогенных мицелиальных грибов с каждым годом оценивается все выше. Это определяется тем, что частота заболеваний и разнообразие видов микроскопических грибов, которые способны вызывать микозы человека, постоянно возрастает.

В настоящий момент потенциально патогенные грибы подразделяют на несколько групп. В разных странах варианты подобной классификации несколько отличаются, но подходы к ней остаются одними и теми же. Наиболее часто используется классификация С. де Хога (Hoog de et al., 2000). Он выделяет несколько групп грибов, обозначаемых как номерные BSL (BioSafety Level, т.е. – грибы, относимые к определенному уровню безопасности), в зависимости от их опасности для человека.

Группа BSL1 – это в принципе безопасные для здоровых людей грибы. В организм здорового человека они преимущественно могут попадать при нарушении кожных покровов и вызывать локализованные микозы. Глубокие микозы эти грибы могут вызывать случайно, на фоне иммунодефицита или критического состояния пациента.

Грибы группы BSL2 – могут попадать в организм здорового человека, и сохраняться в нем, вызывая локализованные микозы. В случае попадания в организм ослабленного человека они могут распространяться более широко и таким образом проявлять свойства оппортунистов. В эту группу включены дерматофиты и другие облигатно патогенные возбудители поверхностных микозов.

Грибы BSL3 – небольшая группа системных патогенов, которая до сих пор включала преимущественно диморфные грибы, т.е. имеющих и мицелиальную и дрожжевую стадии, например, представителей родов *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma* и *Paracoccidioides*. Сейчас в эту группу включают, кроме того, *Penicillium marneffeii*,

а также некоторых темноокрашенных представителей сем. *Herpotrichiellaceae*, например, *Cladophialophora bantiana*.

Имеются и ряд других классификаций рекомендованных в отдельных странах, например, в Бельгии (<http://www.biosafety.be/RA/Class/ListFungi.html>).

В России классификация грибов по группам патогенности имеет обратную нумерацию (I–IV по убыванию опасности). Большинство возбудителей оппортунистических микозов относится к IV группе патогенности, а возбудители эндемических микозов и криптококкоза – к III группе. (Сергеев, Сергеев, 2003). Но так как отечественная классификация была сделана давно и список включенных в нее грибов явно нуждается в пересмотре (Озерская, в печати), а целью нашего обзора является рассмотрение современных данных, мы будем использовать более общепринятую классификацию С. Де Хога, с позиций которой преимущественно изложены зарубежные исследования.

Работы, посвященные оценке распространения в окружающей среде потенциально патогенных для человека мицелиальных грибов, начали проводить в последние десятилетия. Некоторые авторы рассматривают их как «эпидемиологические», хотя четкой связи, между присутствием в среде обитания человека определенных видов потенциально патогенных грибов и развитием микозов часто не имеется. В большей степени такие связи установлены для патогенных грибов, относимых к группе BSL3. Ими вызываются наиболее опасные микозы (гистоплазмоз, бластомикоз, паракокцидиоидоз и др.), заболевания которыми чаще встречаются в определенных географических регионах, где эти грибы распространены. Например, такими регионами для *Penicillium marneffei*, в первую очередь, является Юго-восточная Азия, для *Blastomyces dermatitidis* – Северная Америка, для *Paracoccidioides brasiliensis* – Южная Америка. Сохранение этих грибов в природе происходит, как правило, в жарком климате (Мюллер, Лефлер, 1995, de Hoog et al., 2000 и др.).

Предполагают, что для грибов групп BSL3 длительность сохранения во многом определяется наличием хозяина и возможностью его поражения (Falkow, 1997). Для ряда этих грибов установлена возможность переноса в окружающей среде позвоночными животными, например, бамбуковыми крысами для *Penicillium marneffei*, для *Paracoccidioides brasiliensis* – броненосцами, для *Histoplasma capsulatum* – землеройками и т.д.

Причем заболеваемость самих животных, например, броненосцев, может быть во много раз выше чем людей (Bagagli et al., 2003).

Патогенные грибы группы BSL3 могут выделяться и из экскрементов животных. Например, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* выделяются из помета летучих мышей. Хотя из тел самих летучих мышей они были изолированы редко. Поэтому можно предположить, что при прохождении желудочно-кишечного тракта животных может происходить активация их развития или, что помет в силу своих свойств (химических, микробиологических) благоприятен для развития этих грибов. Для некоторых из этих видов показана возможность присутствия и в других богатых органикой субстратах, например, в гниющей древесине.

С другой стороны, ряд грибов группы BSL3, например, *Blastomyces dermatitidis* может сохраняться и в небогатых органическим веществом субстратах – песчаных, подзолистых, лесных почвах. Заражение человека некоторыми грибами группы BSL3 и развитие микозов может происходить при копке почв (Baumgardner et al., 2005), пыльных бурях, что наиболее четко было показано для возбудителя кокцидиоидоза – гриба *Coccidioides immitis* (Kolivras et al., 2001).

Распространение во внешней среде потенциально патогенных грибов групп BSL2, BSL1 существенно шире, так как большинство из них усваивают широкий набор субстратов, а их присутствие в окружающей среде не определяется связями с конкретными макроорганизмами. Важнейшими экологическими факторами для развития потенциально патогенных грибов групп BSL2, BSL1 являются: содержание органических веществ, влажность среды обитания, ее температура, pH и т.д.

К группе BSL2 относят такие распространенные виды грибов как, например, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Acremonium kiliense*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. verticilloides*, *Paecilomyces variotii*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *S. brumptii* и др., часто обитающие в почве, выделяемые из воздуха, с поверхностей растений и т.п.

Группа BSL1 включает большой набор видов мицелиальных грибов (виды более чем 60 родов, например, *Mucor hiemalis*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma koningii* и др.), представленных в самых разнообразных объектах окружающей среды.

Наибольший интерес в плане оценки экологической безопасности среды обитания челове-

ка, особенно на территориях с умеренным климатом, где истинно патогенные грибы (группа BSL3), как правило, не встречаются, представляют оппортунистические грибы группы BSL2. Некоторые свойства этих грибов могут иметь особое значение при развитии заболеваний человека. Так, большинство родов группы BSL2, среди которых выявлено наибольшее число потенциально опасных видов (представители родов *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, секции *Biveticillata* рода *Penicillium* и т.д.), обычно хорошо развиваются в условиях повышенной температуры 37°C⁰ (Casadevall, 2005). При этом хороший рост зигомиецетов (виды родов *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*) наблюдается при высоком уровне влажности, составляющем не меньше 0,9 а_w (-14 МПа, -140 бар). А представители рода *Aspergillus* могут развиваться и в более засушливых условиях (Domsh et al., 1993). Для потенциально патогенных грибов также характерны оптимумы роста при нейтральном и слабощелочном pH (Марфенина, Фомичева, 2005; Casadevall, 2005 и др.).

Для оценки патогенности оппортунистических грибов имеет значение, в какой форме (дрожжевой или мицелиальной) гриб может развиваться и распространяться (de Hoog, 1996). Способность нахождения некоторых оппортунистических грибов, например, представителей родов *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Cladophialophora* и ряда темноокрашенных грибов в виде дрожжевых почкующихся клеток способствует более быстрому распространению заболеваний в организме человека через кровеносную систему, чем при развитии грибов в виде мицелия (Аравийский и др., 2004).

Обычной причиной заражения возбудителями глубоких микозов во внешней среде является вдыхание спор грибов, а в случае повреждения кожных покровов занос в раны инфекции, причем часто из почвы. При вдыхании крупные споры (более 5 мкм) проникают недалеко и обычно вызывают заболевания носоглотки, в первую очередь, синуситы. Более мелкие споры (1–5 мкм) могут достигать альвеол и вызывать глубокие микозы (Latge, 1999).

Вдыханием грибных спор, или их метаболитов, контактами с кожей могут также вызываться грибные аллергии и микотоксикозы (Autrup et al., 1991; Latge et al., 1994 и др.). Как вызывающие аллергии сейчас известны около 200 видов грибов (Abba, 2004). Как аллергенные, в первую очередь, рассматривают виды темноокрашенных родов *Alternaria* (*A. alternata*), *Cladosporium* (*C. herbarum*), *Ulocladium*, *Stem-*

phylum, а также представителей родов *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. tardum*), *Rhizopus* (*R. stolonifer*) и др. Причем для внешней среды аллергенными, в первую очередь, считают представителей также родов *Alternaria*, *Cladosporium*, а для помещений также виды родов *Aspergillus*, *Penicillium* (McGinnis, 2004).

Среди микотоксинов, продуцируемых микроскопическими грибами, одними из наиболее опасных для человека при попадании в пищу считают афлатоксины. Первоначально возможность продуцировать афлатоксины была показана для вида *A. flavus*. Но к настоящему времени доказано, что продуцировать эту группу токсинов могут представители и других видов рода *Aspergillus* (*A. parasiticus*, *A. glaucus*, *A. niger*), а также грибы и других родов, например, рода *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. digitatum*). Другими опасными для человека микотоксинами, продуценты которых могут активно развиваться во внешней среде и помещениях, считают алтернариол (продуцент *Alternaria alternata*), глиотоксин (продуцент *A. fumigatus*), стеригматоцистин (продуценты *A. versicolor*, *P. chrysogenum*), ниваленол (продуцент *F. nivale*), хитоглобозин (продуцент *Chaetomium globosum*), патулин, цитринин (продуценты *P. expansum*, *P. citrinum*, *A. candidum*, *A. terreus*), веррукозидин, веррукофортин (продуцент *P. polonicum*), сатратоксин, стахиботриамид (продуцент *Stachybotrys chartarum*) и многие другие (Елинов, 2000; McGinnis, 2004 и др.). Что касается развития микотоксикозов то, как показали опыты с животными, вдыхание грибных микотоксинов может быть даже более вредно, чем попадание токсинов в пищу (Niculin et al., 1996).

По современным представлениям, важнейшими факторами, которые определяют возможность развития заболеваний (микозов, аллергий, микотоксикозов) людей при контакте с мицелиальными грибами, могут быть содержащиеся в клеточных стенках грибов β (1,3)-D-глюканы, гидрофобины (простые белки, присутствующие на поверхности грибных клеток), меланины (темноокрашенные пигменты грибов), а также летучие органические соединения, продуцируемые грибами (McGinnis, 2004). β (1,3)-D-глюканы содержатся не только в грибах, но также в бактериях и растениях. Гидрофобины рассматривают как специфические вещества грибов. Меланины – группа высокомолекулярных соединений, имеющих у различных групп организмов, но характерная для большей части микроскопических грибов и очень важная для их жизнедеятельности. Известно, что меланиновые

пигменты грибов защищают их клетки от ультрафиолетовых лучей, высоких температур, окислителей, загрязнения радионуклидами и тяжелыми металлами, поддерживают тургор (Асланиди и др., 2003; Жданова, Васильевская, 1988; Butler, Day, 1998; Zdanova et al., 1994 и др.). Они также могут являться иммуномодуляторами, обладают антимикробными свойствами, но одновременно могут быть факторами вирулентности при развитии грибных заболеваний растений и человека (Butler, Day, 1998; Jacobson, 2000).

Следует отметить, что в описаниях распространения потенциально опасных, аллергенных, микотоксичных видов до сих пор часто встречаются старые видовые названия. Наиболее распространенные ошибки: вместо *Alternaria alternata* – *A. tenuis*, вместо *Stachybotrys chartarum* – *S. atra*, вместо *Fusarium verticilloides* – *F. moniliforme*, вместо *Penicillium chrysogenum* – *P. notatum* и т.д. Для исключения подобных несоответствий и использования современных видовых названий необходимо пользоваться ресурсами Интернет (например, Kirk P.M. et al., 2004; Index Fungorum: <http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>).

Распространение потенциально опасных грибов во внешней среде

В течение своей жизни человек постоянно контактирует с микроскопическими грибами, присутствующими повсеместно в среде его обитания, то есть человек живет в определенной «грибной среде». Численность и разнообразие грибов во внешней среде (outdoor environment) в природных условиях зависит от географического местоположения территории, сезона года, времени дня, погоды, экологических условий проживания человека, форм его деятельности и т.д.

Основным резервуаром микроскопических мицелиальных грибов в природе является почва (Мирчинк, 1988; Carlile et al., 2001; Parkinson, 1981 и др.). Будучи деструкторами, микроскопические грибы в природных условиях активно развиваются на растениях и, особенно, на их остатках. В антропогенных условиях рост плесневых грибов может происходить на поверхностях различных сооружений (зданий, дорог, других конструкций), созданных в результате деятельности человека. Микроскопические грибы хорошо переносятся воздушными потоками и постоянно присутствуют в воздухе (так называемый, «грибной аэропланктон») преимущественно

во в виде спор, а иногда и фрагментов мицелия (Samson et al., 1994). Существенно меньшее количество микроскопических грибов содержится в водоемах, где чаще всего ими обогащена поверхностная пленка воды (Терехова, 2004).

Распространение в природных экосистемах. Важнейшим вопросом прогноза заболеваний оппортунистическими микозами является анализ возможных путей заражения грибами, в том числе и возможности поступления из внешней среды. На кафедре биологии почв факультета Почвоведения МГУ были выполнены многолетние, крупномасштабные исследования, позволившие выявить отчетливые закономерности распространения потенциально патогенных мицелиальных грибов в почве и сопряженных с нею средах (Марфенина, 2002). Исследования проводили на территории Европейской части России в различных климатических зонах – от арктических широт до предгорий Кавказа. Оценивали распространение потенциально патогенных грибов как в ненарушенных природных условиях (на заповедных территориях), так и на территориях, испытывающих сильное антропогенное воздействие (в городах, в промышленно загрязненных районах, на сельскохозяйственных угодьях и т.д.). Базовым был Московский регион, где присутствие потенциально опасных плесеней определяли в разных средах обитания: в почвах, приземном воздухе и снеговом покрове в разные сезоны года.

Хотя многие потенциально патогенные грибы являются эвритопными, т.е. распространены очень широко, тем не менее, определенные тенденции их накопления в среде обитания человека достаточно хорошо прослеживаются. Из почв различных природных и антропогенных территорий мы выделили более 60 видов микроскопических грибов, о которых в настоящий момент имеются сведения как о потенциально патогенных. Основная масса этих видов относится к группе BSL1, то есть к плесневым грибам, которые сравнительно редко вызывают вторичные микозы. Однако около трети всех выделенных видов относится к группе BSL2, которые существенно более опасны, так как известны как возбудители глубоких микозов человека. Это такие широко распространенные почвообитающие грибы как: *Absidia corymbifera*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Acremonium kiliense*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. verticilloides*, *Paecilomyces variotii*, *Scopulariopsis brevicaulis* и др. Эти виды типично встречаются в почвах Европейской части России. Их распространение,

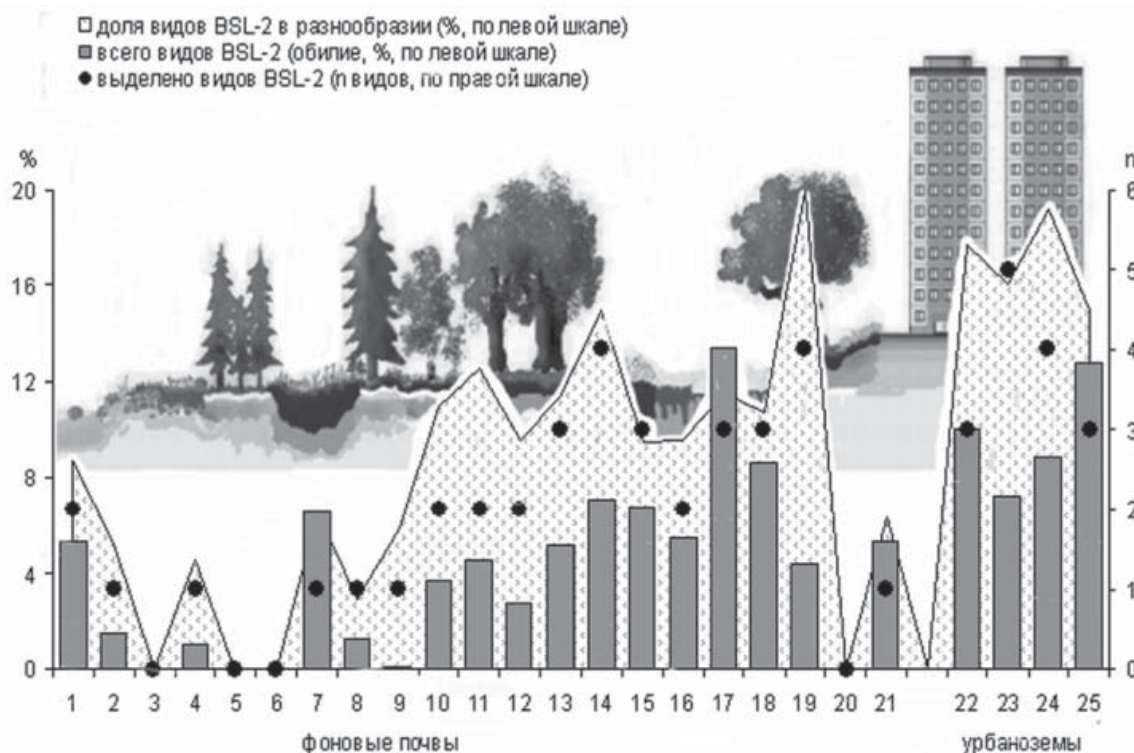


Рис. 1. Потенциально патогенные грибы в зональных и городских почвах.

Типы почв: 1 – маршевая; 2 – примитивная; 3 – подбур; 4, 5 – подзол иллювиально-железистый; 6, 7 – торфяная болотная; 8–10 – дерново-подзолистая; 11–13 – серая лесная; 14, 15 – чернозем; 16 – каштановая; 17 – солонцы; 18 – солончаки; 19 – бурозем; 20 – бурая лесная; 21 – горно-луговая; 22–25 – городские.

обилие и встречаемость, то есть насыщенность потенциально патогенными грибами среды нашего обитания, определяется как природными, так и антропогенными факторами.

Если рассматривать различные природные зоны России с точки зрения условий развития потенциально опасных грибов, то можно отметить, что наша страна расположена в умеренных широтах преимущественно с невысокими температурами и кислыми почвами, т.е. в условиях, которые неблагоприятны для развития многих оппортунистических грибов. Проведенный нами анализ распространения этих видов вненарушенных природных местообитаний показал, что наиболее «микологически чистыми» являются северные и горные районы, а наибольший уровень присутствия потенциально опасных видов в почвах, как правило, выявляется в более теплых, южных регионах (Рис.1). Как общая тенденция, разнообразие потенциально патогенных грибов в почвах увеличивается

с севера на юг. Наименьшее разнообразие потенциальных патогенов выделяется в северных экосистемах – лесотундре, северных хвойных лесах. Очень мало разнообразие этих грибов и в горных условиях, например, в зоне субальпийских лугов и высокогорье. Кроме того, и на Севере, и в горах основная масса выделяемых из почв оппортунистических грибов представлена видами родов *Penicillium*, *Trichoderma*, а также *Aureobasidium pullulans*, *Acremonium strictum* и др., патогенные свойства которых отмечаются редко.

Интересно, что на Севере исключение составляют песчаные морские пляжи, где присутствие оппортунистических грибов, в том числе и возбудителей глубоких микозов, увеличено по сравнению с зональными почвами. В прибрежной зоне, например, выделяются такие виды как: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, которые характерны для более южных широт, а также представители различных

темноокрашенных грибов *Cladosporium spp.*, *Chaetomium globosum*, *Phoma glomerata* и др. Из приморских почв были выделены и такие виды группы BSL2 как *Acremonium kiliense*, *Fusarium verticilloides*, *Paecilomyces variotii*. Эта закономерность вполне объяснима, так как для развития большинства потенциально патогенных грибов, особенно представителей рода *Aspergillus*, оптимальны нейтральные и слабощелочные условия среды (Domsch et al., 1993; Hoog de et al., 2000), характерные для прибрежной зоны. В то время как зональные почвы Севера – кислые. Анализ распространения потенциально патогенных грибов в прибрежной зоне, видимо, требует дальнейших специальных исследований, так как кроме наших данных имеются и другие сведения (например, по пляжам Португалии, Бразилии) об увеличении встречаемости грибов этой группы именно в песках пляжей (Menezes et al., 1997).

Южнее северных лесов, в зоне умеренных широт, разнообразие и обилие потенциально опасных плесеней в почвах увеличивается. Изменяется и состав грибов, входящих в группу BSL2. Здесь начинают обильно встречаться такие виды, как *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Paecilomyces variotii*, опасные свойства которых весьма хорошо известны. Сравнительно «чистыми», с точки зрения присутствия опасных для человека грибов, можно считать экосистемы болот. В болотных почвах виды грибов, известные как возбудители глубоких микозов человека, практически не встречаются.

Еще южнее на Европейской части России – в черноземах (Воронежская, Курская обл., Краснодарский край) и в некоторых засоленных почвах – потенциально патогенные грибы встречаются наиболее часто. В составе потенциально патогенных плесеней в южных почвах отмечено еще больше представителей рода *Aspergillus* – *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. ustus*, а также *Paecilomyces variotii*, грибов рода *Fusarium*. Интересно отметить, что наибольший уровень выделения потенциально патогенных грибов наблюдался в засоленных почвах – аналогично увеличению их присутствия на морских берегах.

В горных почвах под субальпийскими, альпийскими лугами Северного Кавказа и Карпат оппортунистических грибов мало. А видов группы BSL2, как правило, не выделяется.

Следует отметить, что ряд потенциально патогенных грибов является эвритопными. Такие виды, как *Alternaria alternata*, *Aspergillus*

niger, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticilloides*, *Mucorhiemalis*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma koningii* выделялись из большинства исследованных почв и приземных слоев воздуха. Тем не менее, тенденции увеличения присутствия оппортунистических грибов в природных условиях с севера на юг прослеживаются совершенно отчетливо.

В умеренных и северных широтах увеличение разнообразия и обилия потенциально патогенных грибов может особенно проявляться в жаркие годы. Подобное явление отмечалось нами даже в условиях Арктики. Так, в почвах Заполярья, где обычно не выделяются потенциально патогенные грибы, увеличение их числа и обилия отчетливо наблюдалось в жаркие и засушливые годы (2000–2001 гг.). В частности, выделялось большее разнообразие нетипичных для условий Севера видов рода *Aspergillus* (Беспалова и др., 2006).

Распространение в антропогенных экосистемах. В современной биосфере распространение опасных грибов подчиняется не только природным закономерностям, так как большинство экосистем в настоящее время испытывает влияние различных типов антропогенных воздействий, таких как, сведение лесов, распахиwanie земель, промышленное, сельскохозяйственное, транспортное загрязнение, урбанизация и т.д. Нарушение природных условий под влиянием многих антропогенных факторов может приводить к увеличению присутствия потенциально опасных микроскопических грибов в окружающей среде. Наиболее четкие эффекты, изменяющие грибные сообщества, наблюдаются при сведении лесов, распахивании земель, урбанизации (Марфенина, 2005). Высокие уровни промышленного загрязнения (тяжелыми металлами – Pb, Cd, Zn, нефтью) почв умеренных широт также приводят к увеличению встречаемости потенциально опасных видов, в том числе и видов родов *Aspergillus*, *Fusarium* (Зачиняева и др., 2006; Киреева и др., 2006; Марфенина, 2005 и др.)

Отчетливо увеличение присутствия потенциально опасных плесеней происходит на урбанизированных территориях – в городах. Причем, эта тенденция выявляется в разных климатических условиях (в Заполярье, Центральной части, на юге России). Так, во всех исследованных городских почвах наблюдалось резкое увеличение присутствия оппортунистических грибов по сравнению с зональными условиями (Рис. 1). В почвах городов отмечено увеличение встреча-

емости потенциально патогенных грибов группы BSL2 – *A. fumigatus*, *A. flavus* и др., а также увеличение числа видов рода *Penicillium* секции *Biverticillata* (Марфенина, 2000), обладающих возможностью роста при температуре 37°C. Известно, что из всех пенициллов эти виды наиболее часто вовлечены в заболевания человека (Hoog de et al., 2000).

Четче всего увеличение присутствия потенциально патогенных грибов выявлялось в старом индустриальном городе – Москве. В московских городских почвах количество видов потенциально патогенных плесеней могло быть в несколько раз больше, чем в природных зональных почвах, а их содержание составляло почти половину от всех выделяемых микроскопических грибов. В том числе доля возбудителей глубоких микозов (группа BSL2) могла достигать до 25% от всех выявленных.

Наряду с отдельными видами можно отметить и целые группы грибов, постоянно присутствующие в городской среде. Наиболее четко это прослеживается для темноокрашенных грибов, многие из которых известны как аллергены. Увеличение содержания и встречаемости этих грибов наблюдалось в городских почвах в разных природных зонах, а также и в разных компонентах внешней среды города – в приземных слоях воздуха, в снеговом покрове, на поверхности растений (Марфенина и др., 2002).

Подобные изменения грибных сообществ вполне закономерны, так как определяются специфическими экологическими свойствами городской среды. Современные города – это особые экосистемы, которые весьма существенно отличаются от природных по климатическим, физико-химическим свойствам почв и атмосферы, структуре сообществ животных, растений, микроорганизмов, наличию большого числа сооружений из созданных человеком материалов, высокому уровню загрязнения и т.д. По сравнению с фоновыми почвами, почвы города, особенно в северных и умеренных широтах, обогащены органическим веществом, имеют нейтральный или слабощелочной pH, что обычно характерно для более южных почв. В городах, как правило, создаются более теплые климатические условия. Городские почвы характеризуются более теплым температурным режимом, ослаблением промерзания (Почва ..., 1997). Поэтому особенно в крупных городах создаются как бы «более южные» условия, в которых потенциально патогенные грибы развиваются лучше.

Причинами увеличения темноокрашенных грибов в городах может быть большее уплотнение почв, нейтральный или слабощелочной pH, повышенные температуры, более высокие уровни загрязнений и т.д. Ко всем этим факторам темноокрашенные грибы, содержащие меланины (протекторные пигменты), резистентны. Кроме того, многие темноокрашенные грибы (виды родов *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Coniothirium*) хорошо развиваются на поверхности зданий, памятников из известняка, песчаника, мрамора (Sterflinger, Prellinger, 2001 и др.).

Уровень присутствия опасных грибов во внешней среде города может определяться также влиянием городской инфраструктуры и связанным с ней загрязнением. Например, высокий уровень присутствия потенциально патогенных и аллергенных грибов наблюдается в придорожных зонах автомагистралей (Кулько, Марфенина, 2001). Часто именно около дорог, т.е. на участках загрязненных в результате выбросов автотранспорта тяжелыми металлами, наблюдалось увеличение темноокрашенных грибов. Это явление (видимо, одна из форм известного феномена «городского меланизма») наблюдалось в разные сезоны года и в разных средах – в почвах, воздухе, снеговом покрове. Важно отметить, что наибольшее содержание потенциально патогенных и аллергенных грибов часто отмечалось в почвах средней части придорожных газонов (на расстоянии 5–10 метров от автострады), то есть именно на том расстоянии от дороги, на котором часто проложены пешеходные дорожки. То, что феномен накопления темноокрашенных грибов может быть связан с воздействием автотранспорта, подтвердили и исследования поверхности придорожных растений в Подмоскowie. Доля темноокрашенных микроскопических грибов на листьях придорожных деревьев, трав обычно была тем больше, чем выше (в 10 и более раз) был уровень автотранспортной нагрузки на дороге.

Распространение потенциально патогенных грибов во внешней среде как природной, так и городской, имеет определенную сезонную динамику. В городских почвах повышенное выделение потенциально патогенных видов (до 60 % и более) отмечается поздним летом (август) и в начале осени (сентябрь–октябрь), по сравнению с весной и началом лета (15–30%). Самое безопасное время с точки зрения «плесневого загрязнения» – это зима. В снегу потенциально патогенных грибов содержится меньше всего (Кулько, Марфенина, 1998).

Следует особо отметить, что в городах и на окружающих их территориях имеются объекты, для которых характерно наличие богатых органических веществ, повышенные температуры, т.е. условия оптимальные для развития потенциально опасных грибов. Такими объектами являются городские мусорные свалки, компосты. За рубежом большое внимание уделяется и развитию потенциально патогенных плесеней даже в индивидуальных мусоросборниках (Veffa et al., 1998). При компостировании в процессе разложения субстрата происходит его разогревание, и в этих условиях активно развиваются некоторые опасные плесени (Fisher et al., 2000). На участках компостирования городских отходов в г. Санкт-Петербурге было показано развитие таких потенциально опасных для человека видов как *A. fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *Mucor circinelloides* и др. (Веденяпина и др., 2005). Подобная проблема загрязнения опасными плесенями вблизи городских свалок может становиться весьма серьезной для развитых стран, так как, например, только в Германии площади занятые под переработку мусора составляют до 1% от всей территории (Fisher, Dott, 2003).

Распространение в воздушной среде. Микроскопические грибы являются постоянными обитателями воздушной среды. Описание закономерностей их распространения в воздухе проводят в рамках специальной области микологических исследований – аэромикологии. Мы приведем лишь некоторые сведения о закономерностях распространения микроскопических грибов в этой среде, важные с точки зрения путей поступления потенциально опасных грибов к человеку.

Для природных условий обычно характерно доминирование в воздухе темнопигментированных микроскопических грибов *Cladosporium spp.*, *Alternaria spp.*, *Epicoccum nigrum*, *Botrytis cinerea*. По данным некоторых авторов они могут составлять до 90% от всех выделяемых видов, в то время как на долю пенициллов и аспергиллов приходится не более 10% (Hengruez et al., 2001; Lacey, 1996). Однако уровень присутствия последних зависит от района исследования и может быть существенно выше в районах северных и умеренных широт. Одновременно с конидиями микроскопических грибов в воздухе могут присутствовать многочисленные базидиоспоры, аскоспоры (Рыжкин, Еланский, 2003 и др.).

Распространение грибов в воздухе имеет сезонную и суточную динамику. В теплые сезоны

года численность плесневых грибов в воздушной среде обычно в несколько раз больше, чем в холодный период (Liao, Luo, 2005 и др.). Характерные сезонные пики присутствия грибов в воздухе могут быть несколько смещены по времени, в зависимости от региона исследования. Содержание грибов в воздухе обычно увеличивается при увеличении влажности. В южном полушарии (Чили), максимальное содержание грибов в воздухе отмечается осенью – в апреле, мае (Hengruez et al., 2001). Развитие инфекций, вызываемых представителями рода *Fusarium*, часто проявляется во влажный период, что связывают с хорошим ростом этих грибов во влажных условиях и распространением их конидий ветром и осадками (Nelson et al., 1994). В Саудовской Аравии максимальное содержание в воздухе грибов отмечается зимой (декабрь-февраль), а минимальное содержание летом (июнь-август). При этом во влажный период наблюдается увеличение содержания видов родов *Cladosporium*, *Penicillium*, *Ulocladium*, а летом и осенью – *Aspergillus* (Al-Suwaine et al., 1999).

В летне-осенний период присутствие в воздухе темноокрашенных грибов – *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* и др., которые участвуют в заселении поверхности растений и разложении опада обычно максимальное (Li, Kendrick, 1996 и др.).

Отмечены и суточные изменения концентрации спор в приземных слоях воздуха. По данным, полученным по европейским странам, максимум грибных конидий в воздухе во внешней среде обычно наблюдается во второй половине дня (Рыжкин, Еланский, 2003; Carinanos et al., 1999 и др.).

На формирование грибных комплексов в воздухе оказывают влияние другие компоненты внешней среды, в частности, почвенный покров. Распространение потенциально патогенных грибов в воздухе может происходить при переносе зараженных грибами частиц пыли и непосредственно грибных спор из почвы. В наших исследованиях на Кольском полуострове (на природных территориях и в промзоне медно-никелевого комбината) и в Московском регионе (природная территория и зоны вдоль автострад) было установлено, что видовой состав грибов в приземных слоях воздуха аналогичен составу в почвах. То есть при высоком уровне присутствия потенциально патогенных грибов в почве имеется большая вероятность распространения их спор и в воздухе. При этом содержание потенциально опасных плесеней в приземных слоях воздуха

обычно даже выше, чем в почвах и составляло в разные сезоны года до 60–80% от общего обилия грибов.

Уровень присутствие в воздушной среде потенциально патогенных грибов может существенно изменяться под влиянием хозяйственной деятельности человека. Наиболее отчетливо такое повышение показано вблизи свалок, открытых территорий по производству компостов и т.п. Так, до 10^7 КОЕ/м³ термотолерантных грибов обнаруживалось в воздушной среде на местах переработки бытовых отходов (Fisher et al., 2000). На расстоянии более полукилометра от компостного завода в пригородной зоне Нью-Йорка содержание спор *A. fumigatus* в воздухе достигало очень значительных величин – $1,4 \times 10^4$ КОЕ/м³. Для территорий мусорных свалок характерно и наличие в воздушной среде спор грибов, содержащих микотоксины (Fisher, Dott, 2003).

Распространение потенциально опасных грибов в помещениях

Распространение оппортунистических грибов в среде обитания человека преимущественно оценивают по их присутствию во «внутренней среде» (indoor environment), то есть в помещениях (Samson et al., 1994). Этот подход определяется расчетом, что именно в различных помещениях люди (особенно, в городах и, в первую очередь, в развитых странах) проводят больше всего времени. Первоначально, основное внимание уделяли оценке присутствия оппортунистических грибов в воздухе лечебных стационаров, т.е. мест, в которых постоянно находятся люди с пониженным иммунным статусом.

В дальнейшем эти работы были распространены на места постоянного пребывания людей – офисы, детские и учебные учреждения, библиотеки, жилые помещения и т.д. Все эти исследования проводили исходя из гипотезы, что увеличение содержания грибов в воздухе помещений может быть весьма неблагоприятно для здоровья человека (Bush, Portnoy, 2001; Hudson et al., 1998 и др.)

Оценка численности микроскопических грибов в помещениях. Важнейшим показателем микологического состояния среды обитания человека является численность микроскопических грибов в окружающей среде. Этот показатель оценивается по представленности (число колониеобразующих единиц – КОЕ) и составу грибов в воздухе. В воздухе помещений грибы преимущественно присутствуют в виде спор, однако

Таблица 1.
Среднее содержание (КОЕ/м³) микроскопических грибов в помещениях разного типа использования

Тип помещений	Среднее содержание КОЕ/м ³	Количество проанализированных работ
Мельницы	11 500 000	2
Фермы	570 000	9
Пекарни	11 000	3
Фабрики	10 500	9
Жилища	7 000	15
Общественные помещения	3 000	7
Госпитали	800	5

могут обнаруживаться и отдельные фрагменты мицелия (Gorny et al, 2002; Green et al., 2005).

Численность и состав грибов определяют с использованием различных пробоотборников воздуха, среди которых основным признают пробоотборник Андерсена (Shelton et al., 2002, и др.). Принцип работы пробоотборников основан на том, что частицы в них задерживаются, а затем поступают на фильтры, агаровую среду, жидкую среду, адгезивные покрытия. Это дает возможность количественного учета грибных диаспор в воздухе, а в ряде методов и их качественного состава. При отсутствии пробоотборников используют седиментационный метод, т.е. определяют численность и состав грибов, вырастающих на чашках Петри с питательной средой после их экспозиции (15–30 мин) открытыми в исследуемых условиях (Gams et al., 1998). В России долгое время использовался прибор Кротова, представляющий собой цилиндр со съёмной крышкой, под которой имеется столик для установки чашки Петри с плотной питательной средой. Внутри цилиндра встроен вентилятор, засасывающий воздух внутрь прибора через щель, находящуюся в крышке, и вращающий столик с чашкой. С помощью встроенного микроманометра можно контролировать количество просасываемого воздуха (от 25 до 50 л/мин) (Вольпе, Кучеренко, 1970).

В последние годы как один из наиболее эффективных приемов оценки персональной контаминации человека грибными спорами предложено использовать маленькие фильтры, вставляющиеся в ноздри (Tovey, Green, 2005).

Число спор, учтенных этими методами в разных помещениях, составляет от единиц до миллионов спор в одном кубическом метре воздуха (Vujanovic et al., 2001). Анализ имеющихся литературных данных показывает, что численный уровень микроскопических грибов может существенно различаться в зависимости от характера использования помещений. Наибольший уровень присутствия микроскопических грибов – до миллионов (!) грибных зачатков в кубическом метре был выявлен в воздухе мукомолен. Сотни тысяч грибных зачатков обычно выделяются в помещениях на фермах. В различных других производственных помещениях (различные типы фабрик, пекарни) уровень присутствия грибов мог составлять до десятков тысяч на кубический метр воздуха. Меньший уровень содержания грибов обычно отмечается в жилищах, а еще меньший в воздухе общественных зданий – школ, офисов и т.п. (Таб.1,2).

Отмечаемое большее содержание плесеней в жилых помещениях, по сравнению с общественными зданиями, возможно, связано не только с соблюдением в общественных зданиях санитарных правил, их регулярной уборкой, меньшим количеством мебели, но также с тем, что анализ содержания грибов в жилых помещениях часто проводят в связи с наличием протечек, которые резко увеличивают развитие грибов.

Минимальный уровень присутствия (до сотен КОЕ/м³), как правило, отмечается в помещениях, где гигиенические требования выполняются наиболее строго – т.е. в госпиталях.

Оценка качественного состава микроскопических грибов в помещениях. Определение качественного состава опасных для человека грибов в воздухе рабочих и бытовых помещений сейчас в мире проводят очень широко. Сравнительно наибольшее число работ было выполнено в США, часто при поиске источника заболевания, называемого «синдром больных зданий». Исключение составляют страны Африки, для которых нам удалось обнаружить только две работы, выполненные в Египте и Уганде.

При анализе результатов более 70 исследований, выполненных за последние 10 лет, хорошо прослеживается, что на разных континентах (в Северной Америке, Европе, Азии и Австралии) в воздухе помещений доминируют практически одни и те же группы грибов: а именно, виды родов *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* (Таб. 2). Однако в разных странах, в зависимости от климатических условий внешней среды и типа помещения, порядок доминирования грибов может несколько отличаться. Если в странах Азии (Индия, Китай, Арабские эмираты), Северной Америки (США, некоторые города Канады) в воздухе помещений, в первую очередь, доминируют представители *Cladosporium*, *Aspergillus*, то в Европе чаще основными доминантами могут быть виды родов *Penicillium* и *Cladosporium*, а затем уже *Aspergillus* и *Alternaria*. Как другие доминиру-

Таблица 2

Качественный состав и численность микроскопических грибов в воздухе различных помещений

Больничные помещения:				
Исследованный тип помещения	Доминирующие виды и роды грибов в воздухе помещений	Максимальное количество КОЕ в воздухе КОЕ/м ³	Страна, в которой проведено исследование	Авторы исследования
Госпиталь	<i>Penicillium spp.</i> (<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. decumbens</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>P. lanosum</i> , <i>P. implicatum</i>); <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. fumigatus</i> , <i>A. cervinus</i> , <i>A. niger</i>)		Литва	Lugauskas et al, 2000
Госпиталь	<i>Cladosporium spp.</i> (<i>C. herbarum</i> , <i>C. ladosporioides</i>); <i>Wallemia sebi</i> ; <i>Eurotium amstelodami</i> ; <i>Penicillium spp.</i> (<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. spinulosum</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>P. brevicompactum</i>)	208	Австрия	Rainer et al., 2000

Госпиталь	<i>Cladosporium spp.</i> (<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. sphaerospermum</i>); <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. candidus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i>); <i>Rhizomucor pussilus</i>		Италия	Rolandi et al., 1998
Госпиталь	<i>Cladosporium herbarum</i> ; <i>Trichoderma spp.</i> ; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Penicillium spp.</i> (<i>P. brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i>); <i>Mucor racemosus</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i>	83	США, Иллинойс	Curtis et al., 2005
Госпиталь	<i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. clavatus</i>); <i>Penicillium lilacinus</i> ; <i>Fusarium solani</i>	21	США, Арканзас	Anaissie et al., 2003
Госпиталь	<i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. sydowi</i> , <i>A. japonicus</i>)	3263	Индия, Дели	Singh, Singh, 1999
Госпиталь	<i>Aspergillus</i> ; <i>Curcularia</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Helminthosporium</i> ; <i>Fusarium</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Verticillium</i>		Индия, Западный Бенгал	Chakraborty et al., 2000

Жилые помещения:

Исследованный тип помещения	Доминирующие виды и роды грибов в воздухе помещений	Максимальное количество КОЕ в воздухе КОЕ/м ³	Страна, в которой проведено исследование	Авторы исследования
Жилые помещения	<i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Stemphylium</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Alternaria</i>	40000	Россия, Санкт-Петербург	Богомолова и др., 1999
Жилые помещения	<i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Wallemia</i> ; <i>Botrytis</i> ; <i>Alternaria</i>		Россия, Москва	Антропова и др., 2004
Жилые помещения	<i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Rhizopus</i>		Россия, Новгород	Ковзель и др., 2003
Жилые помещения	<i>Cladosporium</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Aspergillus</i>	2494	Польша	Pastuszka et al., 2003
Жилые помещения с протечками	<i>Penicillium</i> ; <i>Alternaria</i>	16968	Польша	Pastuszka et al., 2003
Жилые помещения	<i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Alternaria</i>	15000	Германия	Jovanovic et al., 2004
Жилые помещения с протечками	<i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Stachybotris</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Trichoderma</i>	2696	Канада, Квебек	Duchaine, Meriaux, 2001
Жилые помещения	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Alternaria</i>		США	O'Connor et al., 2004
Жилые помещения	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Aureobasidium</i>		Италия	Palmas et al., 1999
Жилые помещения	<i>Cladosporium</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Chrysosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Alternaria</i>	1245	США, Огайо	Green et al., 2003

Жилые помещения	<i>Cladosporium spp.</i> ; <i>Aspergillus restrictus group</i> ; <i>Penicillium spp.</i> ; <i>Alternaria spp.</i> ; <i>Wallemia sebi</i> ; <i>Aspergillus glaucus group</i>		Япония, Йокогама	Takahashi, 1997
Жилые помещения	<i>Cladosporium spp.</i> (<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. sphaerospermum</i>); <i>Penicillium spp.</i> (<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. crustosum</i>); <i>Alternaria alternata</i>	675	США, Калифорния	Morey et al., 2003
Жилые помещения с протечками	<i>Penicillium spp.</i> (<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. spinulosum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. aurantiogriseum</i>); <i>Cladosporium spp.</i> (<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. sphaerospermum</i>)	712	США, Калифорния	Morey et al., 2003
Жилые помещения	<i>Cladosporium spp.</i> (<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. sphaerospermum</i>); <i>Penicillium spp.</i> (<i>P. sclerotiorum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. decumbens</i>); <i>Aspergillus niger</i>		США, Джорджия	Horner et al., 2004
Жилые помещения с протечками	<i>Penicillium spp.</i> (<i>P. chrysogenum</i>); <i>Cladosporium spp.</i> (<i>C. cladosporioides</i>); <i>Alternaria spp.</i>	567	США, Техас	McGrath et al., 1999
Жилые помещения	<i>Aspergillus</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Chaetomium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Trichoderma</i> ; <i>Verticillium</i> ; <i>Mucor</i>	548	Арабские эмираты	Jaffal, 1997
Жилые помещения	<i>Aspergillus</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Helminthosporium</i> ; <i>Curvularia</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Fusarium</i>		Индия, Западный Бенгал	Chakraborty et al., 2000
Жилые помещения	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Alternaria</i>	8333	Тайвань	Wu et al., 2000
Жилые помещения	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Alternaria</i>	9099	Тайвань	Wu et al., 2000
Жилые помещения	<i>Cladosporium</i> ; <i>Curvularia</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Fusarium</i> ; <i>Penicillium</i>	810	Австралия	Hargreaves et al., 2003

Производственные помещения:				
Исследованный тип помещения	Доминирующие виды и роды грибов в воздухе помещений	Максимальное количество КОЕ в воздухе КОЕ/м³	Страна, в которой проведено исследование	Авторы исследования
Деревообрабатывающее предприятие	<i>Penicillium</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Mucor</i>	325	Россия, Санкт-Петербург	Васильев и др., 2003
Предприятие нефтедобывающей промышленности	<i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Alternaria</i>		Россия	Хуснаризанова и др., 2000

Дерево-обрабатывающее предприятие	<i>Paecilomyces puntonii</i> ; <i>Rhizopus spp.</i> (<i>R.nodosus</i> (= <i>R. oryzae</i>) <i>R. stolonifer</i>); <i>Alternaria alternata</i> ; <i>Cladosporium herbarum</i> ; <i>Mucor racemosus</i> ; <i>Penicillium spp.</i> (<i>P. capsulatum</i> , <i>P. expansum</i>)	23	Литва	Lugauskas et al, 2004
Предприятие по переработке меха	<i>Cladosporium</i> (<i>C. sphaerospermum</i> , <i>C. herbarum</i>); <i>Penicillium spp.</i> (<i>P. expansum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. decumbens</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>P. chrysogenum</i>) <i>Alternaria alternata</i> ; <i>Rhizopus stolonifer</i> ; <i>Aspergillus candidus</i>	4033	Литва	Lugauskas et al, 2001
Бумажная фабрика	<i>Cladosporium</i> (<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i>); <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i>); <i>Mortierella longicollis</i> <i>Penicillium decumbens</i> ; <i>Alternaria alternata</i>	553	Литва	Lugauskas et al, 2000
Обувная фабрика	<i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. fumigatus</i> , <i>A. cervinus</i> , <i>A. niger</i>); <i>Penicillium spp.</i> (<i>P. expansum</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>P. chrysogenum</i>); <i>Eurotium herbariorum</i> ; <i>Alternaria alternata</i>	420	Литва	Lugauskas et al, 2000
Дерево-обрабатывающее предприятие	<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. repens</i>); <i>Cladosporium brevicompactum</i> ; <i>Geotrichum candidum</i> ; <i>Trichoderma album</i> ; <i>Penicillium citrinum</i>	65200	Польша	Dutkiewicz et al., 2001
Мебельная фабрика	<i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Absidia</i>	6200	Польша	Krysinska-Traczyk et al., 2002
Пищевое предприятие	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Aspergillus</i>		Турция	Simsekli et al., 1999
Молочный завод	<i>Aspergillus</i> ; <i>Helminthosporium</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Curvularia</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Nigrospora</i>	8990	Индия, Западный Бенгал	Barui, Chanda, 2000
Текстильная фабрика	<i>Cladosporium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Fusarium</i> ; <i>Penicillium</i>	4807	Тайвань	Su et al., 2002
Фабрика по производству кормов для животных	<i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i>); <i>Penicillium</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Mucor</i>	1240	Египет	Hameed et al., 2003
Мельница	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Eurotium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Absidia</i> ; <i>Fusarium</i>	23000000	Финляндия	Lappalainen et al., 1996
Мельница	<i>Cladosporium spp.</i> (<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i>); <i>Penicillium. viridicatum</i> ; <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. candidus</i> , <i>A. oryzae</i>); <i>Geotrichum candidum</i> ; <i>Cochliobolus sativus</i> ; <i>Mortierella isabellina</i>	17000	Литва	Lugauskas et al, 2004
Мельница	<i>Aspergillus</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Curvularia</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Nigrospora</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Drechslera</i> ; <i>Alternaria</i>		Индия, Западный Бенгал	Chakraborty et al., 2000

Механизированная пекарня	<i>A. flavus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. sydowi</i> ; <i>A. japonicus</i> ; <i>A. fumigatus</i>	6113	Индия, Дели	Singh, Singh, 1999
Пекарня	<i>Aspergillus</i> ; <i>Botrytis</i> ; <i>Curcularia</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Fusarium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Trichothecium</i>	382	Центральная Индия	Jain, 2000
Пекарня	<i>Aspergillus/Penicillium</i> ; <i>Nigrospora</i> ; <i>Periconia</i> ; <i>Ganoderma</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Alternaria</i>	26770	Индия, Западный Бенгал	Adhikari et al., 2000

Фермы:				
Исследованный тип помещения	Доминирующие виды и роды грибов в воздухе помещений	Максимальное количество КОЕ в воздухе КОЕ/м³	Страна, в которой проведено исследование	Авторы исследования
Животноводческая ферма	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Eurotium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Absidia</i> ; <i>Fusarium</i>	870000	Финляндия	Lappalainen et al., 1996
Растениеводческая ферма	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Eurotium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Absidia</i> ; <i>Fusarium</i>	3700000	Финляндия	Lappalainen et al., 1996
Птицеводческая ферма	<i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. oryzae</i> , <i>A. nidulans</i>); <i>Penicillium</i> spp. (<i>P. expansum</i> , <i>P. olivinoviride</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. viridicatum</i>); <i>Botryosporium longibrachiatum</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i>	1000	Литва	Lugauskas et al, 2004
Свиноводческая ферма	<i>Geotrichum candidum</i> ; <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i>); <i>Cladosporium</i> spp. (<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i>); <i>Penicillium</i> spp. (<i>P. viridicatum</i> , <i>P. fellutanum</i>); <i>Mucor circinelloides</i>	1000	Литва	Lugauskas et al, 2004
Фермы по компостированию	<i>Alternaria</i> ; <i>Aspergillus/Penicillium</i> ; Базидиоцпоры; <i>Cladosporium</i>		США, Иллинойс	Hryhorczuk et al., 2001
Свиноводческая ферма	<i>Cladosporium</i> ; <i>Aspergillus</i> / <i>Penicillium</i>	37000	США, Огайо	Adhikari et al, 2004
Птицеводческая ферма	<i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>A. versicolor</i>)	7067	Индия, Дели	Singh, Singh, 1999
Птицеводческая и животноводческая ферма	<i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i>); <i>Alternaria alternata</i> ; <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> ; <i>Absidia</i> <i>blakesleeana</i> ; <i>Penicillium</i> spp. (<i>P. citrinum</i> , <i>P. chrysogenum</i>); <i>Rhizopus nigricans</i>	2226	Индия, Западный Бенгал	Adhikari et al., 2004
Фермы по передержке животных	<i>Cladosporium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Ustilago</i>	2173	Мексика	Rosas et al., 2001

Хранилища:				
Исследованный тип помещения	Доминирующие виды и роды грибов в воздухе помещений	Максимальное количество КОЕ в воздухе КОЕ/м³	Страна, в которой проведено исследование	Авторы исследования
Хранилище зерна	<i>Penicillium spp.</i> (<i>P. viridicatum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. capsulatum</i> , <i>P. palitans</i>); <i>Staphylotrichum coccosporum</i> ; <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. oryzae</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. niger</i>)	1000	Литва	Lugauskas et al, 2004
Винные подвалы	<i>Penicillium</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Aspergillus</i>	2547	Франция	Simeray et al., 2001
Хранилище зерна	<i>Alternaria</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Botrytis</i> ; <i>Helminthosporium</i> ; <i>Syncephalastrum</i> ; <i>Trichothecium</i>	431	Центральная Индия	Jain, 2000
Хранилище	<i>Aspergillus</i> ; <i>Curcularia</i> ; <i>Fusarium</i> ; <i>Rhizopus</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i>		Индия, Западный Бенгал	Chakraborty et al., 2000

Общественные помещения:				
Исследованный тип помещения	Доминирующие виды и роды грибов в воздухе помещений	Максимальное количество КОЕ в воздухе КОЕ/м³	Страна, в которой проведено исследование	Авторы исследования
Школа	<i>Penicillium spp.</i> (<i>P. expansum</i> , <i>P. cyclopium</i>); <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i>)		Литва	Lugauskas et al, 2000
Детский сад	<i>Penicillium spp.</i> (<i>P. cyclopium</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>P. decumbens</i> , <i>P. expansum</i> ,); <i>Alternaria alternata</i> ; <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. fumigatus</i> , <i>A. cervinus</i> , <i>A. niger</i>); <i>Rhizopus stolonifer</i> ; <i>Fusarium moniliforme</i>		Литва	Lugauskas et al, 2000
Кафе	<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Cladosporium herbarum</i> ; <i>Aspergillus spp.</i> (<i>A. fumigatus</i> , <i>A. cervinus</i> , <i>A. niger</i>); <i>Rhizopus stolonifer</i> ; <i>Penicillium spp.</i> (<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i>)		Литва	Lugauskas et al, 2000
Офис	<i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Wallemia</i> ; <i>Cladosporium</i>	300	Германия	Engelhart, Exner, 2002
Офис	<i>Alternaria</i> .; <i>Aspergillus</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i>	1216	Польша	Medrela-Kuder, 2003
Институт	<i>Penicillium chrysogenum</i> ; <i>Cladosporium sp.</i> ; <i>Fusarium sp.</i> ; <i>Stachybotris chartarum</i> ; <i>Aspergillus sp.</i>		США, Техас	Wilson, Straus, 2002
Школа	<i>Cladosporium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Chrysosporium</i>	600	США	Cooley et al., 1998

Школа	<i>Penicillium spp. (P.brevicompectum, P. chrysogenum); Aspergillus spp. (A. glaucus, A. niger, A. versicolor); Cladosporium herbarum</i>	947	США, Иллинойс	Scheff et al., 2000
Офис	<i>Aspergillus sp.; Stachybotris chartarum; Penicillium sp.; Acremonium sp.; Cladosporium sp</i>		США	Shoemaker, House, 2005
Университет	<i>Cladosporium; Aspergillus; Penicillium; Bipolaris; Alternaria; Paecilomyces; Drechslera; Mucor</i>		Кувейт	Khan et al., 1999
Памятники архитектуры (древние церкви)	<i>Aspergillus flavus; Cladosporium sphaerospermum; Fusarium oxysporum; Acremonium; Tritirachium</i>		Италия	Nugari, Roccardi, 2001
Памятники архитектуры (древние церкви)	<i>Cladosporium; Penicillium; Alternaria</i>	178	Италия	Montacutelli et al., 2000
Магазин	<i>Aspergillus; Curvularia; Helminthosporium; Alternaria; Rhizopus; Cladosporium; Fusarium</i>		Индия, Западный Бенгал	Chakraborty et al., 2000
Магазин	<i>Aspergillus; Penicillium; Cladosporium; Fusarium</i>	17205	Индия	Kakde et al., 2001

ющие виды обычно указывают представителей родов *Fusarium*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, но также в различной последовательности. Порядок доминирования, в основном, совпадает с доминированием микроскопических грибов в природной среде, в частности в почвах.

Обычно, в помещениях, доля более теплолюбивых видов, в первую очередь, видов рода *Aspergillus*, совершенно отчетливо увеличивается по сравнению с внешней средой. Причем это наблюдается не только в странах северного и умеренного климатов, но и в тропических и субтропических условиях, где в окружающей среде развивается больше термотолерантных грибов. Так, даже в Индии, в помещениях отмечается увеличение содержания потенциально патогенных видов *Aspergillus*. Значимое повышение (до 3 раз) численности *Aspergillus flavus* было показано в воздушной среде помещений пекарни, птицеводческой фермы, госпиталя по сравнению с таковой во внешней среде. Концентрация таких видов как *A. niger*, *A. versicolor*, *A. sydowi*, *A. japonicus* также обычно была выше внутри помещений, чем вне них (Singh, Singh, 1999).

Содержание опасных видов микроскопических грибов, в первую очередь, видов рода *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*) в воздухе помещений может быть весьма высоко – до 10^4 – 10^7 КОЕ/м³ (Fisher, Dott, 2003).

Имеются и данные об особенностях распределения спор грибов в воздухе внутри помещений. Максимум содержания спор обычно выявляется около пола (на высоте 0,25 м), где доминируют виды рода *Cladosporium*, имеющие более крупные, меланизированные и, следовательно, более тяжелые споры. Сравнительно меньше спор – в середине помещения (на высоте 1,25 м), где доминируют виды *Penicillium*, размер спор которых обычно 2–3 мкм. Увеличение численности спор наблюдается под потолком (на высоте 2–2,5 м), где в наиболее теплом слое воздуха доминируют и наиболее теплолюбивые виды *Aspergillus*, также имеющие мелкие споры (Vajnovich et al., 2001).

Факторы, определяющие состав и содержание микроскопических грибов в помещениях. Такими факторами является занос грибов из внешней среды и экологические условия самих помещений, способствующие развитию грибов.

Занос грибов из внешней среды, скорее всего, является одним из важнейших факторов формирования «микологической среды обитания человека» в помещениях. Грибы часто могут попадать во внутренние помещения из внешней среды из открытых окон и дверей, при вентиляции, отоплении. Установлено, что содержание микроскопических грибов в воздухе помещений хорошо отражает динамику грибных сообществ

во внешней среде за счет заноса грибных диаспор (Ebner et al., 1992; Lehtonen et al., 1993). Это явление меньше выражено в зимний период, а в наибольшей степени проявляется весной, летом, осенью. В эти периоды года прослеживается наиболее четкая корреляция между присутствием грибов во внешней среде и в воздухе помещений по общему разнообразию грибов, их групповому составу. Особенно ясно это выявляется для грибов обитающих на поверхности растений – *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* и т.д., обилие которых к осени обычно возрастает. Характерные сезонные пики присутствия грибов в воздухе могут несколько отличаться в зависимости от географического расположения исследуемого региона. Предполагают, что в наименьшей степени сезонные изменения во внешней среде влияют на содержание постоянно присутствующих в воздухе помещений грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* (Li, Kendrick, 1996). Изменение обилия этих грибов некоторые авторы в большей степени связывают с экологическими условиями самих помещений.

Наиболее крупномасштабное исследование по оценке динамики микроскопических грибов во внешней среде и воздухе внутри зданий было выполнено в течение нескольких лет в различных районах США (Shelton et al., 2002). Определение проводили в воздухе помещений более чем 1 700 зданий и снаружи них. Оценку состава грибов вели преимущественно на родовом уровне, за исключением представителей родов *Aspergillus*, *Stachybotrys*, которых определяли до вида. По результатам исследования численность грибов в воздухе помещений была значительно ниже, чем снаружи. Уровень внутри помещений составлял в среднем около 80 КОЕ/м³, в то время как снаружи зданий более 500 КОЕ/м³. В небольшом числе исследованных помещений концентрация грибных зачатков в воздухе была высока и составила более чем 1 300 КОЕ/м³, а во внешней среде в отдельных вариантах более 3 200 КОЕ/м³. Хотя само содержание грибов могло существенно меняться в разные сроки исследования, тем не менее, соотношение числа грибных зачатков внутри помещений и внешней среде было довольно стабильно.

Подтверждением того, что внешняя среда города имеет большое значение для формирования «микологической среды» в помещениях, могут быть и исследования, выполненные в России. Так, многие виды грибов, постоянно присутствующие в московских городских почвах – *P. chrysogenum*, *Alternaria alternata* и др. (Марфенина и др. 2002), доминируют или часто выделяются и из пыли

московских квартир (Петрова-Никитина и др., 2000). Таким образом, при формировании грибных сообществ в помещениях, большое значение играет занос микроскопических грибов извне. Дальнейшая же стимуляция развития отдельных групп грибов может определяться в зависимости от экологических условий помещения.

Экологические условия самого помещения – режим влажности и температуры, наличие подходящих органических субстратов для развития грибов, газообмен и т.д. – играют важнейшую роль для развития и аккумуляции плесеней. Накопление плесневых грибов в воздухе помещений может, например, определяться тем, что воздух внутри помещений обычно более статичен, на него не воздействует ультрафиолет, он меньше высушивается и хуже заменяется другими воздушными массами.

Практически во всех исследованиях отмечается, что стимуляция развития грибов особенно проявляется во влажных, непрветриваемых условиях (Nielsen et al., 2004; Pessi et al., 2002 и др.). Поэтому случаи плесневого загрязнения особенно часто наблюдаются в ванных комнатах (Anaissie et al., 2003 и др.). Какие же виды грибов, будут развиваться в увлажненных условиях, во многом зависит от температуры помещения. Так, увеличение влажности при пониженных температурах внутри помещений приводит к увеличению присутствия спор грибов рода *Penicillium* (Li, Hsu, 1995), в то время как при повышении температуры – возрастает присутствие грибов рода *Aspergillus* (Vujanovic et al., 2001).

В последние годы дискутируется так называемый «влажный маршрут переноса» микроскопических грибов (Anaissie et al., 2003; Doggett, 2000; Warris, Verweij, 2005). Он подразумевает, что вода, поступающая в водопроводную сеть, может содержать споры потенциально опасных видов, например, аспергиллов. Однако для наличия подобного маршрута существенное значение имеет источник водоснабжения. Если в водораспределительных системах используются грунтовые воды, то они, как правило, не содержат спор грибов. Напротив, поверхностные воды обычно заражены грибными спорами из воздуха и в них может происходить образование биопленок, содержащих грибы. Поступление микроскопических грибов в воздух ванных комнат, кухонь может происходить при разбрызгивании воды или/и с влажных поверхностей, зараженных грибами. В итоге уровень содержания конидий в воздухе этих помещений может быть существенно выше, чем в соседних сухих.

На наш взгляд, загрязнение воздуха во влажных помещениях, скорее, возможно за счет поступления спор с зараженных грибами поверхностей, чем непосредственно из воды. Так как существующие в крупных городах системы очистки воды, обязательно включают эффективные приемы ее обеззараживания: фильтрацию, хлорирование, озонирование и т.п. Важность проблемы и возможные источники «влажного маршрута переноса» требуют дальнейшего уточнения. В частности, стоит исследовать возможность развития грибов в различных участках водораспределительной системы уже после очистки воды.

Важнейшим фактором, определяющим возможность развития грибов в помещениях, является присутствие в них (особенно в больших количествах) предметов, содержащих хорошо разлагаемые грибами субстраты, например, целлюлозу – т.е. книг, бумажных обоев, тканей и др. (Медведева и др., 2002; Beguin, Nolard, 1994; Karunasena et al., 2000; Maggi et al., 2000 и др.).

Активное развитие микроскопических грибов может происходить и на различных поверхностях помещений и зданий. Например, на известковой побелке стен и потолка, на самом известковом камне. Так, на поверхности сооружений из известняка отмечалось развитие таких микроскопических грибов как: *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum*, *Penicillium (P. citrinum, P. chrysogenum, P. expansum, P. purpurogenum)*, *Phoma glomerata*, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum* и др. (Кураков и др., 1999, Буллах, Власов и др., 2005).

Важным фактором, способствующим развитию плесневых грибов, может быть наличие пыли в помещениях (Chao et al., 2001; Nilsson et al., 2004). Увеличению присутствия потенциально опасных грибов, в первую очередь, грибов рода *Aspergillus*, могут способствовать реконструкции зданий, строительные работы, застилка половых покрытий и т.д. То есть все те мероприятия, которые ведут к увеличению запыленности помещений. Особенно четко это было неоднократно продемонстрировано в больничных условиях (Vouza et al., 2002; Yonemori et al., 2002).

Важнейшим вопросом, требующим проведения дальнейших исследований, является определение микологических последствий современных способов конструирования бытовых и производственных помещений. Современные оконные конструкции, при которых смена воз-

духа обычно происходит реже, явно могут способствовать накоплению микроскопических грибов. Использование кондиционеров в таких помещениях не всегда исправляет ситуацию, так как известны случаи развития плесеней внутри систем кондиционирования, в результате чего вместо очищения воздуха происходит нагнетание в помещения спор грибов (Ahearn et al., 1997; Hamada, Fujita, 2002; Simmons et al., 1997). Поэтому работа кондиционеров должна обязательно периодически контролироваться.

Другим важным микологическим аспектом современного устройства жилищ и рабочих помещений является использование различных ковровых покрытий, в которых может происходить аккумуляция, а иногда и развитие плесеней (Beguin, Nolard, 1999, и др.). Так, например, показана связь астматических симптомов с наличием напольных покрытий и ковров (Zock et al., 2002). Это одна из причин, почему в госпитальных условиях не рекомендуется использовать ковровые покрытия (Warris, Verweij, 2005).

Кроме вышеперечисленных источников заражения воздуха установлено, что возможным резервуаром спор, например, потенциально патогенных грибов рода *Aspergillus*, могут быть привнесенные в помещения природные объекты, например, букеты цветов, наличие почвосмесей в горшках комнатных растений и т.п. (Hedayati et al., 2004; Nolard, 1996; Staib, 1991).

В последние годы получены интересные данные о распространении грибов во внутренней среде, связанные с содержанием в помещениях животных. Известно, что разнообразие животных, содержащихся в городских условиях, постоянно увеличивается. При этом возрастает и число питомцев, для которых используются растительная пища и подстилки. С другой стороны, содержание животных в помещениях диктуется необходимостью проведения с ними лабораторных экспериментов в научных целях. В зоологических институтах США было выполнено исследование влияния плесеней на заболеваемость, смертность и размножение крыс, которых сейчас используют и как домашних, и как лабораторных животных. В экспериментах создавали условия влажности и температуры, оптимальные для разведения животных, использовали необходимые для питания растительные субстраты (Wilson, Straus, 2002). Во всех вариантах было выявлено повышенное содержание плесеней в воздухе помещений, где содержались животные. В помещениях, или в закрытых вольерах для крыс, особенно отмечалось распространение вида *Penicillium chrysogenum*, со-

держание которого в воздухе было существенно выше (350 КОЕ/м³), чем во внешней среде. В открытых вольерах отмечался более высокий уровень грибов рода *Cladosporium*. Возможно, такое активное накопление плесеней связано с использованием соломы в виде подстилок для животных. Важно отметить, что авторы прослеживают связь между высоким уровнем распространения *P. chrysogenum* и ухудшением здоровья крыс. Как результат работы указывается необходимость сбора данных о составе и численности микроскопических грибов при содержании и разведении различных животных.

Значение не только самих микроорганизмов, но и их метаболитов. Проблему влияния микроскопических грибов на здоровье человека связывают не только с действием грибных зачатков как аллергенов или возбудителей микозов, но и с негативным влиянием на людей грибных метаболитов. При этом обычно имеют ввиду, не поступающие с пищей метаболиты грибов, которые могут вызвать микотоксикозы, а продуцируемые грибами летучие органические соединения (fungal volatile organic compounds – FVOC) (Larsen, Frisvad, 1995, и др.). Летучие микотоксины – это низкомолекулярные вещества – спирты, кетоны, альдегиды, которые могут образовываться в процессах первичного и вторичного метаболизма. Подобные соединения могут быть токсичны для человека, они присутствуют в грибных спорах и, следовательно, могут содержаться в аэрозолях и пыли. Особенно подчеркивается важность присутствия в воздухе таких опасных для здоровья человека токсинов как: афлатоксины, охратоксин, патулин, трихотецины и др. Летучие микотоксины вызывают такие нежелательные эффекты как головная боль, поражение глаз, слизистых оболочек носа, горла и т.д. Известны случаи острой почечной недостаточности, вызванной охратоксином, влияние на центральную нервную систему могут оказывать треморгенные микотоксины, воздействие на дыхательную систему – токсины *Stachybotrys chartarum* и т.д. Действие микотоксинов может проявляться как при попадании спор токсинообразующих грибов к человеку, например, в бронхи и альвеолы, так доказано и прямое действие микотоксинов при вдыхании. Наибольшие концентрации в воздухе токсинов (афлатоксинов) наблюдались на участках переработки сельскохозяйственных растений: кукурузы, арахиса, зерновых культур. При этом максимальное содержание афлатоксинов

(250–400 нг/г пыли) выявлено в пыли арахиса. Следует однако отметить, что окончательный эффект летучих метаболитов для здоровья людей трудно предсказать, так как сложно определить время действия микотоксинов и их дозу (Fisher, Dott, 2003).

В последнее десятилетие особое внимание уделяется микотоксическим свойствам микроскопического гриба *Stachybotrys chartarum* (Wilson et al., 2004). Этот гриб хорошо развивается на целлюлозе и широко встречается как на природных (почве, растительных остатках, соломе, сене, зерне и т.д.), так и на неприродных (бумаге, гипсе, коврах, пыли, и т.д.) субстратах (Gams et al., 1993). *S. chartarum* способен продуцировать высоко токсичные метаболиты трихотециновой группы. Эти токсины расцениваются как одни из наиболее опасных, т.к. они могут вызывать повреждение легких и гематологические заболевания. Попадание микотоксинов в организм человека возможно как в результате вдыхания спор, так и при контакте гриба с кожей. Такие пути поступления, например, предполагаются для трихотецина. В настоящее время, наиболее четко показана возможность накопления токсинов в помещениях в случаях развития *S. chartarum* (McGinnis, 2004).

Следует отметить, что присутствие видов, известных как продуценты микотоксинов, отнюдь не указывает на то, что микотоксины непременно образовывались. С другой стороны, имеются сведения, что летучие микотоксины могут сохраняться в среде уже после отмирания грибов-продуцентов (Tuomi et al., 2000).

Возможность продуцировать микотоксины может отличаться у различных штаммов одного и того же вида. Например, приблизительно 1/3 штаммов *S. chartarum* может не продуцировать, типичный для этого вида сатратоксин. Кроме того, необходимо иметь в виду, что процесс образования микотоксинов отличается у штаммов одного вида и может существенно зависеть от экологических факторов среды обитания токсинообразующих грибов: типа субстрата, влажности, температуры, содержания кислорода и углекислого газа, влияния других микроорганизмов и т.д. (Ominski et al., 1997). Поэтому устанавливать прямые связи между выделением видов, для штаммов которых известны микотоксичные свойства и возрастанием уровня экологической опасности, представляется не совсем корректным. Однако увеличение содержания видов, уже известных

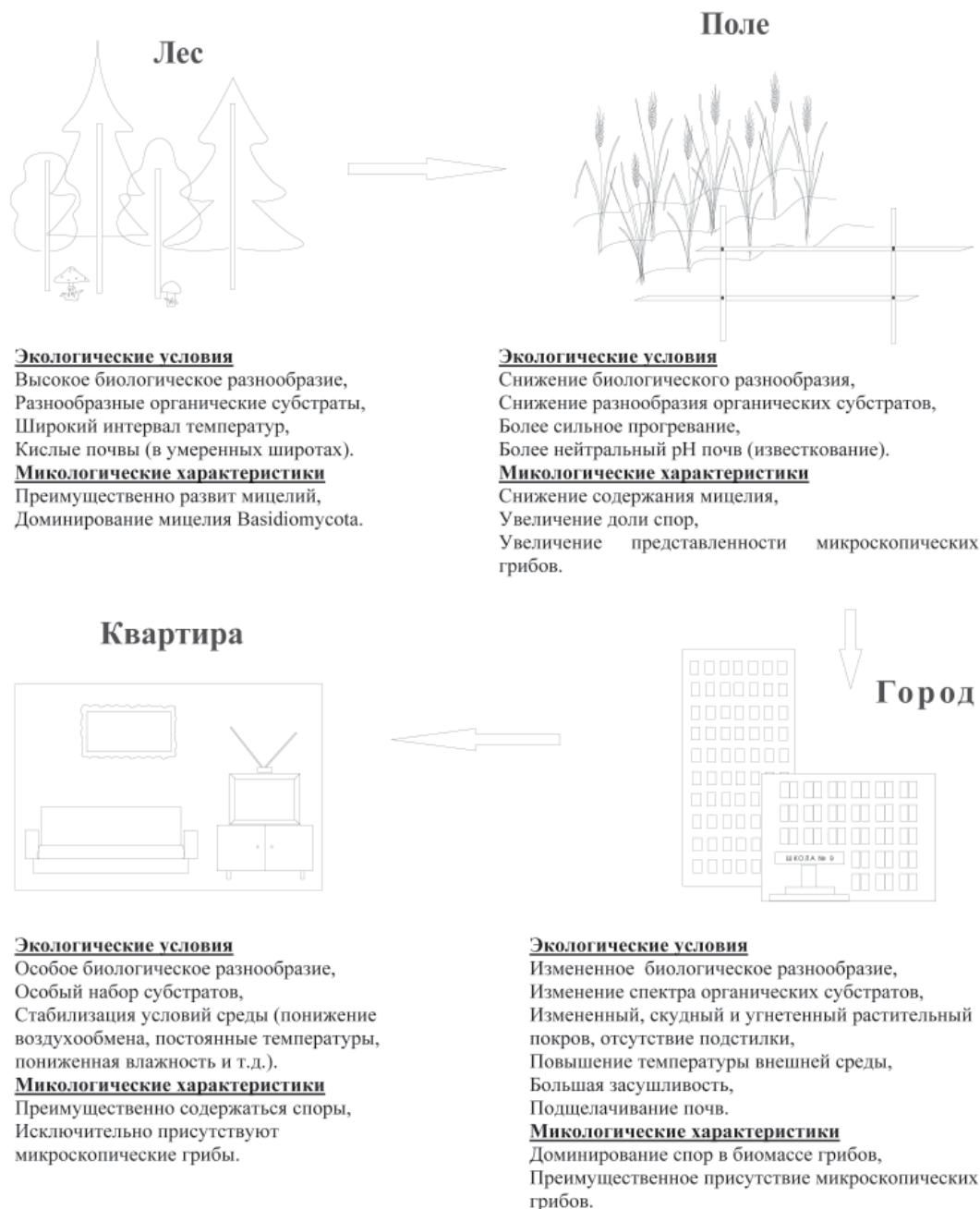


Рис. 2. Изменение ряда экологических условий и микологических свойств среды обитания человека в результате антропогенных преобразований

как микотоксичные, в антропогенных экосистемах, особенно в городских условиях, и установленная для ряда выделенных из антропогенных местообитаний штаммов возможность продуцировать значительные количества микотоксинов, дают основания полагать, что в совокупности эти явления могут иметь экотоксикологическое значение.

Общие тенденции изменения распространения потенциально патогенных грибов при преобразовании человеком среды его обитания. Анализируя, в целом, современные тенденции изменения биосферы и среды обитания человека с позиций медицинской микологии, можно прийти к весьма настораживающим выводам. Формируя среду своего обитания,

человек сам создает условия, благоприятные для развития потенциально опасных для него грибов. Это хорошо прослеживается при анализе микологических последствий изменения окружающей среды в результате хозяйственной деятельности человека. Рассмотрим основные тенденции изменений экологических условий и микологических характеристик, происходящие при изменении среды обитания человека в ряду лес→поле→город→квартира (Рис. 2).

Для ненарушенных экосистем умеренных широт характерны такие экологические условия как сравнительно высокое биоразнообразие, наличие различных органических субстратов, широкие колебания температур, кислые почвы и т.д. В лесных условиях обычно доминируют базидиальные грибы, а в лесных подстилках и почвах имеются огромные запасы грибной биомассы, преимущественно в виде мицелия (Звягинцев, Зенова, 2005; Dighton, 2003 и др.). В результате сведения лесов, разрушения подстилки, сельскохозяйственного использования земель, происходит снижение разнообразия организмов, разнообразия органических субстратов, изменение температурных режимов. Почвы в результате известкования становятся менее кислыми. В полевых условиях происходит снижение присутствия базидиальных грибов, изменяется состав доминирующих микроскопических грибов, снижается содержание мицелия в почвах, но возрастает доля грибных спор легко распространяемых воздушным путем (Великанов, 1997; Марфенина, 2005; Полянская, 1996, и др.). Кроме того, многие грибы, развивающиеся на занимающих обширные территории сельскохозяйственных растениях, например виды рода *Fusarium*, могут быть опасны и для человека.

Наиболее серьезные изменения экологических условий, по сравнению с природными, наблюдаются в городской среде. В городе изменено биологическое разнообразие растительного и животного мира, растительный покров угнетен, отсутствует подстилка, изменен спектр поступающих органических субстратов, климатические условия более аридные, более нейтральный или щелочной pH почв. В городах в почвах содержание мицелия снижено, грибы преимущественно присутствуют в виде спор, причем, в результате элиминирования базидиальных грибов, доля микроскопических грибов может быть существенно выше, чем в природных условиях (Марфенина и др., 2002).

Еще более оптимальными для развития плесеней условиями, могут обладать жилища

человека. В помещениях, на различных покрытиях (включающих доступные для грибов питательные вещества), при постоянно повышенных температурах, пониженном воздухообмене, в отсутствие природных микробных антагонистов, а особенно при повышенной влажности, плесневые грибы могут весьма хорошо развиваться. В результате, «грибная среда» обитания человека в различных жилых и производственных помещениях, представлена спорами микроскопических грибов, многие из которых могут быть для него опасны. С учетом длительности времени, которое люди проводят в помещениях, а также новых конструкций (систем кондиционеров, герметизированных окон, ковровых покрытий и др.), возможность отбора и развития опасных для человека групп грибов в местах его проживания может увеличиваться.

Подобные тенденции могут касаться и глобальных климатических изменений. Реально предположить, что важными для распространения вторичных микозов экологическими факторами могут быть современные тенденции изменения климата, а именно, его возможное потепление, способное приводить к отбору видов, имеющих более высокие температурные оптимумы роста. За последние 100 лет, в ряде регионов России произошел рост среднегодовой температуры на 3–4°C и эти тенденции сохраняются. В результате потепления климата ожидается рост количества осадков, расширение площадей заболоченных земель и увеличение числа подтопленных населенных пунктов (Анисимов, Поляков, 1999). То есть в будущем прогнозируются условия более благоприятные для развития потенциально опасных грибов.

Потепление климата уже расценивается как фактор риска развития ряда инфекционных заболеваний. В ряде стран (Чехия, Швеция, Япония) показано перемещение ареала возбудителей и переносчиков некоторых заболеваний (например, клещевого энцефалита) на север в связи с повышением температуры и увеличением плотности популяций (Ревич, 2005).

Что можно расценивать как микологическую (плесневую) опасность. Подходы к оценке рисков. Оценка рисков для человека при биологическом загрязнении окружающей среды является одной из важнейших современных проблем экологии человека. «Риск» обычно рассматривают как количественную меру той или иной опасности. В свою очередь «опасность» – это ситуация в окружающей человека среде, при которой в определенных условиях возможно

возникновение факторов, способных привести к ухудшению здоровья человека и состояния окружающей среды (Экологический., 1999). Итогом исследования проблемы того или иного риска должно быть управление риском, предусматривающее выбор и использование мер для его уменьшения.

При оценке степени риска в случае распространения потенциально опасных для человека микроскопических грибов однозначный ответ в настоящее время затруднен. Это определяется и недостаточностью данных, и отсутствием точных фактов о причинно-следственных взаимодействиях. То есть до сих пор не было показано наличие четкой реакции «доза-эффект» в зависимости от содержания спор определенных грибов в воздухе и влиянием на здоровье человека (Abba, 2004).

Однако можно привести ряд примеров, в которых авторы прослеживают связи между присутствием потенциально опасных плесеней и здоровьем. Эти данные преимущественно получены при анализе распространения заболеваний микогенными аллергиями или микотоксикозами. Так, в помещениях, где проживали больные бронхиальной астмой, имеющие положительную реакцию на грибные аллергены, число спор (виды родов *Penicillium*, *Aspergillus*) в воздухе было до 40 раз выше, чем снаружи зданий (Fisher, Dott, 2003). Некоторые авторы прослеживают связь «синдрома больных зданий» с высоким (350 КОЕ/м³) присутствием грибов, вызывающих аллергические заболевания, например, *P. chrysogenum* (McGrath et al., 1999).

Наибольшая концентрация спор в образцах воздуха была обнаружена в зданиях, где имелся визуально определяемый рост грибов, а также в зданиях, жители которых жаловались на состояние здоровья. При этом важно, что в помещениях, где были больные пневмонией, присутствие грибов было выше (Shelton et al., 2002).

В крупномасштабном обследовании около 20 тысяч больных астмой из 18 стран Европы, США, Австралии была показана связь симптомов астмы и аллергической реакции бронхов на проживание человека в плесневой среде. В опросных анкетах описывалась детальная характеристика места проживания больных (данные о типе дома, времени его постройки, способах обогрева, вентиляционных системах, наличии двойных окон, половых покрытиях, наличии протечек и визуально определяемых местах развития плесени, плесневого запаха) и возможная связь пле-

сений и симптомов астмы. В наибольшей степени плесневый рост выявлялся в старых домах и в помещениях с протечками. Констатируется, что развитие плесеней в помещениях имеет неблагоприятный эффект для больных астмой, и чем интенсивнее рост плесеней, тем сильнее выражены симптомы астмы. Наиболее отчетлив был ответ у больных, сенсibilизированных к домашним клещам (Zock et al., 2002).

Имеются попытки расчета риска негативного воздействия на здоровье человека грибов, образующих летучие микотоксины. Показано, что при определенном уровне содержания в воздухе спор *S. chartarum*, (которые могут содержать сапратоксин), в результате их вдыхания у людей могут наблюдаться микотоксикозы (American., 2003).

Только в некоторых работах (например, Platt et al., 1990) сделаны попытки найти статистические зависимости между содержанием грибных спор в помещениях и наличием симптомов заболеваний.

Каков же может быть безопасный уровень присутствия плесеней в среде обитания человека? В мировой практике на этот вопрос пока нет четких ответов. Как один из возможных показателей предлагается порог содержания грибов в 500 КОЕ/м³ в воздухе, в сочетании с длительным пребыванием в помещениях (Gots et al., 2003, цитата по Tovey, Green, 2005). В свою очередь, приведенные нами данные (Таб. 1, 2) показывают необходимость дифференцированного расчета подобных показателей в зависимости от типа использования помещений и состояния пребывающих в них людей. Для людей с пониженным иммунным статусом, находящихся на лечении в госпиталях, есть риск возможности заболевания вторичными микозами даже при низких уровнях содержания грибов в окружающей среде. Есть мнения, что в определенных ситуациях опасно присутствие любых микроскопических грибов в помещениях. Предполагают, что для больных с пониженным иммунным статусом может быть опасным уровень присутствия даже 10 КОЕ/м³ термотолерантных аспергиллов (Denping, 1996), так как именно в случае развития аспергиллезов отмечается высокий уровень летальности. В качестве профилактических мер для максимальной очистки от грибных зачатков, с целью предотвращения экспозиции иммунодефицитных больных, предлагают устанавливать специальные системы фильтрации воздуха (Warris, Verweij, 2005).

Для здоровых людей, уровень содержания микроскопических грибов в окружающей среде явно может быть существенно выше. Скорее всего, он может составлять (если основную массу не составляют потенциально опасные грибы) сотни КОЕ/м³. В первую очередь, попытки определения возможного риска и расчеты допустимого содержания должны быть выполнены для госпиталей и предприятий, на которых в силу специфики производства имеется высокий уровень заспоренности среды. Вполне очевидно, что содержание спор в воздухе предприятий численностью несколько тысяч КОЕ/м³ не может быть безопасным для человека. Широкий набор аллер-

Таблица 3
Производства, на которых регистрируется
аллергический альвеолит и его возбудители
(по Hawksworth et al. 1995)

Производства	Возбудитель
Фермы	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Eurotium rubrum</i>
Сыроварни	<i>Penicillium casei</i>
Пивоварни	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>
Пробковые фабрики	<i>Penicillium glabrum</i>
Лесопилки	<i>Rhizopus rhizopodiformis</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Trichoderma viride</i>
Грибоводческие теплицы	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pholiotanameko</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i>
Предприятия по производству лимонной кислоты	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium spp.</i>

гических заболеваний, связанный с пребыванием персонала в среде с высоким содержанием грибных спор, был описан для многих профессий в сельском и лесном хозяйстве, пищевой промышленности. Критическим фактором для заболеваний может быть высокий уровень концентрации грибных спор и длительный период пребывания работающих (Lacey, Dutkiewicz, 1994). Такими производствами являются предприятия по переработке различного растительного сырья, которое может быть сильно обсеменено грибами, например, это мукомольные фабрики, сыродельни, предприятия по переработке коры и др., а также

места складирования растительной продукции (Таб. 2).

Примеры респираторных заболеваний, предположительно вызванных грибными биоаэрозолями, были показаны и для рабочих мусоросортировочных заводов, станций бытовых стоков и т.п. (Poulsen et al., 1995 и др.).

Поскольку, как указывалось выше, особо опасные мицелиальные грибы (группа возбудителей BSL3) обитающие в природных условиях, не распространены на территории России, то наибольший интерес для отечественных медицинских микологов представляет распространение грибов-возбудителей глубоких микозов, относимых к следующей по значимости группе патогенности BSL2. К этим грибам относят виды рода *Aspergillus*, для ряда которых (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*), одновременно показаны и патогенные, и микотоксичные, и аллергенные свойства. Например, высокий процент присутствия грибных спор грибов рода *Aspergillus* – *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* в воздухе клиник предлагают оценивать, как опасную ситуацию по возможности заболевания микозами для многих категорий больных (Perfect, Schell, 1996).

При расчете возможного риска важнейшими факторами должны быть и экологические условия среды. В настоящее время имеются попытки оценки риска заболеваний микозами и экологическими условиями, способствующими распространению в природе возбудителей заболеваний. Было показано, что в Бразилии уровень заболеваемости одним из тяжелых микозов – паракoccидиоидозом (возбудитель *Paracoccidioides brasiliensis*), был выше на территориях, расположенных на суглинистых почвах с высоким уровнем увлажнения. Эти условия, видимо, способствовали развитию и сохранению возбудителя, что, к сожалению, одновременно не проверялось. Предполагается, что антропогенные факторы, способствующие накоплению влаги (уплотнение почв при выпасе) и улучшение почвенной структуры (сельскохозяйственное использование почв) могут даже увеличивать риск инфекции (Simoes et al., 2004). Совместные работы микологов-экологов и медицинских микологов, безусловно, способствовали бы более четкой постановке исследований и результативному решению этой проблемы в целях снижения риска заболевания.

Наиболее важными факторами плесневого риска считают высокий уровень влажности среды и повышенные температуры. Многократно

Таблица 4

Возможные последствия воздействия ряда экологических факторов, характерных для среды обитания человека, на развитие потенциально опасных микроскопических грибов

Внешняя среда		
Характер воздействия	Эффект	Фактор риска
В городах повышенная температура, более засушливые условия	Возрастание доли опасных видов рода <i>Aspergillus</i> (<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i>)	Увеличение распространения вторичных микозов, микотоксикозов
Повышение концентраций загрязняющих веществ (радионуклидов, тяжелых металлов и др.) в окружающей среде	Сохранение резистентных, темноокрашенных видов – <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium spp.</i> и др.	Увеличение микотических аллергий
Наличие свалок, территорий компостирования	Развитие термотолерантных видов <i>Aspergillus</i> (<i>A. fumigatus</i>), <i>Paecilomyces</i> (<i>P. variotii</i>)	Увеличение распространения вторичных микозов, микотоксикозов
Загрязнение почв города кератин-содержащими субстратами (волосы, шерсть, перья)	Аккумуляция и сохранение в окружающей среде геофильных дерматомицетов	Увеличение заболевания микозами кожи
Внутренняя среда (помещения)		
Характер воздействия	Эффект	Фактор риска
Отсутствие смены воздуха, повышенные стабильные температуры	Возможность развития многих микроскопических грибов, при наличии подходящих субстратов	Вторичные микозы, микотические аллергии, микотоксикозы
Протечки в помещениях	Развитие <i>Alternaria alternata</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Penicillium spp.</i>	микотические аллергии, микотоксикозы
Наличие гриборазрушаемых субстратов (обои, ткани, пластмассы и др.)	Развитие <i>Aspergillus</i> (<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> и др.), <i>Penicillium spp.</i> , темноокрашенных грибов <i>Alternaria alternata</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>	микотические аллергии, микотоксикозы
Ковровые покрытия, аккумуляция пыли	Развитие <i>Penicillium spp.</i> , <i>Eurotium spp.</i> , <i>Cladosporium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	микотические аллергии, микотоксикозы
Ванные комнаты (повышенная влажность и температура)	Возможность развития многих микроскопических грибов в более влажных и теплых условиях (виды родов <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> и др.)	Вторичные микозы, микотические аллергии, микотоксикозы
Реконструкция зданий	Увеличение запыленности, приток спор грибов в воздух помещений	Вторичные микозы, микотические аллергии

показано, что увеличение влажности в помещениях приводит к развитию плесневых грибов и, как следствие, возможности возникновения заболеваний связанных с их присутствием (Perfect, Schell, 1996, и др.).

В таблице 4 мы попытались представить далеко не полный список, известных на

настоящий момент сведений, об экологических факторах, способствующих развитию и накоплению потенциально опасных видов плесеней во внешней среде и в помещениях. Как указывалось выше, накопление опасных грибов во внешней среде увеличивает и риск их поступления в помещения (Shelton et al., 2002).

Некоторые факторы «плесневого риска» характерны преимущественно для помещений. Так, летучие микотоксины могут оказать воздействие на человека, прежде всего при развитии плесневых грибов в замкнутом пространстве. Возможность поступления таких веществ к человеку не отрицают и для природной среды, но очевидно, что вероятность таких поступлений в открытом пространстве намного ниже. К сожалению, ни по содержанию грибов, ни для уровня продуцируемых ими аллергенов и микотоксинов до сих пор нет четких стандартов. Поэтому и в этом случае интенсивный рост микроскопических грибов в помещениях, а в определенных ситуациях и во внешней среде, рекомендуют уже расценивать как опасность (Fisher, Dott, 2003).

Одним из ключевых аспектов проблемы оценки плесневой опасности остается вопрос – насколько грибные изоляты из окружающей среды могут быть опасны для человека? То есть об уровне патогенности для человека оппортунистических грибов, обитающих во внешней среде. Первые работы в этом направлении уже выполнены на лабораторных животных, например, для широко распространенного в окружающей среде (на растениях, в почвах, в воздухе) гриба *Fusarium solani*. Для группы мышей двух генетических линий, одна из которых была иммунодефицитной, было показано, что заражение животных конидиями почвообитающих штаммов этого гриба даже в высоких дозах (10^7 конидий на особь), первоначально не ведет к негативным эффектам. Однако двукратное заражение более низкими дозами, или повторное заражение убитыми спорами, вызывает нарушение защитных функций у животных и приводит к их гибели (смертность 30-85% в зависимости от генетической линии животных и штаммов гриба). Важно отметить, что и патогенность почвенных штаммов возрастала при пассировании через организм животных. То есть пребывание в среде обсемененной спорами потенциально патогенных грибов представляет выраженную опасность (Sugiura et al., 2003).

Таким образом, важнейшими факторами в решении вопросов опасности плесеней для человека является уровень присутствия и состав грибов, состояние здоровья населения, тенденции изменения экологических условий среды. На настоящий момент трудно сказать, какой из этих факторов является определяющим, или, скорее всего, их значимость может меняться в зависимости от конкретной ситуации. И хотя плотность распространения потенциально патогенных плесеней вокруг нас и возможность заболеваний оп-

портунистическими микозами не подчиняются прямым зависимостям, тем не менее, оценивая опасность или безопасность окружающей среды и риск грибных заболеваний необходимо учитывать: сколько? каких? обладающих какими потенциально опасными свойствами? грибов может в ней присутствовать, а также где? и когда? они могут развиваться, сохраняться и инфицировать человека.

Важнейшей стратегией контроля и снижения риска различных, вызываемых грибами заболеваний должна быть их профилактика. В этих целях необходимо дальнейшее получение данных о природных резервуарах опасных грибов, условий их развития в природе и антропогенных условиях, путей поступления к человеку. Такими областями пристального внимания микологов во внешней среде, в первую очередь, должны быть южные регионы, а в северных и умеренных широтах – городская среда. Одновременно следует понимать, что преобразуя природную среду и создавая условия проживания соответствующие собственному экологическому оптимуму, человек часто формирует условия, во многом способствующие и увеличению присутствия потенциально патогенных грибов в среде его обитания. Создание наиболее комфортных для человека условий (температура, уровень влажности, состав воздуха, создаваемый отоплением, кондиционированием, вентиляцией и т.п.), в местах проживания и работы не всегда может быть экологически (микологически) для него безопасно. Вопросы микологического контроля и регулирования качества «микологической среды» обитания человека, в целях снижения риска заболеваний – одно из важнейших перспективных направлений совместных исследований экологической и медицинской микологии в XXI веке.

Литература

1. Анисимов О.А., Поляков В.Ю. К прогнозу изменения температуры воздуха для первой четверти XXI столетия // Метеорология и гидрология. 1999. №2. С.25–31.
2. Антропова А.Б., Биланенко Е.Н., Мокеева В.Л., Чекунова Л.Н., Петрова-Никитина А.Д., Желтикова Т.М. Микобиота жилых помещений г. Москвы // Проблемы медицинской микологии. 2004. Т.6. №2. С.58.
3. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. Санкт-Петербург. Издательский дом СПбМАПО. 2004. 186 с.

4. *Асланиди К.Б., Иванова А.Е., Блажеевская Ю.В., Жданова Н.Н., Белозеркая Т.А.* Резистентность микроскопических грибов к окислительному стрессу // Доклады АН. 2003. Т.392. №1. С.119-122.
5. *Беспалова А.Ю., Марфенина О.Е., Мотузова Г.В.* Сообщества микроскопических грибов в фоновых и загрязненных альфегумусовых подзолах и их воздействие на активность меди // Почвоведение. 2006. №2. С.228-236.
6. *Богомолова Т.С., Васильева Н.В., Горшкова Г.И.* Микобиота некоторых жилых помещений в г. Санкт-Петербурге и Ленинградской области // Проблемы медицинской микологии. 1999. №3. С.41-43.
7. *Булах А.Г., Власов Д.Ю., Золотарев А.А.* и др. Экспертиза камня в памятниках архитектуры. Основы, методы, примеры. Санкт-Петербург. Нука. 2005. 198с.
8. *Васильев О.Д., Гошк В.Г., Семенова В.В., Шарко Б.Н.* Микологическое исследование воздушной среды деревообрабатывающего предприятия // Проблемы медицинской микологии. 2003. Т.5. №2. С.72.
9. *Веденяпина Е.Г., Лебедева Е.В., Архипченко И.А., Марков Г.С.* Микромицеты в переработке отходов / Грибы в природных и антропогенных экосистемах. Труды международной конференции, посвященной 100-летию начала работы профессора А.С. Бондарцева в ботаническом институте им В.Л. Комарова РАН. Санкт-Петербург, 24-28 апреля 2005. Т.1. С.98-104.
10. *Великанов Л.Л.* Роль грибов в формировании мико- и микробиоты почв естественных и нарушенных биоценозов и агроэкосистем: Дисс.... д-ра биол. наук. М., 1997. 547с.
11. *Вольпе И.М., Кучеренко В.Д.* Практическое руководство по санитарной микробиологии. М. Изд-во Московского Ун-та. 1970. 148с.
12. *Елинов Н.П.* Краткий микологический словарь. Санкт-Петербург. МЕДЕМ. 2004. 174с.
13. *Елинов Н.П.* Токсигенные грибы в патологии человека // Проблемы медицинской микологии. 2002. Т.4. N 4.
14. *Жданова Н.Н., Васильевская А.И.* Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях. Киев: Наукова думка, 1988. 196с.
15. *Зачиняева А.В., Лебедева Е.В., Ярмишко М.А., Румянцова А.В.* Микологическая индикация почв Череповецкого промышленного района // Микология и фитопатология. 2006. Т. 40. Вып. 1. С.39-46.
16. *Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М.* Биология почв. М.: Издательство Московского Университета. 2005. 445 с.
17. *Киреева Н.А., Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф.* Изменение видового разнообразия микромицетов нефтезагрязненных почв при биоремедиации // Микология и фитопатология. 2006. Т. 40. Вып. 1. С.37-52.
18. *Ковзель Е.Ф., Соболев А.В., Митрофанов В.С.* Характер микогенной сенсбилизации у больных бронхиальной астмой, проживающих в Новгородской области // Проблемы медицинской микологии. 2003. Т.5. №3 С.17-20.
19. *Кулько А.Б., Марфенина О.Е.* Распространение микроскопических грибов в придорожных зонах городских автомагистралей // Микробиология. 2001. Т.70. №5 С.709-713.
20. *Кулько А.Б., Марфенина О.Е.* Особенности видового состава микроскопических грибов в снеговом покрове городской среды // Микробиология. 1998. Т.67. №4. С.569-572.
21. *Кураков А.В., Сомова Н.Г., Ивановский Р.Н.* Микромицеты – обитатели поверхности белокаменных и кирпичных сооружений Новодевичьего монастыря // Микробиология. 1999. Т.68. №2. С.291-300.
22. *Курсанов Л.И., Комарницкий Н.А.* Курс низших растений. М.: Советская наука. 1945. 488с.
23. *Лихачев А.Н.* Оппортунистическая микобиота помещений / Успехи медицинской микологии. Т.1. С.194-195.
24. *Марфенина О.Е.* Антропогенная экология почвенных грибов. 2005. М. Медицина для всех. 195с.
25. *Марфенина О.Е.* Изменение комплекса грибов рода *Penicillium* в почвах подзолистой зоны при антропогенных воздействиях // Микология и фитопатология. 2000. Т.34. Вып.4. С.38-42.
26. *Марфенина О.Е.* Опасные плесени в окружающей среде // Природа. 2002. №11. С.33-38.
27. *Марфенина О.Е., Кулько А.Б., Иванова А.Е., Согонов М.В.* Микроскопические грибы во внешней среде города // Микология и фитопатология. 2002. Т.36. Вып.4. С.22-32.
28. *Марфенина О.Е., Фомичева Г.М.* Эволюция терморегуляции у животных и патогенные свойства грибов. Проблемы медицинской микологии. 2005. Т.7. №2. С. 106.
29. *Медведева Н.Г., Никитина И.П., Апанасевич Н.В.* Методы и средства борьбы с биоповреждениями книжных фондов (из опыта Библиотеки РАН) // Проблемы медицинской микологии. 2002. Т.4. №2. С.70.
30. *Мирчинк Т.Г.* Почвенная микология. М.: Изд-во МГУ, 1988. 220с.
31. *Мюллер Э., Леффлер В.* Микология. М.: Мир, 1995. 343с.
32. *Озерская С.М.* Таксономическое разнообразие патогенных грибов / Медицинская микология. 2006 (в печати).

33. Петрова-Никитина А.Д., Мокеева В.Л., Желтикова Т.М., Чекунова Л.Н., Антропова А.Б., Мокроносова М.А., Биланенко Е.Н., Сизова Т.П. Микобиота домашней пыли г. Москвы // Микология и фитопатология. 2000. Т.34. Вып.3. С.25-33.
34. Полянская Л. М. Микробная сукцессия в почве: Дисс.... д-ра биол. наук. М., 1996. 96с.
35. Почва, город, экология / Под общ. ред. Г.В. Добровольского. М.: Фонд «За экономическую грамотность», 1997. 320с.
36. Ревич Б.А. Изменение климата и угроза здоровью населения России. Россия в окружающем мире: 2004. Аналитический ежегодник. Под ред. Марфенина Н.Н., Степанова С.А.. М. МОДУС-К – ЭТЕРНА. 2005. С.62-80.
37. Рыжский Д.В., Еланский С.Н. Мониторинг содержания спор грибов в приземном воздухе Москвы / Успехи медицинской микологии. 2003. Т.1. С.209-210.
38. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника, лечение. М: Триада-Х. 2001. 472с.
39. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: Бином. 2003. 440с.
40. Терехова В.А. Биоиндикационное значение микромицетов в экологической оценке водных и наземных экосистем. Автореферат дисс. д-ра биол. наук. Москва. МГУ. 2004. 48с.
41. Хуснарязанова Р.Ф., Гимранова Г.Г., Тихонова Т.Н. Заболеваемость микозами рабочих нефтедобывающей промышленности // Проблемы медицинской микологии. 2000. Т.2. №2. С.47-48.
42. Экологический энциклопедический словарь. Под ред. В.И.Данилова-Данельяна и др. М.: Издательский дом «Ноосфера». 1999. 930с.
43. Abba I.T. Are indoor molds causing new diseases? // J. Allergy Clin. Immunol. 2004. February. P.221-226.
44. Adhikari A., Reponen T., Lee S.A., Grinshpun S.A. Assessment of human exposure to airborne fungi in agricultural confinements: personal inhalable sampling versus stationary sampling // Ann Agric Environ Med. 2004. 11. P.269-277.
45. Adhikari A., Sen M.M., Gupta-Bhattacharya S., Chanda S. Incidence of allergenically significant fungal aerosol in a rural bakery of West Bengal, India // Mycopathologia. 2000. 149. P.35-45.
46. Adhikari A., Sen M.M., Gupta-Bhattacharya S., Chanda S. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed // Environment International. 2004. 29. P.1071- 1078.
47. Ahearn D.G., Crow S.A., Simmons R.B., Price D.L., Mishra S.K., Pierson D.L. Fungal Colonization of air filters and insulation in a multi-story office building: production of volatile organics // Current Microbiology. 1997. V.35. P.305-308.
48. Al-Suwaine A.S., Bahkali A.H., Hasnain S.M. Seasonal incidence of airborne fungal allergens in Riyadh, Saudi Arabia // Mycopathologia. 1999. 145. P.15-22.
49. American College of Occupational and Environmental Medicine (2003). [Http://www.acoem.org/guidelines/article.asp?ID=52](http://www.acoem.org/guidelines/article.asp?ID=52).
50. Anaissie E.J., Stratton S.L., Dignani M.C., Lee C., Summerbell R.C., Rex J.H., Monson T.P., Walsh T.J. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies // Blood. 2003. V.101. N.7. P.2542-2546.
51. Atrup J.L., Schmidt J., Seremet T. et al. Determination of exposure of aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B1 adducts to serum albumin. Scandinavian Journal of Work and Environmental Health. 1991. V.17. P.436-440.
52. Bagagli E., Franco M., Bosco S.M.G et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study // Med. Mycol. 2003. 41. P.217-223.
53. Barui N.C., Chanda S. Aeromycoflora in the Central Milk Dairy of Calcutta, India // Aerobiologia. 2000. 16. P.367-372.
54. Baumgardner D.J., Summerbell R., Krajden S. et al. Attempted isolation of *Blastomyces dermatitidis* from native shrews in northern Wisconsin, USA // Medical Mycology, August 2005. 43. P.413-416.
55. Boffa T., Staib F., Fisher J. Lott, Lyon P.F., Gutowski P., Marfenina O.E., Dunoyer-Geindre S., Georgen F., Roch-Susuki R., Gallaz L., Latge J.-P. Mycological control and surveillance of biological waste and compost // Medical Mycology. 1998. V. 36. S.1. P.137-145.
56. Beguin H., Nolard N. Relationship between mycobiota in wall-to-wall carpet dust and age of carpet // Aerobiologia. 1999. 15. P.299-306.
57. Bornehag C.G., Blomquist G., Gyntelberg F., Jarvholm B., Malmberg P., Nordvall L., Nielsen A., Pershagen G., Sundell J. Dampness in buildings and health. Nordic interdisciplinary review of the scientific evidence on associations between exposure to «dampness» in buildings and health effects // Indoor Air. 2001. 11. 2. P.72-86.
58. Bouza E., Pelaez T., Perez-Molina J., Marin M., Alcalá L., Padilla B., Muñoz P. Demolition of a hospital building by controlled explosion: the impact on filamentous fungal load in internal and external air // Journal of Hospital Infection. 2002. 52. P.234-242.
59. Bush R.K., Portnoy J.M. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases // J Allergy Clin. Immunol. 2001. V. 107. P.430-440.

60. *Butler M.J., Day A.W.* Fungal melanins: A review. *Canadian Journal Microbiology*. 1998. V.44. P.1115-1136.
61. *Carinanos P., Galan C., Alcazar P., Dominguez E.* Diurnal variation of biological and non-biological particles in the atmosphere of Cordoba, Spain // *Aerobiologia*. 1999. 15. P.177-182.
62. *Carlile M. J., Watkinson S.C., Gooday G.W.* *The Fungi*. 2nd Ed. Academic press. San Diego. San Francisco. New York. Boston. 2001. 588p.
63. *Casadevall A.* Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? // *Fungal Genetics and Biology*. 2005. V.42. P.98-106.
64. *Chakraborty S., Sen S.K., Bhattacharya K.* Indoor and outdoor aeromycological survey in Burdwan, West Bengal, India // *Aerobiologia*. 2000.16. P.211-219.
65. *Chao H.J., Milton D.K., Schwartz J., Burge H.A.* Dustborne fungi in large office buildings // *Mycopathologia*. 2001. 154. P.93-106.
66. *Cooley J.D., Wong W.C., Jumper C.A., Straus D.C.* Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome // *Occup. Environ. Med.* 1998. 55. P.579-584.
67. *Curtis L., Cali S., Conroy L., Baker K., Ou C.H., Hershov R., Norlock-Cruz F., Scheff P.* Aspergillus surveillance project at a large tertiary-care hospital // *Journal of Hospital Infection*. 2005. 59(3). P.188-96.
68. *Denning D.W.* Therapeutic outcome in invasive aspergillosis // *Clin Infect Dis*. 1996. 23. P.608-615.
69. *Doggett M.S.* Characterization of Fungal Biofilms within a Municipal Water Distribution System // *Applied and environmental microbiology*. 2000. V.66. N.3. P.1249-1251.
70. *Domsh K.H., Gams W.* Andersen T.H. *Compendium of soil fungi*. London: Acad. Press, 1993. V.1. 859 p.
71. *Duchaine C., Meriaux A.* The importance of combining air sampling and surface analysis when studying problematic houses for mold biodiversity determination // *Aerobiologia*. 2001. 17. P.121-125.
72. *Dutkiewicz J., Olenchock S.A., Kryszynska-Traczyk E., Skorska C., Sitkowska J., Prazmo Z.* Exposure to airborne microorganisms in fiberboard and chipboard factories // *Ann Agric Environ Med*. 2001. 8. 191-199.
73. *Ebner M.R., Hastelwandter K., Frank A.* Indoor and outdoor incidence of airborne fungal allergens at low- and high-altitude alpine environments // *Mycol. Research*. 1992. V. 96. P.117-124.
74. *Engelhart S., Exner M.* Short-term versus long-term filter cassette sampling for viable fungi in indoor air: comparative performance of the Sartorius MD8 and the GSP sampler // *Int J Hyg Environ Health*. 2002. 205(6). P.443-51.
75. *Falkow S.* What is a Pathogen? // *ASM News*. 1997. V. 63. N 7. P.359-365.
76. *Fischer G., Müller T., Schwalbe R., Ostrowski R., Dott W.* Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowastehandling facilities // *Int J Hyg Environ Health Res*. 2000. 203. P.97-104.
77. *Fisher G., Dott W.* Relevance of air born fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene // *Archive Microbiology*. 2003. V.179. P.75-82.
78. *Gams W., Hoekstra E.S., Aptroot A.* *CBS Course of mycology*. Fourth edition. Boarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1998. 165 p.
79. *Gorny R.L., Reponen T., Willeke K., Schmechel D., Robine E., Boissier M., Grinshpun S.A.* Fungal Fragments as Indoor Air Biocontaminants // *Appl Environ Microbiol*. 2002. 68. P.3522-3531.
80. *Gots R.E., Layton N.J., Pirages S.W.* Indoor health: background levels of fungi // *AIHA Journal*. 2003. V.64. P.427-438. (цитата по Tovey, Green, 2005).
81. *Green B.J., Sercombe J. K., Tovey E. R.* Fungal fragments and undocumented conidia function as new aeroallergen sources // *J. Allergy. Clin. Immunol*. 2005. 115(5). P.1043-1048.
82. *Green C.F., Scarpino P.V., Gibbs S.G.* Assessment and modeling of indoor fungal and bacterial bioaerosol concentrations // *Aerobiologia*. 2003.19. P.159-169.
83. *Hamada N., Fujita T.* Effect of air-conditioner on fungal contamination // *Atmospheric Environment*. 2002. 36. P.5443-5448.
84. *Hameed A.A., Shakour A.A., Yasser H.I.* Evaluation of bio-aerosols at an animal feed manufacturing industry: A case study // *Aerobiologia*. 2003.19. 89-95.
85. *Hargreaves M., Parappukaran S., Morawska L., Hitchinsb J., Heb C., Gilbertc D.* A pilot investigation into associations between indoor airborne fungal and non-biological particle concentrations in residential houses in Brisbane, Australia // *The Science of the Total Environment*. 2003. 312. P.89-101.
86. *Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C., Pegler D.N.* *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi*, 8th edn. CAB. International, Wallingford. 1995.
87. *Hedayati M.T., Mohseni-Bandpi A., Moradi S.* A survey on the pathogenic fungi in soil samples of potted plants from Sari hospitals, Iran // *Journal of Hospital Infection*. 2004. 58. P.59-62.
88. *Henriquez V.I., Villegas G.R., Nolla J.M.R.* Airborne fungi monitoring in Santiago, Chile // *Aerobiologia*. 2001. 17. P.137-142.
89. *Hoog de G.S.* Risk Assessment of fungi reported from humans and animals // *Mycoses*. 1996. V. 9. N 11/12. P.407-417.

90. Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili. 2000. 1126 p.
91. Horner W. E., Worthan A.G., Morey P.R. Air and Dustborne mycoflora in houses free of water damage and fungal growth // Applied and environmental microbiology. 2004. V.70. N.11. P.6394–6400.
92. Howard D.H. Pathogenic Fungi in Humans and Animals. Second Edition. New York – Basel. Marcel Dekker Inc. 2002.
93. Hryhorczuk D., Curtis L., Scheff P., Chung J., Rizzo M., Lewis C., Keys N., Moomey M. Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility // Ann Agric Environ Med. 2001. 8. P.177–185.
94. <http://www.biosafety.be/RA/Class/List-Fungi.html>.
95. Hudgson M. J., Morey P., W-Y Leung et al. Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor* // J. Occup. Environment 1998. V.40. P.241-249.
96. Index Fungorum: <http://www.speciesfungorum.org/Names/>
97. Jacobson E.S. Pathogenic roles for human melanins // Clinical Microbiological Revue. 2000. V.13. P.708-717.
98. Jaffal A.A. Residential indoor airborne microbial population in the United Arab Emirates // Environment International. 1997. V.23. N.4. P.529-533.
99. Jain A.K. Survey of bioaerosol in different indoor working environments in central India // Aerobiologia. 2000. 16. P.221–225.
100. Jovanovic S., Felder-Kennel A., Gabrio T., Kouros B., Link B., Maisner V., Piechotowski I., Schick K.-H., Schrimpf M., Weidner U., Zollner I., Schwenk M. Indoor fungi levels in homes of children with and without allergy history // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2004. 207. P.369-378.
101. Kakde U.B., Kakde H.U., Saoji A.A. Seasonal variation of fungal propagules in a fruit market environment, Nagpur (India) // Aerobiologia. 2001.17. P.177–182.
102. Karunasena E., Markham N., Brasel T., Cooley J.D., Straus D.C. Evaluation of fungal growth on cellulose-containing and inorganic ceiling tile // Mycopathologia. 2000. 150. P.91–95.
103. Khan Z.U., Khan M.A.Y., Chandry R., Sharma P.N. *Aspergillus* and other moulds in the air of Kuwait // Mycopathologia. 1999. 146. P.25–32.
104. Kirk P.M. et al., 2004. The CABI Bioscience and CBS Database of Fungal Names. – www.indexfungorum.org
105. Kolivras K.N., Johnson P.S., Comrie A.C., Yool S.R. Environmental variability and coccidioidomycosis (valley fever) // Aerobiologia 17. 31–42. 2001.
106. Kryszynska-Traczyk E., Skorska C., Cholewa G., Sitkowska J., Milanowski J., Dutkiewicz J. Exposure to airborne microorganisms in furniture factories // Ann Agric Environ Med. 2002. 9. P.85–90.
107. Lacey J. Spore dispersal – its role in ecology and disease: the British contribution to fungal aerobiology // Mycol Res. 1996. 100. P.641–660.
108. Lacey J., Dutkiewicz J. Bioaerosols and occupational lung disease // J Aerosol Sci. 1994. 25. P.1371–1404.
109. Lappalainen S., Nikulin M., Berg S., Parikka P., Hintikka E.L., Pasanen A.L. Fusarium toxins and fungi associated with handling of grain on eight Finnish farms // Atmospheric Environment. 1996. V.30. N.17. P.3059-3065.
110. Larsen T.O., Frisvad J.C. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa // Mycol Res. 1995. 99. P.1153–1166
111. Latge, J. P., Paris S., Sarfati J., Debeauvais J.P. Monod M. Exoantigens of *Aspergillus fumigatus*: serodiagnosis and virulence / Powell K. A., Renwick A., Peberdy J. F. The genus *Aspergillus*: from taxonomy and genetics to industrial application. Plenum Press, London, United Kingdom. 1994. P.321–340.
112. Latge J.-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis // Clinical Microbiology Reviews. 1999. V.12. N.2. P.310–350.
113. Lehtonen M., Reponen T., Nevalainen A. Everyday activities and variation of fungal spore concentrations in indoor air // Int. Bioteerrior. Biodegrad. 1993. V.31. P.25-39.
114. Li C.-S., Hsu L.-Y. Fungus allergens inside and outside the residences of atopic and control children // Arch Environ Health. 1995. 50. P.38–43.
115. Li D.W., Kendrick B. Functional and causal relationships between indoor and outdoor airborne fungi // Can. J. Bot. 1996. V. 74. Iss.2. P.194-09.
116. Liao C.-M., Luo W.-C. Use of temporal/seasonal and size dependent bioaerosol data to characterize the combination of outdoor fungi to residential exposures // Science of the Total Environment. 2005. 347(1-3). P.78-97.
117. Lugauskas A., Krikstaponis A., Bridziuviene D. Airborne fungi in the fur processing enterprise // Botanica Lithuanica. 2001. 7(3). P.287-293.
118. Lugauskas A., Krikstaponis A., Bridziuviene D. Micological monitoring of different workplaces in Lithuania // Grana. 2000. 39. P.308-316.
119. Lugauskas A., Krikstaponis A., Sveistyte L. Airborne Fungi in Industrial Environments – Potential Agents of Respiratory Diseases // Ann Agric Environ Med. 2004. N.11. P.19–25.
120. Maggi O., Persiani A.M., Gallo F., Valenti P., Pasquariello G., Sclocchi M.C., Scorrano M. Airborne fungal spores in dust present in archives: proposal for a

detection method, new for archival materials // *Aerobiologia*. 2000. 16. P.429–434.

121. *McGinnis M.R.* Pathogenesis of indoor fungal disease // *Medical Mycology*. 2004. V.42. P.107–118.

122. *McGrath J.J., Wong W.C., Cooley J. D., Straus D.C.* Continually measured fungal profiles in sick building syndrome // *Current Microbiology*. 1999. V.38. P.33–36.

123. *Medrela-Kuder E.* Seasonal variations in the occurrence of culturable airborne fungi in outdoor and indoor air in Cracow // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2003. 52. P.203–205.

124. *Menezes E.A., Souto V.L., Trindade E.C., Santos I.N., Favali C.B.* Study of pathogenic yeasts isolated of the beaches from Ceara state – Brasil / Congress of the International Society for Human and Animals Mycology. Salsomaggiore Terme, Parma, Italy, June, 8–13. 1997. P.104.

125. *Montacutelli R., Maggi O., Tarsitani G., Gabrielli N.* Aerobiological monitoring of the «Sistine Chapel»: airborne bacteria and microfungi trends // *Aerobiologia*. 2000.16. P.441–448.

126. *Morey P.R., Hull M.C., Andrew M.* El Nino water leaks identify rooms with concealed mould growth and degraded indoor air quality // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2003. 52. P.197 – 202.

127. *Muller J.* Requirements for establishing a country-wide diagnostic service in medical mycology // *International Society for Human and Animal Mycology*. 13 Congress, Salsomaggiore Terme, Parma, Italy. 1997. S. 94. P.64.

128. *Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie E.J.* Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species // *Clinical microbiology reviews*. Oct. 1994. P.479–504.

129. *Niculin M., Reijula K., Jarvis B.B.* et al. Experimental lung mycotoxicosis in mice induced by *Stachybotrys atra*. *International Journal of Experimental Pathology*. 1996. V.77. P.213–218.

130. *Nielsen K.F., Holm G., Uttrup L.P., Nielsen P.A.* Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2004. 54. P.325–336.

131. *Nilsson A., Kihlstr E., Lagesson V., Wess B., Szponar B., Larsson L., Tagesson C.* Microorganisms and volatile organic compounds in airborne dust from damp residences // *Indoor Air*. 2004. 14. P.74–82.

132. *Nolard N.* Aspergillose invasive origine nosocomiale des epidemies. Mise au point // *Bull. Acad. Natle. Med*. 1996. 180. N.4. P.849–858.

133. *Nugari M.P., Roccardi A.* Aerobiological investigations applied to the conservation of cultural heritage // *Aerobiologia*. 2001. 17. P.215–223.

134. *O'Connor G.T., Walter M., Mitchell H., Kattan M, Morgan W.J., Gruchalla R.S., Pongracic J.A., Smartt E., Stout J.W., Evans R., Crain E.F., Burge H.A.* Airborne fungi in the homes of children with asthma in low-income urban communities: The Inner-City Asthma Study // *J Allergy Clin Immunol*. 2004. V.114. N.3. P.599–606.

135. *Ominski K.H., Marquardt R.R., Sinha R.N.*, et al. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miller J.D., Treholm H.L. (eds.) *Mycotoxins in Grain. Compounds other than Aflotoxins*. St Paul, MN: Eagan Press. 1997. P.287–312.

136. *Palmas F., Cosentino S., Meloni V., Fadda M.E.* Occurrence of mites and fungi in the homes of patients with allergic manifestations // *Aerobiologia*. 1999.15. P.109–114.

137. *Parkinson D.* Ecology of soil fungi // In *Biology of Conidial Fungi*. Vol.1. Academic Press. 1981. P.277–294.

138. *Pastuszka J.S., Tha Paw U.K., Lis D.O., Wlazlo A., Ulfig K.* Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland // *Atmospheric Environment*. 2000. 34. P.3833–3842.

139. *Perfect J.R., Schell W.A.* The new fungal opportunists are coming // *Clinical Infection Diseases*, 1996. V.22 (Suppl 2). P.112–118.

140. *Pessi A.-M., Suonketo J., Pentti M., Kurkilahti M., Peltola K., Rantio-Lehtimäki A.* microbial growth inside insulated external walls as an indoor air biocontamination source // *Applied and environmental microbiology*. 2002. V.68. No.2. P.963–967.

141. *Platt S.D., Martin C.J., Hunt S.M., Lewis C.W.* Damp housing. Mold growth, and symptomatic health state. *BMJ*. 1990. V.298. P.1675–1678 (цит. по Abba, 2004)

142. *Poulsen O.M., Breum N.O., Ebbehoj N., Hansen A.M., Ivens U.I., Vanhelveld D., Mahros P., Matthiasen L., Nielsen B.H., Nielsen E.M., Schibye B., Skov T., Stenbaek E.I., Wilkins C.K.* Collection of domestic waste – review of occupational health problems and other possible causes // *Sci Total Environ*. 1995. 170. P.1–19.

143. *Rainer J., Peintner U., Pöder R.* Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment // *Mycopathologia*. 2000. 149. P.87–97.

144. *Rolandi L., Lodola L., Guglielminetti M., Caretta G., Azzaretti G.* Evaluation of airborne particulate and fungi in critical hospital care units // *Toxicology Letters*. 1998. V.95. N.1001. P.226.

145. *Rosas I., Calderon C., Salinas E., Martnez L., Alfaro-Moreno E., Milton D.K., Osornio-Vargas A.R.* Animal and worker exposure to dust and biological particles in animal care houses // *Aerobiologia*. 2001. 17. P.49–59.

146. Scheff P.A., Paulius V.K., Curtis L., Conroy L.M. Indoor Air Quality in a Middle School, Part II: Development of emission factors for particulate matter and bioaerosols // *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 2000. 15(11). P.835–842.
147. Shelton B.G., Kirkland K.H., Flanders W.D., Morris G.K. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. V.68. N.4. P.1743-1753.
148. Shoemaker R.C., House D.E. A time-series study of sick building syndrome: chronic, biotoxin-associated illness from exposure to water-damaged buildings // *Neurotoxicology and Teratology*. 2005. 27. P.29–46.
149. Simeray J., Mandin D., Mercier M., Chaurmont J.P. Survey of viable airborne fungal propagules in French wine cellars // *Aerobiologia*. 2001. 17. P.19–24.
150. Simmons R.B., Noble J.A., Rose L., Price D.L., Crow S.A., Ahearn D.G. Fungal colonization of automobile air conditioning systems // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1997. 19. P.150–153.
151. Simoes L.V., Marques S.A., Bagagli E. Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses // *Medical Mycology*. 2004. V.42. P.517-523.
152. Simsekli Y., Gücin F., Asan A. Isolation and identification of indoor airborne fungal contaminants of food production facilities and warehouses in Bursa, Turkey // *Aerobiologia*. 1999. 15. P.225–231.
153. Singh A., Singh A.B. Aspergillus spp. as an important occupational risk factor among susceptible individuals // *Aerobiologia*. 1999. 15. P. 233–240.
154. Staib F. Hygienische Aspekte der Verwertung und Behandlung Organischer Haushaltsabfälle aus medizinisch-mykologischer Sicht // *Biologische Verwertung und Behandlung organischer Haushaltsabfälle. Ergebnisse der Expertenanhörung des LfU in Wackersdorf am 14.11.1991. Helf. 116. Z. 18-24.*
155. Sterflinger K., Prellinger H. Molecular taxonomy and biodiversity of rick fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria) // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001. 80. 275-286.
156. Su H.-J.J., Chen H.-L., Huang C.-F., Lin C.-Y., Li F.-C., Milton D. K. Airborne Fungi and Endotoxin Concentrations in different areas within textile plants in Taiwan: a 3-year study // *Environmental Research Section A*. 89. 2002. P.58-65.
157. Sugiura Y., Sugita-Konish Y., Kumagai S., Reiss E. Experimental murine hyalohyphomycosis with soil-derived isolates of *Fusarium solani* // *Medical Mycology*. 2003. V.41. P.241-247.
158. Samson R.A., Flannigan B., Flannigan M.E., Verhoeff A.P., Adan O.C.G., Hoekstra E.S. (Eds.). Health implications of fungi in indoor environments. Air quality monographs. V. 2. Elsevier. Amsterdam. 1994. 602p.
159. Takahashi T. Airborne fungal colony forming units in outdoor and indoor environments in Yokohama, Japan // *Mycopathologia*. 1997. N.139. P.23–33.
160. Tovey E.R., Green B.J. Measuring environmental fungal exposure // *Medical Mycology Supplement 1*. 2005. V.43. P.67-70.
161. Tuomi T., Reijula K., Johnsson T. et al. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings // *Appl. Environ Microbiol.*, 2000. V.66. P1899-1904.
162. Vujanovic V, Smoragiewicz W, Krzysztyniak K. Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air // *Environ Toxicol*. 2001. 16(1). P.1-8.
163. Warris A., Verweij P.E. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus* // *Medical Mycology. Supplement 1*. 2005. V.43. P.59-65.
164. Wilson S.C., Carriker C.G., Brasel T.L., Karunasena E., Douglas D.R., Wu C., Andriychuk L.A., Fogle M.R., Martin J.M., Straus D.C. Culturability and toxicity of sick building syndrome-related fungi over time // *J Occup Environ Hyg*. 2004. 1(8). P. 500-504.
165. Wilson S.C., Straus D.C. The presence of fungi associated with sick building syndrome in North American zoological institutions // *Journal of Zoo and Worldwide Medicine*. 2002. V.33. N4. P.322-327.
166. Wu P.-C., Su H.-J., Lin C.-Y. Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons // *The Science of the Total Environment*. 2000. 253. P.111-118.
167. Yonemori K., Takezako N., Nishimura K., Onose T., Yamanishi F., Kawahata H., Kawana A., Mori N., Kirikae F., Saruta K., Kirikae T., Kuratsuji T., Kudo K., Kobori O., Yazaki Y., Miwa T. Fungal infection in neutropenic patients in a hospital during construction // *Jpn J Infect Dis*. 2002. 55. 4. P.126-127.
168. Zdanova N.N., Vasilevskaya A.I., Artyschkova L.V., Sadovnikov Yu.S., Lashko T.N., Gavriljuk V.I., Dighton G. Changes in micromycete communities in soil in response to pollution by long-lived radionuclides emitted in the Chernobyl accident // *Mycol. Res*. 1994. V. 98. P.789-795.
169. Zock J.P., Jarvis D., Luczynska C., Sunyer J., Burney P. European Community Respiration Health Survey. Housing characteristics, reported mold exposure, and asthma in the European Community Respiration Health Survey. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2002. V.110. P.285-292.

Медицинская ***МИКОЛОГИЯ***

С.М. Озерская, Н.Е. Иванушкина, Г.А. Кочкина

ПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ: КАТЕГОРИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА И РАЗНООБРАЗИЕ

Тема данного обзора довольно актуальна, поскольку понятие категоризации биологического риска непосредственно связано с проблемами биологической безопасности, которым уделяется все большее внимание в современном мире.

Для каждого отдельного государства или конкретного региона Земного шара Всемирная Организация Здравоохранения (Laboratory biosafety manual, 2004) рекомендует проводить обязательную разработку национальной или региональной классификации микроорганизмов по группам биологического риска, которая должна учитывать:

1. Патогенность организма.
2. Пути передачи инфекции и специфику организма-хозяина. Существенную роль при этом играют существующие уровни иммунизации местного населения, плотность и перемещение инфицированного населения, наличие соответствующих переносчиков инфекции и нормы санитарного состояния окружающей среды.
3. Доступность и эффективность профилактических мероприятий на местах. К ним относятся: профилактика путем активной и пассивной

иммунизации; санитарные мероприятия, контроль за переносчиками инфекции – животными и членистоногими.

4. Доступность эффективного лечения на местах – пассивная иммунизация, вакцинация после инфицирования, использование противомикробных и химиотерапевтических средств с учетом возможности появления резистентных штаммов.

Рассмотрим несколько определений категорий биологического риска, принятых в последнее время в различных странах и разными международными организациями, связанными с этой проблемой.

Первая группа риска по определению Европейского экономического сообщества (Directive 2000/54/EC, 2000) включает биологические агенты, не способные вызывать заболевания человека. Всемирная организация здравоохранения (Laboratory biosafety manual, 2004) и Организация экономического содействия и развития (Guidance for the operation..., 2006) включают в первую группу риска микроорганизмы, которые потенциально не являются возбудителями болезней человека

или животных, т.е. *отсутствует совсем или существует низкий уровень риска для отдельного человека и человеческой популяции*. Анализ приводимых определений показывает, что существуют некоторые различия в формулировках, связанные с объемами учитываемых категорий организмов, подверженных воздействию патогенных микроорганизмов. Канадская лаборатория по биобезопасности в своем руководстве (Laboratory biosafety guidelines, 2004) определяет первую группу риска как имеющую *низкий уровень риска для отдельного человека и человеческой популяции* и включающую любые биологические агенты, которые не способны вызывать заболевания у здоровых людей и животных. Австралийский и Новозеландский стандарт (Safety in laboratories, 2002) также указывает на *низкий уровень риска для отдельного человека и человеческой популяции* первой группы и включает в нее микроорганизмы, которые не способны вызывать заболевания человека, растений и животных. Американское руководство по биобезопасности (Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 1999) определяет первый уровень биобезопасности (Biosafety Level 1, BSL 1) как набор хорошо охарактеризованных агентов, способных в редких случаях вызывать заболевания у здоровых взрослых людей, обладающих минимальной потенциальной опасностью для *лабораторного персонала и окружающей среды*. Самое подробное определение первой группы дано на Бельгийском сервере по биобезопасности: (Belgian classifications..., 2006). Класс риска 1 по этой категоризации представляет собой совокупность микроорганизмов, не патогенных для человека, животных, растений, неопасных для *окружающей среды* или представляющих незначительный риск для человека и окружающей среды при использовании в лабораторных исследованиях. Этот класс включает помимо организмов, безопасность которых была доказана, *оппортунистические* виды микроорганизмов, которые могут обладать и *аллергенными* свойствами.

Определения второй группы риска также различаются в разных литературных источниках. Так, американский справочник (Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 1999) приводит короткое определение второго уровня биобезопасности (BSL 2). По данному определению BSL 2 – это агенты среднего уровня риска для человека и окружающей среды. Европейское экономическое сообщество (Directive 2000/54/EC, 2000) и Бельгийский сервер по биобезопасности (Belgian classifications..., 2006) включают во вторую группу (класс) риска биологические агенты,

которые могут вызывать заболевания человека, могут представлять опасность для лабораторного персонала, однако *мала вероятность широкого распространения заболевания; обычно существуют меры эффективной профилактики или действия лечебного характера*. Всемирная организация здравоохранения (Laboratory biosafety manual, 2004), Организация экономического содействия и развития (Guidance for the operation..., 2006), Канадская лаборатория по биобезопасности (Laboratory biosafety guidelines, 2004), а также Австралийский и Новозеландский стандарт (Safety in laboratories, 2002) отмечают для 2-ой группы наличие *умеренного уровня риска для отдельного человека и низкого уровня риска для человеческой популяции*. Патогенные микроорганизмы этой группы могут вызывать заболевания человека или животных, но не представляют серьезного риска для персонала лабораторий, населения, домашних животных или окружающей среды. Неосторожная работа в лаборатории может вызвать серьезную инфекцию, однако существуют доступные лечебные и профилактические средства борьбы с инфекцией, в связи с чем, и риск ее распространения ограничен.

Определения третьей группы риска различаются не столь значительно. Всемирная организация здравоохранения (Laboratory biosafety manual, 2004), Организация экономического содействия и развития (Guidance for the operation..., 2006), Канадская лаборатория по биобезопасности (Laboratory biosafety guidelines, 2004), Австралийский и Новозеландский стандарт (Safety in laboratories, 2002) говорят об *умеренном уровне риска для отдельного человека и низком уровне риска для человеческой популяции*. Патогенные микроорганизмы входящие в эту группу риска обычно вызывают серьезное заболевание у человека или животных, однако, *как правило, не передаются от больного к здоровому организму*. Существуют эффективные лечебные и профилактические средства. Европейское экономическое сообщество (Directive 2000/54/EC, 2000) и Бельгийский сервер по биобезопасности (Belgian classifications..., 2006) определяют третью группу риска как совокупность биологических агентов, которые могут вызывать серьезные заболевания человека и представляют серьезную опасность для *лабораторного персонала*; при работе с микроорганизмами этой группы *имеется риск распространения среди общества*, однако, обычно существуют эффективные средства профилактики или лечения. Американский справочник (Biosafety in microbiologi-

cal and biomedical laboratories, 1999) относит к третьему уровню биологической риска группу *местных или экзотических агентов*, которые могут вызвать серьезную или потенциально смертельную болезнь в результате ингаляции (при контакте в клинической, диагностической, учебной практике, научных исследованиях или процессе производства). Четвертую группу риска данное руководство описывает как опасные и экзотические агенты, которые представляют высокий индивидуальный риск для человека передаваемых воздушным путем лабораторных инфекций и опасных для жизни заболеваний. Всемирная организация здравоохранения (Laboratory biosafety manual, 2004), Организация экономического содействия и развития (Guidance for the operation..., 2006), и Канадская лаборатория по биобезопасности (Laboratory Safety Guidelines, 2004), отмечают для четвертой группы *высокий уровень риска для человека и для человеческой популяции*. В эту группу по данному определению входят патогенные микроорганизмы, которые обычно вызывают серьезные заболевания человека и *животных*, легко передающиеся от одного организма к другому, прямыми или опосредованными путями. Способы эффективной профилактики и лечения обычно не доступны. По данным Европейского экономического сообщества (Directive 2000/54/ЕС, 2000) и Бельгийского сервера по биобезопасности (Belgian classifications..., 2006) биологические агенты четвертой группы риска вызывают серьезные заболевания человека и представляют серьезную опасность для *персонала*; могут представлять *высокий риск распространения в обществе*; для этих инфекций обычно нет никакой эффективной профилактики или доступного лечения. Австралийский и Новозеландский стандарт (Safety in laboratories, 2002) также отмечают, что данная группа риска имеет высокий уровень риска для человека и для человеческой популяции. Патогены этой группы вызывают серьезные заболевания, опасные для жизни человека или животных, представляют серьезную угрозу для лабораторного персонала, вызывают заболевания, легко передающиеся от одного организма к другому, прямыми или непрямыми путями. Способы эффективной профилактики и лечения обычно не доступны.

Известно, что в России категории риска расположены в обратном порядке от первой, куда определены возбудители особо опасных инфекций, среди которых грибов нет, до четвертой группы патогенности (Положение..., 1980).

Группа патогенности I. Возбудители особо опасных инфекций.

Группа патогенности II. Возбудители высококонтагиозных эпидемических бактериальных, вирусных, риккетсиозных, грибковых заболеваний человека, возбудители глубоких микозов человека.

Группа патогенности III. Возбудители бактериальных, вирусных, риккетсиозных, грибковых, протозойных инфекционных болезней, выделенных в самостоятельные нозологические формы, условно-патогенные организмы, вызывающие оппортунистические микозы (системные микозы) при понижении иммунного статуса человека.

Группа патогенности IV. Возбудители бактериальных, вирусных, грибковых инфекций (поверхностных микозов), условно-патогенные организмы.

Недавно при разработке Закона о биологической безопасности РФ в текст его проекта была заложена категоризация патогенных микроорганизмов, соответствующая международным принципам – от 1-ой, включающей самых слабых в этом отношении видов микроорганизмов, до 4-ой – самой опасной (Проект технического регламента..., 2005).

Первая группа – отсутствует или низкая индивидуальная и общественная опасность; патогенные биологические агенты способны вызывать болезни при определенных условиях.

Вторая группа – умеренная индивидуальная и низкая общественная опасность; патогенные биологические агенты могут вызывать болезнь у человека, но не представляют риска для работающего с ним персонала, населения и среды обитания человека; существуют доступные терапевтические и профилактические меры.

Третья группа – высокая индивидуальная и низкая общественная опасность; патогенные биологические агенты обычно вызывают болезнь, но, как правило, не распространяются от больного к здоровому; существуют эффективные лечебные и профилактические мероприятия.

Четвертая группа – высокая индивидуальная и общественная опасность; патогенные биологические агенты обычно вызывают серьезные болезни у человека и легко распространяются от больного к здоровому прямо или опосредованно; эффективные лечебные и профилактические мероприятия отсутствуют.

Однако при дальнейших обсуждениях проекта стало ясно, что изменение порядка категорий патогенности в России влечет за собой необходимость изменения такого множества подзаконных актов, что пока было решено оставить категори-

зацию групп патогенности в прежнем виде.

Списки патогенных видов грибов, включенные в российские правила Госсанэпиднадзора

ра 2003 года (Санитарно-эпидемиологические правила..., 2003) хорошо известны (табл. 1), поскольку они не меняются уже много лет и сохра-

Таблица 1

Списки патогенных видов грибов, включенные в российские правила Госсанэпиднадзора

Группы патогенности по Санитарно-эпидемиологическим правилам МЗ РФ, 2003	Названия видов*
Группа I Возбудители особо опасных инфекций	Грибов нет
Группа II Облигатные патогены, эндемичные виды, возбудители глубоких микозов человека	<i>Blastomyces brasiliensis</i> (= <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)
	<i>Blastomyces dermatitidis</i> (tm – <i>Ajellomyces dermatitidis</i>)
	<i>Coccidioides immitis</i>
	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Группа III Условно-патогенные организмы, вызывающие оппортунистические микозы (системные микозы) при понижении иммунного статуса человека	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	<i>Candida albicans</i>
	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Группа IV Условно-патогенные организмы, возбудители поверхностных микозов (дерматофиты)	<i>Absidia corymbifera</i>
	<i>Aspergillus nidulans</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Candida brumptii</i>
	<i>Candida (c)krusei</i>
	<i>Candida intermedia</i>
	<i>Candida pseudotropicalis</i>
	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Candida guilliermondii</i>
	<i>Cephalosporium acremonium</i> (= <i>Acremonium strictum</i>)
	<i>Cephalosporium cinnabarium</i> (комбинация неизвестна)
	<i>Epidermophyton floccosum</i>
	<i>Geotrichum candidum</i>
	<i>Microsporum</i> spp.
	<i>Mucor mucedo</i>
	<i>Penicillium crustosum</i>
	<i>Penicillium luteo-viride</i>
	<i>Penicillium notatum</i> (= <i>Penicillium chrysogenum</i> var. <i>chrysogenum</i>)
	<i>Pityrosporum orbiculare</i>
	<i>Rhizopus nigricans</i> (= <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>)
<i>Trichophyton</i> spp.	
<i>Trichosporon cerebriforme</i>	

*жирным шрифтом выделены устаревшие наименования видов и ошибки

нили свое содержание с 1980 года (Положение..., 1980). В последнее время эта ситуация начала меняться и в настоящее время на рассмотрении в комиссии Роспотребнадзора РФ находится новый вариант списков патогенных грибов, подготовленный специалистами НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Известно, что на этот перечень уже получены рецензии от ведущих институтов в этой области – Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб». В настоящее время данный список ожидает дальнейшего рассмотрения. Организация, которая непосредственно ответственна за разработку и утверждение списков микроорганизмов по категориям биологического риска в России – Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Противочумный центр» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Таким образом, можно констатировать, что в ближайшем будущем в России будут приняты новые официальные списки патогенных грибов, однако в настоящее время представленные ниже виды мицелиальных грибов и дрожжей включены во вторую и третью группы риска зарубежных списков, но отсутствуют в соответствующих группах российских списков (табл. 2).

Во многих публикациях российских и зарубежных авторов (de Hoog and oth., 2000; Марфина, 2002; Сергеев, Сергеев, 2003) можно увидеть категоризацию групп риска, выраженную индексами BSL. При этом не учитывается тот факт, что BSL – это не категория риска патогенных микроорганизмов, а «biosafety level» – уровень защиты лаборатории от биологического риска, принимаемый в соответствии с группой риска микроорганизмов, с которыми работают в данной лаборатории. ВОЗ опубликовала уже третье издание «Практического руководства по биологической безопасности в лабораторных условиях» (Laboratory biosafety manual, 2004). Данное руководство способствовало принятию во многих странах основной концепции биологической безопасности и развитию национальных кодексов практики по безопасному обращению с патогенными организмами в лабораторных условиях. Особое внимание

Таблица 2
Грибы и дрожжи 2-й и 3-й групп риска, отсутствующие в санитарно-эпидемиологических правилах РФ

<i>Cladophialophora bantiana</i>	<i>Madurella mycetomi</i>
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i>	<i>Neotestudina rosatii</i>
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>crecens</i>	<i>Penicillium marneffeii</i>
<i>Filobasidiella bacillispora</i>	<i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Fonsecaea compactum</i> (= <i>Rhinochadiella compacta</i>)	<i>Scedosporium apiospermum</i>
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	<i>Scedosporium prolificans</i>
<i>Madurella grisea</i>	

ВОЗ уделяет личной ответственности исследователя, работающего с микроорганизмами, а также – классификации лабораторий по уровню биобезопасности, которая производится с учетом их назначения, конструкции, используемого оборудования и средств, практики и оперативных процедур, необходимых для работы с агентами, относящимися к различным группам риска. Лаборатории классифицируются по уровню биологической безопасности (BSL) – BSL1 и BSL-2 – базовые (рис.1а), BSL-3 – изолированные (рис.1б) и BSL-4 – максимально изолированные. Последние лаборатории подчиняются более жестким практическим требованиям. В частности, при работе в них применяется правило «работы в парах», согласно которому в лаборатории не допускается работа в одиночку.

Необходимо отметить, что русскоязычный термин «биобезопасность» по сути объединяет два понятия, которые переводятся английскими словами «biosafety» и «biosecurity». «Biosafety» – это защита лабораторного персонала и окружающей среды от вредного случайного воздействия патогенных микроорганизмов, а «biosecurity» – предотвращение несанкционированного специального использования патогенных микроорганизмов, в том числе и с целью создания биологического оружия. Известно, что вопросам биобезопасности в смысле «biosafety» всегда уделялось много внимания. Периодически пересматривались и издавались специальные руководства под эгидой ВОЗ (Laboratory biosafety manual, 2004), в том числе и переведенные на русский язык (Практическое руководство..., 2004). В ноябре 2006 года опубликовано руководство и по «biosecurity» (Biorisk management..., 2006).

Вопросам «biosecurity» сейчас уделяется очень много внимания, при этом особый интерес обращается со стороны западных специалистов на территорию бывшего СССР, где, как известно,

сохранилось довольно большое число различных микробиологических, в том числе диагностических и клинических лабораторий и небольших производств, которые далеко не всегда соответствуют современным нормам учета, контроля за техникой безопасности и возможным несанкционированным распространением возбудителей инфекционных заболеваний. В 2003 году Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ РАН была проведена инвентаризация российских коллекций микроорганизмов по заданию Министерства промышленности и науки России. Оказалось, что сейчас в России существует около 100 микробных коллекций, заявивших о себе при проведенном опросе (Озерская и др., 2007).

Осенью 2006 года в Москве прошел семинар под эгидой Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСД) по проблемам биобезопасности «Инновации и биобезопасность микробных биологических ресурсов», где обсуждались вопросы введения практики GLP и GMP – кодексов лабораторной и микробиологической практик, анализировался опыт различных стран по работе с патогенными микробными агентами. В работе этого совещания принимали участие и российские специалисты из различных ведомств, включая Российскую академию наук, Министерство науки и образования, Министерство здравоохранения и социального развития.

Рабочие совещания, круглые столы и различные конференции по теме биобезопасности объявляются постоянно. В табл. 3 представлены некоторые из них, проведенные только в период с января по июль 2007 года.

Еще одна довольно крупная инициатива Организации экономического сотрудничества и развития – создание Глобальной сети Биологических ресурсных центров (Towards a global..., 2007), в которые сейчас преобразованы 15 крупнейших коллекций микроорганизмов мира (ATCC, CBS, DSMZ, BCCM и другие). Для стандартизации подходов к поддержанию коллекционных микробных фондов и обеспечения биобезопасности в плане «biosafety» и «biosecurity» специальная рабочая группа при Организации экономического сотрудничества и развития разрабатывает ряд стандартов, некоторые из которых уже прошли длительную процедуру обсуждения и согласования среди специалистов:

- Guidance for the operation of biological research centres (BRCS). Certification and quality criteria for BRCS. <http://www.oecd.org/dataoecd/60/42/23547743.pdf>

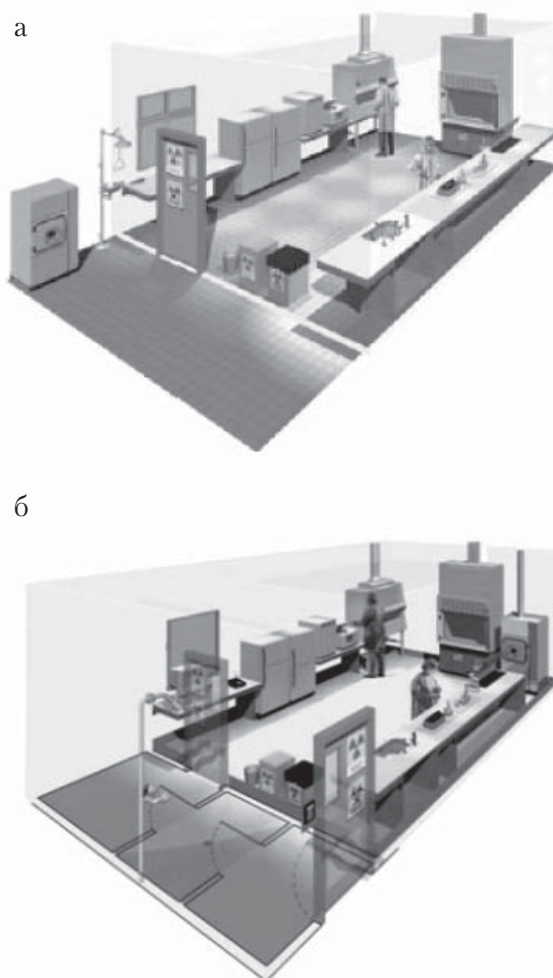


Рис. 1. Лаборатории биологической безопасности.

А – Базовая лаборатория для работы с микроорганизмами 2 группы биобезопасности

Б – Изолированная лаборатория для работы с микроорганизмами 3 группы биобезопасности

(Практическое руководство..., 2004)

- Guidance for the operation of biological research centres (BRCS). Part 1: General requirements for all BRCS. <http://www.oecd.org/dataoecd/60/44/23547773.pdf>.

- Guidance for the operation of biological resource centres (BRCS). Part 2: Microorganism domain. 2006. Draft version.

- Common standards of data exchange and interconnectivity. 2006. Draft version.

В данных стандартах подробно описаны порядок проведения работ с микроорганизмами в исследовательских и производственных лабораториях, правила обмена культурами, оформле-

Таблица 3

Совещания по теме биобезопасности, проведенные с января по июль 2007 года

Название мероприятия	Место проведения	Дата
Combating Bioterrorism / Pandemics: Implementing Policies for Biosecurity	Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA	July 23-25, 2007
Public Policy and Biological Threats: Training the Next Generation	IGCC Public Policy and Biological Threats Program, UC San Diego, USA	July 22-August 4, 2007
Seventh Meeting of the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB)	Bethesda, MD, USA	June 25 – 27, 2007
Bio-Safety and Security in Asia (BIOSECASIA)	Kuala Lumpur, Malaysia	May 21-22, 2007
Dual-Use Biotechnology Threats in a Post 9/11 World: Synthetic Genomics and Bioterrorism	Princeton, NJ, USA	May 18, 2007
Terror Medicine	Princeton, NJ, USA	May 11, 2007
The Weapon Potential of a Microbe and the Select Agents Act	Princeton, NJ, USA	May 4, 2007
Emerging Exotic Diseases of Food Producing Animals: Global Implications	Princeton, NJ, USA	13 April, 2007
The Biological Weapons Threat and Nonproliferation Options: A Survey of Senior U.S. Decision Makers and Policy Shapers	Princeton, NJ, USA	March 30, 2007
Synthetic Biology and Biological Security	Princeton, NJ, USA	March 9, 2007
Developing Options for Global Biosecurity: Assessing Progress and Evaluating New Mechanisms	Carnegie Endowment for International Peace, Washington D.C., USA	March 6 -7, 2007
The New Arms Race: Making the Case for an International Compact for Infectious Diseases	Princeton, NJ, USA	February 16, 2007
Governance for Biological Threat Reduction: A Comprehensive, Interdisciplinary, International Approach	Princeton, NJ, USA	February 9, 2007
Sixth Meeting of the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB)	Bethesda, MD, USA	January 31, 2007 (Closed Session)

ния документации на них, создания баз данных и обмена информацией. Выполнение данных рекомендаций будет способствовать более надежному обеспечению необходимыми культурами всех заинтересованных исследователей. Последнее имеет особенно большое значение, поскольку известно, насколько важно наличие качественно идентифицированной аутентичной культуры при сравнительных диагностических исследованиях, разработке вакцин и биологически-активных препаратов.

Совсем недавно постановлением Правительства Российской Федерации (№ 31 от 22 января 2007 г.) было утверждено «Положение о лицензировании деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных заболеваний», которое касается и юридических лиц, и индивидуальных предпринимателей. По этому Положению для получения лицензии на право

деятельности при работе с микроорганизмами, относящимися к I–IV группам патогенности, необходимо соответствие следующим условиям:

а) соискатель лицензии должен на законном основании иметь помещения, оборудование и другое материально-техническое оснащение, отвечающее требованиям Федерального закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», санитарным правилам и иным нормативным правовым актам Российской Федерации; в качестве подтверждения необходимо иметь заключение Роспотребнадзора о возможности работы с микроорганизмами 1–4 групп патогенности;

б) руководитель организации (структурного подразделения) или его заместитель (это касается и индивидуального предпринимателя или руководителя фирмы) должен иметь высшее или среднее профессиональное образование (медицинское

Таблица 4

Некоторые технические регламенты по отдельным аспектам обеспечения безопасности населения и окружающей среды от различных типов воздействий

Наименование технического регламента	Срок представления проекта технического регламента в Правительство РФ	Федеральные органы исполнительной власти, участвующие в организации разработки технического регламента
I. Общий технический регламент		
О биологической безопасности	декабрь 2006 г.	Минздравсоцразвития России Минсельхоз России МПР России ФСКН России Минпромэнерго России Минрегион России Минкультуры России
II. Специальные технические регламенты		
О требованиях к безопасности объектов технического регулирования, необходимых для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия на территории РФ	декабрь 2006 г.	Минздравсоцразвития России Минпромэнерго России Минрегион России Мининформсвязи России
О требованиях к безопасности объектов технического регулирования, необходимых для обеспечения ветеринарно-санитарного и фитосанитарного благополучия на территории РФ	ноябрь 2006 г.	Минсельхоз России Минздравсоцразвития России Минпромэнерго России
О безопасности микробиологических и биотехнологических производств и их продукции	декабрь 2006 г.	Минздравсоцразвития России Минсельхоз России Минпромэнерго России Росгидромет, Ростехнадзор
О требованиях к безопасности медицинских отходов	сентябрь 2008 г.	Минздравсоцразвития России Минпромэнерго России Ростехнадзор

или биологическое) и соответствующую подготовку по специальности «бактериология», «вирусология», «паразитология», «микробиология»;

в) в штате должны быть специалисты, имеющие высшее или среднее профессиональное образование (медицинское, биологическое) и прошедшие соответствующую подготовку по специальности «бактериология», «вирусология», «паразитология», «микробиология»;

г) повышение квалификации специалистов должно проводиться не реже одного раза в 5 лет;

д) должны соблюдаться правила, установленные Федеральным законом «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», санитарными правилами и иными нормативными правовыми актами Российской Федерации требований по обеспечению безопасности работ, проводимых с возбудителями инфекционных заболеваний.

В Российской Федерации в последние годы идет активная работа по обеспечению законодательной базы в области безопасности. В планах работы различных государственных ведомств имеется почти 200 проектов общих и специальных технических регламентов по различным аспектам обеспечения безопасности населения и окружающей среды от различных типов воздействий.

Проект Общего технического регламента по биологической безопасности обсуждается с 2004 года. Первоначально он имел название регламента по санитарно-эпидемиологической безопасности, но после проведенных общественных слушаний был переименован в проект регламента по биологической безопасности. Слушания по этому проекту уже закончены и в конце 2006 года он передан в Правительство РФ для обсуждения, утверждения и последующей передачи в Госду-

Таблица 5
ПДК мицелиальных грибов-продуцентов в воздухе рабочей зоны

Наименование микроорганизма-продуцента	Продуцент вещества	ПДК, кл/м ³	Класс опасности	Аллергенное действие на организм
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Протеаза С	5000	3	А
<i>Aspergillus awamori</i> , 120/177	Глюкоамилаза	2000	3	А
<i>Aspergillus fumigatus</i> , шт. 4238	Фумагилин	1000	3	А
<i>Aspergillus terreus</i>	Итаконовая кислота	300	3	
<i>Aspergillus niger</i> , шт. R-3	Лимонная кислота	1000	3	А
<i>Blakeslea trispora</i> (+) и (-), 8А	β-каротин	10000	4	А
<i>Entomophthora</i> , шт. "Е.ИНИИ"	Биополиен	5000	3	А
<i>Fusidium coccineum</i> , шт. 108	Фузидиевая кислота	5000	3	
<i>Penicillium canescens</i>	β-галактозидаза	2000	3	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Пенициллин	5000	3	
<i>Penicillium funiculosum</i> , шт. F-149	Декстраназа	2000	3	А
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> , шт. TW-1	β-глюканаза	5000	3	А
<i>Trichoderma reesei</i> , 18.2-КК	Целловиридин Г20Х	5000	3	А
<i>Trichoderma viride</i> , 44-11-62/3	Целлюлолитические ферменты	2000	3	А

му РФ. Общие технические регламенты вводят основные определения и положения, конкретизация которых приводится в специальных технических регламентах, которые разрабатываются параллельно с общими. Перечень таких проектов, имеющих непосредственное значение для микологической практики, представлен в табл. 4.

В приложении к регламенту «О безопасности микробиологических и биотехнологических производств и их продукции» указаны списки по группам патогенности микроорганизмов, которые имеют все тот же вид, что и правила Госсанэпиднадзора РФ 2003 и 1980 годов в части мицелиальных грибов и дрожжей. В отдельном приложении к данному регламенту приведены предельно-допустимые концентрации клеток микроорганизмов в воздухе рабочих зон различных производств, в том числе и для мицелиальных грибов (табл. 5) и дрожжей (табл. 6), с указанием классов опасности для этих организмов. Поскольку общественные слушания данных регламентов прошли явно без участия микологов – специалистов в области таксономии, биотехнологии и медицинской микологии, данные перечни изобилуют ошибками как грамматическими, так и номенклатурными (в таблицах они выделены жирным шрифтом). Не очень ясно, по какому принципу определяются классы опасности для тех или иных видов, если они не входят в списки Госсанэпиднадзора, почему для разных штаммов

одного вида установлены ПДК, различающиеся в несколько раз. Поскольку в производстве можно использовать только непатогенные и нетоксичные штаммы, ПДК, видимо, основано на аллергенных свойствах, а в этом случае у штаммов одного вида не может быть, на наш взгляд, больших различий. По-видимому, эти показатели определялись в разное время и в различных производственных условиях, а рассмотрение и сравнение их с общих позиций при подготовке проекта данного регламента не проводилось.

Проект общего технического регламента по экологической безопасности сопровождается разработкой специальных технических регламентов, список которых приведен в табл. 7. Все эти специальные технические регламенты, так или иначе, связаны с профессиональной деятельностью специалистов-микологов, с проблемами, которые мы обсуждаем на ежегодных конференциях и конгрессах. Это вопросы биоповреждений, токсикологии, пищевой ценности, биобезопасности и другие. Проблема состоит в том, что научные сотрудники еще не вовлечены в практику знакомства с текстами разрабатываемых проектов законов и участия в общественных слушаниях по их обсуждению. В то же время такой опыт уже имеется. В странах Европейского Союза обсуждение проектов законов идет по определенной схеме (рис. 2), включающей и государственные структуры, и профессиональные



Рис. 2. Обсуждение проектов законов в странах ЕС

Таблица 6
ПДК дрожжевых грибов-продуцентов в воздухе рабочей зоны*

Наименование микроорганизма-продуцента	Продуцент вещества	ПДК, кл/м ³	Класс опасности	Аллергенное действие на организм
<i>Candida ethanolica</i> , штг. ВСБ-814	Кормовой белок	100	3	А
<i>Candida lipol(i)ytica</i> , штг. 367-3	Компонент деваройла	200	3	
<i>Candida maltosa</i> , штг. ВСБ-542, 542в, 640, 777, 779	Кормовой белок	500	3	
<i>Candida maltosa</i> , штг. ВСБ-569, 778, 899, 900, 907, 930	Кормовой белок	1000	3	
<i>Candida rugosa</i> , штг. ВСБ-925, 928	Кормовой белок	300	3	
<i>Candida scotti</i> , штг. ВГИ-81/1	Кормовой белок	1000	3	
<i>Candida seatrix</i> , штг. AR-217	Кормовой белок	200	3	А
<i>Candida tropicalis</i> , штг. ВСБ-830	Кормовой белок	300	3	А
<i>Candida tropicalis</i> , штг. ВСБ-637	Кормовой белок	500	3	А
<i>Candida tropicalis</i> , штг. Арх. 2/8	Кормовой белок	1000	3	
<i>Candida valida</i> , штг. EL-1Ф-Б	Кормовой белок	1000	3	
<i>Candida utilis</i> , штг. ВСВ-651	Эприн	1000	3	А
<i>Endomycopsis fibuliger(a)</i> , штг. ВСБ-12	Кормовой белок	400	3	А
<i>Pichia membrane(a)ifaciens</i> , штг. (ВМК-У) ВКМ У-934	Цитохром С	2000	3	

* – жирным шрифтом выделены ошибки

союзы, и общественные ассоциации. В России также профессиональные союзы и общественные организации активно участвуют в процессе обсуждения проектов общих и специальных технических регламентов. Так в Интернете можно найти замечания Союза Металлургов на проект

по санитарно-эпидемиологической безопасности, а на сайте Российского Союза Химиков (рис. 3) размещены имеющие к нему отношение проекты регламентов и идет открытое их обсуждение. Видимо, и Национальной академии микологии нужно принять решение об активном включении

Таблица 7

Некоторые технические регламенты по отдельным аспектам обеспечения безопасности населения и окружающей среды от различных типов воздействий

Наименование технического регламента	Срок представления проекта технического регламента в Правительство РФ	Федеральные органы исполнительной власти, участвующие в организации разработки технического регламента
I. Общий технический регламент		
Об экологической безопасности	март 2007 г.	МПР России Минздравсоцразвития России Ростехнадзор Росгидромет Минсельхоз России МЧС России Минобороны России Минпромэнерго России Минкультуры России ФСКН России Минрегион России МВД России
II. Специальные технические регламенты		
О требованиях к безопасности зерна, процессов его производства, хранения, перевозки, реализации, обработки и утилизации		
О требованиях к безопасности кормов и кормовых добавок		
О требованиях к безопасности пищевых продуктов и процессов их производства, хранения, перевозки, реализации и утилизации		
О требованиях к безопасности продуктов детского питания, процессов их производства, хранения, перевозки и реализации		
О безопасности табачной продукции		
О требованиях к биологической безопасности растений, ввозимых на территорию Российской Федерации		
О требованиях к биологической безопасности животных, ввозимых на территорию Российской Федерации		
О фитосанитарных требованиях к древесным упаковочным и крепежным материалам, ввозимым с различными грузами на территорию Российской Федерации		

Таблица 8

Таксономическое разнообразие патогенных грибов

Группы грибов	Число видов в группах риска		
	1 группа	2 группа	3 группа
Oomycota	2	1	0
Zygomycota	11	27	0
Anamorphic Fungi	25	76	1
Ascomycota	300	266	11
Basidiomycota	36	34	3
Итого	374	404	15

организации в этот процесс. Иначе будут приняты законы, несущие нормы, не только противоречащие микологической практике, но и неверно сформулированные. При этом ряд совершенно необходимых положений может быть упущен.

В рамках данного обзора нельзя не остановиться на таксономическом разнообразии патогенных грибов. На основании литературных данных нами был проведен анализ видов мицелиальных грибов и дрожжей, включенных

Российский Союз Химиков участвует в обсуждении проектов технических регламентов: *Раздел сайта: Программы / Разработка технических регламентов*

Почему блокируется решение правительства об изменении Закона "О техническом регулировании"? Открытое письмо Президенту Российской Федерации ПУТИНУ В.В.

Как Минпромэнерго оценивает ход работ по созданию отраслевых техрегламентов? Проект технического регламента «О безопасности химических производств»

Обоснование необходимости принятия технического регламента «О безопасности химических производств». Состав экспертной комиссии по проведению экспертизы специального технического регламента «О безопасности химических производств». Проект технического регламента «О безопасности синтетических моющих средств и товаров бытовой химии»

Обоснование необходимости принятия федерального закона специального технического регламента «О безопасности синтетических моющих средств и товаров бытовой химии». Состав экспертной комиссии по проведению экспертизы специального технического регламента «О безопасности синтетических моющих средств и товаров бытовой химии». Проект технического регламента «О безопасности химической продукции, процессов ее хранения, перевозки, реализации, применения и утилизации»

Рис. 3. Обсуждение проектов регламентов на сайте Российского Союза Химиков (<http://www.ruschemunion.ru/>)

в официальные списки групп риска различных стран мира – России, Бельгии, Германии, Голландии, Великобритании, США, Швейцарии, Австралии и Новой Зеландии, Сингапура (Directive 2000/54/ec, 2000; de Hoog et al., 2000; Liste risikobewerteter..., 2001; NIH recombinant

DNA guidelines, 2002; Safety in laboratories, 2002; Санитарно-эпидемиологические правила, 2003; Сергеев, Сергеев, 2003; Approved List..., 2004; Guidelines on the import ..., 2004; Herausgegeben vom Bundesamt..., 2004; Belgian classifications..., 2006).

Необходимо отметить, что рассмотренные списки патогенных видов мицелиальных грибов и дрожжей крайне неоднородны. Некоторые из них содержат всего несколько десятков видов (такие как списки Европейского Союза и России), другие – многие сотни (такие как списки Швейцарии и Германии). В результате проведенного анализа была создана база данных, включающая сведения по таксономической принадлежности каждого вида – подцарство, класс, отдел, порядок, семейство, род, вид и вариант. Для каждого наименования вида, упомянутого в том или ином списке, нами было найдено его современное название. Для этого мы использовали сведения из номенклатурной базы данных, размещенной в Интернете (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>), поддерживаемой ассоциацией микологов-систематиков, большая часть которых работает в Голландии (СБС) и Великобритании (Всемирный микологический институт – СМІ).

Количество видов мицелиальных грибов и дрожжей, поименованных в списках патогенных организмов довольно велико и, по нашим данным, уже близко к 800 (табл. 8), хотя еще недавно говорилось о 300–400 видах. Синонимы в данном подсчете мы не учитывали, так же как и различные наименования телеоморфных и анаморфных стадий. Принадлежность видов к той или иной группе риска устанавливали, мажорируя в большую сторону, то есть если вид в разных списках упоминался во второй и в третьей группе, мы относили его к третьей – более опасной. Таким образом, к третьей группе патогенности отнесены 15 видов грибов. Их таксономическое разнообразие представлено в табл. 9.

Таблица 9

Таксономическое разнообразие грибов 3-й группы риска

<i>Ajellomyces capsulatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>
<i>Cladophialophora arxii</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>farciminosum</i>
<i>Cladophialophora bantiana</i>	<i>Histoplasma duboisii</i>
<i>Cladophialophora devriesii</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Penicillium marneffeii</i>
<i>Coccidioides posadasii</i>	<i>Ramichloridium mackenziei</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	

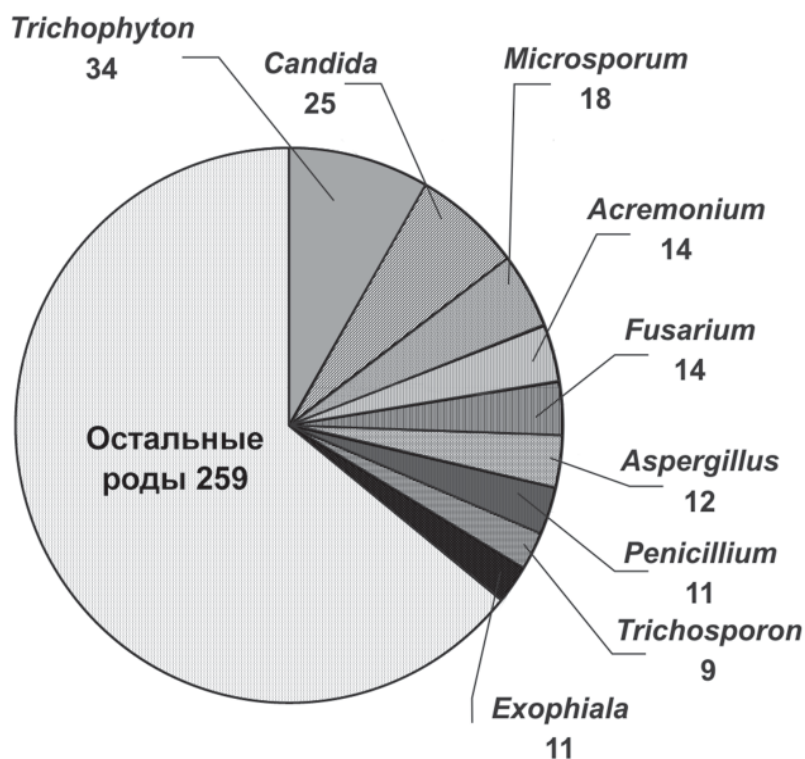


Рис. 4. Таксономическое разнообразие грибов 2-й группы риска (число видов в родах)

Что касается 2-ой группы риска, то ее таксономическое разнообразие оказалось очень велико (рис. 4). При этом на долю 9 родов, таких как *Candida*, *Microsporium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichosporon*, *Exophiala* и *Trichophyton* приходится более трети видов, остальные 259 родов представлены единичными видами.

Особо мы хотели бы остановиться на 1-ой группе патогенности. Таксономическое разнообразие этой группы наиболее резко отличается в

анализированных нами источниках. Список 4-ой группы патогенности, принятый в Российской Федерации, соответствующий 1-й группе риска, представлен в табл. 1. Он не выдерживает никакой критики, т.к. содержит давно устаревшие видовые наименования и даже грамматические ошибки, выделенные жирным шрифтом. Как говорилось выше, сейчас предложен новый вариант официальных списков грибов различных групп патогенности для нашей страны. Однако, на наш взгляд, наиболее приемлемым подходом к этой группе является тот, что приведен в официальных документах по биобезопасности Великобритании и Европейского Союза (Approved List..., 2004; Directive 2000/54/EC, 2000), где говорится, что грибы, не поименованные в группах с уровнем биологического риска 2, 3 и 4, относятся к группе риска 1.

Мы также считаем, что к первой группе риска или четвертой группе патогенности по российской классификации следует отнести все виды грибов, за исключением съедобных, которые не поименованы в других, более опасных группах. Мы понимаем, что этот вывод может вызвать справедливые и серьезные возражения. Однако в современной ситуации невозможно предсказать, какие микроорганизмы, в том числе и грибные, ранее никогда не упоминавшиеся в связи с возникновением инфекционных заболеваний, при создании определенных экологических условий в совокупности с ослабленной иммунной системой человека могут оказаться серьезными патогенами. В свете обеспечения биологической безопасности, при необходимости получения лицензионного разрешения на работу с 1–4 группой патогенности, включив работу с любыми грибами в лицензионную сферу, можно упорядочить систему деятельности и развития микробиологических и микологических лабораторий различного профиля.

Список литературы

1. Марфенина О.Е. Опасные плесени в окружающей среде // Природа. 2002. № 11, С. 33-38;
2. Озерская С.М., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Запротова К.М., Еремина С.С. Обзор состояния дел с коллекциями микроорганизмов в России // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2007. Т.2. № 3. С. 51–61.
3. Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, простейших, микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения. М.: МЗ СССР, 1980. 37 с;
4. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. (3-е издание). Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2004. 201 с. (http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11w.pdf);
5. Проект технического регламента «О биологической безопасности», согласованный с ФОИВ. Москва, 2005. 63 с. (<http://www.minprom.gov.ru/activity/metrology/strateg/trprogramm/3>);
6. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1318-03. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами. М.: Госкомсанэпиднадзор РФ, 2003. 39 с;
7. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: ООО «Бином-пресс», 2003. 440 с;
8. Approved list of biological agents. Advisory Committee on Dangerous Pathogens, UK:HSE, 2004. 21 p. (<http://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf>);
9. Belgian classifications for micro-organisms based on their biological risks. Belgian Biosafety Server, 2006. (<http://www.biosafety.be/RA/Class/ClassBEL.html>);
10. Bioriskmanagement: Laboratory biosecurity guidance. Geneva: World Health Organization, 2006. 33 p.;
11. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 4th edition. Washington: U.S. Government printing office, 1999. 265 p. (<http://www.cdc.gov/OD/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm>);
12. De Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 2000. 1126 p.
13. Directive 2000/54/ec of the European Parliament and of the Council of 8 September 2000. European Economic Community, 2000. (http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=en&numdoc=32000L0054&model=guichett);
14. Guidance for the operation of biological resource centres (BRCS). Part 2: Microorganism domain. OECD Global forum, 2006. Draft;

15. Guidelines on the import, transport, transfer, handling and disposal of human pathogens for diagnosis, scientific research and industrial uses in Singapore. Singapore: Disease Control Branch Current Operations Division Ministry of Health, 2004. 37 p.;
16. Herausgegeben vom Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft BUWAL. Einstufung von Organismen. Pilze. Bern, 2004. (<http://www99.mh-hannover.de/vorstand/biologsicherheit/texte/listepil.pdf>);
17. Laboratory biosafety manual, 3rd edition. Geneva: World Health Organization, 2004. 178 p. (http://www.who.int/csr/deliberations/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en);
18. Laboratory biosafety guidelines. 3rd edition. Canada: Authority of the Minister of health population and public health branch centre for emergency preparedness and response, 2004. 125 p. (http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/pdf/lbg_2004_e.pdf);
19. Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten. Deutschland, Bonn: Bundesministerium für Gesundheit im Auftrag, 2001. 18 p. (http://www.bvl.bund.de/cIn_027/nn_491872/DE/06_Gentechnik/00_doks_downloads/06_Register_Datenbanken/organismenliste,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/organismenliste.pdf);
20. NIH recombinant DNA guidelines. Appendix B. USA: National Institutes of Health, 2002. (http://www4.od.nih.gov/oba/RAC/guidelines_02/APPENDIX_B.htm#_Appendix_B-I_Risk);
21. Safety in laboratories Part 3: Microbiological aspects and containment facilities. Standard AS/NZS 2243.3:2002. 5th edition. School of Medical Sciences – UNSW – Wallace Wurth Building, Sydney, Australia, 2002. 5 p. (http://www.adelaide.edu.au/ethics/genetech/docs/SectionU_PC1Lab.pdf);
22. Towards a global biological resource centre network. OECD, 2007. (http://www.oecd.org/document/51/0,2340,en_2649_34537_33791027_1_1_1_1,00.html).

В.А. Тутьельян, Л.В. Кравченко, А.Ю. Сергеев

МИКОТОКСИНЫ

Микотоксины (греч. *mykes* – гриб и *toxicon* – яд) являются вторичными метаболитами микроскопических (плесневых) грибов, т.е. метаболитами, не являющимися безусловно необходимыми для роста и развития продуцирующих их микроорганизмов. Микотоксины обнаруживают чаще всего в качестве природных загрязнителей растительных продуктов. Некоторые микотоксины, при их высоком содержании в кормах, могут накапливаться в продуктах животного происхождения.

Продуцентами микотоксинов являются многочисленные виды грибов, среди которых доминируют представители родов *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Микотоксины вырабатываются мицелиальными клетками грибов по завершении фазы активного роста и могут накапливаться в органах выживания (конидии, склероции), а также в субстрате, окружающем колонию гриба. Условно грибы-продуценты микотоксинов делятся на «полевые» – фитопатогенные грибы, которые поражают растение и продуцируют токсины в процессе созревания и уборки урожая (типичные представители – грибы рода *Fusarium*), и грибы «хранения» – сапротрофы, которые развиваются на субстрате в процессе его хранения и переработки (чаще грибы рода *Penicillium* и *Aspergillus*).

Для токсинообразования «полевых» грибов определяющим фактором являются климатические и погодные условия. Высокая температура и засуха стимулируют рост грибов *F. verticillioides*, низкая температура и высокая влажность в период цветения и созревания злаковых культур – благоприятствуют росту и токсинообразованию *F. graminearum*. Рост грибов «хранения» зависит от химического состава субстрата, температуры и влажности окружающей среды и самого субстрата. Повреждения, вызванные насекомыми, во всех случаях способствуют инвазии грибов-продуцентов микотоксинов. По данным FAO, ежегодно не менее 25% всех продовольственных ресурсов подвержено загрязнению микотоксинами.

Микотоксины – соединения, образующиеся в цепи последовательных ферментных реакций из относительно небольшого числа химических простых продуктов основного (первичного) метаболизма грибов, таких как ацетат, малонат, мевалонат и аминокислоты (Табл. 1). Они могут выполнять многочисленные функции, направленные на обеспечение выживания микроскопических грибов и их конкурентоспособности в борьбе за место в определенных экологических нишах.

Основной путь попадания микотоксинов в организм – пищевой (алиментарный). Для людей, работающих с загрязненным сырьем, существует профессиональный риск воздействия микотоксинов респираторным путем или контактным, через кожу. Острые пищевые отравления микотоксинами встречаются редко, преимущественно среди сельского населения, носят очаговый, чаще всего семейный характер. Значительно более реальным представляется риск, связанный с хроническим поступлением с пищей незначительных количеств микотоксинов, большинство из которых обладает иммунодепрессивными свойствами, а некоторые являются сильными канцерогенами. В рейтинге канцерогенного риска, связанного с контаминантами пищи, микотоксины (афлатоксины и охратоксин А) занимают первое место и превосходят в десятки раз риск, связанный с такими антропогенными загрязнителями как диоксины, полихлорированные бифенилы, пестициды (Табл. 2).

Хотя в характере токсического действия большинства микотоксинов имеются определенные черты специфичности, микотоксикозы (за небольшим исключением) не имеют строго очерченной клинической картины. Диагностика их основана на выявлении связи между заболеванием и употреблением в пищу контаминированного продукта; обнаружении микотоксина в пище и биомаркеров (метаболитов и аддуктов микотоксинов) в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча), свидетельствующих о воздействии микотоксина на человека; наличии сходства симптомов заболевания у человека с экспериментальным микотоксикозом у животных; воссоздании характерных симптомов заболевания у экспериментальных животных.

Введение системы контроля за содержанием микотоксинов в продовольственном сырье, пищевых продуктах и кормах в большинстве развитых стран резко снизило вероятность острых микотоксикозов. Однако, как свидетельствуют эпидемиологические наблюдения, отсутствие регламентов содержания микотоксинов, низкий

Таблица 1
Основные пути биосинтеза микотоксинов

Первичный метаболит	Путь	Микотоксины
Ацетил-СоА	Поликетидный	Афлатоксины, охратоксины, цитринин, патулин, зеараленон, цитреовиридин, фумонизины, монилиформин
Мевалоновая кислота	Терпеноидный	Трихотецены: Т-2 токсин, НТ-2 токсин, диацетоксискирпенол, дезоксиниваленол, ниваленол, фузаренон Х
Аминокислоты	Синтез пептидов	Эргоалкалоиды

Таблица 2
Рейтинг канцерогенного риска, связанного с контаминантами пищи

(FDA, Health Canada; T. Kuiper-Goodman, 1998)

Токсиканты	Потребление с пищей, мкг/кг м.т.	ДСД, мкг/кг м.т.	ПП/ДСД, %	Примечание
Афлатоксин В1	0,00026 0,002 0,00026	0,001 0,001 0,00004	26 200 600	Взрослые, HBV- Дети, HBV- Взрослые, HBV+
Охратоксин А	0,002	0,012 0,004	17 50	JECFA, ДСД Канада, ДСД
Диоксины (ТХДД)	0,0000002	0,00001	2	
ПХБ	0,01	1	1	
γ-ГХЦГ (линдан)	0,00046	0,3	0,15	
Каптан	0,00016	100	0,0016	

уровень агротехники, недостаточное питание особенно в странах с климатическими условиями, благоприятными для роста и токсинообразования грибов-продуцентов микотоксинов, способствуют возникновению отдельных вспышек микотоксикозов.

Из выделенных более чем 300 микотоксинов, лишь небольшое число представляет риск для здоровья человека и животных и обнаруживается повсеместно в качестве природных конта-

Таблица 3
Алиментарные микотоксикозы у людей

Заболевание, синдром	Микотоксин	Источник микотоксина
Эрготизм	Эргоалкалоиды	Рожь, ячмень, пшеница, просо
Острый гепатит, синдром Рейе, квашиоркор, первичный рак печени	Афлатоксины	Арахис, кукуруза
Балканская эндемическая нефропатия, Опухоли почек, мочеточников	Охратоксин А, Цитринин	Пшеница, ячмень, кукуруза
Алиментарная токсическая алейкия	Трихотеценовые микотоксины, продуцируемые <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> (Т-2 токсин)	Просо, пшеница, ячмень, рожь, овес, гречка
Синдром «пьяного хлеба»	Трихотеценовые микотоксины, продуцируемые <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> (дезоксиниваленол, ниваленол)	Пшеница
Акакаби-токсикоз	Микотоксины <i>F. graminearum</i> (дезоксиниваленол, ниваленол, фузаренон Х)	Пшеница, ячмень, овес, рис
Болезнь Кашина-Бека	Микотоксины <i>F. sporotrichioides</i> (?)	Кукуруза, пшеница
Острые фузариотоксикозы	Трихотеценовые микотоксины – дезоксиниваленол, ниваленол, Т-2 токсин, фумонизины (?)	Кукуруза, пшеница, рис, сорго
Рак пищевода	Фумонизины (?)	Кукуруза
Дефекты нервной (медулярной) трубки	Фумонизины (?)	Кукуруза
Преждевременное менархе, Рак шейки матки	Зеараленон (?)	Кукуруза
Кардиальная бери-бери (синдром «желтого» риса)	Цитреовиридин	Рис
Кодуа-токсикоз	Циклопиазоновая кислота	Гречка
Ониалаи (onyalai)	Токсигенные штаммы <i>Phoma sorghina</i> (тенуазоновая кислота (?))	Просо, сорго

минантов продовольственного сырья и пищевых продуктов (табл. 3 и 4). Единая классификация микотоксинов отсутствует. В одних случаях в основу группового деления положена их химическая структура, в других – характер токсического действия, в третьих – видовая принадлежность грибов-продуцентов. Ниже представлены основные сведения о микотоксинах, представляющих реальную (доказанную) или потенциальную опасность для здоровья человека. К ним относятся афлатоксины, некоторые трихотеценовые микотоксины (дезоксиниваленол, ниваленол, Т-2 токсин), охратоксин А, патулин, зеараленон и фумонизины.

Афлатоксины

Афлатоксины – наиболее известные и изученные микотоксины. Афлатоксины относятся к поликетидным производным (декакетиды, содержат 10 C₂ единиц) и по химической структуре являются фурукумаринами. Впервые в 1961 г афлатоксины были выделены из арахисовой муки, зараженной грибом *A. flavus*, который дал название этой группы микотоксинов – *A(spergillus) fla(vus) toxins*. Семейство афлатоксинов включает не менее 16 соединений, из которых 4 – афлатоксины В₁, В₂, G₁ и G₂, являются природными загрязнителями пищевых продуктов и кормов, а остальные – их метаболитами, об-

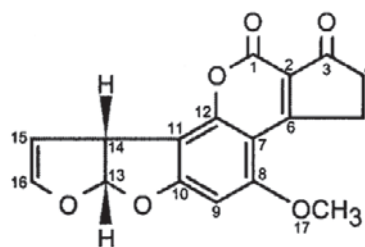
Таблица 4

Микотоксины, представляющие опасность для здоровья человека

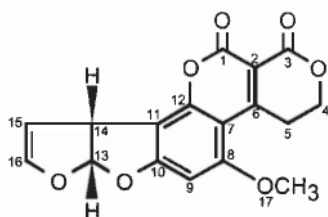
Микотоксины	Основные продуценты	Природные субстраты	Характер токсического действия
Афлатоксины В ₁ , В ₂ , G ₁ , G ₂ , М ₁ Стеригматоцистин	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. versicolor</i>	Арахис, кукуруза, семяна хлопчатника, орехи – грецкие, миндаль, фисташки, фундук Ячмень, кукуруза, кофе, сыры	Гепатотоксическое, гепатоканцерогенное, мутагенное, тератогенное, иммунодепрессивное Гепатотоксическое
Охратоксин А	<i>A. ochraceus</i> <i>A. carbonarium</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Пшеница, ячмень, кукуруза, кофе-бобы, сыры, виноград	Нефротоксическое, канцерогенное, тератогенное, иммунодепрессивное
Цитринин	<i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>Monascus ruber</i> , <i>M. purpureus</i>	Рис, пшеница, ячмень, овес, рожь, кукуруза	Нефротоксическое
Фумонизины В ₁ , В ₂ , В ₃	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i>	Кукуруза, сорго, рис	Гепатотоксическое, нефротоксическое, нейротоксическое, канцерогенное
Трихотеценовые микотоксины: Т-2 токсин, НТ-2 токсин Дезоксиниваленол Ниваленол Макроциклические (сатратоксины, веррукарины, роридины)	<i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. nivale</i> <i>Stachybotrys spp.</i> <i>Myrothecium spp.</i> <i>Phomopsis spp.</i>	Пшеница, ячмень, рожь, овес, кукуруза Сено, солома	Нейротоксическое, геморрагическое, лейкопеническое, дерматотоксическое, иммунодепрессивное
Зеараленон	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	Кукуруза, пшеница, ячмень	Эстрогенное, тератогенное
Патулин	<i>P. griseofulvin</i> <i>P. expansum</i>	Фрукты, овощи и продукты их переработки	Нейротоксическое, мутагенное
Эрготоксины	<i>Claviceps purpurea</i> <i>Claviceps paspali</i>	Различные зерновые, дикорастущие злаки	Нейротоксическое
Циклопиазоновая кислота	<i>A. flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. camemberti</i>	Арахис, кукуруза, сыры	Нейротоксическое, нефротоксическое, гепатотоксическое

разующимися в организме млекопитающих. Буквенные обозначения характеризуют способность афлатоксинов флюоресцировать в ультрафиолетовом свете: группа В – голубым (blue), группа G – зеленым (green). Подстрочная нумерация указывает на их относительную хроматографическую подвижность. Афлатоксин М₁ был обнаружен в молоке коров, получавших корм, загрязненный афлатоксином В₁, и получил название «молочный токсин» с буквенным индексом «М».

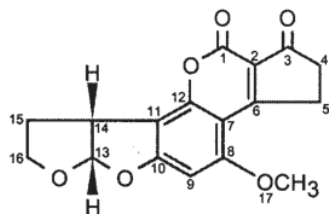
Афлатоксин В₁



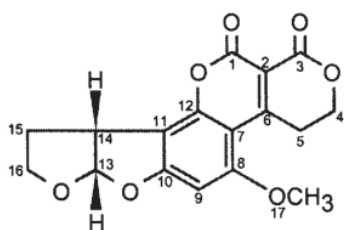
Афлатоксин В2



Афлатоксин G1



Афлатоксин G2



К семейству афлатоксинов относят также и **стеригматоцистин**, который является в цепи биосинтеза афлатоксина В1 одним из его предшественников и обладает близкими токсическими свойствами. Имеются данные об обнаружении стеригматоцистина как контаминанта риса, ячменя, кукурузы. Способность продуцировать стеригматоцистин выявлена у некоторых видов *Aspergillus* – *A. versicolor*, *A. nidulans*.

Афлатоксины отличаются сильными гепатотоксическими, генотоксическими, иммунодепрессивными и канцерогенными свойствами. Афлатоксин В1 является наиболее активным и обнаруживается чаще и в больших концентрациях, чем остальные. К токсическому действию афлатоксинов чувствительно большинство видов животных. Однократная LD₅₀ афлатоксина В1 при введении внутрь варьирует для разных видов животных от 0,3 до 10 мг/кг массы тела. Во всех случаях органом-мишенью является печень. Самцы более чувствительны к действию афлатоксина, чем самки. Характерным морфологическим признаком афлатоксикоза является пролиферация эпителия желчных протоков. Афлатоксины относятся к сильнейшим гепатоканцерогенам. Как афлатоксин В₁, так и смесь афлатоксинов вызывают развитие гепатоцеллюлярных и холангиоцеллюлярных карцином у разных видов, включая приматов. Афлатоксин М1 по своим канцерогенным свойствам в 10 раз менее активен, чем афлатоксин В₁. Согласно классифи-

Таблица 5
Основные физико-химические свойства афлатоксинов

Афлатоксин	Молекулярная формула	Молекулярная масса	Точка плавления, °С	Поглощение в УФ (в этаноле)		Флюоресценция λ, нм (цвет)
				λ, нм	ε	
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268–269	223 265 362	25600 13400 21800	425 (голубой)
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286–289	265 363	11700 23400	425 (голубой)
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244–246	243 257 264 362	11500 9900 10000 16100	450 (зеленый)
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237–240	265 363	9700 21000	450 (зеленый)
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	226 265 357	23100 11600 19000	425 (голубой)

кации Международного агентства по изучению рака (МАИР) афлатоксин В₁ относится к категории веществ, канцерогенных для человека (Группа 1), а афлатоксин М₁ – к веществам, возможно канцерогенным для человека (Группа 2В).

В организме афлатоксин В₁ подвергается метаболическим превращениям главным образом при участии цитохром Р-450 содержащей монооксигеназной системы с образованием менее токсичных метаболитов – афлатоксинов М₁, Q₁, Р₁, которые выводятся из организма в виде конъюгатов с глюкуроновой кислотой, глутатионом или сульфоконъюгатов. При участии некоторых изоформ цитохрома Р-450 – СYP 1A2, СYP 3A4, афлатоксин В₁, так же, как афлатоксин М₁ и стеригматоцистин, может подвергаться эпоксицированию с образованием высокорекреационного 8,9-эпоксида. Канцерогенные свойства афлатоксина В₁ связывают со способностью его эпоксида взаимодействовать с молекулой ДНК, что приводит к специфической (для действия афлатоксина) мутации гена опухолевого супрессора р53. Основной путь детоксикации эпоксида афлатоксина – образование конъюгатов с глутатионом при участии разных классов глутатионтрансферазы. Высокое сродство к эпоксиду афлатоксина обнаружено у глутатионтрансфераз класса α. Выявленные различия между видами в чувствительности к канцерогенному действию афлатоксинов связывают с различиями в соотношении активности ферментов, «активирующих» афлатоксины, и активностью глутатионтрансфераз

Продуценты афлатоксинов (*Aspergillus flavus* и *A. parasiticus*, реже – *A. nomius*) распространены повсеместно, но наиболее благоприятными для их роста и токсинообразования являются регионы с теплым и влажным климатом. В природных условиях наиболее часто и в наибольших количествах афлатоксины обнаруживают в арахисе, кукурузе, семенах хлопчатника. В значительных количествах они могут накапливаться в различных орехах (бразильские и грецкие орехи, миндаль, фисташки, фундук, кешью, пекан). Второе место по частоте загрязнения афлатоксинами занимают специи – разные виды перца, мускатный орех. Зерновые культуры подвергаются загрязнению афлатоксинами редко и, как правило, в низких концентрациях. Высокий уровень загрязнения кормов афлатоксином В₁ может явиться причиной накопления афлатоксина М₁ (метаболит афлатоксина В₁, обладающий гепатотоксическими и гепатоканцерогенными свойствами) в коровьем молоке. Результаты мониторинга свидетельствуют, что население стран

Африки, расположенных южнее Сахары, и стран Юго-Восточной Азии подвергаются воздействию афлатоксинов (через загрязненный арахис и кукурузу, а также молоко, включая грудное) на протяжении всей жизни, начиная с внутриутробного периода.

По данным Объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (JECFA) суточная нагрузка афлатоксинами на население разных стран значительно варьирует. Так, для Китая она может достигать 91 мкг/кг м.т., для стран Европейского Союза – 2 – 77 нг/человека (т.е. 0,03 – 1,28 нг/кг м.т.). Допустимое суточное потребление для афлатоксина не установлено. Комиссия Codex Alimentarius рекомендует снижать содержание афлатоксинов в продуктах питания до «разумно» возможно низкого уровня, т.е. уровня, обеспечивающего баланс между минимальным риском для здоровья и максимальным сохранением структуры питания населения. Кодексным Комитетом по пищевым добавкам и контаминантам (CCFAC) в 2003 г рекомендована для всех видов продуктов питания, но утверждена только для арахиса, предельно допустимая концентрация (ПДК) суммы афлатоксинов – 15 мкг/кг. Для молока утверждена ПДК афлатоксина М₁ – 0,5 мкг/кг.

Острые *афлатоксикозы* у людей связаны с многократным поступлением с пищей исключительно больших количеств афлатоксинов, преимущественно афлатоксина В₁. Они характеризуются подострым началом с лихорадкой и последующим быстрым развитием желтухи (в 98% случаев), асцита (в 74% случаев) и отека ног. В большинстве случаев обнаруживают увеличение печени, реже – селезенки. Часто наблюдается рвота. В сыворотке крови возрастает уровень непрямого билирубина и активность щелочной фосфатазы. На срезах печени, полученных при биопсии или аутопсии, выявляется характерная для действия афлатоксинов пролиферация эпителия желчных протоков. Афлатоксикозы у людей наблюдаются в странах, отличающихся высоким уровнем загрязнения пищевых продуктов афлатоксинами – Индия, Кения, Уганда, Китай. Описаны случаи массовых отравлений афлатоксинами с высокой летальностью (до 25%) в Индии в результате употребления в пищу продуктов из заплесневелой кукурузы, в которой содержание афлатоксина В₁ доходило до 15,6 мг/кг. Расчетная острая летальная доза для человека составляет 10–20 мг.

Отравление афлатоксинами рассматривается как возможный этиологический фактор ост-

рого заболевания у детей (описано как *синдром Reye*), основными проявлениями которого являются энцефалопатия и жировая дегенерация внутренних органов. В печени, сыворотке и моче больных обнаруживали афлатоксины, что в некоторых случаях коррелировало с содержанием афлатоксина в пищевых продуктах. Отмечается значительное сходство заболевания с экспериментальным острым афлатоксикозом у молодых макак (отек мозга, жировая дегенерация печени, почек, сердца, рвота, понос и кома).

Считают, что наряду с белковой недостаточностью афлатоксины являются одним из возможных этиологических факторов *квашоркора*, что связано с обнаружением афлатоксина В₁ и его метаболитов в печени и крови больных детей, коррелирующим с высоким уровнем загрязнения афлатоксином В₁ местных пищевых продуктов, и с наличием общих симптомов *квашоркора* и афлатоксикоза. Географическая зона распространения *квашоркора* (страны с тропическим и субтропическим климатом) и пик заболеваемости в сезон дождей совпадают с зонами и сезоном, в которые отмечаются особо высокие уровни загрязнения пищевых продуктов (арахис, кукуруза) афлатоксинами.

Данные эпидемиологических исследований и результаты биомониторинга свидетельствуют о наличии строгой корреляции между поступлением афлатоксина В₁ с пищей и частотой *первичного рака печени* (гепатоцеллюлярной карциномы) в некоторых странах Африки и Юго-Восточной Азии. В то же время ведется оживленная дискуссия вокруг взаимоотношений афлатоксинов и вируса гепатита В и, возможно, С в этиологии *первичного рака печени*. Установлено, что риск этой формы рака, связанный с потреблением афлатоксинов, возрастает в 30 раз у лиц носителей вируса гепатита В. Одним из возможных механизмов синергизма между двумя факторами риска является изменение метаболизма афлатоксина В₁ у инфицированных лиц. Установлено, что в печени людей, инфицированных вирусом гепатита В, значительно возрастает активность цитохромов Р-450 3А4 и 2А6 (ферментов, «активирующих» афлатоксин В₁) и резко снижена активность глутатионтрансферазы, ключевого фермента детоксикации афлатоксина В₁. В связи с этим, вакцинация против вируса гепатита В, особенно в странах, где *первичный рак печени* относится к наиболее частым формам рака, рассматривается как один из реальных путей снижения частоты этого заболевания.

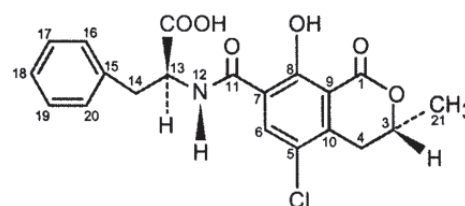
Специфическими индикаторами не только поступления, но и воздействия афлатоксинов на организм являются биомаркеры. К ним относятся – аддукты афлатоксин В₁-N⁷-гуанин (продукт ковалентного связывания афлатоксина В₁ с ДНК), которые выявляются в моче в течение первых 24–48 ч. после потребления загрязненного афлатоксинами продукта, и аддукты афлатоксина В₁ с альбумином в периферической крови, которые имеют значительно более длительный период полужизни. Обнаружение в гепатокарциноме характерной мутации в кодоне 249 гена опухолевого супрессора p53 также указывает на действие афлатоксина.

Биомаркеры позволяют оценить, с одной стороны, реальную нагрузку токсином и степень риска развития опухолей, а с другой – свидетельствует об идентичности путей биохимической активации и токсикодинамики афлатоксина В₁ у человека и экспериментальных животных.

Респираторный путь поступления афлатоксинов в организм возможен при переработке загрязненного продовольственного сырья и кормов. Результаты единичных длительных наблюдений за рабочими, подвергавшимися профессиональному риску контакта с афлатоксинами, установили вероятность возрастания смертности от злокачественных опухолей, в том числе опухолей дыхательных путей, в результате вдыхания и/или заглатывания содержащей афлатоксина пыли.

Охратоксин А

Охратоксины А и В вместе с *цитринином* составляют группу микотоксинов, повреждающих преимущественно почки. По своей структуре охратоксины являются изокумаринами, связанные (табл. 6) пептидной связью с фенилаланином. Чаще всего как природный загрязнитель пищевых продуктов и кормов обнаруживается охратоксин А и в редких случаях – охратоксин В.



Охратоксин А

Таблица 6
Основные физико-химические свойства охратоксинов

Охратоксин	Молекулярная формула	Молекулярная масса	Точка плавления, °С	Поглощение в УФ (в этаноле)		Флюоресценция λ, нм (цвет)
				λ, нм	ε	
А	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	403	169	213 332	36800 6400	475 (зеленый)
В	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆	369	221	218 318	37200 6900	475 (голубой)

Таблица 7
Содержание охратоксина А в продовольственном зерне урожая 2003 и 2004 гг.

Вид зерна	Количество образцов		Содержание охратоксина А в контаминированных пробах, мкг/кг	Среднее содержание охратоксина А в контаминированных пробах, мкг/кг
	Всего	Содержащих охратоксин А		
Пшеница	126	8 (6,4%)	0,24–14,40	2,66
Рожь	56	19 (33,9%)	0,20–12,64	2,89
Ячмень	50	8 (16,0%)	0,20–10,57	3,11
Овес	50	4 (8,0%)	1,72–33,32	10,12
ВСЕГО	282	39 (13,8%)	0,20–33,32	3,63

Основными продуцентами охратоксинов являются *A. ochraceus*, *A. carbonarius* и *P. verrucosum*, которые значительно различаются по условиям оптимального роста и токсинообразования. Так, оптимальная температура для роста *P. verrucosum* составляет 20°C, и он является основным «источником» охратоксинов в зерновых культурах в Европе и Канаде, в то время как температурный оптимум для *A. ochraceus* находится в пределах 24–31°C, а для *A. carbonarius* – выше 32°C и он является «источником» охратоксинов в винограде, вине, кофе. Охратоксин А обнаруживается повсеместно в качестве природного загрязнителя продовольственного и кормового зерна – пшеницы, ячменя, кукурузы, овса, ржи, а также кофе-бобов, винограда, виноградного сока и вина. Загрязнение кормов охратоксинами является причиной контаминации продуктов животного происхождения – мяса, почек, печени и продуктов из них. По усредненным для разных стран данным (JECFA, 2001 г.) средняя концентрация охратоксина А в зерне (включая пшеницу, ячмень, кукурузу, овес, рожь, рис) составляет 0,94 мкг/кг, в зерновых продуктах – 0,19 мкг/кг, в кофе – 0,86, в виноградном соке – 0,44 и в вине – 0,32 мкг/кг, в продуктах животноводства – 0,052 – 0,32 мкг/кг. Расчетная недельная нагрузка охратоксина А на человека при этом составляет в среднем 45 нг/кг м.т. и основным источником охратоксина являются

зерновые – 25 нг/кг м.т. > вино, 8,9 нг/кг м.т. > виноградный сок, 3,1 нг/кг м.т. > кофе, 2,1 нг/кг м.т.

По данным Института питания РАМН за 2003–2004 гг. 13,8% изученных образцов продовольственного зерна содержали охратоксин в концентрации от 0,2 до 33 мкг/кг (Табл. 7). При этом наиболее часто охратоксин А обнаруживали в зерне ржи и ячменя, а наибольший уровень загрязнения – в зерне овса. Расчетное суточное поступление охратоксина А составило 2,7 нг/кг м.т.

Рекомендации JECFA по допустимому недельному потреблению охратоксина А – 100 нг/кг м.т. ССFAC в 2003 г предложила ПДК охратоксина А для пшеницы, ячменя и ржи и продуктов их переработки – 5 мкг/кг.

В экспериментальных условиях чувствительны к нефротоксическому действию охратоксина А все использованные виды животных. При введении внутрь LD₅₀ охратоксина А для разных видов варьирует от 1 до 58 мг/кг м.т. Охратоксин В малотоксичен. В естественных условиях микотоксикозы, связанные с загрязнением кормов охратоксином А, часто наблюдаются у свиней, цыплят, кур. В некоторых скандинавских странах вызванная охратоксином А нефропатия свиней носит эндемический характер. При остром охратоксикозе патологические изменения выявляются и в печени, желудочно-

кишечном тракте, лимфоидной ткани. Хроническое действие охратоксина А характеризуется главным образом поражением почек – дегенеративными и атрофическими изменениями эпителия проксимальных канальцев, интерстициальным фиброзом коркового слоя и гиалинизацией клубочков. Охратоксин А обладает выраженными тератогенными и иммунодепрессивными свойствами.

В организме охратоксин А подвергается гидролизу при участии ферментов кишечника и кишечной микрофлоры с образованием малотоксичного охратоксина-α. В печени охратоксин А подвергается гидроксилированию в цитохром Р-450-содержащей монооксигеназной системе с образованием малотоксичных (4R)-4-ОН-охратоксина А и в значительно меньшем количестве – (4S)-4-ОН-охратоксина А. В основе токсического действия охратоксина А находится его ингибирующее действие на синтез белка, которое является следствием конкурентного подавления токсином фенилаланин-тРНК-синтетазы, блокирования аминокетилирования и процесса элонгации. Охратоксин А является сильным прооксидантом, индуцирует образование активных метаболитов кислорода, что рассматривается как один из вероятных механизмов его канцерогенного действия.

Хотя доказательства острого токсического действия охратоксина А на человека отсутствуют, имеются убедительные доказательства постоянного поступления этого токсина с пищей. Результаты биомониторинга, проводимого во многих странах Европы, в Канаде, Японии свидетельствуют о высокой частоте (в некоторых случаях – у 100% обследованных) обнаружения охратоксина А в сыворотке крови здоровых людей в средней концентрации от 0,14 до 0,88 нг/мл. В ряде стран Европы охратоксин А выявляется и в женском молоке. В связи с этим в странах Европейского Союза величина допустимого суточного потребления охратоксина А снижена до 5 нг/кг м.т.

Проявлением хронического *охратоксикоза* у людей считают Балканскую эндемическую нефропатию (БЭН) – хроническое неизлечимое заболевание почек, эндемическое для Болгарии, Румынии, Югославии (Сербии), Хорватии, Боснии и Герцеговины. Эпидемиологические особенности БЭН типичны для микотоксикозов – заболевание поражает исключительно жителей сельской местности, носит «семейный» характер и имеет выраженную очаговость в пределах одного селения, в зонах, эндемичных по нефропатии, наблюдается высокая заболеваемость почек среди домашних животных. Болезнь обычно

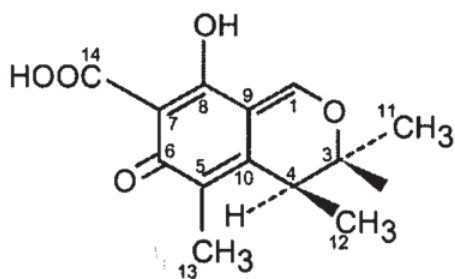
начинается в возрасте 30–50 лет и характеризуется медленным развитием клинических симптомов. На ранних стадиях больные жалуются на неопределенные боли в поясничной области, головную боль, повышенную утомляемость, отсутствие аппетита. При осмотре отмечаются бледность кожных покровов, иногда пожелтение кожи ладоней и подошв. Артериальное давление не повышено. Характерным симптомом БЭН являются анемия, протеинурия, глюкозурия, снижение максимальной секреции п-аминогиппуровой кислоты, нарушение концентрационной способности почек. Почки заметно уменьшаются в размерах. Гистопатологические изменения выражаются в дегенеративных изменениях канальцев, интерстициальном фиброзе и гиалинизации клубочков.

Характерной особенностью БЭН является сопутствующая высокая частота развития опухолей мочевых путей – у трети больных, погибших от БЭН, обнаруживают злокачественные опухоли лоханок почек и мочеточников. В сравнении с неэндемичными районами, в эндемичных опухолях развиваются чаще у молодых, чаще у женщин, как правило являются двухсторонними, чаще локализируются в верхних отделах – в почечных лоханках и мочеточниках, реже – в мочевом пузыре. На связь БЭН с охратоксином А указывает обнаружение охратоксина А чаще и в больших концентрациях в пищевых продуктах в эндемичных зонах; обнаружение охратоксина А в крови населения эндемичных зон в значительно больших концентрациях, чем в неэндемичных; идентичность морфологических и функциональных нарушений почек у больных БЭН, у свиней с нефропатией и у животных с экспериментальным охратоксикозом.

МАИР классифицирует охратоксин А как соединение, возможно канцерогенное для человека (Группа 2В).

Цитринин

Цитринин впервые был выделен из *P. citrinum* как один из токсинов «желтого риса», являющегося причиной токсикозов у людей и сельскохозяйственных животных в Японии и некоторых странах Азии. Продуцентами цитринина являются многие виды *Penicillium* и *Aspergillus*. Среди продуцентов цитринина есть и виды, широко используемые в пищевой промышленности – *P. camemberti*, *A. oryzae*, *Monascus purpureus*, *M. ruber*.



Цитринин обнаруживают в качестве природного загрязнителя риса, ячменя, пшеницы, кукурузы, сыров, в небольших количествах – в мясных продуктах, в почках свиней. Часто его находят в зерне вместе с охратоксином А. В значительных концентрациях цитринин обнаруживается в продовольственном зерне в регионах распространения БЭН. Цитринин обладает нефротоксическими свойствами, умеренно выраженным гепатотоксическим и тератогенным действием. Характер патологических изменений почек, вызванных цитринином у различных животных очень близок к таковому при действии охратоксина А. Экспериментально показано, что цитринин усиливает токсичность, в том числе канцерогенную, охратоксина А. Цитринин значительно менее токсичен, чем афлатоксины и охратоксин А. При введении внутрь LD_{50} цитринина для разных видов животных варьирует от 50 до 220 мг/кг м.т.

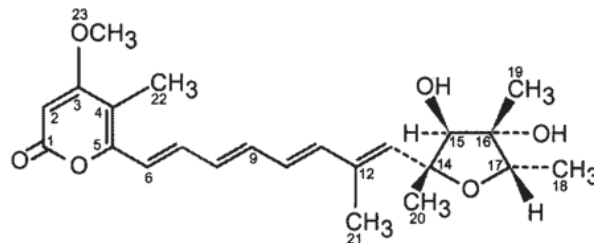
Цитринин наряду с охратоксином А рассматривается в качестве одного из этиологических факторов таких микотоксикозов, как нефропатия у свиней и домашней птицы и Балканской эндемической нефропатии. Цитринин относят к группе микотоксинов *Penicillium* spp., которые вызывают синдром «желтого риса». В то же время, относительно низкая токсичность цитринина, невысокая частота его обнаружения в продовольственном сырье и пищевых продуктах, нестабильность при термической обработке продукта позволяют отнести его к микотоксинам, не представляющим в настоящее время потенциальную опасность для здоровья человека.

Данные о нагрузке цитринином на человека отсутствуют. Регламенты его содержания в пищевых продуктах и кормах не установлены.

Цитреовиридин

Цитреовиридин – микотоксин, обладающий нейротоксическими свойствами, впервые выделен из культуры *P. citreo-viride*, выделенного из «желтого риса». Продуцентами его являются и

некоторые другие виды *Penicillium*. Данные об обнаружении цитреовиридина в качестве контаминанта пищевых продуктах практически отсутствуют. Кроме риса, он был обнаружен в кукурузе и орехах пекан.

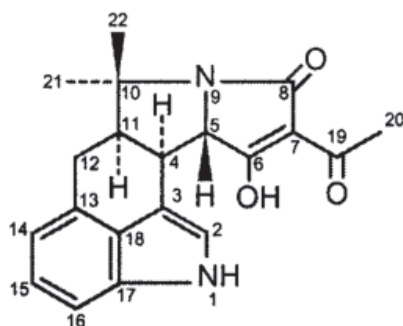


Острое и подострое токсическое действие цитреовиридина характеризуется поражением ЦНС и сердечно-сосудистой системы. При введении внутрь LD_{50} для крыс составляет 50 мг/кг м.т. Симптомы включают раннее развитие судорог и параличей, рвоту, затруднение дыхания, к которым присоединяются гипотермия, нарушения сердечной деятельности – синусовая аритмия и гипотония, остановка дыхания. Эти симптомы очень близки с клиническими проявлениями отравлений у людей, известных как синдром «желтого риса» или кардиальная форма бери-бери. Заболевание было частым явлением в конце XIX начале XX в. и в годы после второй мировой войны в Японии и некоторых странах Азии, где рис составляет основу рациона и характеризовалось острым началом, прогрессирующими параличами, судорогами, рвотой, гипотонией и часто заканчивалось гибелью больных в результате остановки дыхания. Из заплесневелого риса, явившегося причиной отравлений, были выделены токсигенные штаммы *P. islandicum*, *P. citrinum* и *P. citreo-viride*. Синдром был воспроизведен у лабораторных животных введением им микотоксина цитреовиридина, выделенного из культуры *P. citreo-viride*. На связь с микотоксинами указывает резкое уменьшение частоты заболеваний после введения в Японии системы контроля за качеством риса с 1910 г., задолго до широкого внедрения в лечебную практику витаминных препаратов группы В.

Циклопиазоновая кислота

Циклопиазоновая кислота не относится к числу часто выявляемых микотоксинов, но привлекает внимание тем, что часто обнаруживается наряду с афлатоксинами в арахисе и кукурузе.

Продуцентами ее являются *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. tamarii*, а также некоторые виды *Penicillium* – *P. aurantiogriseum*, *P. griseofulvum*. К числу продуцентов циклопиазоновой кислоты относятся и *P. camemberti* и *P. roqueforti*, используемые в производстве сыров. Циклопиазоновая кислота была обнаружена в качестве контаминанта в разных видах сыров – камамбер, бри, гауда, чеддер.



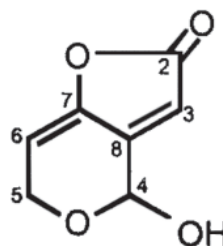
Токсическое действие циклопиазоновой кислоты характеризуется быстрым развитием симптомов поражения ЦНС (мышечный тремор, атаксия, судороги). Наряду с этим обнаруживаются некротические изменения в печени, почках, поджелудочной железе, миокарде, скелетных мышцах. При введении внутрь LD_{50} для крыс-самцов составляет 36 мг/кг м.т., для самок – 63 мг/кг м.т. Циклопиазоновая кислота является сильным ингибитором Ca^{2+} -АТФазы. С циклопиазоновой кислотой связывают микотоксикоз, известный как отравление кодуа (*kodua poisoning*). В некоторых северных районах Индии, где ямчатая гречка (*kodo*) – один из основных продуктов рациона местного населения, наблюдаются случаи отравления заплесневелой, содержащей циклопиазоновую кислоту гречкой. Основные симптомы отравления – тремор, головокружение, тошнота.

Отсутствие методов определения циклопиазоновой кислоты и данных о ее распространенности не позволяют определить степень опасности ее для здоровья человека.

Патулин

Патулин был выделен впервые в качестве антибиотика из культур *P. patulum* и *P. expansum*. После обнаружения у патулина выраженных токсических, мутагенных и, возможно, канцерогенных свойств, а также установления его широкой распространенности как загрязнителя пищевых продуктов, он был отнесен к микотоксинам, представляющим потенциальную опасность для здоровья человека. Основным продуцентом патули-

на является *P. expansum*, но многие другие виды *Penicillium*, некоторые представители *Aspergillus*, а так же *Byssochlamis nivea* и *B. fulva* способны его синтезировать. В качестве природного загрязнителя патулин обнаруживают почти исключительно в яблоках и продуктах их переработки. Редко патулин обнаруживают в других фруктах и фруктовых соках – персиковом, сливовом, грушевом, и в овощах (томатах). Основным источником патулина в питании человека является яблочный сок. Т.к. патулин в яблоке концентрируется в пораженной грибом, подгнившей части плода, обнаружение его в соке свидетельствует об использовании нестандартного сырья для получения сока. В персиках и томатах, независимо от размеров пораженного участка, патулин распределяется диффузно по всей ткани.



Токсичность патулина изучена только экспериментально. У лабораторных животных острое токсическое действие патулина характеризуется поражением ЦНС (тремор, конвульсии, локомоторные нарушения), желудочно-кишечного тракта (геморрагии, изъязвления), в некоторых случаях выявляют некрозы печени, почек, селезенки. При введении внутрь LD_{50} для мышей составляет 35 мг/кг м.т., для крыс – 30–55 мг/кг м.т. Микотоксикозы, связанные с патулином, у человека и сельскохозяйственных животных не описаны.

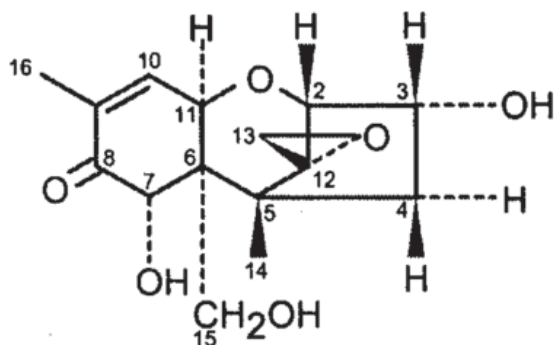
По данным ЖЕСФА расчетное суточное поступление патулина с яблочным соком в среднем составляет 0,2 мкг/кг м.т. для детей и 0,1 мкг/кг м.т. – для взрослых, что ниже рекомендуемой Комитетом величины допустимого суточного потребления патулина – 0,4 мкг/кг м.т. Во многих странах принята установленная ССФАС величина ПДК содержания патулина в яблочном соке и в содержащих яблочный сок напитках – 50 мкг/кг.

Трихотеценовые микотоксины

Группа трихотеценовых микотоксинов включает более 60 соединений, сесквитерпенов по структуре, токсические свойства которых связа-

ны с наличием эпоксидного кольца при С-12, 13. В зависимости от структуры трихотеценового ядра эти микотоксины подразделяются на простые и макроциклические. Простые трихотецены подразделяются на три типа. Тип А составляют соединения, содержащие при С-8 в качестве радикала либо Н, либо ОН и к ним относятся Т-2 токсин, НТ-2 токсин, диацетоксискирпенол, неосоланиол. Тип В составляют соединения, содержащие у С-8 карбоксильную группу – дезоксиниваленол, ниваленол, фузаренон Х. Трихотецены типа С (кратоцин) содержат второй эпоксид при С-7,8. Макроциклические трихотецены – веррукарины, роридины, сатратоксины, имеют макроциклическое кольцо, связанное с С-4 и С-6. В качестве природных загрязнителей продовольственного зерна и кормов практическое значение имеют лишь дезоксиниваленол (вомитоксин), ниваленол, Т-2 токсин, в меньшей степени – диацетоксискирпенол и фузаренон Х. Данные об обнаружении макроциклических трихотеценов в пищевых продуктах отсутствуют.

Дезоксиниваленол – наиболее широко распространенный в мире микотоксин. Продуценты дезоксиниваленола – *F. graminearum* и *F. culmorum*, являются патогенами для злаковых культур и кукурузы. Дезоксиниваленол обнаруживают главным образом в пшенице, кукурузе и ячмене, на долю которых приходится более 2/3 мирового производства зерна. В некоторых регионах мира (Япония, Корея, Австралия, юг Европы) вместо дезоксиниваленола или вместе с ним в зерне обнаруживают ниваленол (основной продукт *F. graminearum*).



В России основным ареалом фузариоза и источником загрязненного дезоксиниваленолом зерна является Северо-Кавказский регион. Результаты мониторинга свидетельствуют, что в отдельные годы частота обнаружения дезоксиниваленола в свежесобранной пшенице в этом регионе может достигать 100%. Расчетная суточная нагрузка дезоксиниваленолом на

человека в среднем по России не превышает ДСП, в то время как для Северо-Кавказского региона она выше, чем в других регионах и в отдельные годы превышает ДСП (Табл. 8 и 9). По данным ILSI (Международного Института наук о жизни), обобщающие сведения по 12 европейским странам, дезоксиниваленол обнаруживается более, чем в 50% продуктов питания. В некоторых странах отмечается опасность поступления дезоксиниваленола с питанием детей в возрасте до 1 года в количестве, превышающем ДСП.

Рекомендуемая ЖЕСФА для дезоксиниваленола величина ДСП составляет 1 мкг/кг м.т., а предложенная в 2003 г. Комиссией ФАО/ВОЗ Codex Alimentarius ПДК составляет – для неочищенного зерна пшеницы и кукурузы – 2 мг/кг, для зерна, прямого продовольственного назначения и продуктов его переработки – 0,5 мг/кг, для детского питания на зерновой основе – 0,1 мг/кг.

Т-2 токсин является одним из самых токсичных среди трихотеценовых микотоксинов. Основными продуцентами Т-2 токсина являются *F. sporotrichioides* и *F. poae*. Случаи обнаружения Т-2 токсина в зерне (пшенице, кукурузе, ячмене, овсе) относительно редки и связаны с определенными обстоятельствами – например, зерно, перезимовавшее под снегом, или зерно поздней уборки в условиях затяжных дождей. Это связано с тем, что синтез и накопление Т-2 токсина в больших количествах происходит в условиях высокой влажности и низкой температуры (оптимум синтеза Т-2 токсина – 8–12° С).

Рекомендуемая ЖЕСФА для Т-2 токсина и НТ-2 токсина или их суммы величина ДСП составляет 0,06 мкг/кг м.т. В связи с тем, что по имеющимся на настоящее время данным суточное поступление Т-2 и НТ-2 токсинов с пищей не превышает 8 и 9 нг/кг м.т., соответственно, регламенты их содержания не рассматриваются.

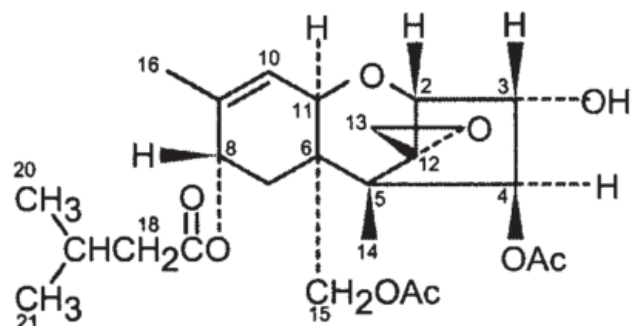


Таблица 8
 Частота и уровни загрязнения ДОН продовольственного зерна пшеницы урожаяв 1989–2005 гг.

Год	Количество образцов		Количество проб, содержащих ДОН выше ПДК	Содержание ДОН в контаминированных пробах, мг/кг	Среднее содержание ДОН в пробах всего ряда, мг/кг
	всего	содержащих ДОН			
1989	57	15 (26%)	5 (9%)	0,05 – 6,65	0,23
1990 – 1991	67	4 (6%)	1 (1%)	0,05 – 0,74	0,02
1992	190	72 (38%)	38 (20%)	0,05 – 5,63	0,33
1993	169	39 (23%)	24 (14%)	0,10 – 3,95	0,20
1994	267	18 (7%)	8 (3%)	0,17 – 1,13	0,03
1995	169	11 (6%)	0	0,07 – 0,70	0,03
1996	120	15 (13%)	0	0,06 – 0,70	0,02
1997	137	15 (11%)	1 (0,7%)	0,05 – 1,14	0,02
1998	126	12 (10%)	1 (0,8%)	0,05 – 1,09	0,03
1999	132	1 (1%)	0	0,05	0,0004
2000	222	6 (3%)	1 (0,5%)	0,09 – 0,77	0,010
2001	252	12 (5%)	0	0,05 – 0,62	0,010
2002	158	6 (4%)	1 (0,6%)	0,05 – 0,78	0,009
2003	375	5 (1%)	0	0,05 – 0,07	0,001
2004	213	2 (1%)	0	0,07; 0,08	0,001
2005	147	12 (8%)	0	0,07 – 0,69	0,023
Итого:	2801	239 (9%)	80 (3%)		

Таблица 9
 Оценка риска, связанного с загрязнением зерна пшеницы ДОН

Год	Суточная нагрузка ДОН			
	В среднем по России		Северо-Кавказский регион	
	мкг/кг массы тела	% от ДСП	мкг/кг массы тела	% от ДСП
1989	0,96	96,0	–	–
1990 – 1991	0,07	7,0	–	–
1992	1,40	140,0	4,10	410,0
1993	0,89	89,0	2,18	218,0
1994	0,12	12,0	0,29	29,0
1995	0,12	12,0	0,68	68,0
1996	0,07	7,0	0,18	18,0
1997	0,08	8,0	0,20	20,0
1998	0,12	12,0	0,48	48,0
1999	0,002	0,2	–	–
2000	0,04	4,0	0,3	30,0
2001	0,036	3,6	0,22	22,0
2002	0,028	2,8	0,28	28,0

Токсическое действие Т-2 токсина, дезоксиниваленола, ниваленола и большинства других трихотеценовых микотоксинов, как и клиническая картина микотоксикозов, вызываемых грибами-продуцентами трихотеценов, характеризуется поражением желудочно-кишечного тракта, кроветворных и иммунокомпетентных органов. Общими симптомами острого отравления являются рвота и понос, отказ от корма, геморрагический синдром; при длительном воздействии трихотеценовых микотоксинов развиваются лейкопения, тромбоцитопения, анемия. Трихотецены обладают в разной степени выраженным дерматотоксическими свойствами. Трихотеценовые микотоксины являются сильными иммунодепрессантами. В целом трихотецены типа А в 10 раз более токсичны, чем трихотецены, относящиеся к типу В. Так, однократная LD_{50} Т-2 токсина при введении внутрь составляет для разных видов животных 3–10,5 мг/кг м.т., а LD_{50} дезоксиниваленола – 46–146 мг/кг м.т.

Основной путь детоксикации трихотеценов в организме – деэпоксидация, которая происходит при участии ферментов микрофлоры кишечника, и образование конъюгатов с глюкуроновой кислотой. Т-2 токсин при помощи микросомальных карбоксилэстераз и цитохром Р-450 содержащих монооксигеназ подвергается так же деацетилированию и гидроксильрованию с образованием менее токсичных метаболитов, которые выводятся из организма в виде глюкуроновых конъюгатов. Трихотецены подавляют синтез белка, блокируя инициацию трансляции (Т-2 токсин) или элонгацию и терминацию синтеза полипептидной цепи (дезоксиниваленол). Токсины, подавляющие инициацию трансляции, обладают более выраженными токсическими свойствами, чем токсины, влияющие на более поздние стадии белкового синтеза на рибосомах.

Алиментарные микотоксикозы, вызванные пищевыми продуктами и кормами, пораженными микроскопическими грибами-продуцентами трихотеценовых микотоксинов, относятся к наиболее рано описанным микотоксикозам человека и сельскохозяйственных животных. С трихотеценовыми микотоксинами связывают алиментарную токсическую алейкию, синдром «пьяного хлеба», акабаби-токсикоз, многочисленные вспышки острых гастроэнтеритов после употребления продуктов из заплесневелого зерна. Токсигенные штаммы *F. sporotrichioides* часто рассматриваются как один из возможных этиологических факторов Уровской (Кашина-Бека) болезни.

Алиментарная токсическая алейкия (АТА) – заболевание, наблюдавшееся в отдельные годы, вплоть до 1955 г. на территории СССР и связанное с употреблением в пищу продуктов переработки перезимовавшего под снегом зерна проса, пшеницы, ячменя. Заболевание характеризовалось локализацией в сельской местности, выраженной очаговостью, сезонностью, неравномерностью вспышек в разные годы и бесспорным доказательством связи с употреблением зерна, пораженного микроскопическими грибами *F. sporotrichioides*, впоследствии идентифицированных как продуценты трихотеценовых микотоксинов, главным образом Т-2 токсина. В легких случаях заболевание протекало по типу гингивита, стоматита, глоссита, реже – по типу гастроэнтерита, с тошнотой, рвотой, головной болью, головокружением, и длилось 3–5 дней. При длительном потреблении загрязненных продуктов доминирующим симптомом становилась прогрессирующая лейкопения, переходящая в особо тяжелых случаях в алейкию и сопровождающаяся геморрагическими диатезами, носовыми кровотечениями, кровотечениями из десен, некрозами зева и глотки (ангинозно-геморрагическая стадия). Тяжелые случаи заболевания на этой стадии заканчивались летально. У домашних животных (свиней, лошадей, домашней птицы), потреблявших с кормом то же загрязненное зерно токсикоз проявлялся в виде острого поражения желудочно-кишечного тракта, геморрагий и лейкопении. Геморрагический синдром, лейкопения и тромбоцитопения были воспроизведены у различных лабораторных животных при скармливании им зерна, зараженного *F. sporotrichioides*.

Синдром «пьяного хлеба» – заболевание человека и животных, связанное с употреблением зерновых продуктов, пораженных грибами *F. graminearum*, известных в настоящее время как продуценты дезоксиниваленола, ниваленола, зезараленона. Впервые это заболевание наблюдали на Дальнем Востоке в 1882 г. Случаи отравления отмечались так же в Италии, Германии, Швеции, Финляндии и Франции. У людей симптомы отравления появлялись вскоре после приема в пищу продуктов (главным образом хлеба) из пораженного («пьяного») зерна: через 30–60 мин появлялась рвота, боли в области живота, понос, возникало чувство слабости, тяжести в конечностях, скованность походки. Через день наступало состояние, похожее на состояние после тяжелого опьянения: сильные головные боли, головокружение. При длительном потреблении «пьяного

хлеба» у людей наблюдались истощение, потеря зрения, явления нарушения психики. У заболевших домашних животных характерными симптомами являлись отказ от корма и рвота.

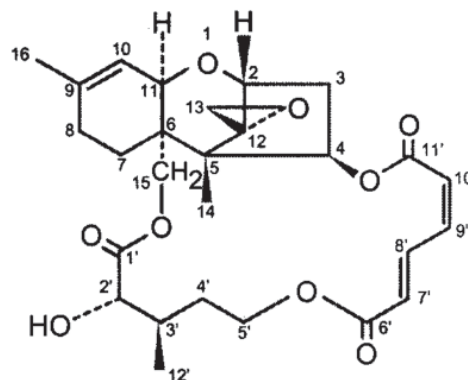
Акакаби-токсикоз, или болезнь, вызванная пораженным красной плесенью зерном, начиная с конца прошлого века, спорадически отмечается у людей и сельскохозяйственных животных в Японии и Корее. Вспышки заболевания наблюдаются в годы с обильными дождями в период цветения, созревания и сбора урожая зерновых и связано с поражением зерна некоторыми видами *F. graminearum* – продуцентами дезоксиниваленола, ниваленола и фузаренона Х. У людей заболевание протекает по типу пищевого отравления – вскоре после приема пищи появляются тошнота, рвота, боли в животе, реже – понос, головная боль, озноб. Нередко одновременно болеют домашние животные, у которых основными симптомами являются отказ от корма, рвота, понос.

Массовые вспышки отравлений заплесневелой пшеницей и кукурузой с высоким содержанием дезоксиниваленола не редкое явление в Китае и Индии. При анализе 35 таких вспышек в Китае установлено, что основными симптомами отравления являются тошнота, рвота, боли в животе (100%), понос (40%), головокружение и головная боль, которые появляются через 5–30 мин после приема пищи. Содержание дезоксиниваленола в кукурузе в отдельных случаях достигало 93 мг/кг. В случаях присутствия наряду с дезоксиниваленолом Т-2 токсина у большинства заболевших были жалобы на першение в горле. В Индии массовое отравление (50 000 пострадавших) хлебом из пшеницы, в которой был выявлен ДОН в значительно более низких количествах – до 8,4 мг/кг, наряду с ниваленолом (до 0,1 мг/кг) и Т-2 токсином (до 4 мг/кг) в отдельных пробах, протекало в виде гастроэнтерита средней тяжести в течение двух дней. Рис, пораженный *F. graminearum* и *F. heterosporum*, явился причиной алиментарного токсикоза, характеризующегося рвотой, поносом, болями и вздутием живота, головокружением и першением в горле. В рисе был обнаружен Т-2 токсин в количестве до 0,42 мг/кг.

Макроциклические трихотеценовые микотоксины – *сатратоксины*, *веррукарин*, *поридины*, составляют группу микотоксинов, продуценты которых, *Stachybotrys*, *Myrothecium* и *Trichothecium* в естественных условиях развиваются на богатых целлюлозой кормах (солома, сено) и могут являться причиной тяжелых микотоксикозов – стахиботриотоксикозов и дендро-

дохиотоксикозов, у лошадей, крупного рогатого скота, овец. Респираторные *стахиботриотоксикозы* наблюдаются у людей, имеющих контакт с пораженными *S. atra* кормами (солома), и проявляются в виде дерматитов, конъюнктивитов, катаральной ангины, фарингита; в некоторых случаях сопровождаются лейкопенией.

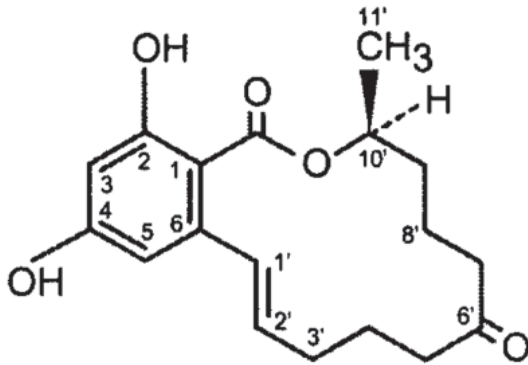
Веррукарин А



В последние годы возрос интерес к продуцентам макроциклических трихотеценов и, в первую очередь, к видам *Stachybotrys*, растущих внутри жилых и офисных помещениях (на бумажных обоях, штукатурке, в системе вентиляции, на фильтрах кондиционеров) особенно в условиях повышенной влажности, вызванной протечками, наводнениями. Многие жители современных герметизированных домов с системой кондиционирования воздуха, чаще при наличии повреждений, вызванных водой, жалуются на ухудшение здоровья, главные симптомы которого раздражение глаз и дыхательных путей, утомляемость, головная боль, ощущения необычного запаха и вкуса. Это явление получило название синдрома «больного» дома – «sick-building syndrome». Американская академия педиатрии поддерживает предположение, что причиной случаев идиопатической легочной геморрагии у детей раннего возраста (до 8 мес.) может быть плесень жилых помещений, т.к. в домах заболевших детей были выделены токсигенные штаммы *S. chartarum* (= *S. atra*) продуцирующие ряд макроциклических трихотеценов и стахилизин, обладающий гемолитическим действием *in vitro* и *in vivo*. Следует подчеркнуть, что до настоящего времени нет убедительных научно-обоснованных доказательств риска для здоровья человека, связанного с возможным поступлением микотоксинов в организм респираторным путем из воздуха внутри жилых, школьных и офисных помещений.

Зеараленон

Зеараленон относится к числу наиболее распространенных в мире микотоксинов. По структуре он является лактоном резорциловой кислоты. Природный зеараленон имеет транс-конфигурацию. Основные продуценты зеараленона – *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. semitectum*. Чаще всего обнаруживается в кукурузе, пшенице и ячмене, нередко вместе с дезоксиниваленолом.



Зеараленон отличается от других микотоксинов отсутствием острого токсического действия (LD_{50} выше 5000–20000 мг/кг). Обладает выраженным гормоноподобным – эстрогенным, действием. Является причиной нарушений репродуктивной функции у сельскохозяйственных животных. Большие дозы зеараленона, принятые вместе с загрязненными кормами, приводят к развитию эстрогенного синдрома, проявляющегося в гиперплазии и метаплазии эпителия матки и влагалища, а также миометрия и молочных желез. Хроническое отравление приводит к раннему созреванию особей и бесплодию. С зеараленоном связывают случаи преждевременного полового созревания детей в Пуэрто-Рико и Венгрии. Полагают, что он может способствовать развитию рака шейки матки. Анализ данных эпидемиологических исследований свидетельствует, что зеараленон представляет минимальную опасность для здоровья человека – при имеющихся уровнях загрязнения пищевых продуктов величины суточной нагрузки не превышают установленную Комиссией Codex Alimentarius ДСП для зеараленона – 0,5 мкг/кг м.т. В то же время, учитывая широкую распространенность зеараленона нередко вместе с трихотеценовыми микотоксинами и фумонизидами, его эстрогенные и канцерогенные (в эксперименте) свойства, не следует недооценивать возможность его неблагоприятного влияния на здоровье человека.

Фумонизины

Фумонизины были впервые выделены в Южной Африке в 1988 г. из культуры *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*). В настоящее время в семейство фумонизинов входят более 15 соединений, сгруппированные в 4 категории – А, В, С и Р. Наиболее часто в природных условиях встречается фумонизин В₁, значительно реже и в меньших количествах – фумонизины В₂ и В₃. Соотношение фумонизинов В₁ : В₂ : В₃ составляет обычно 10:3:1. Фумонизины представляют собой диэфиры пропан-1,2,3-трикарбоновой кислоты и 2-амино-12,16-диметилполигидроксиэйкозана.

Основными продуцентами фумонизинов являются *F. verticillioides* и *F. proliferatum*. Еще не менее 10 видов *Fusarium* способны продуцировать фумонизины в небольших количествах. Установлено, что *F. verticillioides* является преобладающим видом в популяции фузариев на зерне кукурузы, выращиваемой на Северном Кавказе. На его долю приходится 95% всех выделенных изолятов рода *Fusarium* и все исследованные штаммы обладали способностью синтезировать фумонизины. Фумонизины обнаруживают в кукурузе и продуктах ее переработки практически повсеместно. По усредненным для разных стран данным ВОЗ (2000) фумонизидами загрязнено 73% кукурузной муки, крупы, поленты, семолины и 40% других продуктов из кукурузы или содержащие кукурузу (кукурузные хлопья, попкорн, воздушная кукуруза, детское питание). Высокая частота обнаружения фумонизинов в зерне кукурузы и продуктов ее переработки установлена и в исследованиях, проведенных Институтом питания РАМН (Табл. 10).

Расчетное суточное потребление фумонизинов составляет в странах Европы 0,03–0,06 мкг/кг м.т., в Канаде и США – 0,02 и 0,08 мкг/кг м.т. По данным предварительного мониторинга для населения РФ эта величина не превышает 0,005 мкг/кг м.т.

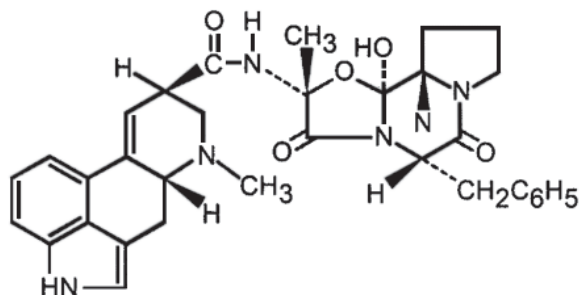
Рекомендуемая JECFA величина ДСП для суммы фумонизинов В₁, В₂ и В₃ составляет 2 мкг/кг м.т.

Фумонизины являются единственными известными природными специфическими ингибиторами биосинтеза сфинголипидов, что является одним из основных механизмов их токсического действия. Они нарушают так же обмен жирных кислот и активность ферментов, участвующих в регуляции клеточного цикла. Фумонизины являются причиной распространенного заболевания у лошадей – лейкоэнцефаломалиции, отека легких и гидроторакса у свиней; они поражают печень,

Микотоксины *Claviceps*

Эрготизм (отравление спорыньей) развивается при употреблении в пищу продуктов из зерна с примесью склероциев (рожков) гриба *Claviceps purpurea*, содержащих большую группу токсичных для человека и животных алкалоидов. По химической структуре **алкалоиды спорыньи** подразделяются на производные лизергиновой и изолизергиновой кислот и клавиновые алкалоиды. Наибольшей биологической активностью обладают производные лизергиновой кислоты – эрготамин, эргометрин, эргокристин, эргозин, эргокриптин, эргокорнин, и они же чаще всего обнаруживаются в качестве природных загрязнителей зерна. *Cl. purpurea* поражает многие виды дикорастущих и культурных злаковых растений, в том числе рожь, ячмень и пшеницу. При содержании склероциев в зерне более 2% по массе возможно развитие массовых заболеваний эрготизмом.

Эрготамин



Эрготоксины обладают выраженной биологической активностью. Их эффекты можно разделить на периферические – сокращение гладких мышц, в том числе кровеносных сосудов и матки, нейрогормональные – блокирование действия адреналина и серотонина, и центральные – галлюциногенное действие, ингибирование секреции пролактина, гипертермия, рвота. Благодаря своим свойствам некоторые алкалоиды нашли применение в фармакологической практике.

Эрготизм является самым древним из известных микотоксикозов человека. Вплоть до XIX в. эпидемии эрготизма среди населения Западной Европы и России были частыми и сопровождались высокой смертностью. Особо опустошительными были вспышки заболевания (в то время известного под названием «огонь

св. Антония») в X–XII вв. После установления причины эрготизма и разработки методов предупреждения заражения спорыньей злаковых культур, это заболевания практически исчезло. В определенных экстремальных условиях локальные вспышки эрготизма могут возникать и в настоящее время. Такие случаи отмечались во Франции в 1951 г., в Индии в 1958, 1973, 1974, 1975 гг., в Эфиопии в 1978 г. и 2001 г. Длительная, в течении 3 лет, засуха, неурожай и голод в некоторых регионах Эфиопии в 1978 г. сопровождалась массовым заболеванием гангренозной формой эрготизма в результате употребления в пищу ячменя, тотально пораженного склероциями спорыньи.

Эрготизм может протекать в двух клинических формах – конвульсивной («злая корча»), более характерная для алкалоидов клавиновой группы (агроклавины), и гангренозной, связанная преимущественно с действием алкалоидов группы эрготаминов. Основными симптомами гангренозной формы являются острые боли, чувство жжения в конечностях, развитие сухой гангрены на фоне общей слабости и сонливости. В тяжелых случаях происходит отторжение мягких тканей, а нередко и целых конечностей (чаще нижних) в местах суставных сочленений. При конвульсивной форме преобладает судорожный синдром, развиваются спастические контрактуры конечностей. Заболевание начинается с потери аппетита, ломоты во всем теле; во многих случаях наблюдаются гастроэнтериты. Симптомы отравления носят приступообразный характер.

В медицинской литературе ежегодно появляются сообщения о спорадических случаях эрготизма при длительном применении препаратов эрготамин при лечении мигрени. Чаще всего наблюдается в разной степени выраженная ишемия нижних конечностей, в тяжелых случаях – гангренозные изменения кишечника, языка.

В отличие от других микотоксинов эрготоксины нестабильны при хранении и в процессе кулинарной обработки в значительной степени теряют свою токсичность. К важнейшим мероприятиям, направленным на профилактику эрготизма относятся регламентация содержания в продовольственном зерне склероциев *Cl. purpurea* – для разных стран – 0,05 % – 0,3% по массе.

Профилактика микотоксикозов

В связи с невозможностью полного предотвращения поражения продовольственных ресурсов микроскопическими грибами-продуцентами микотоксинов и высокой устойчивостью микотоксинов к действию физических и химических факторов, основная роль в профилактике микотоксикозов отводится контролю за загрязнением пищевых продуктов микотоксинами и регламентированию их содержания.

Ключевое место в системе контроля за микотоксинами занимают методы обнаружения и количественного определения содержания микотоксинов в пищевых продуктах и кормах. Скрининг-методы позволяют быстро и надежно «отсеивать» незагрязненные образцы. К ним относятся миниколоночные методы выявления афлатоксинов, охратоксина А и зеараленона и иммуноферментные методы обнаружения афлатоксинов, трихотеценовых микотоксинов, фумонизинов. Количественные аналитические методы основаны на использовании тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) – например, для афлатоксинов, охратоксина, фумонизинов, зеараленона, дезоксиниваленола, патулина, газовой хроматографии (ГХ) – для Т-2 токсина, масс-спектрометрии.

В РФ установлены ПДК для афлатоксина В₁ – 0,005 мг/кг (в зерновых, орехах, масличных),

афлатоксина М₁ – 0,0005 мг/кг (в молоке и молочных продуктах), для дезоксиниваленола – 0,7 мг/кг (для пшеницы) и 1,0 мг/кг (для ячменя), для Т-2 токсина – 0,1 мг/кг (для зерновых), для зеараленона – 1,0 мг/кг (для кукурузы, пшеницы, ячменя) и 0,2 мг/кг (для продуктов переработки кукурузы, пшеницы, ячменя), для патулина – 0,05 мг/кг (для продуктов переработки яблок, томатов и облепихи). Разработан проект ПДК для охратоксина А – 0,005 мг/кг (для зерна пшеницы, ржи, ячменя и овса). Не допускается присутствие микотоксинов в продовольственном сырье и пищевых продуктах, предназначенных для детского и диетического питания (Табл. 11). Как видно из таблицы, в России установлены допустимые уровни для более широкого круга микотоксинов и значительно большего числа пищевых продуктов. Установленные в России ПДК для афлатоксина В₁ в пищевых продуктах не отличается существенно от принятого стандарта и уровней МТЛ (maximum tolerated levels) установленных в большинстве стран мира, но выше МТЛ установленных в ЕС для некоторых видов продуктов для прямого потребления. ПДК для афлатоксина М₁ и патулина соответствует стандарту и уровню МТЛ, принятому в большинстве стран мира. Уровни ПДК для дезоксиниваленола и зеараленона находятся в пределах величин МТЛ, принятых в большинстве стран, в которых установлены регламенты на эти микотоксины.

Таблица 11
 Методы определения микотоксинов

Микотоксины	ПО, мг/кг	Принцип метода	Документ
Афлатоксин В1	0,001	ТСХ-флуориметрия	МЗ 4082-86
	0,00015	ВЭЖХ-флуориметрия	МЗ 2273-80
Афлатоксин М1	0,0003	ТСХ-флуориметрия	МЗ 2273-80
	0,00002	ВЭЖХ-флуориметрия	МЗ 4082-86
Дезоксиниваленол (вомитоксин)	0,15	ТСХ-флуориметрия	МЗ 3940-85
	0,05	ВЭЖХ-УФ	МЗ 5177-90
Зеараленон	0,06	ТСХ-флуориметрия	МЗ 2964-84
	0,005	ВЭЖХ-флуориметрия	МЗ 5177-90
Т-2 токсин	0,05	ГЖХ-ДЭЗ	МЗ 3184-84
	0,02	ГЖХ-ДЭЗ групповой	Руководство по методам..., 2004
Патулин	0,012	ТСХ-флуориметрия	ГОСТ 28038-89
	0,005	ВЭЖХ-УФ	Руководство по методам..1998, 2004
Охратоксин А	0,0002	ВЭЖХ-флуориметрия	Аксенов И.В. и др., 2006
Фумонизин В1	0,01	ВЭЖХ-флуориметрия	Седова И.Б. и др., 2004
Фумонизин В2	0,04		

Таблица 12.
 Допустимые уровни микотоксинов

Микотоксин	Россия ПДК	ЕС MTL	Стандарты ССФАС MTL
Афлатоксин В ₁	0,005 мг/кг 5 мкг/кг Зерновые и зернобобовые, крупа, мука, семена масличных, масла растительные нерафинированные, масло коровье, жировые продукты на основе животных и растит. жиров, орехи, кофе, какао-бобы, чай, кондитерские изделия содержащие орехи, изоляты, концентраты, гидролизаты растительных белков, зародыши семян зерновых, хлопья, шрот, отруби из них < 0,00015 мг/кг < 0,15 мкг/кг Продукты детского питания и для лечебного питания детей	2 мкг/кг Зерно и зерн. продукты, арахис, орехи, сухофрукты для прямого употребления 5 мкг/кг Орехи, сухофрукты, не для прямого употребления, кукуруза, специи 8 мкг/кг Арахис не для прямого употребления 0,10 мкг/кг Продукты детского питания и для лечебного питания детей (с 2004 г)	15 мкг/кг * сумма В ₁ +В ₂ +G ₁ +G ₂ только для непереработанного арахиса
*По оценке ФАО определение суммы афлатоксинов является более сложной аналитической задачей, и не имеет преимуществ в сравнении с определением только В ₁ с позиции оценки риска для здоровья.			
Афлатоксин М ₁	0,0005 мг/кг 0,5 мкг/кг Молоко, пахта, сыворотка молочная, кисломолочные продукты, творог и творожные изделия, консервированное молоко < 0,00002 мг/кг < 0,02 мкг/кг Продукты детского питания и для лечебного питания детей.	0,05 мкг/кг* Сырое молоко и молоко для приготовления молочных продуктов 0,025 мкг/кг Адаптированные молочные смеси и продукты для лечебного питания детей (с 2004 г)	0,5 мкг/кг Для молока
• По запросу 32-й сессии ССФАС (2000 г) JECFA провел количественную оценку риска для сравнения двух уровней ПДК. Расчеты показали, что возможный риск развития рака печени при обоих уровнях минимален и что снижение ПДК с 0,5 до 0,05 мкг/кг не приводит к какому-либо значимому снижению риска для здоровья.			
Дезокси-ниваленол	0,7 мг/кг Пшеница – зерно, крупа, 700 мкг/кг мука, мучные кондитерские изделия, зародыши семян, хлопья, отруби, изоляты из раст. белков 1,0 мг/кг Ячмень – зерно, крупа, мука < 0,05 мг/кг Продукты детского питания и для лечебного питания детей	Гармонизированных регламентов нет Рассматривается проект MTL 750 мкг/кг для муки в качестве сырья для пищевых продуктов	нет

Зеараленон	1,0 мг/кг Зерно пшеницы, ячменя, кукурузы, зародыши семян, хлопья из зерна, отруби, изоля- ты и концентраты из растит. белков 0,2 мг/кг Крупа, хлопья, мука < 0,005 мг/кг Продукты детского питания и для лечебного питания детей	нет	нет
T-2 токсин	0,1 мг/кг Зерно, крупа, мука	нет	нет
Патулин	0,05 мг/кг 50 мкг/кг Соки, напитки, концентраты, полуфабрикаты, джемы, варенье из яблок, томатов, облепихи < 0,02 мг/кг < 20 мкг/кг Продукты детского питания и для лечебного питания детей.	50 мкг/кг Соки и нектары, преимущественно яблочные или соки как ингредиенты др. напитков 25 мкг/кг Яблочное пюре, компоты для прямого употребления 10 мкг/кг То же, но для детского питания	50 мкг/кг Для яблочного сока

Использованные документы: СанПиН 2.3.2.1078-01.

Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC) N 2174/2003,

N 1425/2003, N 455/2004, N 683/2004 FAO Food and Nutrition paper 81. Worldwide regulation for mycotoxins

in food and feed in 2003. FAO, 2004. JRCFA.Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO, Geneva, 2001.

Список литературы

Аксенов И.В., Эллер К.И., Тутельян В.А. Оптимизация аналитических методов количественного определения охратоксина А в пищевых продуктах. Гиг.сан., 2006, № 4, С.50 – 53.

Билай В.И. и Пидопличко Н.М. Токсинообразующие микроскопические грибы. Киев, Наукова думка, 1970, 291 с.

Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, СанПиН 2.3.2.1078-01, М. Минздрав России, 2002.

Ефремов В.В. Алиментарная токсическая алейкия. М. Медгиз, 1948, 120 с.

Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Биобезопасность. Микотоксины – природные контаминанты пищи. Вопр.питания., 2005, № 3, С. 3-13.

Покровский А.А., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Афлатоксины. М. ВИНТИ АН СССР, Токсикология т.8, 1977, 107 с.

Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов. М. Брандес-Медицина, 1998. – с.207-248

Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р. 4.1.1672-03. Минздрав России, Москва 2004, с.187-2009.

Саркисов А.Х. Микотоксикозы, М. Сельхозгиз, 1954. 216 с.

Седова И.Б., Киселева М.Г., Захарова Л.П., Эллер К.И., Тутельян В.А. Оптимизация условий определения фумонизинов В1 и В 2 в кукурузе и продуктах ее переработки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Журнал аналитической химии, 2004, т. 59, № 8, с. 1-7.

Тутельян В.А. и Кравченко Л.В. Микотоксины (Медицинские и биологические аспекты), М. Медицина, 1985. 320 с.

Bennett J.W., Klich M. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews, 2003, v. 16, № 36, p. 497-516.

Betina V. Mycotoxins – chemical, biological and environmental aspects. Elsevier, Amsterdam, 1989. 438 pp.

Bhatnagar D., Yu J., Ehrlich K.C. Toxins of filamentous fungi. Chem.Immunol., 2002, v.81, p. 167-206.

- Codex Alimentarius Commission. Report of the 36th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. – Rotterdam, 2004. – 210 pp.
- FAO Food and Nutrition Paper 81. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. – Rome, 2004. – 180 pp.
- Food Safety, ed. by J.P.F. D’Mello, CABI Publishing, 2003, p. 65-90.
- JECFA. Evaluation of certain mycotoxins in food. (WHO Technical Report Series № 906). WHO, Geneva, 2002. 62 pp.
- JECFA. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. (WHO Food Additives Series 47 and FAO Food and Nutrition Paper 74). 2001. 691 pp.
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v.56, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Lyon, 1993, p. 245-524.
- Marasas W.F.O.* Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural Toxins*, 1995, v.3, № 4, p. 193-198.
- Mazur L.J., Kim J.* Spectrum of noninfectious health effects from molds. *Pediatrics*, 2006, v.118, № 6, p.e1909-1926.
- Miller J.D.* Fungi and mycotoxins in grain: implication for stored product research. *J.stored Prod. Res.*, 1995, v.31, № 1, p.1-16.
- Murphy P.A., Hendrich S., Landgren C., Bryant C.M.* Food mycotoxins: An update. *J.Food Sci.*, 2006, v.71, p. R51-R65.
- Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours, ed. by M.Castegnaro et al., IARC Scientific Publications N 115, Lyon, 1991. 336 pp.
- Mycotoxins in dairy products, ed. by H.P.Van Egmond, London – New York, Elsevier Applied Science, 1989. 272 pp.
- Mycotoxins in food, ed. by P.Krogh, New York, Academic Press, 1987. 263 pp.
- Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. CAST (R139), Ames Iowa, 2003, 199 pp.
- O’Briene E., Dietrich D.R.* Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit.Rev.Toxicol.*, 2005, v.35, № 1, p.33-60.
- Ochratoxin A in food: recent developments and significance. *Food.Addit.Contamin.*, 2005, v. 22., Suppl. 1, p.1-107.
- Rao L.B., Husain A.* Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing «kodu poisoning» in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia*, 1985, v. 89, № 3, p.177-180.
- Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiologic effects, ed. by V.R.Beasley, v.I-II, Boca Raton, Florida, 1989.
- Trichothecenes with a special focus on DON. (ILSI Europe Report Series). ILSI, 2004, 36 pp.
- Weidenborner M.* Encyclopedia of food mycotoxins. Springer, 2001. 295 pp. WHO. Fumonisin B1. (Environmental Health Criteria 219). WHO, Geneva, 2000. 150 pp.
- Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C., Manes J.* Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem.Toxicol.*, 2007, v.45, № 1, p.1-18.

Ю.В. Сергеев

СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медицинская микология, изучающая болезни, вызванные грибами, в России в настоящее время развивается как новая отрасль медицинской науки, а с недавних пор и особой медицинской специальностью, что связано с массовым характером заболеваемости грибковыми инфекциями и микогенной аллергией. Важное значение имеет проблема токсигенных грибов и микотоксинов, затрагивающая вопросы национальной безопасности.

Среди возбудителей микозов в настоящее время перечисляют более 400 видов, при этом из года в год описываются десятки новых возбудителей. Растет число известных грибов – причинных факторов аллергических заболеваний и микотоксикозов, отравлений грибами. Наиболее актуальные вопросы таксономии и биологического разнообразия грибов, имеющих значение для медицины, традиционно находятся в фокусе изучения отечественных биологов-микологов. Развитие этих вопросов на современном этапе нашло отражение в российском сборнике «Новое в систематике и номенклатуре грибов», выпущенного по материалам семинара, проводившегося под эгидой Национальной академии микологии в 2001 г.

Несмотря на то, что медицинская микология рассматривает не только инфекции, вызванные возбудителями-грибами, но и болезни, вызванные токсинами или аллергенами грибов, в наиболее общем и распространенном понимании грибковыми заболеваниями остаются именно инфекции – микозы. Традиционно их делят на поверхностные, поражающие кожу и слизистые оболочки, подкожные и глубокие.

Наибольшее распространение и известность получили массовые грибковые заболевания – инфекции, поражающие миллионы населения. К ним, в первую очередь, следует отнести дерматофитии – грибковые инфекции кожи, а также вагинальный кандидоз. Наиболее массовые грибковые заболевания человека представлены поверхностными микозами и сопряжены со значительным ухудшением качества жизни. Затраты населения на лечение данных заболеваний ежегодно составляют миллиарды рублей, а противогрибковые средства занимают лидирующие позиции среди выпускаемых лекарственных форм.

Заболеваемость дерматофитией неоднократно изучалась разными авторами и продолжает быть предметом многих исследований. Заметно, что в общем числе исследований отечественных

авторов наибольшее внимание приковано именно к микроспории и трихофитии как известным контагиозным микозам, подлежащим обязательной регистрации. Это понятно и потому, что микозы стоп очень трудно регистрировать в соответствии с реальной картиной их распространенности. Только в г. Москве при создании «горячей линии» по микозам стоп и онихомикозу за 1 год обратилось более 100 тыс. пациентов (а зарегистрировано в этот год, по данным официальных отчетов, было не более 20 тыс. больных).

Наибольший вклад в изучение современной эпидемиологии онихомикозов внесло общеевропейское исследование под названием «Ахиллес», проводившееся в 1997–1998 гг. Согласно его результатам, распространенность онихомикоза, выявленного по обращаемости к дерматологу, составила 23%. Данные, по масштабу и значимости сопоставимые с проектом «Ахиллес», в России до последнего времени не были получены. В связи с этим в ГМУ УД Президента РФ было предпринято исследование эпидемиологии онихомикозов в условиях сплошной ежегодной диспансеризации. Впервые были изучены распространенность и заболеваемость онихомикозом, динамика основных эпидемиологических показателей за 10-летний период, сравнительная заболеваемость и ее структура в условиях сплошной ежегодной диспансеризации контингента крупного многопрофильного медицинского учреждения.

Общая распространенность (превалентность) онихомикоза, в пересчете на 1000 контингента, составила 54,5 (или 5,45%). При распределении показателей по возрасту было установлено, что с переходом в более старшую возрастную группу распространенность среди всех больных постоянно увеличивается (в среднем, в 2,46 раз). Среднегодовой темп роста заболеваемости за изучаемый период составил 103,9%, а темп прироста – 5,05%. В целом, заболеваемость онихомикозом за 11 лет выросла в 2,5 раза.

Результаты проведенного исследования указывают на значительную распространенность и рост заболеваемости онихомикозом у современного городского населения России.

В целом, изучение эпидемиологии онихомикоза показало значительную долю онихомикозов в структуре дерматологической заболеваемости, нарастание темпов роста заболеваемости, что необходимо учитывать при разработке лечебно-профилактических мероприятий, подготовке кадров и планировании закупок противогрибковых средств органами здравоохранения. Эти

вопросы сделали актуальной выработку новой концепции борьбы с дерматофитией как массовым грибковым заболеванием в России.

Согласно программе, представленной Национальной академией микологии в 2003 г., главной целью лечебно-профилактических мероприятий при дерматофитии должно стать выявление и лечение больных. Соответственно поставленной цели мы формулируем следующие задачи:

1) Активный поиск больных дерматофитией – прежде всего, микозами стоп и онихомикозом. Эта задача может быть осуществлена как в рамках программ диспансеризации, так и с помощью массовых лечебно-профилактических кампаний типа «горячая линия». Однако подобные методы сопряжены со значительными затратами и не могут быть осуществлены на федеральном уровне. Более совершенным подходом к решению данной задачи может стать эффективная санитарно-просветительная работа, ориентированная на постоянный приток пациентов в специализированные лечебные центры. Перспективным является внедрение программ самодиагностики онихомикоза и микоза стоп, повышающих мотивацию к лечению. Некоторые из этих программ уже апробированы (в частности, в рамках проектов Национальной академии микологии) и внедряются в практику.

2) Совершенствование средств терапии. Необходимо выйти на приемлемый низкий уровень рецидивов после лечения онихомикоза, усовершенствовать и упростить схемы лечения, сделав их доступными не только дерматологам, но и врачам общей практики. С нашей точки зрения, для решения последней задачи подходит уже внедренный в клиническую практику индекс КИОТОС, дающий возможность выбора адекватной схемы терапии онихомикозов и при этом не требующий значительного клинического опыта лечащего врача. Для успешной борьбы с руброфитией силами врачей общей практики необходимо также упростить и унифицировать подходы к их лабораторной диагностике, достаточные для подтверждения диагноза. Для этого могут быть использованы прямые ПЦР-зонды для выявления *T. rubrum* в клиническом материале, причем работы в этом направлении уже проводятся.

3) Разработка принципиально новых средств профилактики. Ближайшей задачей является санитарно-просветительная работа, направленная на раннюю профилактику и предупреждение руброфитии до момента развития онихомикоза, лечение которого сопряжено с большими труд-

ностями и затратами. Перспективной является специфическая профилактика, внедрение эффективных и безопасных дерматофитных вакцин, аналогичных тем, которые разработаны для профилактики зоонозных дерматофитий. Это направление также разрабатывается в России.

Необходимы дальнейшие исследования для уточнения отдельных аспектов предполагаемой стратегии борьбы с дерматофитией, работа по имеющимся направлениям и тем более необходимо объединение усилий специалистов и деятелей науки, практикующих врачей и организаторов здравоохранения разных профилей.

Рост заболеваемости онихомикозами объясняет необходимость активных мероприятий, направленных на выявление и лечение больных, которое на уровне населения в целом не осуществимо только в рамках диспансерного наблюдения. С этой целью в 2000 г. Национальная академия микологии начала проект «Горячая линия» – направленный на реализацию 1 задачи представленной выше программы. Проект имеет три главных задачи:

1. Оповещение населения с помощью средств массовой информации;
2. Экспресс-консультация населения врачами-операторами «Горячей линии»;
3. Направление больных в медицинские центры, где проводится лечение онихомикоза.

Так, в течение только 2 первых месяцев работы проекта поступило более 54 000 обращений, что составило около 2,2/тыс. населения в мес. (по г. Москве).

Разработан алгоритм экспресс-диагностики онихомикоза в рамках «горячей линии», показавший высокую чувствительность и специфичность. В течение 2 первых месяцев работы «горячей линии» записалось на прием более половины обратившихся (60,9%), а уже прошли обследование 42%.

В рамках проекта в Москве было получено более 300 000 обращений в центр «Горячей линии».

Таким образом, первый в мире опыт проведения крупномасштабной массовой кампании по диагностике, лечению и профилактике микозов принадлежит России. Проект «Горячая линия», проведенный в Москве в 2001–2002 гг., показал не только реальную обращаемость больных по поводу микозов стоп, но и позволил создать портрет современного больного онихомикозом, охарактеризовать его с социальных и психологических позиций, изучить качество жизни в его взаимосвязи с клиническими и эпидемиологическими данными.

В рамках программы борьбы с дерматофитией успехи были достигнуты в совершенствовании и разработке новых методов клинической и лабораторной диагностики наиболее распространенных форм дерматофитии.

Для определения схемы и продолжительности системной терапии в России были разработаны стандартизированные подходы с использованием индекса КИОТОС. Индекс представляет собой универсальную систему принятия терапевтических решений при онихомикозе. Внедрение системы КИОТОС в практику в 1999–2001 гг. в целом показало эффективность и удобство использования системы, в особенности – с разработкой специальных расчетных устройств (линейка, электронные калькуляторы). Простота и доступность системы позволили использовать ее в практике не только дерматологов, но и врачей общей практики для лечения онихомикоза. Это представляется тем более необходимым ввиду необычайно широкой распространенности заболевания, во многих районах не охваченного дерматологической службой. Линейки КИОТОС (в английском варианте – SCIO, scoring clinical index for onychomycosis) были переведены на несколько иностранных языков и неоднократно переиздавались за рубежом. В настоящее время они используются, в частности, дерматологами Украины, США, Канады, Израиля, Германии, Франции, Бельгии, Китая и Японии.

Лекторы Национальной Академии Микологии неоднократно приглашались с выступлениями по внедрению КИОТОС в клиническую практику ведущими дерматологическими и микологическими зарубежными научными обществами более 10 стран.

Опыт мировой дерматологической практики показывает, что эффективность традиционных методов диагностики микозов кожи и ногтей – микроскопии патологического материала и выделения культуры возбудителя – достигла своего предела и не является оптимальной.

В 2004 г. в России были разработаны первые генетические зонды для прямой диагностики дерматофитии кожи, волос и ногтей. сначала для изучения возможности применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в выявлении *Trichophyton rubrum* в клинических образцах. Затем был создан аналогичный метод для *Trichophyton mentagrophytes*. Предварительный анализ показал, что создание видоспецифичных генетических маркеров для дерматофитов в принципе возможно, несмотря на то, что эффективного опыта прямой генетической диагностики

дерматофитии в клинических образцах за рубежом до сих пор не имеется. В исследованиях зарубежных авторов, использовавших молекулярные методики, последние были применены либо к идентификации выделенных видов в культуре, либо к чисто исследовательским задачам (изучение биоразнообразия дерматофитов и молекулярно-генетические методы совершенствования таксономии). Для практических целей предлагались либо трудоемкие многоступенчатые алгоритмы, либо общие для грибов метки.

В исследовании был проанализирован именно клинический материал от больных онихомикозами, собранный в нескольких дерматологических и микологических центрах г. Москвы.

По результатам проведенного исследования, чувствительность изученного метода ПЦР-диагностики дерматофитного онихомикоза составила 94,4%, а специфичность – 95,2%. Общая расчетная точность диагностической методики составила 94,8%. Это существенно превышает отдельную и совокупную чувствительность микроскопии и культивирования. Таким образом, в России впервые разработан прямой ПЦР метод для определения генетического материала главного возбудителя онихомикоза *T. rubrum*. В настоящее время завершается многоцентровое исследование, одной из задач которого будет сопоставление результатов микроскопии, культивирования возбудителей и новых методов генодиагностики в клинических условиях.

Успех в разработке методов ПЦР-диагностики дерматофитии должен стать важным звеном в победе над контагиозными грибковыми инфекциями в России и является свидетельством ее глобального приоритета в этом направлении.

Первые успехи генодиагностики дерматофитии дали возможность разработки нового диагностического теста для другой массовой контагиозной инфекции – микроспории. Клиническая чувствительность метода составила, по предварительным оценкам, более 90%. Молекулярно-генетические методы могут эффективно применяться в диагностике *M. canis*, как в целях клинической диагностики, а также для контроля излеченности, проведения массовых скрининговых обследований и изучения контаминированных возбудителем факторов передачи.

Для поиска инновационных технологий массовой профилактики микозов был разработан перспективный сетевой проект Грибок.РУ. В рамках проекта в 2002 г. был создан специальный интернет-сайт, расположенный по адресу <http://www.gribok.ru>, содержащий все ос-

новные интерактивные элементы проекта «Горячая линия» и в то же время – гораздо больше информации, посвященной самому заболеванию. С момента создания данного ресурса его посещаемость постоянно росла, в настоящее время составляя не менее 900 посетителей в сутки. Таким образом, месячная посещаемость ресурса составляет около 2 700 посетителей, а за год – не менее 300 000 (около половины из них – жители Москвы). Исходя из расчетной заболеваемости взрослого населения г. Москвы (1,5 на 1000 населения в год), можно видеть, что показатели ежегодной посещаемости ресурса Gribok.RU более чем в 2 раза превышают показатели всех вновь регистрируемых случаев заболевания микозом стоп и онихомикозом. Тем самым, создан реальный механизм противостояния контагиозной грибковой инфекции, позволяющий остановить распространение инфекции и со временем добиться отрицательной динамики заболеваемости.

Совершенствование данного ресурса с привлечением и популяризацией современной медицинской информации позволило предоставить сведения о грибковых заболеваниях и возможностям их лечения тысячам пациентов из разных стран мира. Ресурс Gribok.RU стал первым в мире популярным сетевым санитарно-просветительным проектом, посвященным проблеме массовых грибковых заболеваний человека.

Таким образом, в России проведены крупномасштабные исследования, позволившие охарактеризовать современные эпидемиологические, этиологические и клинические особенности наиболее распространенных микозов человека и по их результатам – предложить новые методы диагностики, лечения и профилактики микозов. Полученные данные позволили не только получить современные представления о заболевании, но и предложить принципиально новые методы профилактики контагиозных микозов, недоступные за рубежом: массовые лечебно-профилактические кампании и национальные санитарно-просветительные проекты на основе высоких технологий.

Актуальную проблему представляют и оппортунистические глубокие микозы, вызываемые условно-патогенными грибами: комменсалами человека (*Candida spp.*) или широко распространенными в окружающей его среде (*Aspergillus spp.*). Как правило, оппортунистические микозы являются ятрогенной патологией, осложняющие те случаи, которые связаны с выраженным иммунодефицитом и нейтропенией – в частнос-

ти, химиотерапия и радиотерапия по поводу онкологических заболеваний. Поэтому в группы риска по оппортунистическим микозам входят, прежде всего, больные с гематологическими и онкологическими заболеваниями, получающие иммуносупрессанты и цитостатики; пациенты, которым предстоит пересадка органов и тканей. Тем не менее, выделяют и группу СПИД-ассоциированных глубоких микозов – прежде всего, кандидоза пищевода и криптококкоза.

Высокая смертность, несмотря на вовремя начатое лечение, частая неэффективность противогрибковой терапии на фоне нейтропении обуславливают значительный масштаб научных разработок и поиска новых средств диагностики и терапии главных оппортунистических микозов за рубежом. При этом наиболее заметен прогресс в исследованиях геномов главных возбудителей оппортунистических микозов.

Представляется перспективным изучение генетических аспектов патогенности и патогенеза важнейших оппортунистических микозов, наиболее распространенных в России – в частности, аспергиллеза и кандидоза. Имеющиеся работы отечественных исследователей-биологов, в основном, находятся вне поля медицины. Поэтому необходима интеграция усилий исследователей в области молекулярной генетики, классической микологии, микробиологии и клинической медицины, что может быть достигнуто на данном этапе, в рамках совместных проектов по медицинской микологии.

В частности, только в области общей и фундаментальной микологии, изучения систематики в России ведут работу крупные научные коллективы и известные исследователи: БИН РАН (И.В. Каратыгин, В.А. Мельник), Биолого-почвенный институт ДВО РАН (З.М. Азбукина, Л.Н. Васильева и другие), МГУ (Ю.Т. Дьяков, И.И. Сидорова, Л.В. Гарибова). Изданы крупные определители грибов, монографии и руководства – однако они во многом не учитывают нужд медицины. Более того, в рамках существующей санитарной регламентации, микологи не могут работать с культурами даже условно-патогенных грибов. Поэтому усилия биологов, в основном, фокусируются на биологии и генетике непатогенных дрожжей, *Neurospora crassa* и подобных модельных организмов. В области изучения генетики грибов следует отметить кафедру генетики СПбГУ, СПб Институт ядерной физики, Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Отдельные исследования ведутся в Волгоградском НИПЧИ.

К настоящему времени при участии Национальной Академии Микологии подготовлено издание монографии «Введение в генетику грибов». Под эгидой Академии в 2004 и 2005 г. прошло 3 симпозиума, посвященных генетике и медицинской микологии, в том числе 1 – совместно с РАМН в рамках научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней-2005», где состоялся обмен мнениями и опытом биологов, генетиков и клиницистов по наиболее актуальным вопросам генетики, геномики и генодиагностики грибов, имеющих значение для медицины.

Примером успешной интеграции молекулярной генетики и медицинской микологии может служить создание в рамках проекта Национальной академии микологии технологий для прямой диагностики основных возбудителей контагиозных микозов в клиническом материале.

В области изучения этиологии глубоких микозов следует отметить исследования в Гематологическом НЦ РАМН, НИИ Детской гематологии МЗ РФ, Морозовская ДГКБ, Российский Государственный Медицинский Университет, Красноярскую краевую клиническую больницу, проводящих многолетние исследования таких микозов, как кандидоз в многопрофильном стационаре, изучение колонизации слизистых оболочек у больных с гемобластомами, микологический мониторинг у больных с нейтропенией и иммунодефицитом. Однако прогресс в этой области и описания новых видов ограничены отсутствием доступа к крупным коллекциям дрожжевых и мицелиальных грибов. Ограниченное количество музейных видов, которое имеется в распоряжении единственного НИИ Медицинской микологии С-Пб РМАПО, не может удовлетворить запросы в условиях полиэтиологичности микозов на фоне нейтропении, когда тяжелое состояние и гибель больного может наступить в результате инфекции, обусловленной редкими и случайными видами грибов. Вместе с тем, в России созданы и поддерживаются крупнейшие коллекции грибов, в частности известен Объединенный каталог 17 российских коллекций микроорганизмов в 5 томах Всероссийской коллекции микроорганизмов. В силу ряда обстоятельств этот каталог и коллекции медицинских микробиологов оказались разобщенными.

Ряд глубоких микозов, встречающихся в нескольких эндемических районах (Северная и Южная Америка, Африка, Юго-Восточная Азия), так называемые диморфные микозы – не-

редко представляют ВИЧ-ассоциированную инфекцию и считаются особо опасными. Одно время их рассматривали в качестве потенциальных факторов для биологического оружия. В этой связи зарубежным микологическим сообществом в последнее время поднимается и активно обсуждается вопрос о возможности биотерроризма с использованием отдельных видов возбудителей микозов (*Coccidioides* и др.). Однако в России изучением данных микроорганизмов и обусловленных ими опасных микозов занимается только ограниченный круг исследователей – прежде всего, Волгоградский НИПЧИ. Несмотря на то, что наша страна не является эндемическим ареалом «особо опасных микозов», они возможны как завозная инфекция, при этом нередки случаи ошибочной их диагностики. Нужны усилия научного и медицинского сообщества России по ознакомлению врачей с данной проблемой, основными мерами диагностики, лечения и профилактики этих микозов.

Важнейшее значение имеет проблема токсигенных грибов, микотоксинов, затрагивающая вопросы национальной безопасности.

Микотоксикозы – заболевания от воздействия токсинов грибов – распространены повсеместно. Микотоксины постоянно обнаруживаются в разных пищевых и кормовых продуктах. Продуценты микотоксинов, как правило, являются убиквистами и одними из самых распространенных видов грибов (например, *Aspergillus* и *Penicillium*). Загрязнение продуктов микотоксинами происходит повсеместно, но имеет при этом географические и сезонные особенности. Социально-экономическое значение микотоксикозов в настоящее время заключается, в основном, в потерях, которые несут сельское хозяйство и пищевая промышленность. В частности, степень контаминации кормового сырья распространенными микотоксинами (Т2-токсин, зеараленон, охратоксин А), по данным НИИ питания РАМН, может достигать 40–50%. В разных регионах России периодически отмечается высокий уровень контаминации зерна микотоксинами, что требует адекватных профилактических мер и новых исследований.

В России продолжают исследования патогенности и токсигенности грибов, их значения как причинных факторов аллергии и иммунопатологии, роли в современном окружении человека – от общего распространения в природных условиях различных регионов России, на промышленных объектах и в жилищах до специфических условий обитаемых космических объектов. Болезнетвор-

ное влияние токсинов микроскопических грибов по-прежнему находится в фокусе внимания российских микотоксикологов, совершенствующих и предлагающих новые методы диагностики и предотвращения этих заболеваний.

В этом плане дает плоды интеграция усилий исследователей, работающих в разных отраслях науки и практики, сопряженных с токсинами грибов: экологов и фитопатологов, токсикологов и врачей общей практики, санитарных врачей, ветеринаров. Показательны совместные симпозиумы и семинары, участие в которых приняли сотрудники ведущих научных коллективов: НИИ Питания РАМН, Казанского государственного технологического университета, ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН, ВНИИЗ РАСХН, ВНИИ фитопатологии. Такие симпозиумы были организованы, в частности, Национальной академией микологии в рамках 1 Съезда микологов России, 1–5 Всероссийских конгрессов по медицинской микологии. В 2008 г. планируется междисциплинарный симпозиум по проблемам фузариоза и микотоксикозам, обусловленным поражением зерна токсинами *Fusarium* spp.

За последние годы в России были проведены новые исследования биологических эффектов микотоксинов и токсигенного потенциала фитопатогенных грибов и контаминантов, разработаны новые способы деконтаминации и обеззараживания зерна, загрязненного микотоксинами.

Тесно связанной с микотоксикологией является проблема массовых отравлений грибами, долгое время не рассматривавшаяся в фокусе медицинской микологии и микологии вообще. Изучение экологии и токсинообразования ядовитых макромицетов ведется группами исследователей из учреждений, включающих Ботанический институт имени В. Л. Комарова РАН, Кабардино-Балкарский государственный университет. Совершенствование диагностики и лечения массовых отравлений грибами стало возможным благодаря объединенным усилиям врачей из Воронежской ГМА имени Н.Н. Бурденко, НИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского, Информационно-консультативный токсикологический центр МЗ РФ. В течение 2002–2005 г. в изданиях Национальной академии микологии авторами, изучавшими отравления грибами, было опубликовано более 30 статей и тезисов научных докладов.

Весьма актуальной остается проблема микогенной аллергии. Аллергенами грибов могут быть разные их вещества: маннаны и маннанопротеины, фосфолипоманнан, белки теплового шока, ферменты (альдегид дегидрогеназа,

енолаза, супероксид дисмутаза, сериновая протеаза, металлопротеаза, дисульфидизомераза, бета-ксилозидаза, *n*-ацетил глюкозаминидаза), рибосомальные белки, нуклеопротеины. Многие из них не только вызывают аллергические и аутоиммунные реакции, но могут служить иммуномодуляторами и иммуносупрессорами, подавляющими иммунный ответ, что обуславливает развитие иммунодефицита. Поэтому иммунодефициты и аллергия часто взаимосвязаны при микотической патологии.

Аллергенами грибов могут служить споры, поступающие из окружающей среды с воздухом. Споры грибов служат важнейшими аэроаллергенами. Их концентрация в воздухе России, особенно в регионах с влажным умеренным климатом, в сотни раз и более превышает концентрацию пыльцы растений. Важной особенностью этих аэроаллергенов является их круглогодичная персистенция. Причем они присутствуют в окружающей среде, в производственных помещениях и в квартирах. В домашней пыли – частом причинном факторе респираторной аллергии – ринитов, бронхиальной астмы имеется от 10000 до 10 млн спор плесневых грибов. Детальное клинико-лабораторное обследование больных позволяет выявлять аллергические реакции на грибы в 30–60% случаев. Так, у детей с астмой широко распространена аллергия на плесневые грибы, которая выявляется в лабораторных тестах, когда еще кожные пробы отрицательны. Другим источником аллергии к грибам служит пища. Нередки перекрестные реакции между аллергенами пищи (дрожжевые продукты, сыры и др.), напитков (пиво, вино и др.) и аэроаллергенами с аллергией к домашней пыли при аллергических ринитах и бронхиальной астме, атопическом дерматите. Клиническими проявлениями нередко служат крапивницы, отеки Квинке, поражения желудочно-кишечного тракта. Микозы – следующая частая причина аллергии. Среди них наиболее часто встречаются онихомикозы, с которыми ассоциированы аллергические риниты, бронхиальная астма, дерматиты.

Разработка новых методов диагностики и профилактики микогенной аллергии является одним из научных приоритетов России. Изучение промышленных и техногенных факторов на развитие микогенной аллергии и распространение условно-патогенных, токсигенных и аллергенных грибов традиционно проводится в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, Военно-медицинской академии, Башкирском государственном университе-

те, Институте биологии УНЦ РАН.

Мониторинг содержания спор аллергенных грибов и исследования сенсибилизации к экзогенным и эндогенным грибным аллергенам проводится в МГУ, Самарском государственном университете, Институте аллергологии и клинической иммунологии, Нижегородском НИИ гигиены и профпатологии МЗ РФ. Ведется внедрение новых методов диагностики и терапии микогенной аллергии, в частности, в НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН, НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина, Институте аллергологии и клинической иммунологии. Создание вакцины против микогенной аллергии (АСИТ) на основе клеточного эпитопа белка *Aspergillus fumigatus* проводится в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Симпозиум, посвященный микогенной аллергии, аэромикологии, и экологии современного окружения человека, проводится Национальной академией микологии ежегодно, начиная с 2002 г.

В организационном аспекте Минздравом РФ введены специальности клиническая и лабораторная микология, создаются кафедры клинической микологии, функционирует институт медицинской микологии, организуются микологические центры, общественные научные организации. Среди основных организаций и учреждений следует выделить государственные структуры, имеющие особое отношение к отечественной медицинской микологии. К ним следует отнести: Московский городской микологический центр, Центр глубоких микозов (Москва), ЦНИКВИ МЗ РФ, отделение микологии (Москва), Институт Микробиологии РАН, НИИ медицинской микологии МАПО (С-Пб) и Микологический центр МЗ РФ, Уральский НИИ дерматовенерологии, НИИ питания РАМН, Центр профилактики и борьбы со СПИДом (Москва), Волгоградский НИПЧИ, Микробиологические лаборатории ГНЦ РАМН, РОНЦ, ЦКБ МЦ УДП РФ, МОНИКИ, НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Эти учреждения нередко относятся к разным ведомствам, имеют разные направления работы и специализацию основных сотрудников, однако все они объединены общим предметом исследований, относящимся к области медицинской микологии.

Помимо этих организаций, в Российской Федерации вопросами общей микологии и связанной с ней прикладной микологией занимается очень большое число учреждений различных ведомств.

Координации и общей картины направлений развития, взаимодействия до настоящего времени не существовало. В этом аспекте особую роль в объединении ученых различных направлений занимающимися изучением грибов и их интеграции в мировое сообщество играет Общероссийская общественная научная организация «Национальная академия микология». Общероссийская общественная научная организация объединяет 49 регионов России, собирая под своей эгидой микологов всех специальностей. Наиболее крупные отделы академии – отдел медицинской микологии, общей и фундаментальной микологии, ветеринарной микологии, сельскохозяйственной, санитарно-гигиенической, технической микологии и биотехнологий, фармацевтический. В медицинском отделе представлены специальности: кожные болезни, внутренние, педиатрия, оториноларингология, микотоксикология, аллергология и др. В ее составе 22 академика и член-корр. РАМН, РАСХН, РАЕН и др. 94 доктора наук, 215 кандидатов наук.

Отдел медицинской микологии представляет Россию в Европейской Конфедерации Медицинской Микологии (European Confederation of Medical Mycology, ЕСММ), а делегат от Национальной академии микологии является полномочным представителем России в Совете ЕСММ. Благодаря поддержке и признанию таких обществ, как ЕСММ и ISHAM (Международное общество медицинской и ветеринарной микологии) мероприятия общественной академии имеют широкое международное участие.

Проведенные общественной академией Первый съезд микологов России (2002 г. – Крупнейший научный форум России – 2000 делегатов из России и СНГ, 87 организаций, 700 докладов, 30 сессий) и 5 Всероссийских конгрессов по

медицинской микологии (2003, 2004, 2005 гг. – общее число делегатов – 5000, 400 докладов, 1200 опубликованных научных работ) с международным участием позволили объединить ученых различных отраслей теоретической и прикладной микологии в России, оценить состояние развития микологии в России, наметить и координировать основные направления развития микологии в стране.

Наглядным доказательством прогресса медицинской микологии в России являются публикации, изданными в 10 томах сборника академии «Успехи медицинской микологии», периодические издания, внушительная издательская программа академии, проведенные крупные эпидемиологические проекты, широкомасштабные лечебно-профилактические компании, интернет-проекты, научные исследования, выступления с докладами в России и за рубежом, интеграция в международные научные микологические общества и научные организации.

Достижения медицинских микологов, несомненные успехи отечественных ученых продиктовали необходимость их общения и открытого обмена накопленным опытом и современной научной информацией в академических кругах. Требуют всестороннего обсуждения произошедшие изменения в организации микологической службы и развития науки в этой области медицины, а также взаимодействия общественных научных организаций с академической наукой.

Совершенствование медицинской микологической службы возможно, прежде всего, за счет внедрения результатов новых исследований в практику здравоохранения, повышения уровня знаний врачей всех специальностей в области медицинской микологии.

Грибные биотехнологии

Е.П. Феофилова, В.М. Терешина, А.С. Меморская,
Н.Г. Гончаров, А.И. Алехин, Л.М. Дулькин

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИКОПИНА ИЗ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ И ЕГО МЕДИЦИНСКОМ ПРИМЕНЕНИИ

1. Вступление: почему в конце XX века ликопин вызвал интерес у медиков и биологов?

Каротиноиды являются подсемейством (subfamily) изопреноидов и наиболее широко распространены среди природных соединений. Именно они придают оригинальную красно-желтую окраску животным, растениям, микроорганизмам, и выполняют важнейшие биологические функции – являются светособирающими пигментами в фотосинтезирующих системах, фотопротекторами, антиоксидантами и регуляторами микровязкостных свойств мембран. Среди низкомолекулярных соединений, используемых в медицине, за период с 1981 по 2002 гг. природные соединения составляли 61% [Newman et.al., 2003]. Среди этих природных веществ значительное место принадлежит каротиноидам, которые вызвали особый интерес в связи с их применением в медицине и косметологии.

В этом аспекте давно привлекал к себе внимание биологов и медиков широко распространенный в природе каротиноид β -каротин, причем не только в связи с его провитаминой активностью, но и благодаря положительному эффекту в лечении сердечно-сосудистых заболеваний и рака. Кроме того, уже к концу 80-х годов прошлого столетия была разработана биотехнология получения этого каротиноида с использованием гетероталличного мукового гриба *Blakeslea trispora*, что позволило получать β -каротин в достаточно больших количествах и по цене, обеспечивающей его быстрое внедрение в медицину [Колот с соавт., 1971]. Гипотеза о том, что потребление β -каротина замедляет темпы развития рака у людей была выдвинута еще в 1981 г. Однако, начиная с 1995 года, после Решения Всемирной Организации Здравоохранения интерес к β -каротину несколько уменьшился, так как возникли сомнения в его положительном влиянии на рак легких у ку-

рильщиков. Специально проведенное в Финляндии исследование не подтвердило пользы β -каротина у курящих мужчин с раком легких [Buring, Hennekens, 1995]. Более подробные данные, отражающие взгляд на использование β -каротина как лекарственного средства можно найти у [Maune, 1996; Bendich, 2004]. На основании многих исследований был сделан вывод, что β -каротин действует как антиоксидант, влияет на некоторые иммунные функции в организме, снижает опасность заболевания рядом хронических болезней, в частности катарактой, однако потребление этого каротиноида не всегда снижает, а иногда и повышает риск канцерогенеза [Paolini et.al., 1999].

Возможно поэтому, начиная с 1997 года интерес исследователей переместился на ликопин, который обладает среди каротиноидов наиболее выраженной способностью устранять вредное воздействие синглетного кислорода [Sies, Stahl, 1998], что заинтересовало медиков. Не меньшее значение представлял и тот факт, что биологическая функция β -каротина была достаточно обоснована [Феофилова, 2006], в то время как о роли ликопина данные практически отсутствовали.

2. Природные формы ликопина

Ликопин представляет собой ациклический каротиноид, который содержит 11 конъюгированных двойных связей, расположенных линейно в all-trans форме. За немногим исключением ликопин в природных источниках представлен all-trans изомером. Cis-изомерам ликопина свойственна менее яркая окраска, более низкая точка плавления, меньший коэффициент экстинкции, смещение длины волны максимума поглощения и появление нового пика в УФ-области. Ликопин может потенциально образовывать 8 геометрических изомеров. Шесть из них обнаружены в природе: all-trans ликопин является преобладающим в томатах (95%); 15-cis, 13-cis, 9-cis, и 5-cis ликопины найдены в сыворотке крови человека, а 7,9, 9',7'-cis ликопин обнаружен в одном из сортов помидор [Nguyen, Schwartz, 1999].

Ликопин устойчив к нагреванию и не разрушается при приготовлении пищи. Тепловая обработка и свет индуцируют образование cis-изомеров ликопина, которые лучше усваиваются организмом человека, чем all-trans форма [Rao, Agarwal, 2000].

3. Распространение ликопина в природе и особенности биосинтеза

Ликопин не так широко распространен в природе, как β -каротин. Томаты являются основными природными источниками ликопина, содержание которого варьирует в зависимости от сорта. Так, в *Lycopersicon pimpinellifolium* количество ликопина составляет 40,0 мг/100 г сырой массы, а в *L. esculentum* только 3,1–7,7. Сравнимое с томатами количество ликопина обнаружено в розовом грейпфруте (3,36), гуаве (5,4), арбузе (4,1), папайе (2,0–5,3). Кроме того, в небольшом количестве ликопин содержится в сливе, финиках, шиповнике, хурме, манго, тыкве, облепихе, бруснике, морознике, клюкве, баклажанах, крапиве, овощном и черном перце, листьях чайного куста, в корнеплодах дикой моркови, турнепса, брюквы и др. [Nguyen, Schwartz, 1999].

Человек и животные не синтезируют каротиноиды, но получают их с пищей, хотя в последние годы показано, что американский таракан *Periplaneta americana* способен синтезировать каротиноиды из их предшественника – пиррофосфата мевалоновой кислоты [Шуколюков, Сааков, 2001]. У бактерий и грибов синтез каротиноидов интенсивно протекает во второй фазе развития (идиофазе). Триггером каротинообразования служит истощение в среде культивирования источников азота при сохранении определенного уровня углерода.

Практически у всех видов грибов ликопин образуется в очень незначительном количестве как промежуточный продукт, что связано с особенностями биосинтеза каротиноидов. Путь синтеза каротиноидов начинается с реакции конденсации двух молекул геранилгеранилпиррофосфата, в которой участвует фитоинсинтаза. При этом происходит образование фитоина. Другой фермент – фитоиндегидрогеназа осуществляет четыре реакции дегидрогенизации фитоина в результате чего синтезируется ликопин. Следующий шаг в образовании каротиноидов – циклизация ликопина – через γ -каротин с образованием β -каротина. В этих реакциях участвует ликопинциклаза. Этот фермент, ответственный за образование циклических предшественников каротиноидов, был выделен и очищен до гомогенного состояния в активной форме. Ген ликопинциклазы получали из *Erwinia uredovora* и амплифицировали в *E. coli*. Из этого рекомбинантного штамма фермент был очищен с использованием иммуноаффинной хроматографии и показано, что процесс

циклизации включает две реакции – с участием интермедиата – моноциклического γ -каротина. Кофакторами, необходимыми для протекания реакций циклизации являются NADH и NAD [Schurr et al., 1996].

Биосинтез каротиноидов можно представить себе как бифуркатный путь, ведущий к образованию C_{30} - и C_{40} - каротиноидов, причем последние подвергаются значительным энзиматическим модификациям и более широко распространены в природе [Umeno et al., 2005]. У коринебактерий обнаружены C_{45} - и C_{50} -каротиноиды, так называемые гомокаротиноиды, например флавуксантин и декапреноксантин, предшественником которых является ликопин [Krubasik et al., 2001]. В последние годы на основании исследований с мутантами *Phycomyces blakesleeanus* и *Mucor circinelloides* предполагают, что у этих организмов имеется бифункциональный фермент, который кодируется геном *carRP* и представляет собой комплекс, состоящий из четырех идентичных субъединиц фитоиндегидрогеназы и двух субъединиц ликопинциклазы [Velayos et al., 2000]. У *Neurospora crassa* обнаружена мембраносвязанная фитоиндесатураза, осуществляющая пятиступенчатую дегидрогенизацию фитина. При этом основными продуктами являются ликопин и 3,4-дидегидроликопин [Haussmann, Sandmann, 2000].

С практических позиций интерес представляет тот факт, что в зависимости от условий культивирования в указанном выше пути биосинтеза каротиноидов наблюдаются отклонения и происходит накопление какого-либо из промежуточных продуктов. В этом отношении интересны данные о том, что синий свет регулирует у грибов активность некоторых ферментов синтеза каротиноидов, например активность фитоиндегидрогеназы [Blasko et al., 2000].

Совсем недавно считалось, что биосинтез изопреноидных соединений, в том числе и каротиноидов, протекает только через стадию образования мевалоновой кислоты. Однако в последние годы выяснилось, что в зависимости от систематического положения организма пути синтеза изопреноидов не идентичны и существует еще и второй – метилэритритолфосфатный (немаволатный) путь синтеза [Ершов, 2005]. Возможно этим объясняется тот факт, что при добавлении некоторых ингибиторов, действующих у мицелиальных грибов на стадию образования мевалоновой кислоты, не происходит полного подавления синтеза β -каротина.

4. Биологическая функция ликопина у мицелиальных грибов

Биологическая функция ликопина у грибов практически неизвестна. Однако к настоящему времени накоплены экспериментальные данные, которые позволяют высказать предположение по этому вопросу. Образование ликопина происходит в том случае, когда в пути синтеза каротиноидов происходит ингибирование ферментов (циклаз), участвующих в образовании β -иононовых колец, при этом не происходит образование β -каротина. Ликопин среди каротиноидов является самым сильным природным антиоксидантом, а эти соединения необходимы при действии стрессоров для защиты липидного бислоя мембран от разрушающего действия продуктов перекисного окисления липидов. В то же время активный синтез ликопина прекращает процессы репродукции, так как происходит ингибирование образования каротина, являющегося предшественником половых гормонов (триспорных кислот) и спорополленина. Последний представляет собой продукт окислительной полимеризации β -каротина и входит в состав клеточной стенки зигоспор мукоровых грибов. Следовательно, образование ликопина приводит к прекращению в условиях стресса процессов половой репродукции, и, благодаря высокой антиоксидантной активности, более эффективно, чем другие каротиноиды, сохраняет целостность мембран. То, что усиленный синтез ликопина происходит именно в условиях стресса, свидетельствует тот факт, что образование этого полиена наблюдается одновременно с появлением трегалозы, которую называют «стрессовым сахаром», и которая обеспечивает биохимическую адаптацию, в частности защиту мембран и макромолекул клеток при неблагоприятных воздействиях. Таким образом, синтез ликопина и прекращение синтеза β -каротина являются химическим сигналом остановки репродукции (образования половых клеток зигоспор), которая не может происходить при действии стрессоров, когда организм переходит на новый уровень биохимической адаптации [Феофилова и др., 1995].

5. Медицинские свойства ликопина

Провитаминная активность отмечена у α - и β -каротина, β -криптоксантина, но ее нет у ликопина [Isler, 1981]. Однако еще 40 лет назад интерес к ликопину вызвали такие его свойства как способность при интраперитонеальном введении

повышать устойчивость к бактериальным инфекциям и подавлять развитие аденокарцином. А в последние годы данные об антираковом эффекте ликопина нашли новое подтверждение [Rao, Agarwal, 2000]. Кроме того, что особенно заинтересовало биологов и медиков – ликопин задерживает рост раковых клеток, индуцирует клеточные коммуникации и влияет на гормональную регуляцию. В последние годы установлено, что ликопин защищает мембранные липиды от окисления синглетным кислородом и другими активными формами кислорода, а также предотвращает повреждение ДНК при окислительном стрессе. Так, высокий уровень ликопина в клетках ($20 \text{ pmol}/10^6$ клеток) на 86% снижает перекисное окисление липидов и на 77% – образование 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина, индуцированное системой нитрилтриацетат железа/аскорбат и, таким образом, препятствует развитию рака, вызванного окислительной деградацией ДНК [Matos et.al., 2000].

Внимание медиков к ликопину значительно возросло после того, как было установлено, что каротиноиды присутствуют в простате и преобладающим является ликопин [Yokoyama et.al., 1997]. Особый интерес представляло наблюдение, что в простате находятся от 10 до 20 *cis*-изомеров и производных ликопина, в то время как почти 90% ликопина, поступающего с пищей является *all-trans* изомером. Специально проведенное исследование подтвердило особую роль ликопина по сравнению с другими каротиноидами. Оказалось, что β - и α -каротины значительно меньше ингибируют рост раковых клеток по сравнению с ликопином [Levy, Sharoni, 1993]. Об этом же свидетельствовали данные опытов, в которых измеряли концентрацию ликопина в тканях простаты при введении томатного сока в пищу пациентам. Оказалось, что в этом случае по сравнению с контрольной группой количество ликопина в простате увеличилось почти в три раза, при этом наблюдалось снижение PSA и 8-OhdG лейкоцитов в сыворотке крови. Эти данные следует рассматривать как серьезное подтверждение корреляции между количеством ликопина в пище и уровнем этого каротиноида в тканях простаты. Это же подтверждают наблюдения *in vitro* и *in vivo* за ростом опухолей, проводимые в течение последних 10 лет, которые подтвердили защитное действие ликопина в отношении рака простаты [Levy, Street, 1993].

Биологическое действие ликопина комплексное. Полученные к настоящему времени результаты позволяют заключить что ликопин

является важнейшим антиоксидантом в организме человека. Антиоксидантная гипотеза, по-видимому, может объяснить ингибирующее действие ликопина в отношении новообразований, вызванных повреждением ДНК в результате окислительного стресса [Matos et.al., 2000]. Было показано, что каротиноиды без активности провитамина А (ликопин, лютеин, кантаксантин, астаксантин) усиливают клеточный и гуморальный иммунный ответ [Chew, Park, 2004]. Это обусловлено тем, что иммунные клетки особенно чувствительны к окислительному стрессу в связи с тем, что их цитоплазматическая мембрана содержит большое количество полиненасыщенных жирных кислот. Перекисное окисление липидов, вызванное активными формами кислорода (АФК), лежит в основе раковых, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, а также процессов старения. Полагают, что особенность структуры ликопина определяет его локализацию внутри мембраны так как он не имеет гидрофильных групп. На примере лимфоцитов собак показано, что каротиноиды локализованы в основном в митохондриях, микросомах и ядре. Локализация ликопина внутри мембраны митохондрий защищает липиды мембран лимфоцитов от перекисного окисления. Установлено также, что высокий уровень ликопина в клетках ($20 \text{ pmol}/10^6$ клеток) на 86% снижает перекисное окисление липидов и на 77% – образование 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина, индуцированное системой нитрилтриацетат железа/аскорбат и, таким образом, препятствует развитию рака, вызванного окислительным разрушением ДНК [Matos et.al., 2000].

Другая гипотеза связывает антиканцерогенное действие со способностью ликопина останавливать клеточный цикл на стадии G_0/G_1 путем ингибирования онкоген-индуцированного фосфорилирования регуляторных белков-антионкогенов p53 или Rb [Gerster, 1997].

Кроме того, возможно, что антиканцерогенный эффект ликопина обусловлен его способностью регулировать клеточные взаимодействия, вызывая экспрессию гена *connexin43* [Gerster, 1997].

Следует отметить, что, вероятно, роль ликопина более значима и не ограничивается только снижением риска заболеваний раком. В 2001 г. в Финляндии было показано, что низкий уровень ликопина в плазме крови можно связывать с возникновением таких заболеваний как атеросклероз сосудов и инсульт [Rissanen et.al., 2001].

Вероятно, не случайно ликопин присутствует в плазме крови, семенниках, надпочечниках, печени, почках, простате, крови, легких и др., но накапливается только в трех органах – яичках, надпочечниках и простате [Pohar et.al., 2003], что может свидетельствовать о важном значении этого каротиноида в функционировании именно этих органов. Наконец, снижение уровня ликопина может быть ассоциировано с заболеваниями желудочно-кишечного тракта [Johnson, 1998].

Потребление ликопина наиболее высокое в Америке – 3,7 мг в день и совместно с β -каротином содержание этих каротиноидов в пище достигает 30% от всех потребляемых каротиноидов. В Англии потребление ликопина ниже (1,1 мг/день) на одного человека. Еще ниже потребление в других Европейских странах, например в Финляндии – 0,7 мг/день [Giovannucci, Clinton, 1998].

6. Биотехнология получения ликопина из мицелиальных грибов: преимущества и перспективы

К концу XX-го столетия наиболее подробно был изучен биологический эффект ликопина растений, что объяснялось тем, что в биотехнологии использовали растительное сырье. Однако, интерес к грибам, объясняемый их особой “биотехнологичностью”, внес существенные коррективы в существовавшие к 1998 г. биотехнологии получения ликопина, так как появилась возможность получать этот каротиноид более простым и надежным способом.

Мицелиальные грибы не случайно занимают особое место среди микроорганизмов-продуцентов: во-первых, благодаря физиолого-биохимическим свойствам, которые позволяют использовать грибы для получения тех биологически активных соединений (БАС), источником которых ранее были растения, животные и бактерии (гиббереллинов, алкалоидов, абсцизина, эргостерина, незаменимых жирных кислот и др.). Во-вторых, грибы в последнее десятилетие начали широко использоваться в медицине, что привело к созданию новой ветви этой дисциплины – микологической фармакологии.

В связи с этим в последние годы у микологов принципиально изменился взгляд на грибы, которые начинают рассматривать не только как источник питания, в частности резерв белка, но и как созданное природой готовое лекарственное средство. Мицелий и плодовые тела грибов стали ценить не только по содержанию белка,

углеводов, липидов и аминокислотному составу, но и по присутствию БАС, препятствующих возникновению таких наиболее распространенных в XXI веке заболеваний, как сердечно-сосудистые, онкологические и диабет. Но, если всего 10 лет назад, создание лекарственных препаратов из грибов было делом чистой эмпирики, то в настоящее время разработаны научные критерии, определяющие создание заданного препарата.

Разработка научных основ для целенаправленного получения из грибов медицинских препаратов определялась тремя факторами: подробным изучением химического состава плодовых тел или мицелия грибов, быстро развивающимся в последние годы специализированным направлением химии природных соединений и применением новейших методов анализа, позволившим значительно расширить наши представления о новых БАС мицелиальных грибов. Среди таких природных веществ грибов лидирующее место в последние годы принадлежит каротиноидам, из которых наиболее высокой антиоксидантной активностью обладает ликопин.

Биотехнологии получения каротиноидов, в частности ликопина, начали интенсивно развиваться в середине XX века благодаря следующим причинам. В связи с тем, что представители стран Запада предпочитали более «рафинированную» пищу, включающую насыщенные жиры и очищенные углеводы, и употребляли мало овощей и трав, было высказано предположение, что какие-то ингредиенты «растительного» питания снижают риск заболевания рядом онкологических заболеваний, в частности гиперплазией и раком предстательной железы [Giovannucci, Clinton 1998; Cohen et.al., 2000]. Специальное исследование, проведенное в конце XX века, позволило выявить ряд особенностей, связанных с возникновением этих заболеваний. Было установлено, что наиболее высокая смертность от канцерогенеза наблюдается в Северной Европе и США, наиболее благополучен в этом отношении Китай, где отмечены единичные случаи [Parker et.al., 1997]. Интересно, что разница в количестве заболеваний раком простаты среди наций составляет до 30 раз: самый низкий уровень заболеваний отмечен в Китае и Японии, самый высокий – в северной Америке, северной Европе и Австралии [Giovannucci, Clinton, 1998].

К этому же времени идеи академика Н.М. Эмануэля [Корман, 2000] о роли свободнорадикального окисления в возникновении и развитии злокачественных опухолей и особой роли анти-

оксидантов в поддержании иммунного статуса организма заставили медиков обратить особое внимание на растительные пигменты – каротиноиды, содержащие систему сопряженных двойных связей и обладающие высокой антиоксидантной активностью.

Именно благодаря этому свойству и предполагаемому антираковому эффекту ликопин уже с 1990 г. активно входит в пищевые добавки. Так, например за рубежом уже в 1996 г. предложен как потенциальный антираковый препарат «Betaten», полученный из томатов и представляющий собой 4% липидную суспензию каротиноидов, среди которых ликопин составляет 70%. Фирма LycosRed (Израиль) получает из томатов (с немодифицированным геномом) ряд препаратов – Lyc-O-Mato с 6, 7, 10 и 15% ликопина и Lyc-O-Mato Powder с 0,8% ликопина. В России научно-промышленной фирмой «Инвест» разработан препарат «Томатол», получаемый из томатной пасты путем экстракции ликопина растворителями [Капитанов, Пименов, 1996]. Его предлагается использовать в качестве лечебно-профилактического средства, однако томатная паста не является стабильным и конкурентно способным источником сырья. В продажу в настоящее время поступает кристаллический ликопин из томатов, выпускаемый за рубежом фирмами, одновременно специализирующимися на выпуске β-каротина (Hoffmann La Roche и BASF), причем в последнее время немецкая фирма имеет определенные успехи в получении синтетического ликопина, хотя его стоимость выше природного из томатов, который стоит также достаточно дорого.

Высокая стоимость ликопина томатов объясняется тем, что его получение связано с сезонностью и угрозой заражения помидор *Phytophthora infestans*, способной уничтожить весь урожай томатов. Еще одним фактором, тормозящим производство, является потребность в больших площадях земли для выращивания помидор, а главное большой трудоемкостью при химической очистке, что связано с особым составом каротиноидов томатов и наличием близких к ликопину нежелательных пигментов, например, неоликопина и др.

Однако, даже в помидорах содержание ликопина не превышает 400 мг на 1 кг свежих помидор. Учитывая несомненную перспективность ликопина и его широкое использование в настоящее время пока в виде пищевых добавок, встает вопрос о получении этого каротиноида микробиологическим способом, который обеспечил бы его широкое и дешевое производство.

Наибольшее количество каротиноидов образуют грибы порядка *Mucorales*, однако в их составе при обычных условиях культивирования преобладают β-, γ- и α-каротины, но не ликопин. Потенциальными продуцентами являются грибы родов *Phycomyces* и *Blakeslea*, при этом используют спонтанные и индуцированные мутанты и некоторые штаммы, полученные в процессе автоселекции. Для *P. blakesleeanus* при получении ликопина применяют *car R* мутанты и освещение синим светом [Cerdá-Olmedo, 2001]. Однако даже в этих условиях выход ликопина у *P. blakesleeanus* слишком низкий и не соответствует экономическим требованиям, предъявляемым в биотехнологии к выходу конечного продукта. В последние годы каротиноиды и, в частности ликопин, предложено получать, используя модификации в метаболической цепи и применяя технологию рекомбинантных ДНК. Для этих целей используют ряд микроорганизмов, синтезирующих изопреноиды, но не способных образовывать каротиноиды, в том числе ликопин – *Escherichia coli*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygomonas mobilis* [Martin et al., 2003]. Например, для организации синтеза каротиноидов вводят ряд генов (*gps*, *crt* и др.), кодирующих недостающие ферменты геренилгеранилдифосфатсинтазу и фитоинсинтазу. Однако недостаток предшественников, низкий и нестандартный выход каротиноидов задерживают пока использование этих продуцентов для получения конечных продуктов в необходимых масштабах методом микробного синтеза. Поэтому в настоящее время при получении каротиноидов предпочитают пока использовать грибы рода *Blakeslea*.

До начала наших исследований промышленный биотехнологический способ получения ликопина из грибов не был разработан. Мы считали наиболее перспективным использовать для разработки биотехнологического способа получения этого каротиноида мукоровый гриб *Blakeslea trispora*, который является рекордсменом по выходу каротиноидов и способен образовывать до 3–4 г/л β-каротина. Чтобы изменить путь биосинтеза каротиноидов и получать в качестве основного продукта ликопин надо было ингибировать ферменты – циклазы, которые превращают ликопин в β-каротин. Стадию циклизации ликопина можно ингибировать изменением условий культивирования, например, нейтральная или слабощелочная среда способствует преимущественному образованию ликопина. Было известно также, что циклизацию ликопина можно ингибировать, используя замещенные амины (три-

этиламин, 2-(4-хлорфенил)триэтиламин) и азотсодержащие гетероциклы (азины). Стимулирующее действие на образование ликопина у грибов, способных к образованию β -каротина, оказывают также никотин и его производные [Ninet et al., 1969]. Указанные выше соединения стимулируют синтез ликопина не только у грибов, но и у растений и прокариот. Кроме того, особым эффектом отличается циклотел – (2-хлорэтил)-триметил аммоний хлорид. Однако указанные выше стимуляторы ликопинообразования не нашли практического применения, что объяснялось их высокой стоимостью, относительной токсигенностью и низким выходом конечного продукта

Нами предложен новый стимулятор синтеза ликопина – МАП, относящийся к азинам, который при введении его в процессе ферментации в количестве 0,005% практически полностью ингибирует процесс циклизации ликопина [Терешина с соавт., 1996]. Первоначальные исследования [Феофилова с соавт., 1998] были направлены на изучение влияния МАП на состав каротиноидов *V. trispora* и установления механизма его действия (на уровне трансляции, транскрипции и др.). Установлено, что МАП не только стимулирует синтез ликопина, но и синтез бесцветных предшественников каротиноидов – фитоина и фитофлуина, а также нейроспорина. Кроме того, МАП обладает способностью увеличивать общий уровень образуемых каротиноидов. Используя ингибиторы синтеза белка и нуклеиновых кислот – циклогексимид (ЦГ) и актиномицин D (АД), действующие соответственно на уровне трансляции и транскрипции, установлено, что введение ЦГ (50 мкг/мл) в 53-часовую культуру *V. trispora* на фоне действия МАП вызывает значительное ингибирование синтеза ликопина. Иное действие оказывает АД – наблюдается лишь незначительное ингибирование синтеза ликопина. Интересно, что ЦГ меньше подавляет образование β -каротина-каротина, чем ликопина, в то же время АД больше влияет на уровень β -каротина. Из этих данных следует, что МАП:

- действует на ликопинсинтезирующие ферменты на уровне трансляции;
- выступает как стимулятор синтеза ликопинообразующих ферментов, которые синтезируются *de novo*;
- ингибирует синтез циклаз и стимулирует образование дегидрогеназ, что приводит к интенсификации образования бесцветных предшественников каротиноидов;

Выше отмечалось, что у такого сверхсин-

тетика β -каротина как мицелиальный гриб *V. trispora* этот каротиноид образуется путем циклизации предшественника C_{40} -полиена – ликопина. Предложенный нами биотехнологический способ получения ликопина как раз и основан на введении во время ферментации ингибитора циклаз – МАП и таким образом естественный путь биосинтеза каротиноидов не доходит до конечной стадии – образования β -каротина, в результате чего в мицелии гриба происходит накопление ликопина.

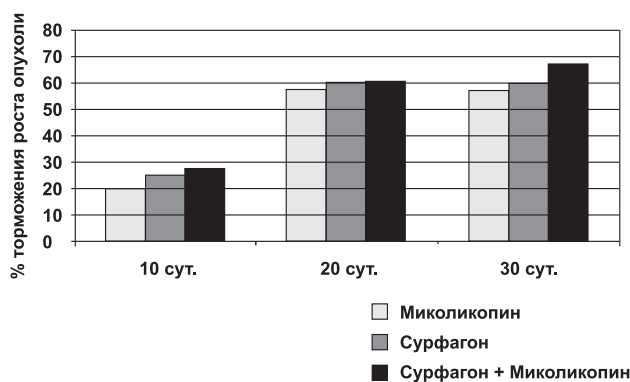
6. Получение нового лекарственного средства на основе ликопина грибов – Миколикопина и его медицинское действие

Проведенная апробация существующего метода извлечения ликопина из томатов показала, что он не подходит для мицелия *V. trispora* и поэтому нами был разработан новый способ получения ликопина [Феофилова с соавт., 1998]. Однако при дальнейшем масштабировании производства ликопина из грибов в условиях завода и определении стоимости конечного продукта оказалось, что и новый способ извлечения этого каротиноида нуждается в модификациях. Основными недостатками являются: низкая экстракция ликопина растительным маслом, значительные потери при последующей перекристаллизации, что приводит к уменьшению выхода конечного продукта. Дальнейшие исследования показали, что при таком способе извлечения происходит также потеря ряда ценных биологически активных соединений, используемых как лекарственные средства. Это – нейтральные липиды, биологическая ценность которых состоит не только в том, что они содержат в составе жирных кислот более 50% от суммы необходимой линолевой кислоты ($C_{18:2}$), но и в наличии пальмитоолеиновой кислоты ($C_{16:1}$), защищающей мембраны от стрессовых воздействий. Кроме того, в липидных глобулах мицелия *V. trispora* наряду с ликопином содержатся убихиноны и другие природные антиоксиданты.

Поэтому целесообразно было сохранить эти соединения при извлечении ликопина из биомассы мицелия и сделать способ получения ликопина более дешевым и эффективным, что и было достигнуто при создании нового лекарственного средства [Феофилова с соавт., 2001] на основе ликопина грибов, названного Миколикопином. Это новое биологически активное средство представляет собой желатиновые капсулы, содержащие суспензию 2% ликопина и указанные выше

БАВ (убихиноны, необходимые жирные кислоты и др.) в подсолнечном масле. В лаборатории по созданию нетоксичных иммуномодуляторов РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН проведены испытания, показавшие, что Миколикопин не токсичен и, кроме антиоксидантного, обладает антимуtagenным, радиопротекторным и иммуномодулирующим действием. Причем эти свойства Миколикопина выражены интенсивнее, чем у суспензии кристаллического (95%) ликопина в подсолнечном масле, например радиопротекторное действие в 2 раза выше.

Нами было проведено также изучение противоопухолевого эффекта Миколикопина на крысах самцах линии АСИ с перевитой опухолью предстательной железы, полученной из индуцированных новообразований по методике, разработанной в лаборатории экспериментальной эндокринной терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для сравнения использовали пептидный гормон, аналог люлиберина – сурфагон (суперрелизинг фактор гонадотропинов) [Буренин с соавт., 2004]. Животные были разделены на четыре группы по 10 крыс в каждой, опыт продолжался 30 сут, препараты вводились ежедневно. Крысы первой группы служили контролем и получали по 0,2 мл подсолнечного масла. Животные второй группы получали Миколикопин, начиная со второго дня после перевивки опухоли (2,5 мг/кг), крысам третьей группы вводили сурфагон в количестве 10 мкг/кг веса после перевивки опухоли, крысам четвертой группы вводили сурфагон и Миколикопин, также начиная со второго дня после перевивки опухоли.



Полученные данные представлены на рисунке и показывают что противоопухолевый эффект отмечен во всех группах по сравнению с контрольной. Торможение роста опухоли (ТРО) Миколикопином (58%) через 20 суток испытаний близко к показателю ТРО для сурфагона (60%). Наиболее высокое ТРО наблюда-

ется при совместном действии Миколикопина и сурфагона (68%). Было отмечено, что совместное введение этих препаратов обеспечивает лучшее физическое состояние крыс (гладкая шерсть, высокая активность), чем при введении одного сурфагона. Следовательно, Миколикопин по показателю ТРО представляет несомненный интерес для его использования при лечении рака простаты.

Выход ликопина при ферментации составляет 1,3–1,5 г/л. Учитывая это, а также указанные выше результаты медицинских испытаний Миколикопина и биотехнологию его получения, можно считать перспективными работы по его медицинскому применению. Полученные данные о противоопухолевом действии Миколикопина открывают новые возможности использования этого средства в комплексной терапии рака предстательной железы.

Список литературы

1. Буренин И.С., Полянская Н.И., Кузьмина З.В., Андриевский Г.В., Помогайбо С.В. Синтетические пептиды как основа для создания лекарственных препаратов нового поколения // Российский биотерапевтический журнал. 2004. Т.3. № 2. С.5.
2. Ершов В.К. Метилэритритолфосфатный (немевалонатный) путь синтеза изопреноидов // Успехи Биол. Химии. 2005. Т. 45. С. 307-354.
3. Капитанов А.Б., Пименов А.М. Каротиноиды как антиоксидантные модуляторы клеточного метаболизма // Успехи современной биологии. 1996. Т.116. В. 2. С. 32-39.
4. Колот А.Б., Вакулова Л.А., Веселов И.Я., Самохвалов Г.И. Биосинтез каротиноидов грибами // Успехи современной биологии. 1971. Т. 71. В.2. С.18-42.
5. Корман Д.Б. Противоопухолевая химиотерапия – современные возможности и перспективы // Свободные радикалы и антиоксиданты в химии и биологии. Тез. Докл. Юбилейн. Конф. Москва. Россия. 2000. С. 118-127.
6. Терешина В.М., Феофилова Е.П., Меморская А.С., Вакулова Л.А., Терентьев П.Б. Влияние азинов на образование ликопина мицелиальным грибом *Blakeslea trispora* // Прикл. Биохим. Микробиол. 1996. Т.32. № 4. С. 427-429.
7. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. Способ получения ликопина. 1998. Патент РФ № 2115678.
8. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Вакулова Л.А., Шашкина М.Я. Способ получения биологически активного средства. 2001. Патент РФ № 2166868.

9. *Феофилова Е.П.* Гетероталлизм муконовых грибов: биологическая функция и практическое использование // Прикл. Биохим. Микробиол. 2006. Т.42. № 5. С. 501-519.
10. *Шуколюков С.А., Сааков И.С.* Американский таракан *Periplaneta americana* синтезирует каротиноиды их предшественника – пиррофосфата [14С]-мевалоновой кислоты // Биохимия. 2001. Т. 66. №. 5. С. 663-669.
11. *Blasko V.A., Iturriaga E.A., Eslava A.P.* Blue light regulation of phytoene dehydrogenase (*car B*) gene expression in *Mucor circinelloides* // Planta. 2000. V. 210. P. 938-946.
12. *Bendich A.* From 1989 to 2001: What have we learned about the «biological actions of beta-carotene» // J. Nutr. 2004. V.134. P.225S – 230S.
13. *Buring J.E., Hennekens C.H.* Beta-carotene and cancer chemoprevention // J.Cell Biochem. Suppl. 1995. V.22. P. 226-230.
14. *Cerdá-Olmedo E.* Phycomyces and the biology of light and color // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. P. 503-512.
15. *Chew B.P., Park J.S.* Carotenoid action on the immune response // J. Nutr. 2004. V. 134. P. 257S-261S.
16. *Cohen J.H., Kristal A.R., Stanford J.L.* Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk // J. Natl. Cancer Inst. 2000. V. 92. N. 1. P. 61-68.
17. *Gerster H.* The potential role of lycopene for human health // J. Am. Coll. Nutr. 1997. V. 16. N. 2 P. 109-126.
18. *Giovannucci E., Clinton S. K.* Tomatoes, lycopene and prostate cancer // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1998. V. 218. N 2. P. 129-139.
19. *Hausmann A., Sandman G.* A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to β -carotene and torulene in *Neurospora crassa* // Fungal Genet. Biol. 2000. V. 30. P. 147-153.
20. *Isler O.* // In: Foreword. Carotenoids and vitamin A precursors. 1981. Ed.: Bauernfeind J.C. N.Y.: Acad. Press. 230 P.
21. *Johnson E.* Human studies on bioavailability and plasma response of lycopene // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1998. V. 218. N. 2. P. 115-120.
22. *Krubasik P., Kobayashi S., Sandmann G.* Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis decaprenoxanthin reveals of mechanisms for C50-carotenoid formation // Eur. J. Biochem. 2001. V.268. P.3702-3078.
23. *Levy J., Sharoni Y.* Use of lycopene for reducing the activity of cells, especially of cancer cells, and pharmaceutical preparations // European Patent application. N. 0600544 A1. 1993.
24. *Mayne S.T.* β - Carotene, carotenoids, and disease prevention in human // FASEB J. 1996. V.10. P.690-701.
25. *Martin V.J., Pitera D., Withers S., Neuman J., Keasling J.* Engineering of a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids // Natl. Biotechnol. 2003. V. 21. P. 756-802.
26. *Matos H. R., Di Mascio P., Medeiros M.H.G.* Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 383. N. 1. P. 56-59.
27. *Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M.* Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002 // J. Nat. Prod. 2003. V.66. P.1022-1037.
28. *Nguyen M.L., Schwartz S.J.* Lycopene: chemical and biological properties // Food Technol. 1999. V. 53. N 2. P. 38- 45.
29. *Ninet L.,Renaut J. Tissier R.* Activation of the biosynthesis of carotenoids by *Blakeslea trispora* // Biothechnol. Bioeng. 1969. V.11. N.6. P.1195-1210.
30. *Paolini M., Cantelli-Forti G., Perocco P., Pedulli G.F., Abdel-Rahman S.Z., Legator M.S.* Co-carcinogenic effect of β -carotene // Nature. 1999. V. 398. N. 6730. P. 760-761.
31. *Parker S., Tong T., Bolder S., Wings P.* Cancer studies // CA Cancer J. Clin. 1997. V. 45. P. 5-27.
32. *Pohar K.S., Gong M.C., Bahnsen R., Miler E.C., Clinton S.K.* Tomatoes, lycopene and prostate cancer: a clinician's guide for counselling those at risk for prostate cancer // World J. Urol. 2003. V. 21. P. 9-14.
33. *Rao A.V., Agarwal S.* Role of antioxidant lycopene in heart diseases // J. Am. Coll. Nutr. 2000. V. 19. N 5. P. 563-569.
34. *Rissanen T., Voutilainen S., Nyyssonen K., Lakka T., Sivenius J., Salonen R., Kaplan G., Salonen J.* Low serum lycopene concentration is associated with an excess incidence of acute coronary events and stroke: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study // Br. J. Nutr. 2001. V. 85. P. 749-754.
35. *Schurr G., Misawa N., Sandmann G.* Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora* // Biochem. J. 1996. V. 315. P. 869-874.
36. *Sies H., Stahl W.* Lycopene: antioxidant and biological effect and its bioavailability in the human // Proc. Soc. Exp. Biol. Med.. 1998. V. 218. N 2. P. 121-124.
37. *Umeno D., Tobias A.V., Arnold F.H.* Diversifying carotenoid biosynthetic pathways directed evolution // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005.V.69. N. 1. P. 51-78.
38. *Velayos A., Eslava A.P., Iturriaga E.A.* A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides* // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 5509-5519.
39. *Yokoyama A., Shizuki Y., Uoshino T., Landmann J.* Dietary carotenoids // Jap. J. Cancer Res. 1997. V. 88. N 12. C. 1121-1124.

Л.В. Коломбет

ГРИБЫ РОДА *Trichoderma* – ПРОДУЦЕНТЫ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

В конце 60-х годов прошлого столетия казалось, что появление на рынке новых, высоко эффективных пестицидов решит все проблемы, связанные с защитой растений. Тем не менее, «как гром среди ясного неба» грянула весть о том, что некоторые «суперхимикаты» становятся неэффективными, поскольку возбудители болезней, адаптируясь к ним, приобретают резистентность. Это приводило к увеличению применяемых доз пестицидов, что, в конечном счете, было бесперспективно и наносило сокрушительный удар по окружающей среде. На волне возникшего кризиса вышла книга Рэйчел Карсон «Безмолвная весна» (Carson, 1962), в которой были затронуты экологические проблемы, связанные с чрезмерным применением агрохимикатов. Начались поиски альтернативных методов защиты растений от болезней и вредителей. В этом не было особой новизны, просто, «химический период» продолжался слишком долго, что затормозило развитие новых иных подходов.

Существование выработанных природой защитных механизмов борьбы с болезнями растений привлекло внимание ученых, занимавшихся поиском альтернативных методов. Во многих случаях успешным оказалось дополнительное внесение или стимулирование аборигенных ан-

тагонистов на посевах растений или в почве. Однако, предстояло преодолеть очень длинную дистанцию от лабораторных экспериментов, до коммерческой реализации полученных продуктов.

Почвенные грибы рода *Trichoderma* уже давно привлекали внимание специалистов в качестве агентов биоконтроля в связи с их способностью подавлять развитие фитопатогенных грибов, не повреждая растений. Они очень широко распространены в природе, легко выделяются в чистую культуру и растут на искусственных питательных средах, быстро накапливая биомассу (Сидорова, 1980; Рудаков, 1981, 1986; Levis, Papavizas, 1985; Великанов, 1997).

Еще в 1932 г. Р. Вейдлинг (Weidling, 1932) обратил внимание на способность дейтеромицетов рода *Trichoderma* подавлять развитие почвенных грибов-фитопатогенов и предложил использовать их для защиты растений. Он обнаружил, что гифы *Trichoderma viride* (*Trichoderma lignorum*) окружают и лизируют гифы *Rhizoctonia solani*. Другие виды фитопатогенов (*Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Sclerotium*) также чувствительны к *T. viride*. Последующие многочисленные исследования были направлены на выяснение спектра антагонистической активности грибов рода

Trichoderma, разработке препаратов для защиты растений от болезней, а также изучению механизмов их антагонистического действия.

Грибы рода *Trichoderma* представляет собой бесполое, выделенные из почвы микромицеты. При этом почти все умеренные и тропические почвы содержат до 10^3 КОЕ/г почвы. Эти грибы также колонизируют остатки древесных и травянистых растений, на которых чаще всего находят телеоморфу (род *Hypocrea*). Тем не менее, многие штаммы, включая большинство антагонистов, не имеют стадии телеоморфы. В природных условиях бесполое формы грибов существуют в виде вегетативно размножающихся, часто гетерокариотических популяций. Им свойственен высокий уровень генетического разнообразия, кроме того, их можно использовать для наработки полезных продуктов. Они являются отличными продуцентами экстрацеллюлярных белков, и, по многочисленным данным, продуцентами целлюлолитических ферментов, разлагающих клеточную

стенку и хитин. Они также синтезируют другие полезные ферменты. Штаммы р. *Trichoderma* синтезируют более 100 различных метаболитов, обладающих антибиотической активностью. Они являются продуцентами антигрибных био-препаратов и стимуляторами роста и развития растений. Часть этих штаммов характеризуются «ризосферной конкурентоспособностью» – т.е. способностью колонизировать корни растений и расти в симбиотической ассоциации с ними.

Таксономия этих грибов в последние годы значительно видоизменена и дополнена новыми видами. За последние 60 лет более 3 тысяч публикаций посвящено представителям грибов этого рода (Wells, 1988; Tronsmo, 1995; Kubicek, Harman, 1998; Harman, Kubicek, 1998; Fungi as biocontrol agents, 2001).

Мы рассмотрим только основные аспекты изучения этих грибов, которые важны для понимания их роли как продуцентов промышленных препаратов.

Современные представления о классификации грибов рода *Trichoderma*

Более 200 лет назад в 1794 году Персон описал почвенный гриб зеленой окраски как *Trichoderma* и отнес его к *Gasteromycetes* (Persoon, 1794 – цит. по: Rifai, 1969). В 1821 г. Фриз переопределил этот род. В качестве типового им был выбран наиболее часто встречающийся вид – *T. viride*. Одна из первых попыток систематизировать грибы, имеющих зеленые споры, была сделана Саккардо (Saccardo, 1885, 1901), который привел описание 22 видов. В дальнейшем, более подробно изучили этот род Жилман и Эббот (Abbott, 1926; Gilman, Abbott, 1927), они впервые определили конкретные критерии для этого рода, сузили его объем и выделили четыре вида: *T. lignorum* (Tode) Harz, *T. koningii* Oudemans et Koning, *T. glaukum* Abbott и *T. album* Preuss.

Род *Trichoderma* имеет ряд синонимов: *Pyrenium* Tode (1790), *Pachybasium* Sacc. (1885), *Aleurisma* Link: Fr. (1809), *Sporoderma* Mont. (1856) и *Pyreniopsis* O. Kuntze (1898) (Александрова и др., 2004).

Бисби (Bisby, 1939), изучив изменчивость видов *Trichoderma*, пришел к выводу что род *Trichoderma* является монотипным, и представлен только одним сильно варьирующим видом – *T. viride*. Однако эта точка зрения сразу же была

подвергнута критике и различные исследователи выделяли от 2 до 6 групп (агрегатов) видов (Пидопличко, 1953; Шкляр, 1957; Литвинов, 1967). Одна из таких групп – *T. lignorum*. Этот вид можно считать синонимом как *T. viride*, так и *T. harzianum*. Под его описание подходит, по крайней мере, 5 современных видов этого рода (Александрова и др., 2004).

Классификация Бисби просуществовала до 1969 года, когда индонезийский миколог Рифай предпринял наиболее глубокое и обстоятельное изучение рода *Trichoderma* (Rifai, 1969). Автор выделил 9 групп, подробно описал их и составил удобный ключ для определения.

Этот автор отмечал, что только анаморфные характеристики видов не могут являться адекватным критерием для выделения видов рода. Для пяти из предложенных в его классификации видов он установил связь с известными аскомицетными видами рода *Hypocrea*. Сейчас установлено, что практически все виды рода *Trichoderma* имеют совершенную стадию, относящуюся к роду *Hypocrea* и лишь несколько близки к родам *Podostroma* и *Sarawacus* (Samuels, 1996; Adler, 1996; Becker, 1996; Rossman, 1996; Kuhls et al., 1997; Rossman et al., 1999; Dodd et al., 2002; Lu et al., 2004).

В 1984 г. Биссет предпринял очередную попытку классификации с учетом аскомицетных видов, предложив бесполое стадии некоторых аскомицетов объединить с дейтеромицетами и объединить их в 5 секций: *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Hypocreanum* (Bissett, 1984; 1991a, 1991b, 1991c, 1992).

Широкая вариабельность морфологических признаков грибов рода *Trichoderma* настоятельно требовала использования новых подходов для классификации. Начиная с 1982 года, проводятся таксономические исследования этих грибов с использованием так называемых макромолекулярных характеристик (по оценке ферментов и нуклеиновых кислот). Наиболее обширные исследования в этом направлении проводятся Гарри Самюэлс (Garry Samuels) в Лаборатории ботанической и микологической систематики в Белтсвиле (США) (Samson, 1995; Samuels, 1996; Esposito, Dasilva, 1998) и Кристианом Кубичеком (Christian P. Kubicek) в Институте химической инженерии в Вене (Австрия) (Kubicek, Harman, 1998; Lu et al., 2004).

Оказалось, что анализ ДНК можно использовать для идентификации некоторых видов из родов *Trichoderma* и *Gliocladium* (Zimand et al., 1994; Vulat et al., 1998). Это важно для контроля штаммов-продуцентов биопрепаратов на основе грибов этих родов. Поскольку основой препаратов, как правило, являются живые культуры, при попадании в природу (почву) становится возможным проследить их судьбу.

В целом, ученые сходятся во мнении, что, для идентификации видов рода *Trichoderma* необходимо изучение не только морфологических особенностей изолятов, но и использование современные молекулярные методы (Samuels, 1996; Samuels et al., 1999; Kuhls et al., 1999; Dodd et al., 2000; 2002).

Итак, классическая таксономия грибов рода *Trichoderma*, основываясь на различиях в морфологии, органах бесполой споруляции разделяла род на 9 видов. По результатам молекулярно-генетических исследований род *Trichoderma* разделяется, по крайней мере, на несколько десятков видов (до 100 видов, по личному сообщению Дружининой И.). Обзор состояния с таксономией и ключ для определения видов рода *Trichoderma* представлен в обзоре А.В. Александровой с соавторами (Александрова, 2003, Александрова и др., 2004).

Наиболее часто в качестве штаммов-продуцентов биопрепаратов выступают изоляты под названием *Trichoderma virens* (Miller et al.) Arx, *T. harzianum* Rifai и *T. viride* Pers.: Fr. (Hermosa et

al., 2001). Однако в последнем десятилетии прошлого века стали появляться публикации о гетерогенности представителей этих видов. В конце концов из вида *T. viride* в 1999 году отделили вид *T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt et Nirenberg (Samuels et al., 1999; Lieckfeldt et al., 1999).

Молекулярно-генетическое изучение (сопоставление последовательностей ITS1 области гДНК и фрагментов фактора 1 элонгации трансляции (*tef1*)) 69 биактивных изолятов грибов рода *Trichoderma* из разных коллекций и географических зон показало, что больше половины антигрибных штаммов группируются в секцию *Pachybasium*, из них 81% – в кластер *T. harzianum* + *T. inhamatum* и 16% – *T. virens*. В секции *Trichoderma*, которая включает 36% из 69 изученных штаммов, 56% сгруппированы с *T. asperellum* и 24% – с *T. viride*, *T. atroviride* или *T. koningii*. Только 10% изученных штаммов относятся к секции *Longibrachiatum* (Hermosa et al., 2001; 2004). Ряд продуцентов биопрепаратов, с которыми работали длительное время, переопределены и являются другими видами. Так, например, штамм P1 *T. harzianum* был переопределен как вид *T. atroviride* P. Karst (Bolar et al., 2001), штамм *Gliocladium virens* по современной классификации является *T. virens*, а штамм E-203 *T. harzianum* переопределен как *T. asperellum* (Shoresh et al., 2005).

Большинство штаммов рода *Trichoderma* размножаются преимущественно бесполом путем. При отсутствии мейоза, хромосомная пластичность становится нормой, и различные штаммы имеют различное число и размеры хромосом. Большинство клеток мицелия многоядерны (Toyama, Toyama, 1995; Gomez et al., 1997). Различные неполовые генетические процессы, как, например, парасексуальная рекомбинация, мутации и другие процессы содействуют изменению количества ядер в одном организме гриба (Antal et al., 2002). Таким образом, гриб очень адаптабилен и активно эволюционирует.

Вследствие такой высокой вариабельности *Trichoderma*, контроль генетического дрейфа в штаммах-продуцентах биопрепаратов – важный момент в создании качественных биопрепаратов на основе природных изолятов. Чтобы была обеспечена стабильная эффективность препаратов, используемые в качестве продуцентов изоляты должны быть гомокариотическими, т. е. содержать ядра полностью генетически аналогичные или идентичные. К сожалению, это обстоятельство редко учитывается при разработке новых биопрепаратов на основе грибов р. *Trichoderma*.

Биологические особенности грибов р. *Trichoderma*, обеспечивающие их активность в качестве продуцентов биопрепаратов

Биологические особенности грибов р. *Trichoderma*, обеспечивающие их активность в качестве продуцентов биопрепаратов

Многочисленными исследованиями показано, что грибы рода *Trichoderma* проявляют активность в отношении широкого круга фитопатогенных грибов. *T. harzianum* и *T. virens* (обычно под именем *Gliocladium virens*) – виды, которые чаще всего упоминаются в связи с биологической защитой (Papavizas, 1985; Chet, 1987; Штейнберг, Завелишко, 1988; Smith et al., 1990). Гриб *T. harzianum*, сам по себе, либо в комбинации с другими видами рода *Trichoderma*, или с химическими адъювантами, использовался в защите растений от различных болезней. Некоторые из них: увядание редиса (возбудитель – *Nectria haematococca* Berk. et Broome) (Lifshiz et al., 1985), кукурузы и соевых бобов (Kommedal et al., 1981; Бекмаханова и др., 1989), серая гниль томатов (*Botrytis cinerea* Pers.) (Migheli et al., 1994), винограда, клубники и яблони (Elad et al., 1994; Tronsmo, Hjeljord, 1995; Harman et al., 1995); гниль, хранящихся яблок, вызываемая грибами рода *Colletotrichum* (Tronsmo, Hjeljord, 1995); гниль огурцов, вызываемая *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (*Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk*) (Lewis, Papavizas, 1980; Симочкина и др., 1988; Lewis, Lumsden, 2001); гнили моркови (*Mycocentrospora acerina* (Hartig) Deighton; *Rhizoctonia carotae* Rader; *Botrytis cinerea* Pers.) (Tronsmo, 1989); гнили гороха *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Knudsen, Eschen, 1991) и *Colletotrichum truncatum* Schw. (Andrusset Moore) (Bancole, Adebajo, 1996), салата-латука – *Sclerotinia minor* Jagger (Vannacci et al., 1991) и *S. sclerotiorum* (Gepp et al., 2003); а также синдром вилта чечевицы и нута, преимущественно вызываемый *Sclerotium rolfii* Sacc. (*Athelia rolfii* (Curzi) C.C. Tu et Kimbr.), *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk) и *Fusarium oxysporum* Sheld. (Mukhopadhyay, 1995, Mukherjee and Radhu, 1997a).

*) – Обозначение видов по тексту соответствует оригинальному написанию в цитированной литературе, в скобках дано современное название в соответствии с CABI Bioscience Database: <http://indexfungorum.org>.

Показано, что некоторые виды рода *Trichoderma* способны вызывать деградацию зрелых склероциев *Botrytis*, *Sclerotium* и др., а также ингибировать их формирование (Roulston, Lane, 1988; Woo et al., 1999). Найдены штаммы *Trichoderma*, которые при внесении в почву вызывали 82% разрушение склероциев *S. minor*, поражающего посевы ромашки (*Pyrethrum*) в Тасмании (Австралия) (Metcalf et al., 2003). Штаммы L4 и S17A *T. viride* активно разрушают склероциев патогена, вызывающего гниль лука – *Sclerotium cepivorum* Berk. (Clarkson et al., 2003). Изоляты Tm-4 *T. hamatum* и Tv-1 *T. viride* (биомасса в виде конидий) в условиях теплицы снижали жизнеспособность склероциев возбудителя южной склероциальной гнили овощной фасоли *Sclerotium rolfii* (*Athelia rolfii*) (Hoynes et al., 1999). Способность грибов рода *Trichoderma* паразитировать на склероциях используется как основной механизм биологического контроля *S. rolfii* (*Athelia rolfii*) и *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*) (Mukherjee et al., 1995).

В Бразилии в условиях защищенного грунта успешно испытаны грибы рода *Trichoderma* против питиозной гнили табака (возб. *Pythium aphanidermatum* (Efsen) Fitzp.) (Mukhopadhyay et al., 1986; Jackisch-Matsuura, Menezes, 1999).

Испанские исследователи продемонстрировали способность *T. harzianum* подавлять развитие возбудителя фитофтороза (*Phytophthora capsici* Leonian), поражающего корни перца стручкового (*Capsicum annuum* L.) (Sid Ahmed et al., 1999). На сладком перце предпосевная обработка семян суспензией спор (4 г/т семян) как *T. harzianum* так и *T. viride* снижали угнетение роста рассады перца, вызванное грибами рода *Pythium* (Sharma et al., 2003).

Гриб *T. harzianum* показал высокую эффективность при защите капусты, томатов, перца, баклажан от черной ножки, корневых гнилей и пятнистости листьев (Буймистру и др., 1986; Monaco, 1990; Dik et al., 1999; Илларионова, 2002; Stevaert et al., 2003); значительно снижал численность *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (G.F. Atk.) W.C. Snyder et H.N. Hansen и *Fusarium oxysporum* f. *melonis* W.C. Snyder et H.N. Hansen в ризосфере дыни и хлопчатника (Sivan, Chet, 1989); а также *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* W.C. Snyder et

H.N. Hansen (Zhang et al., 2004); подавлял питиозную гниль семян и выпревание проростков гороха (Nelson et al., 1988). Предпосевная обработка семян гороха конидиями штамма 41 *T. koningii* и штамма 3 *T. viride* не только увеличила полевою всхожесть семян, но и снизила их поражение *Ascochyta pisi* Lib., *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris*), *Pythium irregulare* Buisman, *Fusarium* spp. Оказалось, что, грибы рода *Trichoderma* способны надежно защищать от почвенных фитопатогенов не только семена, но и растения гороха на протяжении всего вегетационного периода (Pieta et al., 1998a). Штаммы 51 *T. koningii* и 21 *T. viride* эффективно защищали сою от почвенных фитопатогенных грибов, возбудителей болезней корней и корневой шейки (*R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*), *P. irregulare*, *Botrytis cinerea*, *Phoma exigua* Sacc. и *Fusarium* spp.). Защитный эффект в полевых условиях наблюдали не только на стадии всходов, но и в течение всей вегетации растений (Pieta et al., 1998b). Исследователи отмечают высокую эффективность антагонистов рода *Trichoderma*, в частности *T. viride*, в закрытом грунте против *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*), *Botryosporium diffusum* (Grev.) Corda, *Sclerotinia sclerotiorum*, *F. solani* (Mart.) Sacc. (*Nectria haematococca*), паразитирующих на томатах и огурцах (Сычев, Шапошник, 1982; Симочкина и др., 1988; Твердюков, 1998).

Грибы рода *Trichoderma* применяются для защиты ячменя и пшеницы от корневых гнилей, вызываемых *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (*Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur), *Fusarium oxysporum*, *F. solani* (*Nectria haematococca*) и др. (Chet, Henis, 1983; Patil et al., 1987; Ермекова, 1988; Раац, 1988; Кривошекова, Мищенко, 1990; Коломникова и др., 1995; Лихачев и Буров, 1999), а также от фузариоза колоса (Новикова и др., 1994). *T. hamatum* и *T. koningii* контролировали развитие возбудителя выпревания зерновых культур *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* J. Walker и уменьшали полегание пшеницы и райграса на полях Западной Австралии (Dewan, Sivasithamparam, 1988; Dunlop et al., 1989).

Гриб *T. lignorum* Harz. предложен для борьбы с вертициллезом хлопчатника (Тешабаева, 1981; Хакимов, 1981; Марупов, 1981; Пантелеев, Багирова, 1988), а также при укоренении черенков розы (Понировский, Стрижак, 1982) и винограда (Messina, 2000). *T. harzianum* может быть применен в качестве антигрибного препарата против эутипного (*Eutyplata*) засыхания винограда (John et al., 2003).

Канадскими исследователями показано, что осенние обработки листьев яблони препаратом гриба-антагониста *Trichoderma* sp. снижают продуцирование аскоспор возбудителем парши *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter в весенний период (Carisse, 2000). Изолят FA 1132 *T. harzianum* проявил высокую активность против *Ganoderma boninense*, вызывающей гниль стволов масличной пальмы (*Elaeis guineensis*) (Abdullah, Ilias, 2004).

Как следует из выше перечисленных примеров, штаммы грибов рода *Trichoderma* проявляют свою активность главным образом против грибных возбудителей болезней. Тем не менее, имеются примеры активности этого гриба и против бактериальных фитопатогенов (Utkhede, Koch, 2004), а также и против паразитических нематод (Spiegel, Chet, 1998).

Кроме паразитизма на грибном мицелии *Trichoderma* может атаковать ризоморфы, склероции и плодовые тела грибов. Еще в 1951 году Блисс изучал особенности взаимодействия грибов рода *Trichoderma* и ризоморф *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. в естественной и стерильной почвах (Bliss, 1951). Он показал, что потеря почвой фунгистазиса может привести к увеличению популяции и агрессивности гриба *Trichoderma*. Так, способность грибов рода *Trichoderma* поражать плодовые тела таких грибов, как шампиньоны, шиш-таке и вешенка причиняет ущерб при коммерческом выращивании грибов (Tokimoto, 1982; Muthumeenakshi et al., 1994; Morris et al., 1995a,b; Seaby, 1996; Wuest et al., 1996; Castle et al., 1998; Williams et al., 2003). Однако это обстоятельство не должно смущать разработчиков биопрепаратов, т.к. изоляты патогенных грибов рода *Trichoderma* первоначально отнесенные к *T. harzianum* (биотипы Th4 и Th2), на самом деле являются новыми видами *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* Samuels, W. Gams et O. Petrini и *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* Samuels, W. Gams et O. Petrini, отличающимися как от *T. harzianum* так и от *T. atroviride* (Samuels et al., 2002).

В то же время, существует широкая вариабельность антигрибной активности у изолятов *Trichoderma*, даже относящихся к одному и тому же виду. Кроме того, интенсивность процесса ингибирования патогенов зависит от условий среды, в которой происходит взаимодействие фитопатогена и его антагониста (Sid Ahmed et al., 1999). Важную роль при этом играют температура, кислотность и тип почвы, сорт и даже линия растения (Whipps, 1987; Mukherjee, Radhu, 1997b; Cliquet, Scheffer, 1997; Bae, Knudsen, 2005).

Считается, что биологическая активность изолятов *Trichoderma* проявляется как антагонизм: за счет выделения метаболитов (антибиотиков), конкуренции за источники питания и как микопаразитизм: за счет паразитизма на возбудителях болезней растений (Dennis, Webster 1971a,b,c; Tronsmo, 1986; Whipps, 2001; Howell, 2003). Причем даже у одного штамма можно встретить все возможные механизмы (Лернер, 1977; Сейкетов, 1982; Тулемисова, Успанов, 1986; Kenerley, Andrews, 1989; Sivan, Chet, 1989a; Lorito et al., 1994, 1996; Benhamou, Chet, 1996; Green et al., 1999). Предполагается также, что антагонистическая активность может быть обусловлена способностью штаммов *Trichoderma* придавать растениям устойчивость к стрессам посредством влияния на развитие корневой системы, за счет растворения и разложения субстратов до доступных питательных веществ, а также путем инактивации ферментов патогенов (Harman, 2000).

Конкуренция за питание и пространство возникает, когда два (или более) микроорганизма одновременно претендуют на один и тот же ресурс (Paulitz, 1990; Elad, 1996; Howell, 2002). Конкуренция между биоагентом и патогеном может обеспечить сдерживание заболевания. Кроме того, существует недостаточно изученная конкуренция между антагонистом и аборигенной эпифитной микрофлорой (в ризосфере и филлоплане). Наиболее важными ресурсами конкуренции являются углерод, азот, железо, витамины и кислород.

Показано, что при использовании *T. viride* против *Chondrostereum purpureum* (Pers.) Pouzar (возбудитель посеребрения листьев сливы) главным механизмом контроля является конкуренция за источники питания (Corke, Hunter, 1979; Corke, Rishbeth, 1981). Антагонистическое взаимодействие гриба *T. harzianum* T-35 с грибом *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* и *F. oxysporum* f. *melonis* также идет по конкурентному пути (Silvan, Chet, 1989b).

Микопаразитизм или гиперпаразитизм – термины, описывающие феномен использования ресурсов одного гриба другим в паразитических целях.

Считается, что именно по этому типу идет взаимодействие между грибами р. *Trichoderma* и фитопатогенами из родов *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Armillaria*, *Colletotrichum*, *Verticillium*, *Venturia*, *Endothia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Diaporthe* и *Fusicladium* (Dennis, Webster, 1971c; Wells, 1988).

Использование сканирующего электронного микроскопа и флюоресцентных красителей позволило значительно продвинуться в понимании процесса паразитизма (Elad et al., 1983a). После контакта *Trichoderma* spp. с *R. solani* и *S. rolfsii* на поверхности гиф фитопатогенов ясно видны отверстия в клеточной стенке, лизис которой произошел в месте контакта с мицелием *Trichoderma*.

Добавление циклогексимида – ингибитора синтеза белков, снижает активность ферментов и защищает гифы патогена от разрушения. Было показано также, что в местах соприкосновения гиф патогена и *Trichoderma* увеличивается активность секретируемой β -1,3-глюканазы.

По современным представлениям процесс микопаразитизма разделяют на четыре основные стадии (Chet, 1990; Herrera-Estrella, Chet, 1998).

Первая стадия заключается в том, что фитопатоген привлекает к себе микопаразита посредством индукции химических стимулов, и называется стадией хемотрофного роста (Chet et al., 1981). Во время первой стадии микопаразит начинает атипичически разветвлять свои гифы, которые растут в направлении патогенного гриба.

Вторая стадия – распознавание. На этой стадии происходит образование тонкого экстрацеллюлярного фибриллярного материала, связывающего гифы паразита с гифами хозяина (Elad et al., 1987; Inbar, Chet, 1995). Факторы, контролируемые узнавание и связывание между грибом-хозяином и паразитом все еще не выяснены. Этот процесс может включать гидрофобные взаимодействия или взаимодействия между комплементарными молекулами (такими как лектины и карбогидраты), присутствующими на поверхности, как хозяина, так и микопаразита. В случае *Trichoderma* имеются свидетельства о выработке лектина как паразитом, так и хозяином. Показано, что мицелий *T. harzianum* атаковал нейлоновые волокна, покрытые растительным пектином (конкавалином А) или лектином, полученным из клеточной стенки *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*) (Elad et al., 1983a; Elad et al., 1983a; Barak et al., 1985; Inbar, Chet, 1992, 1994).

Мало известно о сигнальных путях, следующих за узнаванием хозяина. Тем не менее, предварительные исследования с *T. atroviride* показывают, что в этом процессе могут участвовать гетеротримерные G белки и cAMP (Omero et al., 1999; Rocha-Ramirez et al., 2002; Zeilinger et al., 2005).

Чет с сотрудниками ввели конфронтационный анализ (анализ «встречных» культур в чашках Петри) для изучения регуляции синтеза хи-

тинолитических ферментов при взаимодействии *Trichoderma* – гриб-хозяин (Chet, Inbar, 1995; Haran et al., 1996a; Chet et al., 1998a). Набор хитиназ также как и других ферментов, разлагающих клеточную стенку, различается между видами и штаммами (Lorito, 1998), а хитиназы по-разному экспрессируются в процессе микопаразитизма (Haran et al., 1996b; Mach et al., 1999; Viterbo et al., 2002). В своей пионерской работе Inbar, Chet (1992) показали, что образование этих ферментов у *T. harzianum* обусловлено физическим взаимодействием патогена и гиперпаразита при участии молекул лектина. Затем было показано, что изначально N-ацетилглюкозаминидаза (ХИТ102) *T. harzianum* Т-У индуцируется после контакта с лектином *Sclerotium rolfsii*, но через 12 часов после контакта ее активность исчезает, в то время как активность другой N-ацетилглюкозаминидазы возрастает (Haran et al., 1996b). Предположили, что ХИТ102 ответственен за инициацию инфекции и индукцию других хитиназ. Наоборот, у *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris*) в качестве хозяина, ХИТ102 стимулировалась после контакта тремя эндохитиназами в течение 12 часов, после чего активность ХИТ102 снизилась, а активность эндохитиназ возросла.

В случае *T. atroviride* P1 экспрессия гена эндохитиназы ech42 наблюдалась до контакта со штаммом *R. solani* (*T. cucumeris*), в то время как экспрессия гена N-ацетилгексоаминидазы nag1 не менялась до окончания контакта (Zeilinger et al., 1999; Kulling et al., 2000). При проверке взаимодействия *T. atroviride* P1 с *B. cinerea*, было обнаружено, что транскрипция гена ech42 начинается только через 24 ч после контакта грибов (Geremia et al., 1993). Механизм антагонистического взаимодействия *T. atroviride* P1 и *B. cinerea* зависит не только от синтеза фермента, разлагающего клеточную стенку. При микопаразитизме экспрессия ech42 вызывается, вероятно, продуктами деградации клеточной стенки фитопатогена, образование которых не требует контакта между *Trichoderma* и *R. solani* (*T. cucumeris*) (Zeilinger et al., 1999).

Итак, считается, что продукты разложения клеточной стенки действуют как стимуляторы хитиназ в системе гиперпаразит – патоген. Исследования последних лет согласуются с моделью, по которой диффузия макромолекул *Trichoderma* освобождает низкомолекулярный индуктор экспрессии ech42 при атаке *Rhizoctonia* (Kullnig et al., 2000; Woo et al., 2003). Вероятно, эта макромолекула является хитиназой, поскольку ее действие ингибируется аллосамидином (Zeilinger et al., 1999). Аналогичные результаты

были получены австралийскими учеными, изучившими действие *T. koningii* (штамм Tr5) на возбудителя белой гнили лука – *Sclerotium cepivorum* (Metcalf et al., 2001). При обработке корней лука, инфицированных *S. cepivorum* штаммом Tr5, даже без контакта гиф двух грибов начинается лизис и разрушение мицелия патогена. При этом обнаруживаются только одна эндо- и одна экзохитиназа *T. koningii*, в то время как при росте на хитине крабов у этого штамма определяются по два экзо- и эндо-фермента.

С другой стороны, данные исследований, включающие комбинации очищенных ферментов, разлагающих клеточную стенку и антибиотиков из видов *Trichoderma*, также поддерживают точку зрения о дистанционном воздействии метаболитов *Trichoderma* на фитопатогены (Schirmbock et al., 1994, Lorito et al., 1998).

Третья стадия – прикрепление паразита к патогену. Гифы *Trichoderma* могут прикрепляться к патогену двумя способами: 1) её гифы растут рядом с гифами гриба-хозяина; 2) её гифы обвивают гифы гриба-хозяина, образуя аппрессории (Dennis, Webster, 1971c; Tronsmo, Dennis, 1978; Harman et al., 1981; Tu, Vaartja, 1981; Elad et al., 1983b; Ikotun, Adekunle, 1990; Inbar et al., 1996).

Последняя (четвертая) стадия – разложение клеточной стенки хозяина путем синтеза гиперпаразитом литических ферментов: β -1,3-глюканазы, хитиназ, целлюлаз и протеаз, которые способны разлагать основные полимеры, входящие в состав клеточной стенки хозяина, что способствует поглощению питательных веществ микопаразитом (De La Cruz et al., 1992; Viterbo et al., 2002; Маркович, Кононова, 2003).

Комбинированная активность всех веществ, продуцируемых триходермой, приводит к паразитизму в отношении гриба-мишени (патогена) и растворению его клеточной стенки. При этом гриб-гиперпаразит пробурывает отверстия на гифах и аппрессориях патогена, и его гифы проникают внутрь гриба-мишени (патогена). После отделения гиф гиперпаразита от фитопатогена на поверхности гиф последнего обнаружены лизированные участки и проникающие отверстия (Elad et al., 1983b; Ridout et al., 1988). Контроль *R. solani* (*T. cucumeris*) и *Pythium ultimum* Тrow грибами *Trichoderma*, включая *T. harzianum*, может происходить посредством прямого проникновения гиф (Dennis, Webster, 1971c; Benhamou, Chet, 1993).

Известно, по меньшей мере, 20–30 генов белков и других метаболитов, которые непосредственно участвуют в микопаразитизме, что

типично для сложных систем, каковым является это взаимодействие двух грибов.

При изучении с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии механизмов ингибирования *Cercospora beticola* Sacc. (циркоспорозная пятнистость сахарной свеклы) различными штаммами *Trichoderma* (*T. aureoviride*, *T. harzianum* и *T. virens*) показано, что в присутствии *T. virens* концы гиф фитопатогенов вздувались и происходило разрушение их апикальных везикулярных кластеров. Если *T. aureoviride* вызывал разрыв концов гиф и высвобождение цитоплазматического материала, то в случае *T. harzianum* не обнаружено значительных изменений у патогена (Caesar-TonThut, Lartay, 2003).

Последний пример подтверждает, что описанные выше стадии процесса микопаразитизма могут проявляться не всегда, однако ключевым моментом является питание микопаразита на грибе-хозяине (Peterbauer et al., 1996; Vázquez-Garcidueñas et al., 1998).

В 90-х годах XX века обнаружено явление, связанное с паразитизмом *T. harzianum* – образование гифальных колец в зоне взаимодействия с патогеном. Роль этих колец в жизненном цикле гриба *T. harzianum* не установлена, однако поскольку формирование этих структур в отсутствие хозяина не происходит, авторы предположили, что они связаны с микопаразитизмом (Elad et al., 1987).

Важная деталь часто упускается из виду в связи с микопаразитизмом. Микопаразит может также поражать полезные грибы, например, формирующие микоризу. Показано, что штамм T-203 *T. asperellum* атакует мицелий микоризного гриба *Glomus intraradices* N.C. Schenck et G.S. Sm. в аксеничной системе *in vitro*. Тем не менее, в почвенных системах гриб *G. intraradices* не только не поражался в присутствии *T. asperellum* T-203, а даже подавлял рост другого представителя этого рода – *T. harzianum*. Авторы считают, что это происходило вследствие конкуренции за пищевые ресурсы (Green et al., 1999). С другой стороны, в системе *in vitro* продукты гидролиза, полученные из мицелия *G. intraradices*, стимулировали созревание конидий у *T. asperellum*, но не у патогена *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* G. M. et J. K. Armstrong et Littrell. Несомненно, эти результаты можно объяснить использованием разными группами исследователей различных изолятов грибов и примененных нестандартных методических подходов, однако они отчетливо демонстрируют сложность взаимодействий, происходящих в ризосфере.

Процессы, характерные для *Trichoderma*, наблюдаются и у других грибов-микопаразитов, например, при паразитизме *Pythium oligandrum* Drechsler на *Phytophthora parasitica* Dastur (*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan) (Picard et al., 2000).

Антагонизм грибов р. *Trichoderma*

Dennis, Webster (1971a,в) впервые описали антибиотическую активность у грибов рода *Trichoderma*, связанную с антагонистической функцией. Они показали, что грибы рода *Trichoderma* синтезируют стабильные и нестабильные антибиотические компоненты, способные ингибировать мицелиальный рост различных грибов. При этом, синтез антигрибных метаболитов варьирует у разных изолятов, даже относящихся к одному и тому же виду. Антибиотические вещества были обнаружены и идентифицированы у различных видов грибов рода *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei* и *T. viride* (Ghisalberti, Sivasithamparam, 1991a; Sivasithamparam, Ghisalberti, 1998). Многочисленные публикации по этой теме систематизированы в таблице 1.

Антибиотические вещества грибов *Trichoderma*, подавляющие фитопатогены, выделяются во внешнюю среду. Это свойство используется для отбора *in vitro* перспективных штаммов-продуцентов биопрепаратов (Тарунина, 1982; Patil et al., 1987; Al-Heeti, Sinclair, 1988; Vanachter et al., 1988; Шемшур, 1991; Великанов и др., 1994).

Взаимосвязь между гиперпаразитической и антибиотической активностью активно изучается, однако однозначный ответ пока не получен (Antal et al., 2000).

При антагонизме *T. harzianum* и *Botritis cinerea*, например, изучали молекулярные основы синергизма между β -1,3-глюканазами, хитиназами и протеазами, участвующими в гидролизе клеточной стенки, и пептидными антибиотика-

Таблица 1
Биологически активные вещества, синтезируемые грибами рода *Trichoderma*

Тип антибиотических метаболитов	Соединение	Ссылка
Поликетиды	6ПП (6-пентил- α -пирон)	Collins, Halim, 1972 Sperry, et al., 1998 Dodd et al., 2000
Производные метаболизма амонокислот (изонитрил)	Дермадин (активный против грам+ и грам- бактерий) Триховиридин	Pyke, Dietz, 1966 Okuda et al., 1982 Yamano et al., 1970
Пептиды (пептаиболы: трихополиин и др., циклоспорины)	Аламетицины Сузукациллин (антибактериальная активность) Трихоспорин В-V Триховирины	Meyer, Reusser, 1967 Reusser, 1967 Fox, Richards, 1982 Гаузе и др., 1983 Ooka, T. et al., 1966 Iida A et al., 1990 Brückner, Koza, 2003
Терпеноиды (трихотецины: триходермол, диацетоксисцирпенол, Т-2 токсин)	Трихотоксины (A_{40} , A_{50}) (токсичен для млекопитающих) Trichodermin	Godfredsen, Vangedal, 1965 Brückner et al., 1985 Jtoh et al., 1980
	глиотоксин и глиовирин	Webster, Lomas, 1964 Howell, Stipanovic, 1995
	Альфа-пироны	Ghisalberti et al., 1990 Keszler et al., 2000

ми, пептаиболами (Schirmbock et al., 1994). Оказалось, что пептаиболы (трихорзианин А и В) *in vitro* ингибируют активность синтетазы β -глюкана, выделенной из плазматических мембран *B. cinerea*. Это ингибирование является обратимым при добавлении фосфатидилхолина. Синтез β -глюкана *in vivo*, анализируемый по включению [2-3H]-глюкозы в матрикс клеточной стенки, также ингибируется в присутствии пептаиболов, причем ингибирование усиливается при добавлении β -1,3-глюканазы *T. harzianum*. Этот синергизм авторы объясняют ингибированием мембраносвязанной синтетазы β -1,3-глюкана хозяина пептаиболами, которые подавляют синтез β -глюкана клеточной стенки, поддерживают разрушающее действие β -глюканаз и все вместе усиливают фунгицидную активность.

Очищенные хитобиогидролаза и эндохитиназа, как и очищенные β -1,3-глюканаза и трихорзианины А1 и В1 ингибируют прорастание спор и рост мицелия при более высоких концентрациях по сравнению с наблюдаемыми в культуральных жидкостях. При тестировании смеси ферментов и антибиотиков наблюдается синергическое действие, при этом концентрация и ферментов, и антибиотиков, вызывающая 50%-ное ингибирование,

находятся в том же интервале, что и наблюдаемые в супернатантах культуры. Поэтому параллельное образование и синергизм гидролитических ферментов и антибиотиков играют важную роль в антагонистическом действии *T. harzianum* на фитопатогенные грибы (Schirmbock et al., 1994).

Образование летучих антибиотиков грибами рода *Trichoderma* и спектр их действия подробно характеризуется в работах В.И. Билай (1961а, 1961б, 1977) и Г.Ш. Сейкетова (1982). Активными компонентами летучих выделений являются ацетальдегид, этанол, ацетон, лактон, этилен, терпеновые производные и иногда производные апирона (Zerra et al., 1990; Faull, Scarseletti, 1994). Есть мнение, что летучие антибиотики играют роль в подавлении фитопатогенов, когда прямые контакты мицелия отсутствуют (Nelson, Powelson, 1988; Ghisalberti, Rowland, 1993). Так, летучие фракции *T. hamatum* были предложены в качестве способа биологической защиты ломкой фасоли от *Botrytis cinerea* и для подавления *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et D.L. Oliver – возбудителя выпревания зерновых культур.

Однако, несмотря на способность многих антагонистов (в том числе и грибов рода *Trichoderma*) к наработке антибиотиков или ток-

синов, имеется лишь ограниченные примеры использования таких метаболитов в качестве био-препаратов против фитопатогенов (Paravizas, Lumsden, 1980).

Интересные результаты получены недавно швейцарскими учеными при разработке способов борьбы с заболеваниями виноградной лозы (Christen et al., 2003). Эутипное отмирание (возбудитель – *Eutypa lata* (Pers.) Tul. et C. Tul.) и эска (возбудители – *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. et Mugnai) Crous et W. Gams, *Fomitiporia punctata* (Fr.) Murrill или *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.) – основные заболевания ствола винограда, характеризующиеся его медленным засыханием, ведущим к гибели всего растения. Эти фитопатогены синтезируют несколько токсинов (среди которых эутипин, D-3-фениллактоновая кислота, 4-гидроксибензальдегид), вызывающих некроз древесины. В результате скрининга выявлены штаммы *Trichoderma*, способные разрушать токсины возбудителей болезней виноградной лозы. Так, штамм *Trichoderma album* Preuss разлагал эутипин до нетоксичного спирта эутипинола. Штамм *T. atroviride* разрушал все тестируемые токсины, другой штамм *Trichoderma* разрушал все токсины за исключением D-3-фенилмолочной кислоты (Christen et al., 2003).

Не исключено, что микробная деградация токсинов фитопатогенов может стать новым эффективным способом биологической борьбы с заболеваниями растений

Значительная группа биологически активных веществ, образуемых видами рода *Trichoderma*, находит применение также и в медицине. Зарагозовая кислота и вирудиофунгин являются сильными ингибиторами фермента ФТП-азы (farnesyl-protein-transferase), и могут выступить в качестве потенциальных противораковых лекарств, а также как вещества, снижающие уровень холестерина в крови (Huang et al., 1995; Егоров и др., 1999). Циклоспорины (циклические ундекопептиды, получаемые из *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai – антибиотики, подавляющие иммунитет, используются в медицине при трансплантации органов и лечении аутоиммунных заболеваний (Гаузе и др., 1983).

Согласно Кулса с соавторами (Kuhls et al., 1995) штамм *Trichoderma* 'todica' Sokoloff et Toda (nom. inval.) продуцирует противовирусный антибиотик. Есть сообщение о том, что пептидные антибиотики *Trichoderma harzianum* ES39 способны ингибировать подвижность сперматозоидов кабанов (Peltola et al., 2004).

Обобщая информацию относительно антибиотических свойств грибов рода *Trichoderma* можно заключить, что эти микромицеты синтезируют ряд активных метаболитов, которые могут рассматриваться как перспективные препараты для растениеводства, а также для медицины и ветеринарии.

Поскольку клеточные стенки многих фитопатогенных грибов содержат хитин и/или фибриллы β-глюкана, погруженные в белковый матрикс (Chet et al., 1967), при паразитизме в лизисе их гиф участвуют хитиназы, β-глюканазы и протеазы (Chet, Baker, 1981; Wessels, 1986; Viterbo et al., 2002). Образование этих ферментов наблюдается при паразитическом взаимодействии видов *Trichoderma* и некоторых фитопатогенных грибов (Haran et al., 1996), а также в условиях имитации микопаразитизма, при которых *Trichoderma* выращивается в среде, содержащей стерильные мицелии или клеточные стенки патогенных грибов (De La Cruz et al., 1993, Geremia et al., 1993, Carsolio et al., 1994). Как правило, чем выше гидролитическая активность штаммов *Trichoderma* в отношении клеточных стенок фитопатогенных грибов, тем выше степень подавления роста патогена (Paravizas, 1985).

Изучению ферментов, обеспечивающих гиперпаразитическую активность *Trichoderma*, генов, их кодирующих, и генов-регуляторов активности, посвящены многочисленные исследования, обобщенные в ряде недавних обзоров (Lorito et al., 2001; Viterbo et al., 2002; Маркович, Кононова, 2003). Данные, представленные в таблице 2 дают представление об основных литических ферментах, грибов рода *Trichoderma*, и генах, их кодирующих.

Обширные исследования посвящены изучению хитинолитических ферментов. Это экзо- и эндохитиназы и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (Sahai, Manocha, 1993, Haran et al., 1996a; Lorito et al., 1994, 1996, 1998).

Хитинолитическая система *T. harzianum* состоит из 5–7 различных ферментов в зависимости от штамма (Haran et al., 1996a). В хорошо охарактеризованном штамме *T. harzianum* TM обнаружены две β-(1,4)-N-ацетил-глюкозаминидазы (102 и 73 кДа), четыре эндохитиназы (52, 42, 33 и 31 кДа) (Haran et al., 1995, 1996a). Различные компоненты хитинолитической системы *T. harzianum*, вероятно, включают взаимодополняющие по способу действия ферменты, причем для максимальной эффективности гидролиза требуется полная система (Lorito et al., 1993a).

Таблица 2
Гидролитические ферменты *Trichoderma*, участвующие в деградации клеточных стенок фитопатогенных грибов при микопаразитизме

Ген	Приблиз. мол. масса, кДа	Ферментативная активность	Штамм	Ссылка
1	2	3	4	5
Хитиназы				
–	102	N-ацетил - β -D-глюкозаминидаза	TM, 39.1 (A)T25-1 (A)	Haran et al., 1995
	73	N-ацетил - β -D-глюкозаминидаза	TM (A)	Haran et al., 1995
exc2	73		T25-1 (A)	Draborg et al., 1995
excl/nag1	64-69		T25-1, P1 (B)	Peterbauer et al., 1996
	28	N-ацетил - β - D-глюкозаминидаза	T189 (A)	Deane et al., 1998
exc1y	62,7 (123)	N-ацетил - β -D-глюкозаминидаза	T203 (B)	Ramot et al., 2004
exc2y	65,9 (136)	N-ацетил - β -D-глюкозаминидаза		
	52	Эндохитиназа	TM, TY (A)	Haran et al., 1996a
ech41	41	Эндохитиназа	P1 (A)	Margolles-Clark, et al., 1996
ech42	42	Эндохитиназа	IM1206040 (B)	Carsolio et al., 1999
ech42	42	Эндохитиназа	6Sr4 (Г)	Stevaert et al., 2003
chit42	44		CECT 2413 (A)	Garcia et al., 1994
chit42	42		Gv29-8 (Д)	Baek et al., 1999
ThEn42	42		O1 (B)	Lorito et al., 1998
	40	хитобиозидаза, или экзохитиназа	P1 (B)	Harman et al., 1993
	37	Эндохитиназа	CECT 2413 (A), 109 (A)	De La Cruz et al., 1992
Chit36	36	Эндохитиназа	TM (A)	Viterbo et al., 2001, 2002
Chit33	33	Эндохитиназа	CECT 2413 (A)	De La Cruz et al., 1992
	31	Эндохитиназа	TM, TY (A)	Haran et al., 1996a
Глюканазы				
gluc78/ xbg1.3-110	78	Эндо- β -1,3-глюканаза	P1 (B), CECT 2413 (A)6Sr4 (Г)	Donzelli et al., 2001 De La Cruz et al., 1993 Stevaert et al., 2003
	74	Эндо- β -1,3-глюканаза	T24 (A)	El-Katatny et al., 2001
	36	Эндо- β -1,3-глюканаза	39.1 (A)	
	17	Эндо- β -1,3-глюканаза	CECT 2413 (A)	Lorito et al., 1994
	29	Эндо- β -1,3-глюканаза	TC (A)	Noronha, Ulhoa, 1996, 2000
–	–	Эндо- β -1,3-глюканаза	3/78 (E)	Тиунова и др. 1983
–	–	Эндо- β -1,6-глюканаза		

BGN16.2	43	Эндо- β -1,6-глюканаза	CEPT 2413 (А)	Lora et al., 1995
BGN16.1		Эндо- β -1,6-глюканаза	CEPT 2413 (А)	De La Cruz et al., 1999
BGN16.3		Эндо- β -1,6-глюканаза	CEPT 2413 (А)	Montero et al., 2005
Lam1.3	110	Экзо- β -1,3-глюканаза	T-Y (А)	Cohen-Kupiec et al., 1999
	75	Экзо- β -1,3-глюканаза		Ramot et al., 2000
egl1	50	Эндо- β -1,4-глюканаза	RUT C30 (Ж)	Migheli et al., 1998
egl4	56	Эндоглюканаза	(Ж)	Saloheimo et al., 1997
Протеазы				
prb1	31	Щелочная протеаза	IMI206040 (Б)	Flores et al., 1997
prb1	31	Щелочная протеаза	6Sr4 (Г)	Stevaert et al., 2003
	18,8	Протеаза	1051 (А)	De Marco, Felix, 2002

Примечание: А – *T. harzianum* Rifai (= *T. inhamatum* Veerkamp et W.Gams); Б – *T. atroviride* P. Karst., В – *T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt et Nirenberg, Г – *T. hamatum* (Bon.) Bainer, Д – *T. virens* (Miller et al.) Arx, Е – *T. viride* Pers.: Fr.; Ж – *T. longibrachiatum* Rifai (= *T. reesei* E.G. Simmons)

Из различных видов грибов рода *Trichoderma* очищено и охарактеризовано несколько эндо- и экзохитиназ, N-ацетилглюкозаминидаз.

Первыми выделили, очистили и охарактеризовали хитиназы гриба *T. harzianum* De La Cruz et al. (1992). Из супернатанта культуры *T. harzianum* СЕСТ 2413 выделены и очищены три белка с хитиназой (ХИТ) активностью. Из культуральной жидкости *T. harzianum* Pl выделены хитобиозидазы и эндохитиназа (Harman et al., 1993). N-концевые аминокислотные последовательности хитиназ, выделенных из разных штаммов *Trichoderma*, и имеющих близкие молекулярные массы (40-46 кДа), проявляют высокую степень гомологии.

Из штамма T203 *T. asperellum* выделены и охарактеризованы две N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы, которые обе являются димерами (Ramot et al., 2004). Мономерные молекулы фермента неактивны. То есть активность хитинолитического комплекса может зависеть также и от факторов, вызывающих денатурацию белковых молекул. Мутации в гене *exс2* не влияют на жизнеспособность гриба и его микопаразитическую активность. Авторы (Ramot et al., 2004) считают, что этот ген не является критическим в проявлении микопаразитической активности гриба *T. asperellum*.

β -1,3-Глюканазы – вторая группа ключевых ферментов, вовлеченных в процесс микопаразитизма видов *Trichoderma*. Следует заметить, что

эти ферменты имеются не только у грибов, но и у бактерий и высших растений (Sivan, Chet, 1989a; Simmons, 1994; Lim, Kim, 1995).

β -1,3-Глюканазы грибов выполняют различные функции при развитии и дифференцировке (Wessels, 1986). Кроме того, они играют роль в питании сапрофитов и микопаразитов, а также участвуют в автолизе (Chet, 1987; Sivan, Chet, 1989a). При микопаразитизме роль секретируемых различными видами *Trichoderma* β -1,3-глюканаз, вероятно, подобна роли ферментов растений в защитных реакциях на воздействие фитопатогена (Simmons, 1994; Vazquez-Garciduenas et al., 1998).

В специфических условиях *Trichoderma* синтезирует β -1,3-глюканазы (эндо- и экзоглюканазами), также эндо- β -1,6-глюканазу, которая гидролизует еще один главный компонент клеточной стенки грибов – β -1,6-глюкан. Ферментативная активность глюканаз обнаружена *in vitro* при росте *Trichoderma* на всех источниках углерода, причем самый высокий уровень наблюдался при применении ламинарина и очищенных клеточных стенок фитопатогенных грибов (Kitamoto et al., 1987; Peberdy, 1990; Chet et al., 1998; Vazquez-Garciduenas et al., 1998). Так же как и хитиназы, β -1,3-глюканазы, ингибируются глюкозой (Ramot et al., 2000).

Штамм СЕСТ 2413 *T. harzianum* образует, по меньшей мере, три внеклеточные β -1,3-глюканазы. Основной из этих внеклеточных ферментов,

названный БГН13.1, получен в электрофоретически гомогенном виде и охарактеризован. Эта β -1,3-глюканаза впервые описана для мицелиальных грибов и принадлежит к другому семейству, отличающемуся от описанного ранее, куда были отнесены подобные ферменты бактерий, дрожжей и растений. Показано, что этот фермент гидролизует клеточные стенки дрожжей и грибов (Peberdy, 1990; De La Cruz et al., 1993).

Другой штамм *T. harzianum* – IMI206040 при индукции ламинарином секретировал семь внеклеточных β -1,3-глюканаз с молекулярной массой от 60 до 80 кДа (Vazquez-Garciduenas, et al., 1998; Carsolio et al., 1999).

Оказались аналогичными ген *gluc78*, кодирующий эндо- β -1,3-глюканазу в штамме P1 *T. atroviride*, и гены, кодирующие этот фермент в *T. harzianum*, *T. virens* (Donzelli et al., 2001), и в *T. hamatum* (Stevaert et al., 2003). Кроме того, у изученных штаммов подобными являются и регуляторные гены.

Следующая группа ферментов, участвующая в микопаразитизме – это внеклеточные протеазы *Trichoderma* (Scott, Schekman, 1980). Интенсивное изучение этих ферментов было осуществлено Delgado-Jarana et al. (2000). Изучено влияние рН, источников азота и углерода на активность кислых, нейтральных и щелочных протеаз и экспрессию генов, их кодирующих (Naab et al., 1990). Наиболее исследована щелочная протеаза *Prg1* *T. harzianum*. Фермент очищен и охарактеризован как сериновая протеаза (табл.2) с молекулярной массой 31 кДа. Клонирован и охарактеризован ген, кодирующий *Prg1* (*prg1*). Показано, что этот ген активен и репрессируется глюкозой, если гриб выращивают на средах, содержащих в качестве единственного источника углерода, клеточные стенки *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*), автоклавированный мицелий или хитин, и репрессируется глюкозой (Flores et al., 1997).

Первоначально предполагали, что протеазы не играют существенной роли в процессах микопаразитизма (Mischke, 1996), однако затем появились исследования, прямо указывающие на участие протеаз в процессах взаимодействия *Trichoderma* с фитопатогенами (Flores et al., 1997; Migheli et al., 1998; Elad, Kapat, 1999; Antal et al., 2000; De Marco, Felix, 2002). Интересно, что наилучшая защита от патогена обеспечивается штаммом, который вырабатывает протеиназу на среднем уровне. По-видимому, очень высокие уровни ее выработки могут вызвать деградацию других ферментов, которые важны для микопаразитического процесса (Flores et al., 1997).

Наиболее подробно действие ферментов литического комплекса на фитопатогены изучено у штаммов *T. harzianum* СЕСТ 2413 и *T. harzianum* PI (Ulhoa, Peberdy, 1991; De La Cruz et al., 1992; Lorito et al., 1993a, 1994; Schirmböck et al., 1994). Эндохитиназы (33, 37 и 42 кДа) гидролизуют клеточные стенки *Botrytis cinerea*, ингибируют прорастание спор и рост споровых трубок различных грибов. Причем активность хитиназы ХИТ 42 повышается в присутствии ХИТ 33 и ХИТ 37. При сочетании эндо- и экзохитиназ наблюдается более сильное торможение прорастания спор патогенов по сравнению с одним из испытуемых ферментов (De La Cruz et al., 1992). Подобные закономерности обнаружены также при изучении очищенной ХИТ 41 из *T. virens*, которая ингибирует созревание спор конидий *B. cinerea* и вызывает разрушение клеточных стенок хозяина, приводящее к разрыву кончиков гиф (Di Pietro, 1993). Не вызывает сомнений факт, что при сочетании хитинолитических и глюканолитических ферментов наблюдается значительный синергический эффект, особенно при применении смеси эндохитиназ и β -1,3-глюканаз (Stevaert et al., 2004).

Обнаружение ферментов, обуславливающих биологическую активность грибов рода *Trichoderma*, стимулировало генетические исследования по изучению регуляции активности генов, кодирующих эти ферменты. В настоящее время детально изучена регуляция генов *ech42*, *chit33*, *chit36* и *nag1* (Geremia, 1993; Garcia et al., 1994; Lorito et al., 1996; Carsolio et al., 1999; Mach et al., 1999; Viterbo et al., 2001). Показано, что ген *ech42* индуцируется при взаимодействии *Trichoderma* с фитопатогенными грибами и при выращивании в присутствии стерильного мицелия некоторых грибов в качестве единственного источника углерода. Экспрессия *ech42* подавляется высокими концентрациями глюкозы, повышается при экспозиции на свету, при споруляции и в условиях питательного стресса. Кроме того, транскрипция гена *ech42* запускается при действии таких факторов, как низкая температура, высокое осмотическое давление или добавление этанола (Mach et al., 1999). Инкубация при 40°C, при рН 2,0 в присутствии CdSO_4 или H_2O_2 не вызывала экспрессию *ech42* (<0,05 Е/мл). Однако у мутантов с разрушенным геном *nag1* (не синтезируют N-ацетил- β -D-глюкозаминидазу) ген *ech42* не индуцировался добавлением хитина (Brunner et al., 2003).

Важно заметить, что штамм *T. harzianum* P1 с мутантным геном *ech42* не только не снижал

антагонистической активности против *Pythium ultimum* или *S. rolfsii*, но и увеличил активность против *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*). Предполагается, что экспрессия этого гена в *T. harzianum* P1 не очень важна для подавления этих фитопатогенов (Woo et al., 1999; Carsolio et al., 1999).

Ген chit33 слабо экспрессируется при росте на хитине и клеточных стенках *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*). Добавление глюкозы и глицерина останавливало индукцию хитином или клеточными стенками фитопатогенов. Низкие концентрации углерода и азота, а также температурный стресс индуцировали экспрессию гена chit33 (Lorito et al., 1994; Dana et al., 2001).

Экспрессия гена pag1 начиналась при росте на клеточных стенках гриба *B. cinerea* и на продуктах деградации хитина (Mach et al., 1999).

Следует отметить, что часть данных по регуляции экспрессии получена на генах, кодирующих химерные белки, обладающих хитиназной и глюкозооксидазной активностями (Mach et al., 1999; Dana et al., 2001).

Таким образом, механизм регуляции генов, кодирующих отдельные ферменты хитинолитической системы, весьма сложен. Чем полнее он будет понят, тем более эффективные препараты будут созданы на основе грибов рода *Trichoderma*.

Активно развивается в последние годы генно-инженерные исследования с использованием либо штаммов грибов р. *Trichoderma* в качестве объектов генетического конструирования, либо их генов в качестве материала для новых генетических конструкций. Это направление исследований обобщенно можно разделить на гомологичное и гетерологичное клонирование. Под гомологичным клонированием имеется в виду передача генов, выделенных из одного штамма *Trichoderma* в другой штамм с целью увеличения биологической активности последнего. Гетерологичное клонирование – трансформация штамма *Trichoderma* генами, полученными из других микроорганизмов или передача генов *Trichoderma* другим микроорганизмам или растениям. Из различных видов *Trichoderma* клонированы гены ech42 (Geremia, 1993; Hayes et al., 1994; Garcia et al., 1994; Carsolio et al., 1999; Baek et al., 1999); chit33 (Lorito, 1994; Limon et al., 1999) и pag1 (Draborg et al., 1995; Peterbauer et al., 1996). Получены также трансформанты, у которых наблюдается конститутивная суперпродукция отдельной хитиназы (Baek et al., 1999; Limon et al., 1999).

Ген ech41, кодирующий эндохитиназу с молекулярной массой 41 кДа, выделен из *T. harzianum* P1 и экспрессирован в *T. reesei* с промотором гена целлюлазы cbhI (Margolles-Clark et al., 1996). Продукция хитиназы у трансформанта оказалась в 20 раз выше, чем у исходного штамма. Получена серия трансформантов *T. virens*, в которых ген ech42 либо разрушен, либо конститутивно суперэкспрессируется. Трансформанты стабильны и подобны изогенной линии по скорости роста, споруляции, продукции антибиотиков, эффективности колонизации корней хлопчатника и росту (выживанию) в почве (Baek et al., 1999).

На основе природного типа *T. harzianum* также сконструированы штаммы, которые содержат несколько копий гена, кодирующего ХИТ 42, или разрушенный ген. В линиях с несколькими копиями гена уровень внеклеточной активности эндохитиназы в условиях индукции возрастал в 42 раза по сравнению с изогенной, а при отсутствии гена, хитинолитическая активность не проявлялась (Carsolio et al., 1999).

Трансформанты *T. harzianum* СЕСТ 2413 с суперпродукцией ХИТ33 более эффективно ингибировали рост *Rhizoctonia solani in vitro* по сравнению с природными штаммами. При выращивании трансформантов на глюкозе внеклеточная активность хитиназы была в 200 раз выше, чем у исходной линии. Однако не обнаружена корреляция между числом копий гена chit33 и уровнем его экспрессии у трансформантов (Limon et al., 1999).

Трансформанты *T. longibrachiatum* с экстракопиями гена egl1, кодирующего выработку β -1,4-эндоглюконазы, более активны против *Pythium ultimum* на огурце, чем исходный штамм (Migheli et al., 1998). Подобным образом, трансформанты *T. harzianum*, сверхпродуцирующие протеиназу, кодируемую prb1, обеспечили в 5 раз большее увеличение контроля гнили хлопчатника, вызываемой *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*) (Flores et al., 1997).

Штамм *Gliocladium virens* (синоним *T. virens*), который высоко эффективен против *R. solani* (*T. cucumeris*) на хлопчатнике, но имеет неудовлетворительные технологические и коммерческие параметры, путем слияния протопластов объединили со штаммом *T. koningii*, который сохраняет жизнеспособность при хранении в течение длительного времени, но имеет слабую антагонистическую активность (Hanson, Howell, 2002). Получили форму, морфологически похожую на *T. virens*, обладающую активностью в отношении *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*) и способную к длительному хранению (до 1 года).

Гетерологичная трансформация – прием, используемый для увеличения эффективности штаммов-продуцентов биопрепаратов. Так, у трансформантов *T. reesei* с геном, кодирующим хитиназу из *Aphanocladium album* (Preuss) W. Gams, активность внеклеточной хитиназы оказалась в 6,5 раз выше, чем внутриклеточного фермента (Deane et al., 1999). Трансформант штамма *T. atroviride* P1 с геном глюкозооксидазы *gox* из *Aspergillus* var. *niger* Tiegh., приобрел способность синтезировать глюкозооксидазу (причем пропорционально количеству копий гена) и более высокую антагонистическую активность в отношении *R. solani* (*T. cucumeris*), *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* и *P. ultimum* (Lorito et al., 2001). Авторы полагают, что применение этого супер-GOX штамма вызывает приобретенную системную устойчивость у бобовых растений, семена которых до созревания были обработаны *Trichoderma*.

У *Enterobacter cloacae* экспрессия трансформированных генов хитинолитических ферментов *T. harzianum* привела к увеличению антагонистического эффекта (Lorito et al., 1993b). Кроме того, показано, что антибиотическое действие липодепептидов из *Pseudomonas* spp. на фитопатогены можно значительно усилить добавлением хитиназ из *Trichoderma* (Lorito et al., 2000; Woo et al., 2002). Обнадеживающие результаты получены при трансформации геном *chit42* дрожжей 3 видов: *Rodotorula glutinis* (LS-11), *Cryptococcus laurentii* (LS-28) *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* (MA5) (Gastoria et al., 2000). Несмотря на очень низкую частоту трансформации были получены трансформанты, которые выделяют ХИТ42 и проявляют повышенную биологическую активность по отношению не только к специфическим грибам (*Penicillium expansum* Link), но к более широкому кругу патогенов.

Таким образом, созданы штаммы-трансформанты *Trichoderma*, у которых суперпродукция отдельной хитиназы приводила к более эффективному воздействию на фитопатогенные грибы.

Ясно, что эта стратегия является перспективной для получения более эффективных (и с более широким спектром активности) биопрепаратов.

Широкий скрининг *in vitro* не выявил ни одного хитинсодержащего фитопатогена, устойчивого к хитиназам из *Trichoderma* (Lorito et al., 1994; Haran, et al., 1996a; Schickler, Chet, 1997). Возникла идея создания трансгенных растений с геном (генами) хитиназы, которые были бы устойчивыми к различным грибным патогенам (Broglie et al., 1991). Ген эндохитиназы 42 из *T.*

atroviride P1 и *T. harzianum* СЕСТ 2413 перенесли в табак и картофель, а из *T. virens* – в табак и хлопчатник (Lorito et al., 1998; Emani et al., 2003).

В различных тканях растений без видимого влияния на их рост и развитие получен высокий уровень конститутивной экспрессии гена гриба. Эти трансгенные линии были высоко устойчивы или полностью устойчивы к *A. alternata*, *A. solani* Sorauer, *B. cinerea* и к *R. solani*. Оказалось, что ген эндохитиназы из *Trichoderma*, трансформированный в клетки растений, обеспечивает более высокий уровень активности и более широкий спектр устойчивости, чем аналогичные гены из растений и бактерий. Получены также трансгенные яблони и брокколи, в которые перенесен ген хитиназы *T. harzianum* (Bolar et al., 2000; Mora, Earle, 2001). Трансформация яблони генами, кодирующими эндо и экзо-хитиназы обеспечила синергичный эффект этих генов в повышении устойчивости растений к возбудителю парши (*Venturia inaequalis*) (Bolar et al., 2000). В то же время, трансформация яблони генами хитинолитического комплекса привела к снижению высоты растений.

Трансформация растений генами *Trichoderma* для повышения их устойчивости к болезням осуществляется на капусте, томатах, винограде, лимоне, пшенице, рисе, лесных деревьях и некоторых других растениях (Lorito, Scala, 1999).

Эти результаты показывают, что грибы, рода *Trichoderma* – богатый источник генов для конструирования новых организмов с полезными свойствами.

Могут ли изоляты *Trichoderma* быть возбудителями болезней растений в случае возникновения неблагоприятных условий? В 1944 году появились сообщения о том, что неизвестный изолят *Trichoderma* (English, 1944) стал причиной гнили яблок, а в 1976 году появились сообщения о том, что *T. lignorum* вызывала гниль плодов цитрусов (Knosel, Schickedanz, 1976). Инокулированный в раны изолят *T. harzianum* мог стать причиной гнили яблок после 7-дневного хранения при температуре 25° С (Conway, 1983).

По данным Фара с сотрудниками (Farr et al., 1989) *T. viride* поражает 32 рода растений. В своей работе Мензис (Menzies, 1993) показал, что изолят *T. viride*, выделенный из здоровых корней томатов, проявил себя как патоген рассады огурцов, перца и томатов, как в лабораторных, так и в тепличных условиях. Опираясь на определение Гаррета (Garret, 1970), Мензис назвал выше упомянутый изолят *Trichoderma* мигрирующим, или второстепенным.

Тем не менее, в случае испытания таких изолятов, как *T. pseudokoningii*, *T. viride*, а также *T. harzianum*, патогенность отсутствовала. Возникает вопрос: может ли данный гриб стать минорным патогеном при определенных условиях, или же свойства различных изолятов являются специфическими? Иными словами, являются ли некоторые изоляты – второстепенными патогенами, а некоторые – очень важными антагонистами? Дело осложняет тот факт, что *T. viride* в зависимости от условий опыта может быть как полезным, так и вредным грибом в отношении одного и того же вида растения. Изолят *T. viride*, не паразитирующий на растении, может быть прекрасным биоконтрольным агентом, конкурируя с фитопатогенами за питательные субстраты, или индуцируя иммунитет растений (Menzies, 1993). Следует иметь в виду, что, несмотря на очень низкую вероятность реализации патогенных свойств различных видов (штаммов) *Trichoderma*, некоторые изоляты этого гриба всё же могут быть второстепенными (минорными) патогенами.

Вильям Миллер (William B. Miller) из Корнельского Университета (США) сообщил, что

T. viride может являться причиной загнивания кончика листьев тюльпана или поражения корней. Однако он называет этот гриб «мягким» патогеном и считает, что заболевания могут быть подвержены только ослабленные растения, или растения в состоянии стресса.

В ряде случаев виды *Trichoderma* могут представлять опасность для здоровья человека. Так в недавнее время выяснилось, что они вызывают глубокие микозы у людей с подавленным иммунитетом, в основном у пациентов, перенесших пересадку органов или больных СПИДом (Munoz et al., 1997; Guarro et al., 1999). Оказалось, что из 6 выделенных патогенных изолятов 5 являются *T. longibrachiatum* и один – *T. citrinoviride* Bissett. Оба эти вида относятся к секции *Longibrachiatum*. По-видимому, патогенность грибов рода *Trichoderma* ограничена только этой секцией (Kuhls et al., 1999; Tang et al., 2003). Штаммы-продуценты биопрепаратов (*T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. asperillum*) относятся к другой секции и на протяжении всего времени использования их в растениеводстве нет примеров их отрицательного воздействия на человека или животных.

Взаимоотношения грибов р. *Trichoderma* с высшими растениями и почвенной микрофлорой

Хорошо известно, что штаммы грибов р. *Trichoderma* способны заселять корни растений (Dubos, 1987; Elad, 1994; Harman, 2000).

Что же известно сегодня о взаимодействии штаммов *Trichoderma* spp. с растениями? Некоторые штаммы *Trichoderma* могут заселять только определенные участки на корнях (Metcalf, Wilson, 2001), но конкурентные ризосферные штаммы находятся на всей поверхности корней в течение несколько недель или даже месяцев (Thrane et al., 1997; Harman, 2000).

В немногих случаях, которые были тщательно проанализированы, штаммы *Trichoderma* колонизируют поверхность корня, обвивая его, подобно тому, как они обвивают гифы патогенного гриба при микопаразитизме. Проникновение гиф триходермы в ткань корня обычно ограничивается одним, максимум двумя слоями клеток корня (Yedidia et al., 1999, 2000; Metcalf, Wilson, 2001). Однако, был описан эндофитный штамм гриба *Trichoderma stromaticum* Samuels et Pardo-

Schultheiss, глубоко проникающий в сосудистую систему какао (Evans et al., 2003). Наличие эндогенных штаммов *Trichoderma* – продуцентов российских триходерминовых препаратов показано в исследованиях, проведенных О.Л. Рудаковым (Рудаков, Макаренкова, 2002).

Одним из наиболее интригующих фактов является то, что, хотя *Trichoderma* spp. и другие колонизирующие корни грибы, заселяют корни растения, они при этом не являются фитопатогенами. Однако в редких случаях штаммы *Trichoderma* spp. являются патогенами растений – яблони, кукурузы, люцерны – а некоторые штаммы также могут синтезировать фитотоксичные метаболиты (Bailey, Lumsden, 1996). Они являются продуцентами ферментов, которые могут действовать на клеточные стенки тканей растений (Harman, Kubicek, 1998).

Тем не менее, выдающимся феноменом является тот факт, что триходерма (и, вероятно, другие микроорганизмы, такие как непатогенные

штаммы *Fusarium* и *Rhizoctonia*, микоризные и другие грибы) инфицирует корни, но ограничивают свое патогенное влияние поверхностными клетками корней растений.

Некоторые штаммы *Trichoderma* могут расти также в филлоплане растений. Так, после опрыскивания листьев конидиальным препаратом штамма Т-22, споры гриба прорастали и становились видимыми многочисленными гифы антагониста, которые паразитировали на *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*) (Lo et al., 1998).

Таким образом, *Trichoderma* при определенных условиях способна колонизовать также поверхность листьев. Однако, вполне возможно, что антигрибная активность антагониста может и не зависеть от способности колонизовать поверхность листьев, поскольку присутствие *Trichoderma* может индуцировать системную болезнестойчивость и препятствовать проникновению фитопатогена в растение (Elad, Karat, 1999).

Одновременно в нескольких исследованиях было показано, что колонизация корней штаммами *Trichoderma* ведет к повышению уровней связанных с защитой растений ферментов, включая пероксидазы, хитиназы, β -1,3-глюканазы, а также гидропероксидазу (Yedidia et al., 1999; Howell et al., 2000; Harman et al., 2004a). Показано, что обработка корней огурца штаммом Т39 *T. harzianum* (в виде живых или убитых клеток) для защиты от листовых патогенов индуцировала в клетках растения синтез протеаз, которые разрушают ферменты патогена, такие как пектиназы, кутиназы, глюканазы и хитиназы (Elad, 2000). Другой антагонист *T. asperellum* Т-203 инициировал в побегах и корнях огурца кратковременное увеличение синтеза фенилаланинаммонийлиазы (Shoresh et al., 2005). Через 2 дня уровень синтеза фермента снизился до исходных значений. Тем не менее, когда листья огурца инокулировали *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, экспрессия многих зависимых от защиты генов возрастала в несколько раз.

Электрофоретический анализ белков 5-ти дневных проростков кукурузы, семена которой либо обработаны, либо не обработаны, штамм Т-22, показал, что электрофореграммы растений из обработанных семян содержат на 40% белков больше, чем контрольные (Harman et al., 2004b). Сходные результаты были получены при анализе белков бобов. Совместно, эти данные показывают, что эти грибы сильно модифицируют метаболизм растений, что, в большинстве случаев, способствует усилению их болезнестойчивости.

Очевидно, что изменение метаболизма растений может привести к накоплению в нем антимикробных веществ. Так, предполагается, что *T. virens* способен индуцировать выработку фитоалексина, обеспечивая локальную болезнестойчивость у хлопчатника. Штамм *T. asperellum* Т-203 при колонизации корней огурца вызывает увеличение уровня фенольных гликозидов в листьях; их аглюконов, действующих как сильные ингибиторы в отношении ряда бактерий и грибов. Увеличение синтеза ингибиторных веществ обнаружено только у растений, чьи корни заражены инокулюмом Т-203, а листья заражены инокулюмом *P. syringae* pv. *lachrymans*. Этот эффект не наблюдался в случае применения указанных микроорганизмов порознь. То есть, он не ограничен только взаимодействием Т-203 с растением. Показано, также, что экстракты из листьев других растений, зараженных *P. syringae* и обработанных штаммами Р1 или Т-22, обладают большим антимикробным действием, чем необработанные (Woo et al., 2003).

Таким образом, штаммы *Trichoderma* не только продуцируют антибиотические вещества напрямую, но и активно стимулируют растения, побуждая их к выработке их собственных антимикробных веществ. Поэтому колонизация корней этими микромицетами индуцирует значительные изменения метаболизма в клетках растений.

Итак, ряд штаммов *T. virens*, *T. asperellum*, *T. atroviride* и *T. harzianum* индуцируют метаболические изменения у растений, увеличивая их устойчивость к ряду фитопатогенных микроорганизмов и вирусов. Более того, эта индуцированная болезнестойчивость проявляется у многих видов растений. Например, Т-22 индуцирует болезнестойчивость томата и кукурузы, что говорит об отсутствии (или незначительной) специфичности действия *Trichoderma*. Когда биомассу гриба (в виде конидий или хламидоспор) вносят в почву, происходит тесный контакт с корнями растений, на поверхности которых споры прорастают. Мицелий гриба в основном растет на поверхности корней, хотя некоторые штаммы могут инфицировать наружные клетки корня. Гриб вырабатывает, как минимум, три класса веществ, которые стимулируют защитные механизмы растений, предотвращающие дальнейшее инфицирование патогенами. Это пептиды, белки и низкомолекулярные вещества. В некоторых случаях возникает локальная болезнестойчивость, как в случае с *T. virens* на хлопчатнике, но в большинстве случаев возникает системная ус-

тойчивость. За короткий период времени возросшая экспрессия защитных генов охватывает все растение. Этот процесс может быть временным, но он индуцирует экспрессию генов защитных белков, когда растения поражаются патогенами на участках, удаленных от локализации штамма *Trichoderma*. Проведенные исследования показывают, что начальные реакции, которые включают выработку связанных с патогенезом белков, имеют общие с SAR признаки.

Известно, что виды *Trichoderma* spp. и другие полезные микроорганизмы, колонизирующие корни, стимулируют рост растений и их продуктивность (Undser, Byker, 1967; Pozo et al., 2002).

Впервые ростстимулирующая активность грибов рода *Trichoderma* установлена в 1984 году Бакер (Baker et al., 1984). Дальнейшие исследования показали, что обработка почвы суспензией спор *Trichoderma* spp. стимулирует рост, раннее цветение и появление большого числа бутонов у декоративных культур (Chang et al., 1986; Coley-Smith et al. 1991; Lynch et al. 1991; Kleifeld, Chet 1992). Стимулирующее действие было показано также для овощных (Baker, 1989; Ousley et al., 1994; Губкин и др., 1998; Harman, 2000; Yossen et al., 2003) и злаковых культур (Голованова, 2005).

На интуитивном уровне этот эффект можно считать непродуктивным, поскольку большинство видов *Trichoderma* также индуцируют устойчивость у растений, а запускаемые пути болезнеустойчивости энергетически невыгодны для растений. Тем не менее, многие индуцирующие болезнеустойчивость грибы и бактерии увеличивают рост, как побегов, так и корней. В качестве ускоряющих рост растений широко известны индуцирующие болезнеустойчивость ризобактерии (Клоергер et al., 1993), а также эндофитные резидентные бактерии (Nejad, Jonson, 2000). Штаммы *Trichoderma*, вероятно, обладают этим же свойством (Chang et al., 1986; Harman, 2000). В случае штамма Т-22 данный эффект продолжается в течение всего вегетационного периода однолетних растений и может быть индуцирован небольшим количеством грибной биомассы (менее 1 г/га), используемой для обработки семян (Harman, 2000).

Рост кукурузы и овощных культур может увеличиваться также в присутствии других полезных колонизирующих корни микроорганизмов. Datnoff et al. (1995), а также Nemes et al. (1998) продемонстрировали синергизм микоризных грибов и штамма Т-22. Также был показан синергизм действия ферментов *Trichoderma* и бактериальных антибиотиков (Woo et al., 2002).

Смеси различных, колонизирующих корни микроорганизмов зачастую способствуют достижению лучших результатов, чем использование каждого из них отдельно (Whipps, 2001). Более развитая корневая система способствует увеличению урожая и биомассы растений.

Эффективность грибов рода *Trichoderma* зависит не только от штамма, почвенных условий, вида растения-хозяина, но и его сорта, т.е. генотипа. Так, например, отзывчивость кукурузы на обработку штаммом Т-22 зависит от линии растений: некоторые линии реагируют слабо, у других наблюдается снижение роста и урожайности. Эти различные реакции растений на полезные микроорганизмы, такие как Т-22, требуют изучения механизмов взаимодействия растение-гиперпаразит на уровне транскрипции и трансляции. Вероятно, протеомный или геномный анализ позволят идентифицировать гены и пути, участвующие в механизмах устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессорам, а также в ускорении их роста.

В большинстве случаев невозможно отделить прямое влияние на рост растений от подавления патогенных или вредоносных микроорганизмов, снижающих рост корней. Однако ряд изученных штаммов гриба (Т-22, *T. asperellum* Т-203 и др.) проявляли ростстимулирующий эффект, как в стерильной, так и в нативной почве (Undser, Byker, 1967; Yedidia et al., 2001; Harman, 2004b). В большинстве случаев более мощное развитие корневой системы и увеличение роста растений вызваны, вероятно, антигрибным действием антагониста и связанными с ним эффектами на ризосферную микрофлору. Вредоносная корневая микрофлора способна снижать рост растений в отсутствие заболевания (Burr et al., 1978). Некоторые виды ризосферной микрофлоры, продуцируют цианиды – вероятно, для конкурентного поддержания своей экологической ниши (Bakker et al., 1987). Виды *Trichoderma* устойчивы к цианидам за счет синтеза ферментов, разлагающих эти вещества (Ezzi, Lynch, 2002).

Недавно было показано, что фенотипически сходное ускорение роста растения индуцируется выделением летучих веществ, таких как ацетон и 2,3-бутандиол (Flyu, 2003), однако молекулярные механизмы ускорения роста растений с помощью *Trichoderma*, пока до конца не изучены.

Таким образом, увеличение роста корней, и всего растения, повышение устойчивости растений к стрессам достигаются несколькими различными путями. Каждый из них, вероятно, включает многочисленные механизмы, обеспе-

чивающие защиту растений от патогенов, инфицирующих корни и листья.

Грибы рода *Trichoderma* способствуют увеличению поглощения ряда питательных веществ (меди, фосфора, железа, марганца и натрия) в корнях гидропонной культуры, в том числе и в аксеничных условиях (Yedidia et al., 2001). Кукуруза, выращенная из семян, обработанных Т-22, достигает максимальной урожайности при уменьшенном на 40% потреблении азотных удобрений (Harman, Donzelli, 2001). Подобный прием способствует снижению загрязнения почвы и поверхностных вод нитратами, что важно при крупномасштабном выращивании этой культуры. Помимо влияния на эффективность использования азота, Т-22 (а также, по-видимому, другие штаммы *Trichoderma*) могут переводить в доступную форму питательные вещества, необходимые растению, такие как водонерастворимые фосфаты, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} и Zn^{2+} (Altomare et al., 1999).

Виды рода *Trichoderma* не только активно участвуют в разложении органических соединений, процессах аммонификации и усилении мобилизации фосфора и калия, обогащая почву подвижными формами питательных веществ. Они также стимулируют рост бактерий рода *Azotobacter* и клубеньковых бактерий (Мирчинк, 1984, 1988; Шемшура, 1991).

Таким образом, грибы рода *Trichoderma* способствуют увеличению размера, массы и роста корней и всего растений. Такой эффект обеспечивается: 1) прямым влиянием на растения, 2) подавлением вредной ризосферной микрофлоры, 3) инактивацией токсичных веществ в прикорневой зоне. Эти микромицеты увеличивают поглощение питательных веществ, эффективность утилизации азота и мобилизацию питательных веществ.

Анализ экспериментальных данных по изучению грибов рода *Trichoderma* свидетельствуют о том, что этот микромицет эволюционировал как активный симбионт растений. Виды *Trichoderma* активны, поскольку они способны пролиферировать в растении, конкурировать и выживать в ризосфере и других экосистемах. Активные изоляты гриба способны колонизовать корни и размножаться на них. Когда микромицет заселяет корни растения, он проникает только в наружные слои корней, отчасти и потому, что сам индуцирует защитные реакции растения. Поэтому, несмотря на то, что *Trichoderma*, вероятно, обладает врожденной способностью атаковать растения, она, как правило, авирулентна. Защитные реакции

растений могут стать системными и защищать все растение от ряда патогенов и болезней, даже если *Trichoderma* растет только на его корнях. Подобная колонизация корней также увеличивает и рост всего растения, таким образом, увеличивая продуктивность и урожайность. Кроме того, активные виды *Trichoderma* помогают растениям переносить абиотический стресс, улучшать поглощение питательных веществ. Эти факты свидетельствуют о том, что в ходе совместной эволюции *Trichoderma* в отношении растений в большей степени заняла нишу симбиотическую, и в меньшей – паразитическую. Подобные взаимодействия происходят и с другими грибами и бактериями, включая авирулентные штаммы таких патогенов, как *Fusarium* и *Rhizoctonia*. Знания о вышеизложенных фактах можно использовать более эффективно, если лучше понимать механизмы и системы, которые участвуют во взаимодействии *Trichoderma* и фитопатогенов растений. Более того, именно гены, кодирующие Avr белки *Trichoderma*, могут быть более приемлемы (чем их гомологи из патогенных грибов) для генно-инженерных модификаций растений, с целью придания им болезнеустойчивости (Hammond-Kosack et al., 1995; Гарчевский, 2001; De Wit, 2002).

Несмотря на многочисленные исследования механизмов действия грибов рода *Trichoderma* на фитопатогены, представления о механизмах активности далеки от полного понимания. Наряду со способностью стимулировать рост растений или ингибировать рост фитопатогенов напрямую, появились доказательства того, что грибы этого рода могут индуцировать системный (systemic acquired resistance – SAR) или локальный иммунитет растений к ряду патогенов (van Loon et al., 1998; Harman et al., 2004a). Более того, имеются конкретные штаммы, которые влияют на рост и развитие растений как в аксеничных (Undser, Vyker, 1967; Yedidia et al., 2001), так и в естественных полевых условиях (Chang et al., 1986; Harman, 2000). Последние научные достижения сильно поменяли представления о механизмах действия этих грибов.

Локальная и системная устойчивость возникает у большинства растений в ответ на инфицирование патогенными микроорганизмами, повреждения, вызванные насекомыми и другими вредоносными факторами, обработку различными химическими индукторами, а также на присутствие непатогенных ризобактерий (van Loon et al., 1998; Park, Kloepper, 2000; Yedidia et al., 2000; Kuc, 2001; Oostendort et al., 2001). При изучении механизмов устойчивости показано, что

во многих случаях салициловая и жасмоновая кислоты, вместе с этиленом или закисью азота, вызывают в растении каскад процессов. Это приводит к синтезу ряда метаболитов и белков, обеспечивающих устойчивость растений (Delaney, Uknes, 1994; van Loon et al., 1998; Chen et al., 1999; Hammerschmidt et al., 2001; Bostock et al., 2001; Thaler et al., 2002).

Считается, что индуцированная системная устойчивость, которая активируется ризобактериями, является ближайшим аналогом пути индуцированной устойчивости, активируемого грибами рода *Trichoderma*.

Тем не менее, эта устойчивость различается, поскольку колонизация корней ризобактериями не приводит к ощутимой экспрессии зависимых от патогенеза белков, а колонизация корней некоторыми бактериальными штаммами не индуцирует аккумуляцию салициловой кислоты растениями (Bakker et al., 2003). Способность ризобактерий индуцировать системную устойчивость наглядно продемонстрирована (Клоерперг et al., 1993; Pieterse, van Loon, 1999; Спайк и др. 2002).

Некоторые грибы, не родственные *Trichoderma*, увеличивают рост и продуктивность растений, к тому же они также могут индуцировать иммунитет растений. Например, род *Fusarium* включает как патогенные в отношении растений, так и непатогенные расы и штаммы. Известно, что непатогенные грибы рода *Fusarium* обладают высокой антигрибной активностью (Fravel et al., 2005). Недавно было показано, что эти грибы индуцируют устойчивость к патогенным штаммам и расам *Fusarium* или *Pythium ultimum* (Windham et al., 1986; Fuchs et al., 1997; Duqff, 1998; Benhamou et al., 2002). Подобным образом, микромицеты рода *Rhizoctonia* могут индуцировать иммунитет растений (Hwang, Venson, 2003). Микромицеты родов *Penicillium* и *Phoma* обладают теми же способностями (Koike, 2001). Индуцирующие устойчивость грибы инфицируют наружные клетки корней растений, при этом их действие в других слоях (более глубоких) практически отсутствует.

Индукция болезнеустойчивости растений грибами рода *Trichoderma* в сравнении с индукцией растений ризобактериями изучена слабее. Это, вероятно, связано с тем, что микологи сосредоточены на изучении прямого антигрибного влияния *Trichoderma* (микопаразитизм, антибиотическое действие). Тем не менее, в 1997 году опубликовано одно из первых сообщений по индукции иммунитета растений грибами рода *Trichoderma* (Bigrimana, 1997). Показано, что об-

работка почвы штаммом Т39 гриба *T. harzianum* повысила устойчивость листьев бобов к *B. cinerea* и *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magnus) Briosi et Cavara, несмотря на то, что штамм Т39 заселяет только корни, но не листья. Те же виды *Trichoderma* оказались эффективными против патогена *B. cinerea* и на других двудольных растениях (De Meyer et al., 1998). Похожие исследования были проведены на большом количестве как однодольных, так и двудольных растений, при этом для индукции болезнеустойчивости использованы различные виды и штаммы рода *Trichoderma*. Большинство примеров таблицы 3 свидетельствует именно об индукции системного иммунитета, поскольку подавление возбудителя болезни отмечено в органах, удаленных от самой ризосферы, где находится *Trichoderma*.

Способность штамма Т-22 гриба *T. harzianum* индуцировать системный иммунитет у кукурузы, особенно замечательна тем, что до сих пор не известно об устойчивости, индуцированной у этой культуры какими-либо другими ризосферными микроорганизмами.

Итак, отмечена способность *Trichoderma* индуцировать устойчивость к ряду заболеваний, вызываемых патогенами (грибы, бактерии и вирусы) у различных видов растений. Трудной задачей является проверка роли *Trichoderma* в индуцировании устойчивости к патогенам, вызывающими болезни рассады и корней. Это связано с тем, что, как антагонист, так и патоген находятся на одном участке.

Были проверены штаммы *T. virens*, различающиеся по микопаразитической активности и по способности синтезировать антибиотики, на способность защищать рассаду хлопчатника от *R. solani* (*T. cucumeris*) (Howell et al., 2000; Howell, 2003). Оказалось, что, даже мутанты, не синтезирующие антибиотики, и не способные к микопаразитизму, защищали рассаду хлопчатника от болезни. Авторы предполагают, что в этом случае, вероятнее всего, штаммы *T. virens* индуцируют локальную, а не системную, устойчивость

Как видно из таблицы 3, появляется все больше данных, о том, что не только прямое влияние на фитопатогены является главным механизмом антигрибного действия грибов р. *Trichoderma*. Оказывается, большинство штаммов, изученных к настоящему времени, индуцируют системную устойчивость у растений. Они обеспечивают защиту, которая и во временном и в пространственном отношении удалена от этого штамма. Повреждение листьев томата *Alternaria solani* Sorauer в полевых условиях значительно снижа-

Таблица 3
 Проявление иммунитета у растений под действием микромицетов р. *Trichoderma* (Narman et al., 2004a)

Виды и штаммы	Растение	Патогены	Проявление устойчивости	Время после обработки	Эффективность	Ссылка
<i>T. virens</i> G-6, G-6-5 и G-11	Хлопчатник	<i>R. solani</i> (<i>Thanatephorus cucumeris</i>)	Защита растений, индукция выработки фунгиотоксичных терпеноидных фитоалексинов	4 дня	78% снижение заболевания, способность индуцировать выработку фитоалексинов, необходимой для максимальной анти-грибной активности	Howell et al., 2000
<i>T. harzianum</i> T-39	бобы	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Sacc. et Magnus) Briosi et Savara,	Защита листьев при заселении T-39 только корней	10 дней	42% снижение заболевания в области узлов, число распространения узлов снижено	Bigirmana, 1997
<i>T. harzianum</i> T-39	томат, перец, табак, латук, бобы	<i>V. cinerea</i>	Защита листьев при заселении T-39 только корней	7 дней	25–100 % снижение симптомов серой плесени	De Mayer et al., 1998
<i>T. harzianum</i> T-39	огурец	<i>V. cinerea</i> , <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sphaerotheca fusca</i> (Fr.) S. Blumer	Обработка корней T-39 или убитыми клетками защищает листья	57 дней	Снижение серой гнили плодов на 35–44% и стеблей на 43–64%. Снижение белой гнили плодов на 64%, стеблей – на 30–35%. Снижение заболеваемости мучнистой росой на 55–64%	Elad, 2000
<i>T. asperellum</i> T-203	огурец	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Защита листьев при заселении T-203 только корней; обработка антигрибных веществ листьями	5 дней	Почти 80% снижение заболевания на листьях; 100 кратное снижение количества патогенных бактериальных клеток на листьях	Shoresh et al., 2005

<i>T. harzianum</i> T-22; <i>T. atroviride</i> P1	бобы	<i>B. cinerea</i> и <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	Защита листьев при заселении грибом только корней; выработка антигрибных веществ листьями	7–10 дней	69% снижение симптомов серой плесени при использовании T-22; 54% снижение симптомов бактериального заболевания	Harman et al., 2004b
<i>T. harzianum</i> T-1 & T22; <i>T. vires</i> T3	огурец	пятнисто-зеленый вирус мозаики	Защита листьев при заселении <i>Trichoderma</i> корней	7 дней	Уменьшение темпов снижения роста, индуцированных болезнью	Lo et al., 2000
<i>T. harzianum</i> T-22	томат	<i>Alternaria solani</i>	Защита листьев при заселении <i>Trichoderma</i> корней	3 месяца	Доходящее до 80% уменьшение симптомов раннего увядания, вызванного природно-чаговой полевой инфекцией	Seaman, 2003
<i>T. harzianum</i> T-22	кукуруза	<i>Colletotrichum graminicola</i> (Ces.) G.W. Wilson (Glomerella graminicola D.J. Politis)	Защита листьев при заселении <i>Trichoderma</i> корней	14 дней	44% снижение размера узлов на поврежденных листьях; отсутствие болезни на неповрежденных листьях	Yedidia et al., 1999, 2000.
<i>Trichoderma</i> GT3-2	огурец	<i>Colletotrichum orbiculare</i> (Berk. et Mont.) Arx, <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Защита листьев при заселении <i>Trichoderma</i> корней; индукция лигнификации и генерация супероксида	1 день	59 и 52% защита от болезней, вызванных <i>C. orbiculare</i> и <i>P. syringae</i> , соответственно	Koike et al., 2001
<i>T. harzianum</i>	перец	<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	Защита стеблей при заселении <i>Trichoderma</i> корней; повышенный уровень выработки фитолексина капсидола	9 дней	Почти 40% снижение длины каждого из узлов	Ahmed et al., 2000
<i>T. harzianum</i> NF-9	рис	<i>Magarorthe grisea</i> ; <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Защита листьев при заселении <i>Trichoderma</i> корней	14 дней	34–50% снижение заболевания	Tong Xu, неопубликованные наблюдения

лось на листьях в случае, когда корни инокулировали штаммом Т-22 заблаговременно (100 и более дней).

Таким образом, экспериментальные данные показывают, что индуцированный *Trichoderma* локальный или системный иммунитет растений является важным компонентом подавления их болезней. Однако, включение этого процесса зависит от конкретных штаммов – индуктора и фитопатогена. Например, мутантный штамм *T. atroviride* P1 с подавленной эндохитиназной активностью, снизил антигрибную активность в отношении *B. cinerea*, когда в конидиальной форме был применен на листьях (Woo et al., 1999), хотя именно листья является индикатором микопаразитической активности при борьбе с этим патогеном. И наоборот, этот же мутантный штамм обладал большей, чем родительский штамм, антигрибной активностью в отношении *R. solani* (*T. cucumeris*).

Исследования другого антагониста *T. virens* привели к другим результатам. Активные штаммы *Trichoderma* гораздо более устойчивы к терпеноидным фитоалексинам по сравнению с большинством грибов (Howell et al., 2000). Действительно, было обнаружено, что в целом грибы р. *Trichoderma* очень устойчивы к ряду токсинов и ксенобиотических веществ (включая антибиотики), продуцируемым другими микроорганизмами, а также к растительным антимикробным веществам и химическим фунгицидам (Harman et al., 1996; Ezzi, Lynch, 2002; Ezzi et al., 2003). Молекулярные основы этой устойчивости *Trichoderma*, заключаются в следующем – штаммы *Trichoderma* продуцируют ряд АТФ-связывающих транспортных молекул (АТФ-зависимые пермеазы), которые обеспечивают транспорт различных субстратов через биологические мембраны. При этом сверхэкспрессия генов этих пермеаз снижает содержание токсических веществ в клетках *Trichoderma* spp. (Lanzusa, 2002). Показано, что эти АТФ-зависимые транспортные молекулы играют важную роль во многих процессах в клетках *Trichoderma* spp. Они обеспечивают устойчивость к токсикантам (загрязнителям), продуцируемым почвенной микрофлорой или техногенного происхождения (например, фунгициды и соединения тяжелых металлов) (Errasquin, Vazquez, 2003); участвуют в выделении во внешнюю среду факторов микопаразитической активности, таких как антибиотики и ферменты, разлагающих клеточную стенку (Howell et al., 2000); обеспечивают транспорт через клеточную мембрану метаболитов, ингибирующих или разрушающих пектиназы и другие

ферменты, играющих важную роль в патогенезе (Zimand et al., 1994). О роли АТФ-зависимых транспортных молекул свидетельствует тот факт, что «нокаутные» мутанты *T. atroviride*, у которых недостаточно специфических транспортных молекул, подавляются токсинами таких патогенов как *B. cinerea*, *R. solani* (*T. cucumeris*) и *P. ultimum* (Lanzusa, 2002; Ruocco, 2002).

На сегодняшний день известно уже три класса веществ-индукторов болезнестойчивости, продуцируемых *Trichoderma*. Это, в первую очередь, белки с ферментативными или иными свойствами; гомологи белков, кодируемых генами авирулентности (Avr), и олигосахариды, а также другие низкомолекулярные вещества, продуцируемые стенками клеток грибов или растениями под действием ферментов *Trichoderma*.

22-кДа ксиланаза, секретируемая некоторыми видами *Trichoderma*, индуцирует выработку этилена и реакцию защиты у растений (Lotan, Flutz, 1989; Fuchs et al., 1991). Интересен тот факт, что этот низкомолекулярный белок перемещается по сосудистой системе табака и выделяется на засечках его черенков. Этот белок индуцирует локальную устойчивость (Balley et al., 1991), в то время, как системная болезнестойчивость, вызванная данным белком, возникает лишь при его перемещении внутри растения.

Недавно установлено, что активные штаммы *T. virens* могут индуцировать в клетках корней хлопчатника продукцию белков и пептидов, стимулирующих синтез терпеноидов (Hanson, Howell, 2004). Индуцирующей активностью обладают шесть пептидов или белков размером от 6,2 до 42 кДа. Один из них реагировал с антителами к этилен – индуцируемой ксиланазе из *T. viride*, а другой (18 кДа), который значительно стимулировал синтез терпеноидов и увеличивал активность пероксидазы в корешках хлопчатника, имел сходство с аминок-терминальной последовательностью сериновой протеиназы из *Fusarium sporotrichioides* Sherb.

Белки Avr генов идентифицированы у ряда грибных и бактериальных фитопатогенов. Обычно они действуют как расовые или специфические стимуляторы, индуцирующие сверхчувствительность и другие виды защитных реакций растений с генами устойчивости (Baker et al., 1997; De Wit, 2002). У штамма Т-22 идентифицированы белки – гомологи Avr4 и Avr9, обнаруженные ранее у *Cladosporium fulvum* Cooke (возбудителя бурой пятнистости листьев томата). Похожие протеины синтезирует и штамм P1 *T. atroviride* (Wao et al., 2003).

Получены трансформанты *T. atroviride*, синтезирующие меченные зеленым флюоресцирующим красителем белки или имеющие специфическую ферментативную активность (глюкозооксидаза или b-глюкоронидаза) под контролем промоторов, связанных с защитой от фитопатогенов (Thrane et al., 1995; Zeilinger et al., 1999; Mach et al., 1999; Brunner et al., 2005). Благодаря этому появилась возможность выделять и характеризовать биоактивные молекулы, которые

выделяются под действием *Trichoderma* spp. Эти молекулы, вырабатываемые в ходе многочисленных взаимодействий, которые происходят между *Trichoderma*, грибными фитопатогенами и корнями растений, действуют как индукторы антагонистической активности (посредством экспрессии генов *Trichoderma*) или функционируют просто как стимуляторы иммунитета (Kubicek et al., 2001; Wao, 2002).

Биотехнологические проблемы создания препаратов на основе грибов р. *Trichoderma* для растениеводства

Несмотря на то, что различные штаммы микроорганизмов интенсивно изучаются в качестве перспективных продуцентов биопрепаратов, коммерческое применение имеют в течение последних десятилетий только несколько штаммов-антагонистов из родов *Bacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Chaetomium* и *Trichoderma* (Estrella, Chet, 1998; Hebar, 1999; Зазимко и др., 1999; Маслиенко, 2005; Справочник пестицидов и агрохимикатов..., 2005). Обобщение существующих подходов к получению биопрепаратов на основе живых клеток (бактерий, грибов и вирусов) предложена следующая схема возможных биотехнологических приемов (рисунок 1) (Jackson, 2000).

Для грибов р. *Trichoderma* наиболее разработанными являются технологии получения ферментов на основе различных штаммов вида *T. reesei* (Holtzapfle et al., 1990; Margolles-Clark et al., 1997; Andreaus et al., 1999; Dominigues et al., 2001; Olsson et al., 2003). Особенностью этих технологических решений является то, что конечным продуктом является метаболит, синтезируемый штаммом-продуцентом. Главной задачей в этом случае является получение фермента (или антибиотика); культура гриба является как бы «биореактором», синтезирующим нужный продукт. По окончании процесса культивирования биомасса штамма-продуцента подлежит утилизации.

Впервые препарат на основе живых клеток *T. harzianum* был применен около сорока лет назад для борьбы со *Sclerotium rolfsii* Sacc. арахиса (Backman, Rodrigues-Kabana, 1975). Затем препараты на основе грибов рода *Trichoderma* были разработаны и применяются в России (триходермины), США, Израиле, Новой Зеландии, странах Европы (таблица 4).

Препараты производят на основе штаммов грибов *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. polysporum* (Koch, 1999; Monte, Llobell, 2003). Их используют против грибных фитопатогенов, поражающих тепличные (Петрухина, 1981; Kubota, 1993; Hoynes et al., 1999), полевые (Harman, Nadar, 1990), плодово-ягодные (Elad, 1994, Hunt, Gale, 1995), древесные (Ricard, 1981; Labudova, Gogorova, 1988; Samuels, et al., 2000), и декоративные культуры, а также для защиты плодов от гнилей (Tronsmo, 1986, 1989, 1991). В нашей стране на основе грибов рода *Trichoderma* разработана серия препаратов типа «триходермин», предназначенных для защиты растений от широкого спектра фитопатогенов (Тулемисова, 1990; Твердюков и др., 1993; Третьяков и др. 1993; Тюльпанова и др. 1997, Титова и др., 2002; Громовых, 2002; Новикова, 2005).

По оценкам зарубежных специалистов с 1984 г. наблюдается ежегодный прирост рынка биопрепаратов на 4–5%. Затраты ведущих химических фирм США, Великобритании, ФРГ, Дании, Нидерландов, Бразилии на разработку технологий получения биопрепаратов составляют 2,5–12,5% общих расходов компаний.

Первые препараты для коммерческого использования изготавливали на твердом носителе – торфе, соломе, зерне (таблица 5).

Используя обогащенные мелассой гранулы известняка в качестве питательного субстрата и носителя для развития антагониста, Бэкман и Родригес-Кабана разработали систему защиты растений от болезней, вызываемых почвенными патогенами (Backman, Rodriguez-Kabana, 1975). Диспергирование питательных веществ в почву облегчалось благодаря использованию из-

Таблица 4
Препараты на основе грибов, зарегистрированные как биофунгициды
(Mendelson et al., 1994; Fravel, Larkin, 1996; Biopesticides, 1999; Koch, 1999; Fungi as biocontrol agents, 2001)

Гриб-антагонист	Вредный объект(ы)/активность	Болезнь/хозяин	Название продукта и производитель
	Почвенные и корневые инфекции		
<i>Coniothyrium minitans</i>	<i>Sclerotinia minor</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Защита овощных и полевых культур	Contans WG (Prophyta Biologischer Planzenschultz GmbH, Германия)
		Тепличные растения	KONI (Bioved Ltd, Szigetszentmiklos, Венгрия)
<i>Trichoderma virens</i> (<i>Gliocladium virens</i>)	<i>Pythium ultimum</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i>	Повреждения рассады	SoilGard (GL-21), ранее GlioGard (Thermo Trilog, Columbia, Maryland, США)
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Fusarium spp</i> ; <i>P. ultimum</i> ; <i>R. solani</i> ; <i>Sclerotinia homeocarpa</i>	Разнообразные культуры	T-22G, T-22 Planter Box, Bio-Trek и Root Shield (Bio-Works Inc., Geneva, New York, США)
	Различные грибные патогены		Supresvit (Bortegaard and Reitzel, Дания, или Fytovita, Чешская Республика)
<i>T. harzianum</i> + <i>T. polysporum</i>	Различные грибные патогены корней	Тепличные культуры, древесные	VINAB-T WP (Bio-Innovation Eftf AB, Bredholmen, Швеция) или Svenska Predator AB, Швеция; или Bayer, Швеция)
<i>Trichoderma viride</i>	<i>F. sp.</i> ; <i>Pythium sp.</i> ; <i>Rhizoctonia sp.</i> ; <i>Macrophomina phaseolina</i> ; <i>Phytophthora sp.</i>	Хлопок, бобовые, подсолнечник, табак, овощные культуры	Ecofit (Hochst Schering AgrEvo Ltd, Chakala, Индия)
<i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium spp.</i>	Различные культуры	Trichoderma 2000 (Muscotrol (EfA1) Ltd, Израиль)
<i>T. koningii</i> и <i>T. harzianum</i>	Грибные патогены	Овощные, рассада, различные фруктовые и зерновые, тропические и декоративные	TRI – D25 (JH Biotech, Inc., США)
<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia spp.</i>	Цветочные, декоративные, бордюрные, овощные культуры	Bio-Fungus (ранее Anti-Fungus) и Antagon (De Ceuster Meststoffen N.V. (DCM)) (De Ceuster Meststoffen N.V.) – BELGIUM

Антагонист	Вредный объект(ы) /активность	Болезнь/хозяин	Название продукта и производитель
		Воздушные инфекции	
<i>Aspergillus quisqualis</i>	Мучнистая роса	Бордюрные растения, виноград, декоративные, земляника, томаты,	AQ10 Biofungicide (Ecogen Inc., Langhorne, Пенсильвания, США)
<i>Peniophora (Phlebiopsis) gigantea</i>	<i>Heterobasidium annosum</i>	Стволовые и корневые гнили ели	Pg suspension (Omex Environmental Ltd UK) и Rotstop (Kemira Agro Oy, Хельсинки, Финляндия)
<i>T. harzianum</i>	<i>Botrytis cinerea</i> и другие воздушные патогены	Огурец, виноград, нектарин, соя, земляника садовая, подсолнечник, томаты	Trichodex (Makhteshim Chemical Works Ltd, Израиль), а также некоторые Европейские компании
<i>T. harzianum</i>	Грибные патогены	Широкий спектр культур	Trichopel (Agrimm Technologies Ltd., Новая Зеландия)
<i>T. harzianum</i> + <i>T. viride</i> (смесь)	<i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora</i> spp.	Тепличные культуры	Promote/Promot Plus (JH Biotech Inc., США)
<i>T. harzianum</i> + <i>T. viride</i> (смесь) + <i>T. polysporum</i>	Грибные патогены	Тропические и овощные культуры	Trisan (Applied Chemicals, Таиланд)
<i>T. harzianum</i> + <i>T. viride</i> (смесь) + <i>T. polysporum</i>	<i>B. cinerea</i>	Земляника садовая	VINAV-T WP (Bio-Innovation Eftf AB, Bredholmen, Швеция; или Svenska Predator AB, Швеция; или Вауег, Швеция)
<i>T. harzianum</i> + <i>T. viride</i> (смесь)	<i>Chondrostereum purpureum</i> ; <i>Eutypa</i>	Болезнь «серебряных» и хлоротичных листьев, а также курчавость косточковых и винограда	Trichodowels, Trichoject and Trichoscal (Agrimm Biologicals Ltd, и Новая Зеландия)
	<i>C. purpureum</i>	Болезнь «серебряных» листьев семечковых и косточковых деревьев	
		Защита запасов	
<i>Candida oleophila</i>	<i>Botrytis</i> spp.; <i>Penicillium</i> spp.	Гнили фруктов при хранении	Aspire (Ecogen Inc., Pennsylvania, США)
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>B. cinerea</i> ; <i>Penicillium expansum</i>	Гнили яблок и персиков	YieldPlus (Anchor Yeast, Cape Town, Южная Африка)

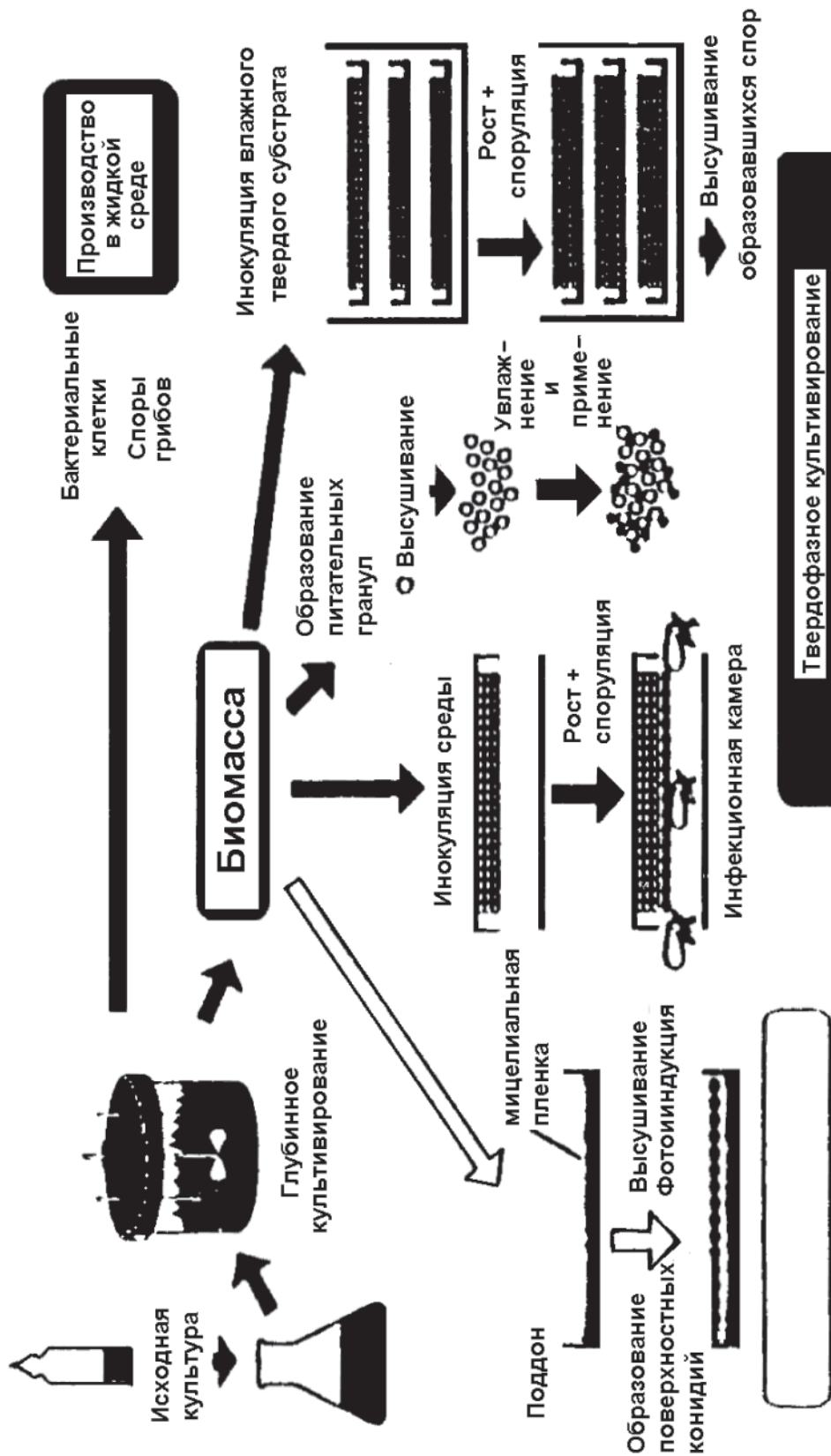


Рисунок 1. Схема биотехнологических методов производства биопрепаратов на основе живых микробных культур (Jackson, 2000)

вестняка. Для эффективной защиты арахиса от *Sclerotium rolfsii* на 1 га требовалось 140 кг гранул, содержащих *Trichoderma*.

В качестве субстрата для роста и споруляции *T. harzianum* Хадар с сотрудниками использовали пшеничные отруби (Hadar et al., 1979). Этот препарат (в расчете на сухую массу) содержал 3×10^9 конидий/г. Через 6 месяцев хранения при 4°C при комнатной температуре жизнеспособными оставались 80% конидий *T. harzianum*. Дальнейшее улучшение ростовой среды было достигнуто в результате смешивания торфа и пшеничных отрубей (Sivan et al., 1984). Благодаря применению данного препарата оказалось возможным подавить рост ряда почвенных патогенов (Chet, 1987; Smith et al., 1990). Однако через 1 год хранения при 25°C титр жизнеспособных пропагул гриба снижался на порядок: с 4×10^9 до 4×10^8 КОЕ/г среды.

В другом способе в качестве твердого питательного субстрата использовали проавтоклавированный в пластиковых упаковках ячмень (Tribe, Ahmed, 1975). Зерно имело большую поверхность, и на 15 день при оптимальной влажности гриб продуцировал 5×10^8 спор/г субстрата. Эта технология наработки спор была успешно испытана для штаммов *T. harzianum* P1 и *T. harzianum* 107 (Tronsmo, 1986, 1989, 1991). Однако подобный подход оказался неприемлемым для другого штамма *T. harzianum* 1295-22, который не спорулировал при таких условиях (Tronsmo, 1995).

Последний пример убеждает в необходимости разработки технологий производства для каждого конкретного штамма микромицетов р. *Trichoderma*.

В процессе культивирования грибов-антагонистов Папавизас с сотрудниками в качестве «носителей биоконтроля» выбрали хламидоспоры (Lewis, Papavizas, 1983). Они разработали систему жидкостной ферментации, не требующую сложных ферментационных установок (Papavizas et al., 1984). Через 15 дней инкубации при помешивании им удалось наработать максимальный урожай биомассы с большим количеством хламидоспор таких культур как *Trichoderma hamatum*, *T. harzianum*, *T. viride* и *T. virens*. После ферментации биомассу смешали с альгинатом, погрузив полученную смесь в CaCl_2 для получения гранул (Lewis, Papavizas, 1985).

В настоящее время препарат, содержащий альгинатные гранулы с хламидоспорами гриба, зарегистрирован Службой Защиты Окружающей Среды США (EPA USA) в качестве препа-

рата против почвенных патогенов тепличных растений (Lumsden et al., 1991). Технология получения гранул имеет различные модификации, например, гранулы получают, смешивая порошок растительного клея, высушенные споры гриба, и растительное масло (Levis et al., 1998).

Поскольку штаммы 107, P1 и 1995-22 *T. harzianum* при описанных условиях продуцируют очень небольшое количество конидий и хламидоспор, этот метод ферментации оказался не подходящим при приготовлении препаратов на их основе (Tronsmo, 1995).

Наиболее оптимальным способом коммерческой наработки биопрепаратов является жидкостная ферментация в крупных промышленных ферментерах. Этот подход считается более технологичным, т.к. контролируемые условия процесса ферментации позволяют получать стандартизированный конечный продукт (Mendelsohn, et al., 1994). Кроме того, культивирование в закрытых аппаратах является более экологичным процессом, исключая попадание штамма-продуцента (и его метаболитов) в воздух рабочей зоны.

Разработкой глубинных технологий производства препаратов на основе грибов р. *Trichoderma* занимались различные группы исследователей в разных странах, начиная с середины 80-х годов (Papavizas et al., 1984; Tabachnik, 1989; Harman et al., 1991; Tronsmo, 1995; Lewis et al., 1996).

Исследования российских (советских) ученых в этой области начались в ВИЗР Н.С. Федоринчиком и М.Т. Петрухиной в 80-х годах (Федоринчик и др., 1975; Петрухина, 1981; Воронкова и др., 1981), затем были продолжены Н.Н. Гринько, (1998, 2004), Т.А. Нугмановой (2005) и И.И. Новиковой (2005) и Л.В. Коломбет (1994, 2001).

Исследованиями, проведенными на кафедре микологии и альгологии МГУ, показано, что различные штаммы по-разному реагируют на необычные для этих грибов условия культивирования. В ряде случаев культура гриба не проходит всех стадий онтогенеза (фиалоконидии не образуются), но даже при наличии конидиогенеза, клеточная стенка фиалоконидий при глубинном культивировании морфологически отличается от клеточной стенки конидий при поверхностном культивировании (Шарова, 1981; Горленко и др., 1982; Шарова, Высоцкий, 1983).

При культивировании в жидкой среде гриб образует пропагулы 3 типов: мицелий, хламидоспоры и фиалоконидии. При подборе благоприятных условий культивирования количество «глубинных» фиалоконидий значительно пре-

вышает количество образовавшихся хламидоспор. Обычно конидии хорошо продуцируются в условиях обильной аэрации. Это удалось осуществить в лаборатории Хармена (Harman et al., 1991). Ученые разработали систему жидкостной ферментации конидий гриба *T. harzianum* 1295-22 в больших объемах. Однако, даже при избыточном синтезе конидий, лишь немногие конидии этого гриба переносят высушивание. Авторы усовершенствовали технологию, объединив жидкостную и твердофазную ферментации. При этом на твердом носителе происходило образование «поверхностных» конидий, которые значительно устойчивее к внешним факторам (в том числе и к высушиванию). Авторы констатировали, что для коммерческой наработки биопрепарата необходимо получение высокого урожая спор с длительной жизнеспособностью при определенной температуре окружающей среды. С учетом сказанного ими разработана технология производства прошедшего регистрацию коммерческого продукта на основе *T. harzianum* 1295-22.

Аналогичный подход был использован Lewis et al. (1991). Мицелий *T. hamatum* (TRI-4 и Tm 23) и *T. harzianum* (Th-87), полученный культивированием в жидкой среде смешивали с вермикулитом или размолотыми пшеничными отрубями. За 2–3 дня перед применением «активировали» препарат добавлением подкисленной воды.

Как оказалось, при обработке препаратом почвы и растений показатель количества жизнеспособных конидий не является существенным, важно лишь, чтобы препаративная форма содержала конидии, которые при благоприятных условиях (влажность и источники питания) прорастают и быстро накапливают биомассу гриба, которая начинает проявлять свою биологическую активность.

Ответом на вопрос: «Что может превратить потенциальный лабораторный штамм-продуцент биопрепарата в коммерчески эффективный продукт?» является создание препаративной формы (Connick et al., 1990).

Использование микробной биомассы в виде пасты в качестве биопрепарата предусматривает необходимость разработки методов стабилизации биопродукта для обеспечения сохранности его в течение необходимого периода времени.

Успешной разработкой препаративной формы считается такая ее разработка, при которой производство конечного продукта экономически выгодно, безопасно, экологично, легко осуществимо с помощью стандартного оборудования и эффективно в различных агроэкологических.

Препаративную форму продукта также характеризуют поддерживающие питательные субстраты и добавки для жидкостного опрыскивания. К биопрепаратам, содержащим живые культуры, обычно предъявляют следующие требования: они должны быстро заселять культурные растения и приспосабливаться к экоресурсам конкретного агробиоценоза. Для ускорения прорастания конидий в некоторых случаях в препаративную форму биопрепарата добавляют питательные субстраты (Danielson, Davey, 1973). В тоже время, питательные субстраты, вносимые вместе с препаратом в почву или на растение, могут способствовать развитию фитопатогенов (Harman, Nadar, 1990).

Чтобы избежать этого негативного эффекта целесообразным является использование питательной добавки, недоступной для патогенов и стимулирующей развитие антагониста. Подобный подход был использован российскими учеными при создании препаратов серии Хитозар Био, состоящие из мицелиальной и споровой массы гриба *T. viride* Т-36 и сухого хитин-хитозанового субстрата (Новикова и др., 2004). Эффективность использования хитина против *Cercospora arachidicola* на посевах арахиса показана также при совмещении его с *Bacillus cereus* (Kokalis-Burelle et al., 1992). Выводы авторов основаны на данных о том, что хитин является питательным субстратом, который доступен лишь некоторым грибам.

Таким образом, при разработке биопрепаратов на основе живых культур *Trichoderma* основной акцент делается на создании препаратов, содержащих споры (конидии, хламидоспоры). Тем не менее, Левис и Папавизас считают, что молодой мицелий *Trichoderma* более эффективен, чем конидии гриба, так как, он лучше приживается в почве и быстрее начинает проявлять свои антагонистические свойства (Lewis, Papavizas, 1985). Однако препарат, содержащий мицелий, трудно сохранить. Левис с соавторами предложили следующий подход: наработка в течение 2–3 суток в ферментере биомассы гриба, содержащей хламидоспоры (не конидии) (Lewis et al., 1998). Авторы считают, что мицелий их продуцента на этой стадии культивирования представляет собой молодые, физиологически активные клетки гифов. В эту биомассу стерильно добавляли вермикулит и отруби. Смесь увлажняли подкисленной водой и высушивали на воздухе. В такой форме препарат мог храниться до 1 года. Перед применением препарат увлажняли подкисленной водой и инкубировали 2–3 дня. Этот процесс называли «активацией». В этот период хламидоспоры прорастали и молодой ми-

Таблица 5

Этапы разработки препаратов на основе грибов р. *Trichoderma*

Год	Субстрат	Назначение	Ссылка
1975	Гранулированный известняк, пропитанный 10% мелассой (черной патокой). Проавтоклавированный ячмень	Против <i>S. rolfsii</i> на арахисе	Backman, Rodrigues-Kabana, 1975 Tribe, Ahmed; 1975
1979	Пшеничные отруби	Против почвенных возбудителей болезней	Nadar et al., 1979
1981	Хитин или стенки грибных клеток	Для покрытия семян. Увеличивает эффективность <i>T. hamatum</i> при обработке семян гороха и редиски	Harman et al., 1981
1983–1985	Компостируемая кора твердой древесины	Против почвенных патогенов	Nelson et al., 1983 Hotlnik, Kuter, 1985
1983	Предложил жидкий посев как систему доставки биконтрольного агента для обработки мелких семян овощных культур		Fisher et al., 1983
1984	Лигнин и барда в качестве субстрата роста и носителя <i>Trichoderma</i> Пшеничные отруби с торфом	<i>T. harzianum</i> против <i>Pythium aphanidermatum</i>	Sivan et al., 1984

целей рос на отрубях. Аналогичную активацию перед применением использовали, когда в составе препарата были гранулы целлюлозы.

Десятилетняя программа в Университете Линкольна (Новая Зеландия) по изучению грибов рода *Trichoderma* в качестве продуцентов биопрепаратов для защиты растений завершилась созданием двух коммерческих продуктов Trichodry™ 6S и Trichoflow™ 6S на основе изолята 6SR4 *T. hamatum* и препарата Trichopel™ Ali 52 на основе изолята C52 *T. atroviride* (McLean et al., 2004). Товарные формы препаратов представляют собой высушенные пластинки (Trichodry™ 6S), порошок (Trichoflow™ 6S) или гранулы (Trichopel™ Ali 52). Технология приготовления их представляет коммерческую тайну, скорее всего препараты содержат поверхностные конидии и метаболиты.

На основе проведенного цикла аналитических и многолетних экспериментальных исследований – от скрининга эффективного штамма-продуцента до рецептурной формы препарата и технологии его применения в производственных условиях нами предложена методология получения антигрибных биопрепаратов на основе мицелиальных грибов-антагонистов фитопатогенов (рисунок 2) (Коломбет, 2006).

Методология включает 5 основных блоков: многоуровневый скрининг штаммов, процесс культивирования штамма-продуцента, разработка рецептуры препарата, разработка технологий применения и Государственная регистрация. По окончании скрининга перспективный штамм-

продуцент биопрепарата должен обладать антигрибной активностью в отношении выбранных экономически значимых патогенов. Он не должен быть фитотоксичным по отношению к растениям, на которых планируется его применение, должен быть безвреден для теплокровных животных, охарактеризован по способности к культивированию в жидкой питательной среде. Экспериментальные образцы должны показать биологическую эффективность в вегетационных экспериментах на искусственном и естественном инфекционном фоне. Выбор компонентов питательной среды, их оптимизация, а также определение параметров культивирования осуществляется в многофакторных экспериментах. Целью этого блока исследований является получение максимально возможного количества биомассы при минимальных затратах сырьевых ресурсов. На этапе создания рецептуры препарата необходимо выбрать форму биомассы (конидии, мицелий, хламидоспоры) и путем варьирования ингредиентов обеспечить ее стабильность при определенных условиях хранения и применения. При разработке технологий применения необходимо учитывать также физиологические свойства штамма-продуцента, чтобы сохранить его жизнеспособность. Завершающим этапом является прохождение Государственной регистрации и включение нового препарата (имеющего зарегистрированную в Патентном ведомстве торговую марку) в Государственный Каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации.

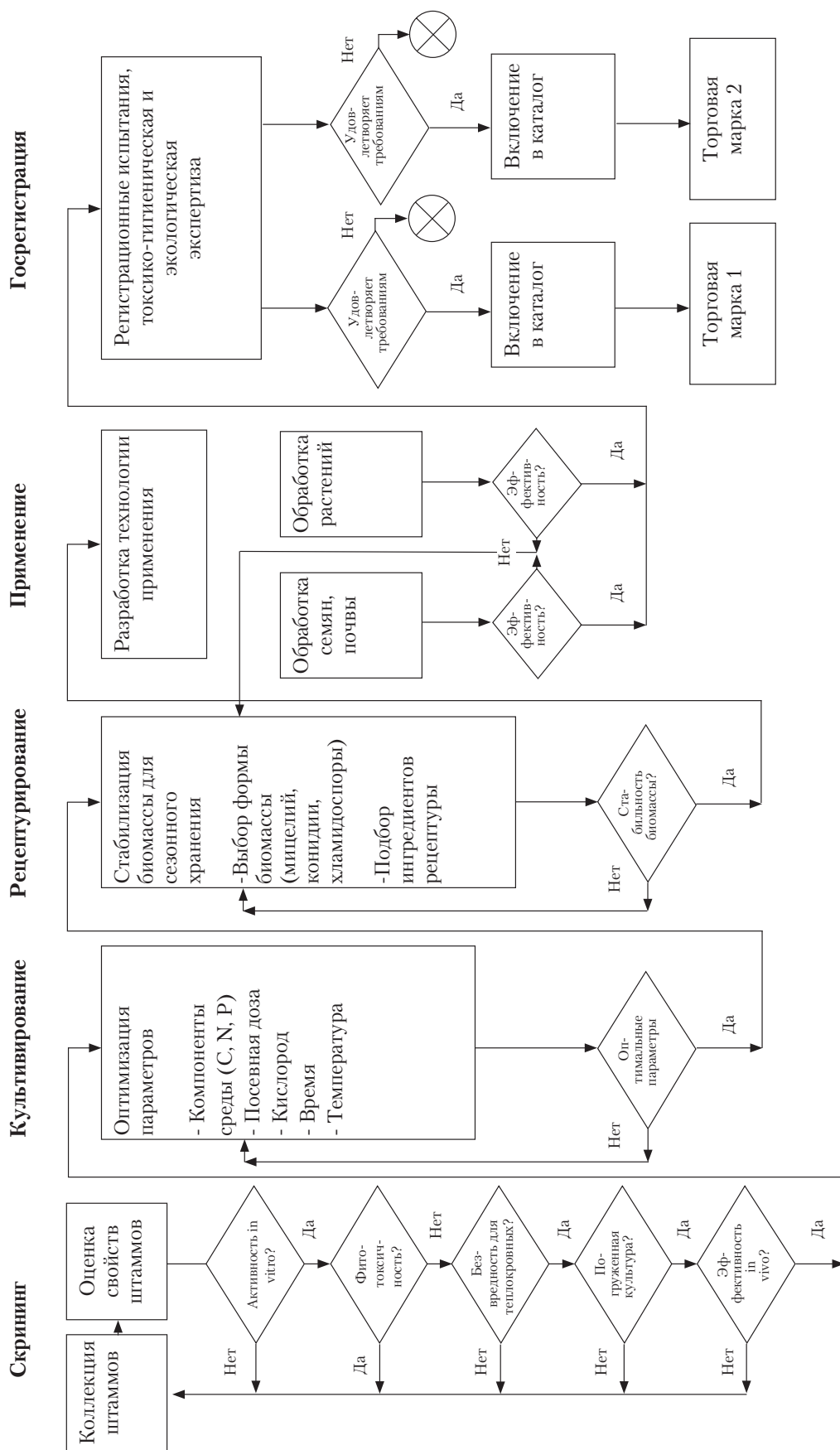


Рисунок 2. Методология получения биопрепаратов на основе микромицетов (концептуальная блок-схема)

Список литературы

- Александрова, А.В.* Род *Trichoderma* Pers.: Fr. // Новое в систематике и номенклатуре грибов: сборник; под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В.Сергеева. – М.: Национальная академия микологии. – 2003. – С. 219-276.
- Александрова, А.В.* Исторический обзор и современная система рода *Trichoderma* Pers.: Fr. (Eumycota, Deuteromycotina, Nuyphomycetes) / А.В. Александрова, Л.Л. Великанов, И.И. Сидорова // – Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38, вып.1. – С. 3-19.
- Бекмаханова, Н.Е.* Результаты исследования и применения триходермина против бактерициоза сои / Н.Е. Бекмаханова, А.К. Успанов, З.И. Ахметова // Тезисы докл. науч. конф. “Проблемы создания и применения микробиологических средств защиты растений”, 16-18 мая, Велегож. – 1989. – С. 252.
- Билай В.И.* Микроскопические грибы-продуценты антибиотиков. – Киев: Изд-во АН УССР, 1961а. – 184 с.
- Билай В.И.* О природе антагонистических свойств триходермы и использования ее в борьбе с заболеваниями сельскохозяйственных растений // Труды I-й Всес. конф. по изучению и применению антибиотиков в растениеводстве. – Ереван: Изд-во АН Арм. ССР, 1961б. – С. 125-132.
- Биопестициды: использование и способы применения; под ред. Ф.Р. Холл, Д.Д. Менн. – Тотова, – Нью-Джерси. Хуман Пресс Инк. – 1999. – 626 р. – Рецензия // Агрехимия. – 2000. – №5. – С. 85 – 91.
- Буймистру Л.Д.* Использование триходермина в комплексной защите рассады овощных культур от вредителей, болезней и сорняков / Л.Д. Буймистру, Н.И. Леонтьян, П.И. Леонтьян // Естественные враги насекомых-фитофагов: сборник. – Киев: Штиинца, 1986. – С. 48-52.
- Великанов Л.Л.* Микробиологические средства защиты растений – Л.Л. Великанов, И.И. Сидорова // Итоги науки и техники. – М.: ВИНТИ, 1988а. – Т.6. – С. 75-83.
- Великанов Л.Л.* Сравнение гиперпаразитической и антибиотической активности изолятов рода *Trichoderma* Pers.: Fr. и *Gliocladium virens* Miller, Giddens et Foster по отношению к патогенам, вызывающим корневые гнили гороха / Л.Л. Великанов, Е.Ю. Сухоносенко, С.И. Николаева, И.А. Завелишко // Микология и фитопатология. – 1994. – Т. 28, вып. 6. – С. 52-56.
- Великанов Л.Д.* Роль грибов в формировании мико и микробиоты почв естественных и нарушенных биоценозов и агроценозов: дис. д-ра биол. наук. – М.: 1997. – 547 с.
- Великанов Л.Л.* Пространственное распространение грибов рода *Trichoderma* в почвах Звенигородской биологической станции МГУ (Московская область) / Л.Л. Великанов, И.И. Сидорова, Салах Курини // Микология и фитопатология. – 1999. – Т. 33, вып. 2. – С.101-106.
- Воронкова Е.И.* Разработка технологии производства триходермина / Е.И. Воронкова, Н.Т. Петрухина, Г.А. Савицкая // В сб. науч. тр.: “Препараты микробиологического синтеза сельскому хозяйству”, 1981. – С. 38-41.
- Гаузе Г.Ф.* Изыскание новых антибиотиков из группы циклоспоринов / Г.Ф. Гаузе, Л.Н. Терехова, Т.С. Максимова // Антибиотики. – 1983. – Т. 28, вып. 4. – С. 243-245.
- Голованова Т.И.* Микроорганизмы – антагонисты и ростовые процессы растений. // Молекулярные механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений: фундаментальные и прикладные аспекты / Материалы Всероссийской конф., 15-17 июня 2005 г., Саратов. – 2005. – С. 41-42.
- Губкин В.Н.* Предпосевная обработка семян моркови биопрепаратами / В.Н. Губкин, З.Н. Дудина, Г.Ф. Першина // Использование грибов рода *Trichoderma*: сб. науч. тр. / Всерос. НИИ селекции и семеноводства овощных культур. – 1998, вып.36. – С. 94-98.
- Громовых Т.И.* Фитопатогенные микромицеты сеянцев хвойных в Средней Сибири: видовой состав, экология, биологический контроль: дис. на соискание ученой степени д-ра биол. наук. – Красноярск. – 2002. – 334 с.
- Гринько Н.Н.* Бирегуляция популяций фузариий (на примере овощных культур защищенного грунта) / Н.Н. Гринько, Т.В. Стрижак // Производство экологически безопасной продукции растениеводства: региональные рекомендации; Под ред. М.С. Соколова и Е.П. Угрюмова. – Пущино – 1998. – Вып. 4. – С. 87-90.
- Гринько Н.Н.* Биотехнологические аспекты культивирования штамма *Trichoderma harzianum* Rifai ВКМ F-2477Д // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2004. – № 1. – С. 57-61.
- Ермекова Б.Д.* Почвенные грибы и обыкновенная корневая гниль колосовых зерновых. – Алмата: Наука, 1988. – 144 с.
- Егоров Н.С.* Микробные ингибиторы ферментов биосинтеза и этерификации холестерина / Н.С. Егоров, Н.А. Баранова, И.Г. Крейер // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – № 5. – С.38-44.
- Зазимко М.И.* Новые биопрепараты для защиты колосовых культур / М.И. Зазимко, Л.Д. Жалиева, Л.В. Маслиенко // Защита и карантин растений. – 1999. – № 2. – С. 27.
- Илларионова И.А.* Микромицеты рода *Trichoderma* как средство биозащиты белокачанной капусты в республике Татарстан: автореферат дис... на соискание ученой степени канд. биол. наук. – 2002. – Казань. – 20 с.

Коломникова В.И. Влияние триходермина на численность возбудителей корневых гнилей в почве / В.И. Коломникова, М.М. Трушко, Н.И. Рыжова // Защита растений. – 1995. – № 3. – С. 19.

Коломбет Л.В. Глубинная технология производства микофунгицида на основе грибов *Trichoderma viride* / Л.В. Коломбет, В.В. Дербышев, Р.А. Степанова, Д.В. Ежов, О.В. Дианова // Материалы международной науч.-практ. конф. «Производство и применение биологических средств защиты растений от вредителей и болезней», 12-16 сент. 1994 г., Одесса. – 1994. – С. 139.

Коломбет Л.В. Изучение Микофунгицида на основе *Trichoderma viride* – препарата для борьбы с болезнями растений / Л.В. Коломбет, С.К. Жиглецова, В.В. Дербышев, Д.В. Ежов, Н.И. Косарева, Е.В. Быстрова // Прикладная биохимия и микробиология, 2001. – Т. 37, №1. – С. 110-114.

Коломбет Л.В. Научное обоснование и практическая реализация технологии создания грибных препаратов для защиты растений от болезней: дис... на соискание ученой степени д-ра биол. наук. – Москва. – 2006. – 353 с.

Кривошекова Т.Г. Эффективность триходермина / Т.Г. Кривошекова, В.С. Мищенко // Защита растений. – 1990. – № 11. – С. 22.

Лернер Л.Е. Биологическая активность микофильных грибов и их взаимодействие с грибами в культуре: автореф. дис... канд. биол. наук. – М.: Изд-во МГУ, 1977. – 22 с.

Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. М.: Наука, – 1967. – С. 140-185.

Лихачев А.Н. Использование *Trichoderma viride* для защиты зерновых культур от корневых гнилей и земляники от серой гнили / А.Н. Лихачев, Б.В. Буров // Международная научно-практическая конференция “Актуальные вопросы агроэкологии в интегрированных системах защиты растений”: сб. материалов. – Пенза, 1999. – С. 55-57.

Маркович Н.А., Кононова Г.Л. Литические ферменты *Trichoderma* и их роль при защите растений от грибных болезней (обзор). 2003. Прикл биохимия и микробиология. том 39. №4. стр. 389-400.

Марунов А. Соотношение основных систематических групп почвенной микрофлоры и взаимоотношение их с *V. dahliae* и *T. lignorum* в светлом сероземе под хлопчатником // Перспективные методы защиты хлопчатника, предотвращающие загрязнение внешней среды. Труды / САНИИЗР. – Ташкент, 1981. – Вып. 15. – С. 43-46.

Маслиенко Л.В. Обоснование и разработка микробиологического метода борьбы с болезнями подсолнечника // автореф. дис... на соискание ученой степени д-ра биол. наук. – Краснодар. – 2005. – 48 с.

Мирчинк Т.Г. Почвенные грибы как компонент биогеоценоза // Почвенные микроорганизмы как компонент биогеоценоза. – М.: Наука, 1984. – С. 114-131.

Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. – М.: Изд-во МГУ, 1988. – 220 с.

Новикова И.И. Испытание новых биопрепаратов в борьбе с фузариозом колоса / И.И. Новикова, В.Г. Иващенко, Г.В. Калько, И.В. Бойкова, Л.А. Назаровская, А.И. Литвиненко // Микология и фитопатология. – 1994. – Т. 28, вып. 1. – С. 70-75.

Новикова И.И. Разработка методов совместного применения микробов-антагонистов и дериватов хитина – индукторов устойчивости с целью создания комплексной технологии защиты растений от болезней разной этиологии / И.И. Новикова, В.А. Павлюшин, С.Л. Тютерев, Э.В. Попова, И.В. Бойкова, Г.А. Быкова, Л.К. Хацкевич // Доклады РАС-ХН – 2004. – Вып. 6. – С. 17-24.

Новикова И.И. Биологическое обоснование создания и применения полифункциональных биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: автореф. дис... на соискание ученой степени д-ра биол. наук. – СПб. – 2005. – 45 с.

Нугманова Т.А. Разработка опытно-промышленной технологии производства биопрепарата на основе новых штаммов грибов рода *Trichoderma* для защиты корнеплодов от фитопатогенных инфекций в процессе длительного хранения / Т.А. Нугманова, М.Г. Осипова, Н.Р. Дядищев, А.А. Денисов, Л.В. Михина, и др. // Материалы IV семинара-совещания «Средства защиты растений, регуляторы роста, агрохимикаты и их применение при возделывании сельскохозяйственных культур», Анапа. – 2005. – С.83-85.

Пантелеев А.А. Применение микробов-антагонистов и продуктов их метаболизма в борьбе с вилтом хлопчатника / А.А. Пантелеев, З.С. Багирова // Актуальные вопросы защиты растений: материалы Всесоюзного закавказского совещания по координации научно-исследовательских работ по защите растений, ноябрь, 1988. – Кировабад – С. 36-37.

Петрухина М.Т. Производство и применение микробиологических препаратов для борьбы с болезнями растений // Препараты микробиологического синтеза – сельскому хозяйству. М:1981. – С. 3-11.

Понировский В.Н. Влияние грибов рода *Fusarium solani* (Mart) App. et Wr. и *Trichoderma lignorum* Harz. на укоренение черенков розы в условиях искусственного тумана / В.Н.Понировский, Н.П. Стрижак // Совершенствование методов защиты с.-х. культур от вредителей и болезней. – Харьков, 1982. – С. 68-71.

- Пидопличко Н.М.* Грибная флора грубых кормов. – Киев: Наукова думка, 1953. – С. 181-183.
- Рудаков, О.Л.* Микофильные грибы, их биология и практическое значение. – М.: Наука, 1981. – 158 с.
- Рудаков О.Л.* Проблемы и перспективы использования гиперпаразитов и антагонистов в защите растений от инфекционных заболеваний. Микробиологические средства защиты растений. – Кишинев, Штиинца, 1986, С. 29-33.
- Рудаков В.О.* Физиологическая вариабельность штаммов триходермы / В.О. Рудаков, И.В. Макаренко // Гавриш. – 2002. – № 5. – С. 17-19.
- Сейкетов, Г.Ш.* Грибы рода *Trichoderma* и их использование в практике. – Алма-Ата: Наука, 1982. – 248 с.
- Спайк Г. Rhizobiaceae.* Молекулярная биология растений, взаимодействующих с растениями / Г. Спайк, Ф. Кондрози, П. Хукас. – СПб. – 2002. – 567 с.
- Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации / Выпуск 9. – М: Агрорус. – 2005. – С. 589.
- Сидорова, И.И.* Биологические методы борьбы с фитопатогенными грибами // Итоги науки и техники. Защита растений. – М.: ВИНТИ, 1980. – № 2. – С. 116-157.
- Симочкина В.И.* Использование гриба триходермы в борьбе с корневой гнилью огурцов в закрытом грунте / В.И. Симочкина, А.К. Успанов, Н.Е. Бекмаханова // Известия АН Казах. ССР. – Алма-Ата: Наука, 1988. – № 15. – С.149.
- Сычев П.А.* Антагонистические свойства *Trichoderma viride* по отношению к некоторым патогенам *Cucumis sativum* L / П.А. Сычев, Ю.А. Шапошник // Микология и фитопатология. – 1982. – Т. 16, вып. 2. – С. 151-159.
- Тарунина Т.А.* Влияние *Trichoderma lignorum* Tode ex Harz. на *Fusarium oxysporum* Schlecht. и *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. в стерильной почве // Микология и фитопатология. – 1982. – Т. 16, вып. 6. – С. 536-538.
- Тарчевский И.А.* Патоген-индуцируемые белки растений // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 5. – С. 517-532.
- Твердюков А.П., Никонов П.В., Ющенко Н.П.* Триходермин // Защита раст., 1993. – № 6. – С. 40.
- Твердюков, А.П.* Биологическая защита томатов в закрытом грунте // Защита и карантин растений. – 1998. – № 1. – С. 41.
- Тешабаева Р.* Применение грибов-антагонистов в борьбе с вилтом хлопчатника // Перспективные методы защиты хлопчатника, предотвращающие загрязнения внешней среды / Труды САНИИЗР. – Ташкент. – 1981. – Вып. 15. – С. 79-82.
- Титова Ю.А.* Триходермин на основе вторичной биоконверсии отходов и его эффективность против болезней огурца / Ю.А. Титова, И.И.Новикова, Л.Б. Хлопунова, Д.В Коршунов // Микология и фитопатология. – 2002. – Т.36, вып. 4. – С. 76-80.
- Тулемисова К.А.* Антагонизм и гиперпаразитизм *Trichoderma lignorum* к фитопатогенным грибам / К.А. Тулемисова, А.К. Успанов // Вестник АН Казах. ССР. – 1986. – № 12. – С. 47-51.
- Тулемисова К.А.* Микробиологические методы защиты растений // Вестник АН Казах. ССР. – 1990. – № 6. – С. 29-36.
- Тиунова Н.А.* Биосинтез β -глюканаза и хитиназы в культуре микофильного штамма *Trichoderma viride* / Н.А. Тиунова, Н.М. Жлоба, И.И. Сидорова // Микробиология. – 1983. – Т. 52, вып. 5. – С. 723-728.
- Тюльпанова В.А.* Биотехнология новых форм грибных фунгицидов для защиты растений / В.А. Тюльпанова, Т.И. Громовых, А.Л. Малиновский, Т.Л. Козлова, И.А. Арефьева, И.А. Шипилова // Сибирский экологический журнал, 1997. – № 5. – С. 495-500.
- Федоринчик Н.С.* Глубинный способ выращивания гриба *Trichoderma lignorum* Harz / Н.С. Федоринчик, Т.А Тарунина, Л.Я. Рунковская // Тр. ВИЗР. – 1975. – № 2. – С. 151-160.
- Хакимов А.Х.* Итоги исследований САНИИЗР по применению триходермы против вертициллеза // Перспективные методы защиты хлопчатника, предотвращающие загрязнения внешней среды / Труды САНИИЗР. – Ташкент. – 1981. – Вып. 15. – С. 91-94.
- Шарова М.Б.* К сравнительно-морфологическому изучению спор гриба *Trichoderma* растений // Препараты микробиологического синтеза – сельскому хозяйству. М:1981, с. 133-136.
- Шарова М.Б., Высоцкий В.В.* Электронно-микроскопическое изучение *Trichoderma viride* Fr. // Микол. и фитопатол., 1983. – Т. 17. – Вып. 4. – С. 296-301.
- Шкляр Т.Н.* К вопросу о систематике и физиологических функциях грибов из рода *Trichoderma* // Доклад ТСХА. – 1957. – Т. 29. – С.68-77.
- Штейнберг М.Е.* Сравнительная характеристика некоторых изолятов *Gliocladium* – биологических агентов в борьбе с белой гнилью подсолнечника / М.Е. Штейнберг, И.А. Завелишко // Микробиологический журнал. – 1988. – Т. 50. – № 6. – С. 63-64.
- Шемшур О.Н.* Структурные и метаболические особенности аспорогенной культуры гриба триходерма: автореферат дис... канд. биол. наук / Ин-т микробиологии и вирусологии АН Казах. ССР. – Алма-Ата. – 1991. – 20 с.

- Abbott E.V.* Taxonomic studies on soil fungi. Iowa: St. Coll // J. Sci. – 1926. – P.15-36.
- Abdullah F.* Application of *Trichoderma harzianum* in the control of basal stem rot of oil palms / F. Abdullah, G.N.M. Ilias // J. of Zhejiang University Agriculture and life sciences Proceedings of Eighth International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*. – 2004. – Vol. 30, N 4. – P. 391.
- Adler T.* Discovering the sexy side of valued fungi // Science News. – 1996. – Vol.149, N. 8. – P. 118.
- Andreas J.* Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulose enzymes / J. Andreas, H. Azevedo, A. Cavaco-Paulo // J. Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 1999. – Vol. 7. – P. 233-239.
- Ahmed A.S.* Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation / A.S. Ahmed, C.P.Sanchez, M.E. Candela // Eur. J. Plant Pathol. – 2000. – Vol. 106. – P. 817-824.
- Antal Z.* Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species / Z. Antal, L. Manczinger, G. Szakas, R.P.Tengerdy, L. Ferenczy // Mycol. Res. – 2000. – Vol. 104. – P. 545-549.
- Antal Z.* Complete DNA sequence and analysis of a mitochondrial plasmid in the mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain T95 / Z. Antal, L. Manczinger, L. Kredics, F. Kevei, E. Nagy // Plasmid. – 2002. – Vol. 47. – P. 148-152.
- Al-Heeti M.B.* Antagonism between *Gliocladium roseum*, *Trichoderma harzianum* or *Trichothecium roseum* and *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* / M.B. Al-Heeti, J.B. Sinclair // Mycopathologia. – 1988. – Vol. 103, N 3. – P. 135-140.
- Altomare C.* Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 / C. Altomare, W. A. Norvell, T. Björkman, G. E Harman // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – P. 2926-2933
- Bae Y.S.* Soil biomass influence on growth and biological efficacy of *Trichoderma harzianum* / Y.S. Bae, G.R. Knudsen // Biological Control. – 2005. – Vol. 32, N 2. – P. 236-242.
- Baek J.M.* The role of an extracellular chitinase from *T. virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* / J.M. Baek, C.R.Howell, C.M. Kenerley // Curr. Genet. – 1999. – Vol. 35, N 1. – P. 41-50.
- Bankole S.A. and Adebajo A.* Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride* / S.A. Bankole, A. Adebajo // Crop protection. – 1996. – Vol. 15. – N 7. – P. 663-636.
- Barak R.* Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii* / R.Barak, Y. Elad, D. Mirelman, I. Chet // Phytopathology. – 1985. – Vol. 75. – P. 458-462.
- Baker R.* The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. / R. Baker, Y. Elad, I. Chet // Phytopathology. – 1984. – Vol. 74. – P. 1019-1021.
- Baker R.* Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity // TIBTCH. – 1989. – Vol. 7. – P. 34-38.
- Baker B.* Signaling in plant-microbe interactions / B. Baker, P.Zambriski, B. Staskawicz, S.P.Dinosh-Kumar // Science. – 1997. – Vol. 276. – P. 725-733.
- Bakker P.A.H.M.* Understanding the involvement of rhizobacteria mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases / P.A.H.M. Bakker, L.X. Ran, C.M.J. Pieterse, L.C. van Loon // Can. J. Plant Pathol. – 2003. – Vol. 25. – P. 5-9.
- Becker H.* Sexual *Trichoderma* discovered // Agricultural Research. – 1996. – Vol. 44, N. 2. – P. 22.
- Balley B.A.* Ethylene biosynthesis inducing endoxylanase is translocated through the xylem of *Nicotiana tabacum* ov. *xanthi* plants / B.A.Balley, R.Taylor, J.F.D.Doan, J.D. Anderson // Plant Physiol. – 1991 – Vol. 97. – P. 1181-1185.
- Bailey B.A.* Название статьи / B.A. Bailey, R.D. Lumsden // *Trichoderma* and *Gliocladium*. – 1996. – Vol. 2. – P. 185-204.
- Beckman P.A.* A system for the Growth and Delivery of Biocontrol Agents to the Soil / P.A.Beckman, R. Rodriguez-Kabana // Phytopathology. – 1975. – Vol. 65. – P. 819-821.
- Benhamou N.* Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani* ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitism process / N. Benhamou, I. Chet // Phytopathology. – 1993. – Vol. 83, N 10 – P. 1062-1071.
- Benhamou N.* Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction / N.Benhamou, I. Chet. // Phytopathology. – 1996. – Vol. 86, N 4. – P. 405-416.
- Benhamou N.* Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber / N. Benhamou, C.Garand, A.Goulet // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68, N 8. – P. 4044-4060.
- Biopesticides: use and delivery / Ed. F.R. Hall, J.J. Menn. – Totowa. – New Jersey. Human Press Inc. – 1999. – 626 p.
- Bisby G.R.* *Trichoderma viride* Pers. et Fr. and notes on *Hypocrea* // Trans. Br. Mycol. Soc. – 1939. – Vol. 23, N. 2. – P. 149-168.
- Bissett J.* A revision of the genus *Trichoderma*. (I). Section *Longibrachiatum* sect. nov. // Can. J. Bot. – 1984. – Vol. 62. – P. 924-931.
- Bissett J.* A revision of the genus *Trichoderma*.

- (II). Infrageneric classification // *Can. J. Bot.* – 1991a. – Vol. 69. – P. 2357-2372.
Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*.
- (III). Section *Pachybasium* // *Can. J. Bot.* – 1991b. – Vol. 69. – P. 2373-2417.
Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*.
- (IV). Additional notes on section *Longibrachiatum* // *Can. J. Bot.* – 1991c. – Vol. 69. – P. 2418-2420.
Bissett J. *Trichoderma atroviride* // *Can. J. Bot.* – 1992. – Vol. 70, N 3. – P. 639 – 641.
Bolar J.P. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor / J.P. Bolar, J.L. Norelli, K.-W. Wong, C.K. Hayes, G.E. Harman, H.S. Aldwinckle // *Phytopathology.* – 2000. – Vol. 90, N 1. – P. 72-77.
Bostock R.M. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores / R.M. Bostock, R. Karban, J.S. Thaler, P.D. Weyman, D. Gilchrist. // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2001. – Vol. 107, N 1. – P. 103-111.
Brunner K. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and major relevance to biocontrol / K. Brunner, C.K. Peterbauer, R.L. Mach, M. Lorito, S. Zeilinger, C.P. Kubicek // *Curr Genet.* – 2003. – Vol. 43. – P. 289-295.
Brunner K. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance / K. Brunner, S. Zeilinger, Ciliento, S.L. Woo, M. Lorito, C.P. Kubicek, R.L. Mach // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2005. – Vol. 71, N 7. – P. 3959-3965.
Brogliè K.E. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solanii* / K.E. Brogliè, I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, S. Knowlton, C.J. Mauvals, R. Brogliè // *Science.* – 1991. – Vol. 254. – P. 1194-1197.
Bigirimana J. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum* // *Med. Fac. Landbouww Univ Gent* – 1997. – N 62. – P. 1007-1007.
Butt T.M. Fungal Biological control agents. Pesticide Outlook / T.M. Butt, L. Copping. – 2001. – N 11. – P. 186-191.
Brückner H. Trichotoxin A40. Purification by counter-current distribution and sequencing of isolated fragments / H. Brückner, W.A. König, M. Aydin, G. Jung // *Biochim Biophys Acta.* – 1985. – Vol. 827. – P. 51-62.
Bliss D.E. The destruction of *Armillaria* in citrus soils // *Phytopathology.* – 1951. – Vol. 41. – P. 665
Bolar J.P. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus *Venturia inaequalis* in transgenic apple plants / J.P. Bolar, J.L. Norelli, G.E. Harman, S.K. Brown, H.S. Aldwinckle // *Transgen. Res.* – 2001. – Vol. 10. – P. 533-543.
Bulat S.A. Up-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium* / S.A. Bulat, M. Lubeck, N. Mironenko, D.F. Jensen, P.S. Lubeck // *Mycol. Res.* – 1998. – Vol. 102. – P. 933-943.
Carson R. Silent spring. Houghton Mifflin Company. – 1962. – 304 p.
Caesar-TonThut T.C. Mechanisms of inhibition of *Cercospora beticola* by antagonistic *Trichoderma* species / T.C. Caesar-TonThut, R. T. Lartay // 8th International Congress of Plant Pathology. – Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 44.
Carisse O. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis* / O. Carisse, V. Pheilion, D. Rolland, J. Bernier // *Phytopathology.* – 2000. – Vol. 90, N 1. – P. 31-37.
Carsolio C. Characterization of ech42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism / C. Carsolio, A. Gutierrez, B. Jimenez, M. Van Montagu, A. Herrera-Estrella // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91, N 23. – P. 10903-10907.
Carsolio C. Role of the *T. harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism / C. Carsolio, N. Benhamou, S. Haran, C. Cortes, A. Gutierrez, I. Chet, A. Herrera-Estrella // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65, N 3. – P. 929-935.
Castle A. Morphological and Molecular Identification of *Trichoderma* Isolates on North-American Mushroom Forms / A. Castle, D. Speranzini, N. Rghei, G. Alm, D. Rincken // *Appl. and Environ. Micr.* – 1998. – Vol. 64, N 1. – P. 133-137.
Chang Y.C. Increased growth of plants in the presence of biological control agent *Trichoderma harzianum* / Y.C. Chang, R. Baker, O. Kledeid, I. Chet // *Plant Dis.* – 1986. – Vol. 70. – P. 145-148.
Chen C. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots / C. Chen, R.R. Belanger, N. Benhamou, T.C. Paulitz // *European J. of Plant Pathology.* – 1999. – Vol. 105. – P. 477-486.
Chet I. Chemical composition of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. / I. Chet, J. Henis, R. Mitchell // *Can. J. Microbiol.* – 1967. – Vol. 13. – P. 137-141.
Chet I. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani* / I. Chet, R. Baker // *Phytopathology.* – 1981. – Vol. 71. – P. 286-290.
Chet I. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. / I. Chet, G.E. Harman, R. Baker // *Microbial Ecology.* – 1981. – Vol. 7. – P. 29-38.
Chet I. *Trichoderma* – Application, mode of ac-

tion, and potential as a biocontrol agent of soil-borne plant pathogenic fungi // Innovative Approaches to Plant Disease Control. – New York. – 1987. – P. 137-160.

Chet I. Mycoparasitism – recognition, physiology and ecology // New directions in biological control. Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. – New York. – 1990. – P. 725-733.

Chet I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma-harzianum* / I. Chet, J. Inbar. // Microbiology-UK. – 1995. – Vol. 141. – P. 2823-2829.

Chet I. Mycoparasitism and lytic enzymes / I. Chet, N. Benhamou, S. Haran // *Trichoderma* and *Gliocladium*. – Taylor and Francis, London. – 1998a. – Vol. 2. – P. 153-172.

Chet I. Electrophoretic characterization of chitinases as a tool for the identification of *Trichoderma harzianum* strains / I. Chet, B.C. Daningehali, S. Haran, H. Schickler // *Mycological Research*. – 1998b. – Vol. 102. – P. 373-377.

Christen D. Microbial degradation of toxins as a biocontrol method for *Eutypa dieback* and *Esca* disease of grapes / D.Christen, E. Abou-Mansour, M. Tharin, R. Tabacchi, G. Defago // 8th International Congress of Plant Pathology. – Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 38.

Clarkson J.P. Biological control of *Allium* white rot by sclerotial degrading fungi / J.P. Clarkson, T. Paune, A. Meal, J.M. Whipps // 8th International Congress of Plant Pathology. – Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 34.

Cliquet S. Influence of Culture Conditions on Growth and Survival of Conidia of *Trichoderma* spp. Coated on Seeds / S. Cliquet, R.J. Scheffer // *Biocontrol science and technology*. – 1997. – Vol. 7. – P. 171-181.

Cohen-Kupiec R. Molecular characterization of a novel b-1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum* / R. Cohen-Kupiec, K.E. Broglie, D. Frisem, R.M. Broglie, I. Chet // *Gene*. – 1999. – Vol. 226. – P. 147-154.

Coley-Smith J.R. Control of bottom rot disease of lettuce (*Rhizoctonia solani*) using preparations of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* or *tolclofos-metyl* / J.R. Coley-Smith, C.J. Ridout, C.M. Mitchell, J.M. Lynch // *Plant Pathology*. – 1991. – Vol. 40. – P. 359-366.

Collins R.P. Characterisation of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers) / R.P. Collins, A.F. Halim // *J. Agricultural and Food Chemistry*. – 1972. – Vol. 20. – P. 437-438.

Connick jr W.J. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology / W.J. Connick jr., J.A. Lewis, P.C. Quimby jr. // In: New direction in biological control. Alternatives for suppressing agricultural pest and diseases. R.R Baker and P.E. Funn (ed.). – Alan R.

Liss, Inc. New York. – 1990. – P. 345-372.

Conway W.S. *Trichoderma harzianum*: a possible cause of apple decay in storage // *Plant Disease*. – 1983. – Vol. 67. – P. 916-917.

Corke A.T.K. Biocontrol of *Nectria galligena* infection of pruning wounds on apple shoots / A.T.K. Corke, T. Hunter // *Journal of Horticultural Science*. – 1979. – Vol. 54. – P. 47-55.

Corke A.T.K. Use of microorganisms to control plant diseases. In *Microbial control of insects, mites, and plant diseases* / A.T.K. Corke, J. Rishbeth // Academic Press. London. – 1981. – P. 717-735.

Dana M.M. Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum* / M.M. Dana, M.C. Limon, R. Mejias, R.L. Mach, T. Benitez, J.A. Pintor-Toro, C.P. Kubicek // *Curr. Genet* – 2001. – Vol. 38, N 6. – P. 335-342.

Danielson R.M. Effect of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma in vitro* / R.M. Danielson, C.B. Davey // *Soil Biology and Biochemistry* – 1973. – Vol. 5. – P. 517-524.

Datnoff L.E. Biological control of *Fusarium crown* and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* Biol. Control / L.E. Datnoff, S. Nemecek, K. Pamazny. – 1995. – Vol. 5. – P. 427-431.

Deane E.E. The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase BBA Protein Struct / E.E. Deane, J.M. Whipps, J.M. Lynch, J.F. Peberly // *Mol. Enzym.* – 1998. – Vol. 1383. – P. 101-110.

Deane E.E. Transformation of *Trichoderma reesei* with a constitutively expressed heterologous fungal chitinase gene / E.E. Deane, J.M. Whipps, J.M. Lynch, J.F. Peberly // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1999. – Vol. 24. – P. 419-424.

Delgado-Jarana J. Overproduction of b-1,6- glucanase in *T. harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH / J. Delgado-Jarana, J.A. Pintor-Toro, T. Benitez // *Biochim.Biophys. Acta*. – 2000. – Vol. 1481. – P. 289-296.

De Meyer G. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea* / G. De Meyer, J. Bigirimana, Y. Elad, M. Hofte // *Eur. J. Plant Pathol.* – 1998. – Vol. 104. – P. 279-286.

De La Cruz J. Isolation and characterization of the three chitinases from *Trichoderma harzianum* / J.De La Cruz, A. Hidalgo-Gallego, T. Lora, J.M. Benitez, J.A. Pintor-Toro, A. Llobell // *Eur. J. Biochem.* – 1992. – Vol. 206, N 3. – P. 859-867.

De La Cruz J. Carbon source control on b-glucanases, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum* / J.De La Cruz, M. Rey, T. Lora J.M. Benitez, A. Hidalgo-Gallego, F. Dominguez, J.A. Pintor-Toro, A. Llobell // *Arch.Microbiol.* – 1993. – Vol. 159. – P. 316-352.

- De La Cruz J.* Purification and properties of a basic endo-1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum* / J. De La Cruz, A. Llobell // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 265. – P. 145-151.
- Delaney T.P.* A central role of salicylic acid in plant disease resistance / T.P. Delaney, S.Uknes // *Science.* – 1994. – Vol. 266, N 5188. – P. 1247-1250.
- De Marco J.L.* Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate, which controls cocoa plant witches' broom disease / J.L. De Marco, C.R. Felix // *BMS Biochemistry.* – 2002. – Vol. 3.
- Dennis C.* Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* / C. Dennis, J. Webster // *Transactions of the British Mycological Society.* I. Production of non-volatile antibiotics. – 1971a. – Vol. 57. – P. 25-39.
- Dennis C.* Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* / C. Dennis, J. Webster // *Transactions of the British Mycological Society.* II. Production of volatile antibiotics. – 1971b. – Vol. 57. – P. 41-48.
- Dennis C.* Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction / C. Dennis, J. Webster // *Transactions of the British Mycological Society.* – 1971c. – Vol. 57, N 3. – P. 363-369.
- Dewan M.M.* Identity and frequency of occurrence of *Trichoderma* spp. in roots of wheat and ryegrass in Western Australia and their effect on root rot caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* / M.M. Dewan, K. Sivasithamparam // *Plant and Soil.* – 1988. – Vol. 109, N 1. – P. 93-101.
- De Wit P.J.G.M.* The molecular bases Sivasithamparam // *Plant and Soil.* Co-evolution between *Cladosporium lulum* and tomato. Antonio van Lesuwenhoek. – 2002. – Vol. 81. – P. 409-412.
- Dik A.J.* Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato / A.J. Dik, G. Koning, J. Kohl // *Europ. J. Plant Pathol.* – 1999. – Vol.105, N 2. – P. 115-122.
- Di Pietro A.* Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin / A.Di Pietro, M. Lorito, C.K. Hayes, R.M. Broadway, G.E. Harman // *Phytopathology.* – 1993. – N 83. – P. 308-313.
- Draborg H.* Molecular cloning and expression in *S.cerevisiae* of two exochitinases from *T. harzianum* / H. Draborg, S. Kauppinen, H. Dalboge, S. Christgau // *Biochem. Molec. Biol. Int.* – 1995. – Vol. 36, N 4. – P. 781-791.
- Dodd S.L.* Control of *Athelia rolfsii* disease on lentil seedlings using 6-pentil-a-pyrone / S.L. Dodd, R.A. Hill, A. Stewart // *Soil. Biol. Biochem.* – 2000. – Vol. 32. – P. 1033-1034.
- Dodd S.L.* Taxonomy and phylogenetic relationships of two species of *Hypocrea* with *Trichoderma* anamorphs / S.L. Dodd, E. Lieckfeldt, P. Chaverri, B.E. Overton, G.J. Samuels // *Mycol. Progr.* – 2002 – N 1. – P. 409-426.
- Dominigues F.C.* Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source / F.C. Dominigues, J.A. Queiroz, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca // *Biotechnology Letters.* – 2001. – Vol. 23. – P. 771-775.
- Donzelli B.G.G.* Cloning, sequence and structure of a gene encoding an antifungal glucan 1,3-b-glucosidase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) / B.G.G. Donzelli, M. Lorito, F. Scala, G.E. Harman // *Gene.* – 2001. – Vol. 277. – P. 199-208.
- Dubos B.* In *Innovate Approaches To Plant Disease Control.* – New York. – 1987. – P. 107-135
- Dunlop R.W.* An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens / R.W. Dunlop, A. Simon, K. Sivasithamparam // *Journal of Natural Product.* – 1989. – Vol. 52, N 1. – P. 67-74.
- Duqff B.J.* Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 // *Eur. J. Plant Pathol.* – 1998. – Vol. 104. – P. 903-910.
- El-Katatny M.H.* Characterization of a chitinase and endo- β -1,3-glucanase from *T. harzianum* Rifai T-24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii* / M.H. El-Katatny, M. Gudelj, K.H. Robra, M.A. Elanghy, G.M. Gubitz // *Appl. Microbiol. Biot.* – 2001. – Vol. 56. – P. 137-143.
- Elad Y.* Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma* spp. and plant pathogenic fungi / Y. Elad, R. Barak, I. Chet, Y. Henis // *Phytopathologische Zeitschrift* – 1983a. – Vol. 107. – P. 168-175.
- Elad Y.* Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy / Y. Elad, I. Chet, P. Boyle, Y. Henis // *Phytopathology.* – 1983b. – Vol. 73. – P. 85-88.
- Elad Y.* Possible role of lectins in mycoparasitism / Y. Elad, R. Barak, I. Chet // *Journal of Bacteriology.* – 1983c – Vol. 154. – P. 1431-1435.
- Elad Y.* Scanning electron microscopical observations of early stages of interactions of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani* / Y. Elad, Z. Sadowsky, I. Chet // *Transactions of British Mycological Society.* – 1987. – Vol. 88, N 2. – P. 259-263.
- Elad Y.* Biological control of grey grape mould by *Trichoderma harzianum* // *Crop Protect.* – 1994. – Vol. 13. – P. 35-38.
- Elad Y.* Mechanisms involved in biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases // *Eur J. Plant Pathol.* – 1996. – Vol. 102. – P. 719-732.

- Elad Y.* The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea* / Y. Elad, A. Kapat // *European J. of Plant Pathology*. – 1999. – Vol.105. – P. 177-189.
- Elad Y.* Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action // *Crop Protection*. – 2000. – Vol.19. – P.709-714.
- Emani C.* Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* / C. Emani, J.M. Garcia, L. Lopata-Finch, M.J. Pozo, P. Uribe, D.-J. Kim, G. Sunilkumar, D.R. Cook, C.M. Kenerley, K.S. Rathore // *Plant Biotechnology Journal*. – 2003. – Vol. 1, N 5. – P. 321-336.
- English H.* Notes on apple rots in Washington // *Plant Disease Reporter*. – 1944. – Vol. 28. – P. 610-622.
- Errasquin E.L.* Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge / E.L. Errasquin, C.T. Vazquez. – 2003. – Vol. 50. – P. 137-143.
- Esposito E.* Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma* / E. Esposito, N. Dasilva // *Critical Reviews in Microbiology*. – 1998. – Vol. 24, N. 2. – P. 89-98.
- Estrella A.H., Chet I.* Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. In *Agricultural biotechnology*, Altman A. (Ed). New York: Marcel Dekker, Inc. 1998. – P. 263-282.
- Evans H.C.* Mycobiota of an indigenous *Thiobroma* species (Sterculiaceae) in Ecuador assessing its potential for biological control of cocoa diseases / H.C.Evans, K.A.Holmes, S.E. Thomas // *Mycol. Prog.* – 2003. – Vol. 2. – P. 149-160.
- Ezzi M.I.* Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. / M.I. Ezzi, J.M. Lynch // *Enzymol Microbial Technol.* – 2002. – Vol. 31. – P. 1042-1047.
- Farr D.F.* *Fungi on Plants and Plant Products in the United States* / D.F. Farr, G F. Bills, G.P. Chamuris, A.Y. Rossman // St. Paul. Minnesota: APS Press. – 1989. – 999 p.
- Faull J.L.* *In vitro* activity of 6-penlyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctoma solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* / J.L. Faull, R. Scarseletti // *Micological Research*. – 1994. – N 98. – P. 1207-1209.
- Fisher C.G.* Fluid drilling a potential delivery system for fluid biocontrol agents with small seeded vegetables / C.G. Fisher, K.E. Conway, J.E. Motes // *Proc. Okla. Acad. Sci.*, – 1983. – Vol. 63, – 100 p.
- Flores A.* Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* strains by over-expression of the proteinase encoding gene *prb1*. / A. Flores, I. Chet, A. Herrera-Estrella // *Curr. Genet.* – 1997. – Vol. 31, N 1. – P. 30-37.
- Fox R.O.* A voltage-gated oin channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1,5- \AA -resolution / R.O. Fox, F.M. Richards // *Nature*. – 1982. – Vol. 300. – P. 325.
- Flyu C.M.* Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 4927-4932.
- Fravel D.R.* Availability and application of biocontrol products / D.R. Fravel, R.P. Larkin // *Biological and Cultural Tests*. – 1996. – Vol. 11. – P. 1-7.
- Fravel D.R.* Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides / D.R. Fravel, K.L. Deahl, J.R. Stommel // *Biological Control*. – 2005. – Vol. 34, N 2. – P. 165-169.
- Fuchs Y.* Ethylene biosynthesis inducing protein from cellulysinase is an endoxylanase / Y. Fuchs, A. Saxona, H.R. Gamble, J.D. Anderson // *Plant Physiol.* – 1991. – Vol. 97. – P. 1181-1185.
- Fuchs J.G.* Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium wilt* of tomato / J.G. Fuchs, Y. Moanne-Locooz, G. DeFago // *Plant Dis.* – 1997. – Vol. 61. – P. 492-496.
- Fungi as biocontrol agents* / T.M. Butt, C.W. Jackson and N. Magan // CAB International. New York. – 2001. – 390 P.
- Garret S.D.* *Pathogenic root-infecting fungi* // Cambridge University Press. London. – 1970. – 294 p.
- Garcia I.* Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* / I. Garcia, J.M. Lora, J. De La Cruz, T. Benitez, A. Llobell, J.A. Pintor-Toro // *Curr. Genet.* – 1994. – Vol. 27, N 1. – P. 83-89.
- Gastoria*, Transferring of an endochitinase-encoding gene from *Trichoderma* spp. to antagonistic yeasts // 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology. – Taormina. Italy. – 2000. – P. 83.
- Gepp V.* Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Uruguayan vegetable crops / V. Gepp, A.S. Silveria, E. Perez // 8th International Congress of Plant Pathology. – Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 33.
- Geremia R.* Molecular characterization of the protease-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum* / R. Geremia, G. Goldman, D. Jacobs, W. Ardiles, S. Vila, M. Van Montagu, A. Herrera-Estrella // *Mol. Microbiol.* – 1993. – Vol. 8, N 3. – P. 603-613.
- Gomez I.* Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates / I. Gomez, I. Chet, A. Herrera-Estrella // *Mol. Gen. Genet.* – 1997. – Vol. 256. – P. 127-135.
- Ghisalberti E.L.* Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones / E.L. Ghisalberti, M.J. Narbey, M.M. Dewan, K. Sivasinthamparam // *Plant Soil*. – 1990. – Vol. 121. – P. 287-291.

- Ghisalberti E.L.* Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp / E.L. Ghisalberti, K. Sivasithamparam // *Soil Biol. Biochem.* – 1991. – Vol. 23, N 11. – P. 1011-1020.
- Ghisalberti E.L.* Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum* / E.L. Ghisalberti, C.Y. Rowland // *Journal of Natural Products.* – 1993. – N 56. – P. 1799-1804.
- Gilman J.C.* A summary of the soil fungi / J.C. Gilman, E.V. Abbott // *J. Sci.* – 1927. – Vol. 1. – P. 225.
- Green H.* Suppression of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* by Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* in Root-Free Soil / H. Green, J. Larsen, P.A. Olsson, D.F. Jensen, I. Jakobsen // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1999. – Vol. 65, N 4. – P. 1428-1434.
- Guarro J.* Fatal Case of *Trichoderma harzianum* Infection in Renal Transplant Recipient / J. Guarro, M. I. Antolin-Ayala, J. Gene, J. Gutierrez-Calzada, C. Nieves-Diez, M. Ortoneda // *J. Clinical Microbiology.* – 1999. – P. 3751-3755.
- Haab D.* Formation of the extracellular protease from *T. resei* QM 9414 involved in cellulose degradation / D. Haab, K. Hagspiel, K. Szakmary, C.P. Kubicek // *J. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 16. – P. 187-198.
- Hadar Y.* Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum* / Y. Hadar, I. Chet, Y. Henis // *Phytopathology.* – 1979. – Vol. 69. – P. 64-68.
- Hammerschmidt R.* Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu May (2000) / R. Hammerschmidt, J.P. Metraux, L.C. van Loon // *Eur J. Plant Pathol.* – 2001. – Vol. 107. – P. 1-6
- Hammond-Kosack K.E.* Functional Expression of a fungal avirulence gene from a modified potato virus X genome / K.E. Hammond-Kosack, B.J. Staskawicz, J.D.G. Jones, D.C. Baulcombe // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1995. – Vol. 8. – P. 181-185.
- Hanson L.E.* Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens* / L.E. Hanson, C.R. Howell // *Mycological Research.* – 2002. – Vol. 106, N 3. – P. 321-328.
- Hanson L.E.* Elicitors of plant defense responses from biological control strains of *Trichoderma virens* / L.E. Hanson, C.R. Howell // *Phytopathology.* – 2004. – Vol. 94, N 2. – P. 171-175.
- Haran S.* New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum* / S. Haran, H. Schickler, A. Oppenheim, I. Chet // *Micol. Res.* – 1995. – Vol. 99, N 9. – P. 441-446.
- Haran S.* Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* / S. Haran, H. Schickler, I. Chet // *Microbiology.* – 1996a. – Vol. 142, N 9. – P. 2321-2331.
- Haran S.* Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism / S. Haran, H. Schickler, A. Oppenheim, I. Chet // *Phytopathology.* – 1996b. – Vol. 86. – P. 980-985.
- Harman G.E.* Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent / G.E. Harman, I. Chet, R. Baker // *Phytopathology.* – 1981. – Vol. 71. – P. 569-572.
- Harman G.E.* Biological fungi in plant pathology / G.E. Harman, Y. Hadar // In: *New Directions in Biological Control*, R.R. Baker et P.E. Dunn (ed.), 1990. – P. 779-792.
- Harman G.E.* Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control / G.E. Harman, X. Jin, T.E. Stasz, G. Peruzzotti, A.C. Leopold, A.G. Taylor // *Biological control.* – 1991. – Vol. – 1.- P. 23-28.
- Harman G.E.* Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase / G.E. Harman, C.K. Hayes, M. Lorito, R.M. Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer, A. Tronsmo // *Phytopathology.* – 1993. – Vol. 83, N 3. – P. 313-318.
- Harman G.E.* Integrated and biocontrol of *Botrytis* on grape and strawberry / G.E. Harman, J. Kovach, B. Latone, J. Agosin, R. San Martin, D.G. Riegel, A. Tronsmo, R.C. Pearson // *Fifth International Gliocladium and Trichoderma workshop*. Beltsville. MD, April, 1995. – 1995.
- Harman G.E.* Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. / G.E. Harman, B. Latorre, E. Agosin, R. San Martin, D.G. Riegel, P.A. Nielsen, A. Tronsmo, R.C. Pearson // *Biol. control.* – 1996. – Vol. 7, N 3. – P. 259-266.
- Harman G.E., Kubicek C.P.* Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement // *Trichoderma and Gliocladium* Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds), London: Taylor et Francis. – 1998. – Vol. 2 p. 229-265.
- Harman G.E.* Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 // *Plant Dis.* – 2000. – Vol. 84. – P. 337-393.
- Harman G.E.* Enhancing Crop Performance and Pest Resistance with genes from biocontrol agents / G.E. Harman, B.G.G. Donzelli // *In Enhancing Biocontrol Agents and Handling Risks.* – IOC Press Amsterdam. – 2001. – P. 114-125.
- Harman G.E.* *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review* / G.E. Harman, C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito // *Microbiology.* – 2004a. – Vol. 2. – P. 43-55.
- Harman G.F.* Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Py-*

thium ultimum and Coletotrichum graminicola / G.F. Harman, R. Petzoldt, A. Comis, J. Chen // Phytopathology. – 2004b. – Vol. 94, N 2. – P. 147-153.

Hayes C.K. Isolation and sequence of an endochitinase gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum* / C.K. Hayes, S. Klemsdal, M. Lorito, A. Di Pietro, C. Peterbauer, J.P. Nakas, A. Tronsmo, G.E. Harman // Gene. – 1994. – Vol. 138, N 1-2. – P. 143-148.

Hebar P.K. 1999. Control of plant diseases by biofungicides. Proc. of the XIVth International Plant Protection Congress “Plant Protection towards the third millenium-where chemistry meets ecology” July 25-30, Jerusalem, Israel. P. 7.

Hererra-Estrella A. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. / A. Hererra-Estrella, I. Chet // Agricultural Biotechnology. – Inc. New York, Basel, Hong Kong. – 1998. – P. 263-282.

Hermosa M.R. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against fungal plant pathogens / M.R. Hermosa, I. Grondona, J.M. Diaz-Minguez, E.A. Iturriaga, E. Monte / Curr Genet. // – 2001. – V. 38. P. 343-350.

Hermosa M.R. Genetic diversity shown *Trichoderma* biocontrol isolates / M.R. Hermosa, E. Keck, I. Chamorro, B. Rubio, L.Sanz, J.A. Vizcaino, I. Grondona, E. Monte / Mycological Research // – 2004. – Vol. 108. – P. 897-906.

Holtzapple M. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulose by sugars and solvents / M. Holtzapple, M. C. Hendrickson, Cognata, Y. Shu // Biotechnology and Bioengineering. – 1990. – Vol. 36. – P. 275-287.

Hotlnik H.A.J. Effects of compost in container media on diseases caused by soil plant pathogens / H.A.J. Hotlnik, G.A.Kuter // Acta. Hortic. – 1985. – Vol. 172. P. 191.

Howell C.R. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* – induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens* – antibiosis / C.R. Howell, R.D. Stipanovic // Phytopathology. – 1995. – Vol. 85, N. 4. – P. 469-472.

Howell C.R. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens* / C.R. Howell, L.S. Puckhabor, L.E. Hanson, R.D. Stipanovic // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90. – P. 248-252.

Howell C.R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. // Phytopathology. – 2002. – Vol. 92. – P. 177-180.

Howell C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. The history and evolution of current concepts // Plant Dis. – 2003. – Vol. 87. – P. 4-10.

Hoynes C.D. Biological control agents in combi-

nation with fertilization or fumigation to reduce sclerotial viability of *Sclerotium rolfsii* and disease of snap beans in the greenhouse / C.D. Hoynes, J.A. Lewis, R.D. Lumsden, G.A. Bean // J. Phytopathol. – 1999. – Vol.147, N 3. – P. 175-182.

Huang L.Y. New fungal metabolites as potential antihypercholesterolemics and anticancer agents / L.Y. Huang, R.B. Lingham, G.H. Harris, S.B. Singh, C. Dufresne, M. Nallinomstead, G.F. Bills, M. Mojena, M. Sanchez, J.D. Karkas, J.B. Gibbs, W.H. Clapp, M.S. Meinz, K.C. Silverman, J.D. Bergstrom // Can. J. Bot. (Supplementary). – 1995. – Vol. 73. – P. 898-906.

Hunt J.S. Control of dead arm disease in grapes with injects able *Trichoderma* / J.S. Hunt, D.S.J. Gale // Fifth International Gliocladium and *Trichoderma* workshop.- 1995.- Beltsville, MD.

Hwang J. Expression of induced resistance in ponsettia cuttings against *Rhizoctonia* stem rot by treatment of stock plants with binucleate *Rhizoctonia* / J. Hwang, D.M. Benson // Biol. Control. – 2003. – Vol. 27. – P. 73-80.

Iida A. Fungal metabolites. IV. Synthesis of an antibiotic peptide, trichosporin B-V, from *Trichoderma polysporum* // Chem Pharm Bull (Tokyo). – 1990. – Vol. 38, N 11. – P. 2997-3003.

Inbar J. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon / J. Inbar, I. Chet // Journal of Bacteriology. – 1992. – Vol. 174. – P. 1055-1059.

Inbar J. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism / J. Inbar, I. Chet // Microbiology. – 1994. – Vol. 140. – P. 651-657.

Inbar J. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum* / J. Inbar, I. Chet // Microbiology. – 1995. – Vol. 141, N 11. – P. 2823-2833.

Inbar J. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control / J. Inbar, A.N.A. Menendes, I. Chet // Soil Biol. Biochem. – 1996. – Vol. 28, N 6. – P. 757-763.

Ikotun T. Inhibition of growth of some plants pathogenic fungi by some antagonistic microorganisms isolated from soil / T. Ikotun, F. Adekunle // Journal of Basic Microbiology. – 1990. – Vol. 30, N 2. – P. 95-98.

Jackisch-Matsuura A.B. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*) / A.B. Jackisch-Matsuura, M. Menezes // Summa phytopathol. – 1999. – Vol. 25, N 2. – P. 161-164.

Jackson M.A. Biopesticides, microbial // Encyclopedia of Microbiology. J. Lederberg (Ed). Academic Press Sn Diego CA – 2000. – P. 169-183.

John S. Towards biological control of eutypa dieback of grapevines / S. John, E.S. Scott, T.J. Wicks, J.S. Hunt // 8th International Congress of Plant Pa-

- thology. – Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 43.
- Jtoh Y.* A new sesquiterpene antibiotic, heptelidic acid producing organisms, fermentation, isolation and characterization / Y. Jtoh, K. Kodama, K. Furuya, S. Takahashi, T. Haneishi, Y. Takiguchi, M. Arai // *J. Antibiotics*. – 1980. – Vol. 33. – P. 468-473.
- Kenerley C.M.* Pathogen interactions with microbes on the phylloplane / C.M. Kenerley, J.H. Andrews // 197th ACS National Meeting, Dallas, Texas, 9-14 Apr. 1989. – 1989.
- Keszler A.* Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectroscopy / A. Keszler, E. Forgacs, L. Kotai, J.A. Vizcaino, E. Monte, I. Garcia-Acha // *J. Chromatograph Sci.* – 2000. – Vol. 38. – P. 421-424.
- Kitamoto Y.* Purification and some properties of an exo-b-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* / Y. Kitamoto, R. Kono, A. Shimotori, Y. Ichikawa // *Agric. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 51, N 12. – P. 3385-3386.
- Kleifeld O.* *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response / O. Kleifeld, I. Chet // *Plant and Soil*. – 1992. – Vol. 144. – P. 267-272.
- Klopper J.W.* In Pest Management. Biologically Based Technologies / J.W. Klopper, S. Tuzun, L. Lu, G. Wei // Proceeding of the Beltswill Symposium XVII. (American Chemical Society). – 1993. – P. 10-20.
- Knosel D.* Temperaturanspruche und extracellulare enzymatische Aktivitat einiger aus Citrusimporten isolierte Pilze / D. Knosel, F. Schickedanz // *Phytopathologische Zeitschrift*. – 1976. – Vol. 85. – P. 217-226.
- Knudsen G.R.* Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum* / G.R. Knudsen, D.J. Eschen // *Plant Disease*. – 1991. – Vol. 75. – P. 466-480.
- Koike N.* Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungal lignification and superoxide generation // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2001. – Vol. 107. – P. 523-533.
- Koch E.* Evaluation of commercial products for microbial control of soil-borne plant diseases // *Crop Protection*. – 1999. – Vol. 18. – P. 119-125.
- Kokalis-Burelle N.* Potential for biological control of early leafspot of peanut using *Bacillus cereus* and chitin as foliar amendments / N. Kokalis-Burelle, P.A. Beckman, R. Rodrigues-Kabana, L.D. Ploper // *Biological Control*. – 1992. – Vol. 2. – P. 321-328.
- Kommedahl T.* Variability in performance of biological and fungicidal seed treatments in corn, peas and soybeans / T. Kommedahl, C.E. Windels, G. Sarbini, H.B. Wiley // *Protection Ecology*. – 1981. – Vol. 3. – P. 55-61.
- Kubicek C.P.* *Trichoderma* and *Gliocladium* / C.P. Kubicek, G.E. Harman // *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. – Taylor and Francis, London. – 1998. – Vol. 1. – 278 p.
- Kubicek C.P.* *Trichoderma* from genes to biocontrol / C.P. Kubicek, R.L. Mach, C.K. Petebauer, M. Lonto // *J. Plant Pathol.* – 2001. – Vol. 83. – P. 11-23.
- Kubota T.* *Trichoderma harzianum* SK-55 fungus, fungicide containing it, and method of manufacture of the same and its use: Patent 5422107 USA, MKU6 A 01N 63/00, A 01N 1/00. Hokkaido Green Kosan, Inc. № 172273; 23.12.1993; № 4-359484.
- Kuc J.* Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2001. – Vol. 107. – P. 7-12.
- Kuhls K.* PCR-fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections / K. Kuhls, E. Lieckfeldt, T. Borner // *Microbiol.* – 1995. – Vol. 150. – P. 363-371.
- Kuhls K.* Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences / K. Kuhls, E. Lieckfeldt, G.J. Samuels, W. Meyer, C. P. Kubicek, T. Borner // *Mycologia*. – 1997. – Vol. 89, N 3. – P. 442-460.
- Kuhls K.* Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride* / K. Kuhls, E. Lieckfeldt, T. Borner, E. Gueho // *Med. Mycol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 25-33.
- Kullnig C.* Enzyme diffusion from *T. atroviride* (= *Trichoderma harzianum* P1) to *R. solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact / C. Kullnig, R.L. Mach, M. Lorito, C.P. Kubicek // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, N 5. – P. 2232-2234.
- Labudova I., Gogorova L.* Biological control of phytopathogenic fungi through lytic action of *Trichoderma* species / I. Labudova, L. Gogorova // *FEMS Microbiol Letters*. – 1988. – V. 52. – № 3. – P. 193-198.
- Lanzusa S.* Cloning of ABC transporte-encoding genes in *Trichoderma* spp. to determine their involvement in biocontrol // *J. Plant Pathol.* – 2002. – Vol. 84. – P. 184.
- Lewis J.A.* Integrated control of *Rhizoctonia* fruit rot of cucumber / J.A. Lewis, G.C. Papavizas // *Phytopathology*. – 1980. – Vol. 70. – P. 85-89.
- Lewis J.A.* Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media / J.A. Lewis, G.C. Papavizas // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1983. – Vol. 15. – P. 351-357.

Lewis J.A. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil / J.A. Lewis, G.C. Papavizas // *Plant Pathology*. – 1985. – Vol. 34. – P. 571-577.

Lewis J.A. A new formulation system for the application of biocontrol fungi to soil / J.A. Lewis, G.C. Papavizas, R.D. Lumsden // *Biocontrol Science and Technology*. – 1991. – Vol. 1. – P. 59-69.

Lewis J.A. Biocontrol of damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* with alginate prills of *Gliocladium virens*, *Trichoderma hamatum* and various food bases / J. A. Lewis, R. D. Lumsden, J. C. Locke // *Biocontrol science and technology*. – 1996. – Vol. 6. – P.163-173.

Lewis J.A. A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soil-less mix / J.A. Lewis, R.P. Larkin, D.L. Rogers // *Plant disease*. – 1998. – Vol. 82, N.5. – P. 501-506.

Lewis J.A. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. / J.A. Lewis, R.D. Lumsden // *Crop Protection*. – 2001. – Vol. 20. – P. 49-56.

Lieckfeld E., G. J. Samuels, and H.I. Nirenberg. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl. Environ. Microbiol.* – Vol. -65. – P. 2418-2428.

Lifshitz R. Decrease in incidence of *Rhizoctonia* preemergence damping-off by the use of integrated and chemical controls / R. Lifshitz, S. Lifshitz, R. Baker // *Plant Disease*. – 1985. – Vol. 69. – P. 4341- 4344.

Lim H.-S. The role and characterization of 1,3-glucanase in biocontrol of *Fusarium solani* by *Pseudomonas stutzeri* YEL-1 / H.-S. Lim, S.-D. Kim // *J. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33, N 4. – P. 295-301.

Limon M.C. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase / M.C. Limon, J.A. Pintor-Toro, T. Benitez // *Phytopathology*. – 1999. – Vol. 89, N 3. – P. 254-261.

Lo C.T. Induction of systemic resistance of cucumber to cucumber green mosaic virus by the root-colonizing *Trichoderma* spp. / C.T. Lo, T.F. Liao, T.C. Deng // *Phytopathology*. – 2000. – Vol. 90. – P. 47-52.

Lora J.M. Molecular characterization and heterologous expression of an endo-b-1,6-glucanase from the mycoparasitic fungus *T. harzianum* / J.M. Lora, J. De La Cruz, T. Benitez, A. Llobell, A. Pintor-Toro // *Mol. Gen. Genet.* – 1995. – Vol. 28. – P. 478-483.

Lorito M. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: II Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase / M. Lorito, G.E. Harman, C.K. Hayes, R.M. Broadway, A. Tronsmo, S.L. Woo, A. Di Pietro // *Phytopathology*. – 1993a. – Vol. 83, N 3. – P. 302-307.

Lorito M. Antifungal, synergistic intereaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae* / M. Lorito, C.K. Hayes, S.L. Woo, A. Di Pietro, G.E. Harman // *Phytopathology*. – 1993b. – Vol. 73. – P. 721-728.

Lorito M. Purification characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum* / M. Lorito, C.K. Hayes, S.L. Woo, A. Di Pietro, G.E. Harman // *Phytopathology*. – 1994. – Vol. 84. – P. 398-405.

Lorito M. Mycoparasitic interaction relieves binding of Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequence of ech-42 (endochitinase-encoding) gene of *Trichoderma harzianum* / M. Lorito, R.L. Mach, P. Sposato, J. Strauss, C.K. Peterbauer, C.P. Kubicek // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1996. – Vol. 93, N 25. – P. 14868-14872.

Lorito M. Chitinolytic enzymes and their genes / M. Lorito, G.E. Harman, C.P. Kubicek // *Trichoderma and Gliocladium*. – Taylor and Francis. London. – 1998. – Vol. 2. – P. 73-99.

Lorito M. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens / M. Lorito, S.L. Woo, I.G. Fernandes, G. Colucci, G.E. Harman, J.A. Pintor-Toro, E. Filippone, S. Mucifora, C.B. Lawrence, A. Zoina, S. Tuzun, F. Scala // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V. 95, N 14. – P. 7860-7865.

Lorito M. Microbial genes expressed in transgenic plants to improve disease resistance / M. Lorito, F. Scala // *J. Plant Pathology*. – 1999. – P. 73-88.

Lorito M. *Pseudomonas* lipodepsipeptides (LPDs) and *Trichoderma* cell wall-degrading enzymes are synergistic in the inhibition of fungal growth // 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, Taormina. Italy. – 2000. – P. 91.

Lorito M. Enhancing Biocontrol of fungal Pests by exploiting the *Trichoderma* genome / M. Lorito, F. Scala, A. Zoina, S.L. Woo // *Enhancing Biocontrol Agents and handling risks. Series I: Life and Behavioral Sciences*. – IOS Press. – 2001. – Vol. 339. – P. 248-264.

Lotan T. Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction / T. Lotan, R. Flutz // *Plant Physiol.* – 1989. – Vol. 89. – P. 138-143

Lu B. *Hypocrea* *Trichoderma* species with pachybasium-like conodiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum* and their newly discovered relatives / B. Lu, I. Druzhinina, P. Fallah, P. Chaverri, C. Gradinger, C.P. Kubicek, G.J. Samuels // *Mycologia*. – 2004. – Vol. 96, N 2. – P. 310-342.

Lumsden R. D. Approval of *Gliocladium virens* by the U.S. Environmental Protection Agency for biological control of *Pythium* and *Rhizoctonia* damping-

- off / R. D. Lumsden, J.C. Locke, J.F. Walter // *Petria*. 1991 – Vol. 21. – P. 138 p.
- Lynch J.M.* Response of lettuce to *Trichoderma* treatment / J.M. Lynch, K.L. Wilson, M.A. Ousley, J.M. Wipps // *Letters of Applied Microbiology*. – 1991. – Vol. 12. – P. 59-61.
- Mach R.L.* Expression of two major chitinase genes of *T. atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals / R.L. Mach, C.K. Peterbauer, K.Payer, S. Jaksits, S.L.Woo, S. Zeilinger, CM. Kullnig, M. Lorito, C.P. Kubicek // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65, N 5. – P. 1858-1863.
- Margolles-Clark E.* Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei* / E. Margolles-Clark, C.K. Hayes, G.E. Harman, M. Penttila // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – Vol. 62, N 6. – P. 2145-2151.
- Margolles-Clarc E.* Expression patterns of the hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources / E. Margolles-Clarc, M. Ilmen, M. Penttilla // *J. of Biotechnology*. – 1997. – Vol. 57. – P.167-179.
- McLean K.L.* Commercial development of *Trichoderma* species for control of soil-borne vegetable diseases and their integration into standart crop management practies / K. L. McLean, J. S. Hunt, A. Stewart // // *J. of Zhejiang University Agreeculture and life sciences Proceedings of Eighth International Workshop on Trichoderma and Gliocladium.* – 2004. – Vol. 30, N 4. – P. 407.
- McBeath J. H.* Cold tolerant *Trichoderma*, 1995. Patent.
- Mendelsohn M.* Commercialization, facilitation, and implementation of biological control agents: a government perspective / M. Mendelsohn, E. Delfosse, C. Grable, J. Kough, D. Bays, P. Hutton // In: *Biological control of postharvest diseases-theory and practice* (Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E.). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. – 1994. – P. 123-133
- Menzies J.G.* A strain of *Trichoderma viride* pathogenic to germinating seedlings of cucumber, pepper and tomato // *Plant Pathology*. – 1993. – Vol. 42. – P. 784-791.
- Messina J.* The use of beneficial *Trichoderma* in grapevine propagation // *Comb. Proc. Intern. Plant Propagators 'Soc.* – 2000. – Vol. 49. – P. 145-148.
- Metcalf D.A.* The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii* / D.A. Metcalf, C.R. Wilson // *Plant Pathology*. – 2001. – Vol. 50, N 2. – P. 249-257.
- Metcalf D.A.* Screening biological control agents for *Sclerotinia minor* in *Pyrethrum* in Tasmania / D.A. Metcalf, F. Giblin, L. Gibson, C. Archer, P. Schupp // *8th International Congress of Plant Pathology*. – Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 37.
- Meyer C.E.* A polypeptide anti-bacterial agent isolated from *Trichoderma viride* / C.E. Meyer, F. Reusser // *Experimenta*. – 1967. – Vol. 23. – P. 85.
- Migheli Q.* Fate of transformed *Thchoderma harzianum* in the phylloplane of tomato plants / Q. Migheli, A. Herrera-Estrella, M. Avataneo, M.L. Gullino // *Molecular Ecology*. – 1994. – Vol. 3. – P. 153-159.
- Migheli Q.* Transformants of *T. longibrachiatum* overexpressing the β -1,4 endoglucanase gene *egl1* schow enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber / Q. Migheli, L. Gonzalez-Candelas, L. Delessi, A. Camponogara, D. Ramon-Vidal // *Phytopathology*. – 1998. – Vol. 88. – P. 673-677.
- Mischke S.* Evaluation of chromogenic substrates for measurement of protease production by biocontrol strains of *Trichoderma* // *Microbios*. – 1996. – Vol. 87. – P. 175-183.
- Monaco C.I.* Incremento en el crecimiento de las plantas inducido por *Trichoderma harzianum* // *La Planta*. – 1990. – P. 75-77.
- Montero M.* BGN16.3, a novel acidic {beta}-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 / M. Montero, L. Sanz, M. Rey, E. Monte, A. Llobell // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272, N 13. – P. 3441-3448.
- Mora A.* Combination of *T. harzianum* endochitinase and membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants / A. Mora, E.D. Earle // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 55, N 3. – P. 306-310.
- Morris E., O. Doyle, and K. Clancy.* A profile of *Trichoderma* species. I. Mushroom compost production. *Mushroom Sci.* – 1995a. – Vol.14. – P. 611-618.
- Morris E., O. Doyle, and K. Clancy.* A profile of *Trichoderma* species. II. Mushroom growing units. *Mushroom Sci.* 1995b. – Vol.14. – P. 619-625.
- Mukhopadhyay A.N.* *Trichoderma harzianum* – a potential biocontrol agent for tobacco damping-off / A.N. Mukhopadhyay, A. Brahmahtt, G.J. Patel // *Tobacco Research*. – 1986. – Vol. 12, N 1. – P. 26-35.
- Mukhopadhyay A.N.* Biological seed treatment with *Gliocladium* and *Trichoderma* for control of chickpea and lentil wilt complex. Fifth International *Gliocladium* and *Thchoderma* workshop. Beltsville, MD. Abstract. – 1995.
- Muthumeenakshi S.* Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles / S. Muthumeenakshi, P.P. Mills, A.E. Brown, D.A. Seaby // *Microbiology*. – 1994. – Vol. 140. – P. 769-777.
- Mukherjee P.K.* Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* – its relevance to understanding the mechanisms of biocontrol / P.K. Mukherjee, A.N. Mukhopadhyay, D.K. Sarmah, S.M. Shrestha // *J. Phytopathol.* – 1995. – Vol. 143, N

5. – P. 275-279.

Mukherjee P.K. Trichoderma sp. as a microbial suppressive agent of *Sclerotium rolfsii* on vegetables / P.K. Mukherjee, K. Radhu // World journal of Microbiolog and Biotechnology. – 1997a. – Vol. 13. – P. 497-499.

Mukherjee P.K. Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of Trichoderma sp. on *Sclerotium rolfsii* / P.K. Mukherjee, K. Radhu // Mycopathologia. – 1997b. – Vol. 139. – P. 151-155.

Munoz F.M. Trichoderma longibrachiatum infection in a pediatric patient with aplastic anemia / F.M. Munoz, G.J. Demmler, W.R. Travis, A.K. Ogden, S.N. Rossmann, M.G. Rinaldi // J. of Clinical Microbiology. – 1997. – Vol. 35, N. 2. – P. 499-503.

Nejad P. Endophytic Bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression on oilseed rape and tomato / P. Nejad, P.A. Jonson // Biological Control. – 2000. – Vol. 18. – P. 208-215.

Nelson E.B., Kuter G.A., Hotlnik H.A.J. Effect of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark / E.B.Nelson, G.A. Kuter, H.A.J. Hotlnik // Phytopathology. – 1983. – Vol. 73. – P. 1457.

Nelson M.E. Biological control of gray mold of snap beans by Trichoderma hamatum / M.E. Nelson, M.L. Powelson // Plant Diseases. – 1988. – Vol. 72. – P. 727-729.

Nemec S. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus / S. Nemec, L.E. Datnoff, J. Strandberg // Crop Protect. – 1998. – Vol. 15. – P. 735-742.

Noronha E.F. Purification and characterization of an endo-b-1,3-glucanase from Trichoderma harzianum. / E.F.Noronha, C.J. Ulhoa // Can. J. Microbiol. – 1996. – V.42. № 10. P. 1039-1044.

Noronha E.F. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from Trichoderma harzianum. / E.F.Noronha, C.J. Ulhoa // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – Vol. 183. – P. 119-123.

Ooka T. A new antibacterial peptide «Suzukacilin» / T. Ooka, Y. Shimojima, T. Akimoto, S. Senoh, J. Abe // Agric. Biol. Chem. – 1966. – Vol. 30. – P. 700.

Okuda T. Correlation between species of Trichoderma and production patterns of isonitrile antibiotics / T. Okuda, A. Fujiwara, M. Fujiwara // Agricultural and Biological Chemistry. – 1982. – Vol. 46. – P. 1811-1822.

Olsson L. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by Trichoderma reesei Rut C-30 / L. Olsson, T.M.I.E. Christensen, K.P. Hansen, E.A. Palmqvist // Enzyme and Microbial Technology. – 2003. – Vol.33. – P. 612-619

Omero C. G protein activators and camp promote mycoparasitic behaviour in Trichoderma harzianum

/ C. Omero, J. Inbar, V. Rocha-Ramirez, A. Herrera-Estrella, I. Chet, B.A. Horwitz // Mycological Research. – 1999. – Vol. 103, N 12. – P. 1637-1642.

Ousley M.A. Potential of Trichoderma spp. as consistent plant growth stimulators / M.A. Ousley, J. M. Lynch, J M. Whipps // Biol. Fertil. Soil. – 1994. – Vol.17. – P. 85-90.

Oostendort M. Induce disease resistance in plants by chemicals / M. Oostendort, W. Kunz, B. Dietrich, T. Stauo // Eur. J. Plant Pathol. – 2001. – Vol. 107. – P. 19-28.

Paau A.S. Formulations useful in applying beneficial microorganisms to seeds // Trends of Biotechnology. – 1988. – Vol.6, N 11. – P. 276-279.

Park K.S. Activation of PR1 a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against Pseudomonas syringae pv. tabaci / K.S. Park, J.W. Kloepper // Biol.Control. – 2000. – Vol. 18. – P. 2-9.

Papavizas G.C. Biological control of soilborne fungal propagules / G.C. Papavizas, R.D. Lumsden // Annual Review Phytopathology. – 1980. – Vol. 18. – P. 389-413.

Papavizas G.C. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi / G.C. Papavizas, M.T.Dunn, J.A.Lewis, J. Beagle-Ristaino // Phytopathology. – 1984. – Vol. 74. – P. 1171-1175.

Papavizas G.C. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol // Annual Review of Phytopathology. – 1985. – Vol. 23. – P. 23-54.

Patil I.S. Antagonistic action of species of Trichoderma, Bacillus and Streptomyces on Drechlera sorokiniana (Sacc) subran and jain / I.S. Patil, K. Srikanth, R.K. Hegde // Pesticides. – 1987. – Vol. 21, N 12. – P. 22.

Paulitz T.C. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control // New directions in biological control. Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. – Alan R. Liss, Inc. New York. – 1990. – P. 713-724.

Peberdy J.F. Fungal cell walls – a review. Biochemistry of Cell Walls andbranes in Fungi //Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. – Springer-Verlag. Berlin. – 1990. – P. 5-30.

Peltola J. Biological Effects of Trichoderma harzianum Peptaibols on Mammalian Cells / J. Peltola, A. Ritieni, R. Mikkola, P.A. Grigoriev, G. Pócsfalvi, M.A. Andersson, M.S. Salkinoja-Salonen // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70, N 8. – P. 4996-5004.

Peterbauer C.K. Molecular cloning and expression of the nag1 gene (N-acetyl-b-D-glucosaminidase-encoding gene) from Trichoderma harzianum P1 / C.K. Peterbauer, M. Lorito, C.K. Hayes, G.E. Harman, C.P. Kubicek // Curr. Genet. – 1996. – Vol. 30, N 4. – P. 325-331.

- Pieterse C.M.J.* Salicylic acid – independent plant defense pathways / C.M.J. Pieterse, L.C. van Loon // Trends Plant Sci. – 1999. – Vol. 4. – P. 52-58.
- Pieta D.* The efficiency of microbiological dressing of pea (*Pisum sativum* L.) against pathogenic soil-borne fungi / D. Pieta, E. Patkowska, A. Pastucha // Ann. agr. Sc. Ser. E-Plant Protect. – 1998a. – Vol. 27, N 1/2. – P. 81-89.
- Pieta D.* The efficiency of microbiological dressing of soybean seed (*Glycine max* (L.) Merrill) against root and stem base diseases / D. Pieta, A. Pastucha, E. Patkowska // Ann. Agr. Sc. Ser. E-Plant Protect. – 1998b. – Vol. 27, N 1/2. – P. 103-109.
- Picard K.* Cytological Effects of Cellulases in the Parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum* / K. Picard, Y. Tirilly, N. Benhamou // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66, N 10. – P. 4305-4314.
- Pozo M.J.* Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses of *Phytophthora* infection in tomato plants // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53. – P. 525-534.
- Pyke T.R.* U-21,963, a new antibiotic. I. Discovery and biological activity / T.R. Pyke, A. Dietz // Appl. Microbiol. – 1966. – Vol. 14. – P. 506-510.
- Ramot O.* Regulation of b-1,3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *T.harzianum* / O. Ramot, R. Cohen-Kupiec, I. Chet // Mol. Res. – 2000. – Vol. 104. – P. 415-420.
- Ramot O.* Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine / O. Ramot, A. Viterbo, D. Friesem, A. Oppenheim, I. Chet // Curr. Genet. – 2004. – Vol. 45. – P. 205-213.
- Reusser F.* Biosynthesis of antibiotic U-22,324. A cyclic polypeptide // J. Biol. Chem. – 1967. – P. 242-243.
- Ridout C.J.* Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum* / C.J. Ridout, J.R. Coley-Smith, J.M. Lynch // Enzyme Microbiology and Technology. – 1988. – Vol. 10. – P. 180-187.
- Ricard J.L.* Commercialization of a *Trichoderma* – based mycofungicide – some problems and solutions // Biocontrol News and Information, 1981. – V. 2. – P. 95-98.
- Rifai M.A.* A revision of the genus *Trichoderma*. // Mycol. Papers, Imp. Mycol. Inst. – 1969. – Vol. 1. – P. 1-56.
- Rocha-Ramirez V.* *Trichoderma atroviride* G-Protein {alpha}-Subunit Gene *tga1* Is Involved in Mycoparasitic Coiling and Conidiation / V. Rocha-Ramirez, C. Omero, I. Chet, B.A. Horwitz, A. Herrera-Estrella // Eukaryotic Cell. – 2002. – Vol. 1. – P. 594-605.
- Rossman A.Y.* Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales // Mycologia. – 1996. – Vol. 88, N 1. – P. 1-19.
- Rossman A.Y.* Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes) / A.Y. Rossman, G.J. Samuels, C.T. Rogerson, R. Lowen // Stud. Mycol. – 1999. – Vol. 42. – P. 1-248.
- Roulston S.* Observations on the interactions between *Trichoderma viride* and three *Botrytis* species / S. Roulston, S.D. Lane // Mycologist. – 1988. – Vol. 2, N 4. – P. 176-177.
- Ruocco M.* ABC transporters in *Trichoderma harzianum* // The 7th International Mycological Congress, Book of Abstracts. – Oslo, Norway, 11-17 August 2002. – 2002. – P. 354.
- Saccardo P.A.* Fungi Algeruensis, Tahitensis et Gallici // Rev. Mycol. – 1885. – Vol. 7. – P. 158-161.
- Saccardo P.A.* Sylloge fungorum omnium hucusquecognitorum. – Paris. – 1901. – 455 p.
- Schirmbock M.* Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi / M. Schirmbock, M. Lorito, Y.L. Wang, C.K. Hayes, I. Arsian-Atac, F. Scala, G.E. Harman, C.P. Kubicek // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60, N 12. – P. 4364-4370.
- Sahai A.S.* Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction / A.S. Sahai, M.S. Manocha // FEMS Microbiol. Rev. – 1993. – Vol. 11, N 4. – P. 317-338.
- Saloheimo M.* Cdna cloning of a *trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast / M. Saloheimo, T. Nakari-Setälä, M. Tenkanen, M. Penttilä // European Journal of Biochemistry. – 1997. – Vol. 249, N 2. – P. 584-591.
- Samuels G.J.* *Trichoderma* – a review of biology and systematic of the genus // Mycological Research. – 1996. – Vol. 100, N 8. – P. 923-935.
- Samuels G.J., Lieckfeldt E., Nirenberg H.I.* *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride* // Sydowia. – 1999. – Vol. 51. – P. 71 – 88.
- Samuels G.J.* *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasit of the cacao witches broom pathogen / G.J. Samuels, R. Padro-Schultheiss, K.P. Hebbar, R.D. Lumsden, C.N. Baston, J.C. Costa, J.L. Bezerra // Mycol. Res. – 2000. – V. 104. – N 6. – P. 760-764.
- Samuels G.J.* *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus* / G.J. Samuels, W. Gams, L.A. Castlebury, O. Petrini // Mycologia. – 2002. – Vol. 94, N 1. – P. 146-170.
- Samson R.A.* Constraints associated with taxonomy of biocontrol fungi // Can. J. Bot. (Supplementary). – 1995. – Vol. 73. – P. 583-588.
- Schickler H.* Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi / H. Schickler, I. Chet // J. Industrial Microbi-

ology and Biotechnology. – 1997. – Vol. 19. – P. 196-201.

Seaby D. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology*. 1996. – Vol. 45. – P. 905-912.

Shoresh M. Involvement of jasmonic acid\ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* strain T-203 / M. Shoresh, I. Yedidia, I. Chet // *Phytopathology*. – 2005. – Vol. 95. – P. 76-84.

Seaman A. Efficacy of OMRI-approved products for tomato foliar disease control. // *New York State Integrated Pest Management Program*. – New York. – 2003.

Scott J.H. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis / J.H. Scott, R. Schekman // *J. Bacteriol.* – 1980. – Vol. 142, N2. – P. 414-423.

Sharma S.K. Effect of biocontrol treatments on damping off and seedling vigour in bell pepper / S.K. Sharma, N.P. Dohroo, U.K. Kohli, M.C. Thakur // 8th International Congress of Plant Pathology. – Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 35.

Sid Ahmed A. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants / A. Sid Ahmed, C. Perez-Sanchez, C. Egea, M.E. Candela // *Plant Pathol.* – 1999. – Vol. 48, N 1. – P. 58-65.

Sivasithamparam K. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium* / K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti // *Trichoderma and Gliocladium*. – Taylor and Francis, London. – 1998. – Vol. 2. – P. 139-191.

Sivan A. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum* / A. Sivan, Y. Elad, I. Chet // *Phytopathology*. – 1984. – Vol. 74. – P. 498-501.

Sivan A. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes from *Trichoderma harzianum* / A. Sivan, I. Chet // *J. Gen. Microbiol.* – 1989a. – Vol. 135. – P. 675-682.

Sivan A. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization / A. Sivan, I. Chet // *Phytopathology*. – 1989b. – Vol. 79, N 2. – P. 198-203.

Simmons E.G. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium* // *Mycologia*. 1967. Vol. 59. P. 67-92.

Smith V.L. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. / V.L. Smith, W.F. Wilcox, G.E. Harman // *Phytopathology*. – 1990. – Vol. 80. – P. 880-885.

Sperry S. Vertinoid polyketides from the saltwater culture of the fungus *Trichoderma longibrachiatum* separated from a *Haliclona* marine sponge / S. Sperry,

G.J. Samuels, P. Crews // *J. Org. Chem.* – 1998. – Vol. 63. – P. 10011-10013.

Spiegel Y. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent against soilborne fungi and plant parasitic nematodes in Israel / Y. Spiegel, I. Chet // *Integrated Pest Management Reviews*. – 1998. – Vol. 3. – P. 169-175.

Steyaert J.M. Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum* / J.M. Steyaert, A. Stewart, M.V. Jaspers, M. Carpenter, H.J. Ridgway // *Mycologia*. – 2004. – Vol. 96. – P. 1245-1252.

Stevaert J.S. Studies on the genetic regulation of mycoparasitism in *Trichoderma hamatum* / J.S. Stevaert, H.J. Ridgway, M.V. Jaspers, A. Stewart // 8th International Congress of Plant Pathology. – Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 42.

Tabachnik M. Method of growing trichoderma. US patent № 4837155. June 6, 1989.

Tang P. Allergic Fungal Sinusitis Associated with *Trichoderma longibrachiatum* / P. Tang, S. Mohan, L. Sigler, I. Witterick, R. Summerbell, I. Campbell, T. Mazzulli // *J. Clinical Microbiology*. – 2003. – P. 5333-5336.

Thaler J.S. Antagonism between jasmonate-and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato / J.S. Thaler, A.L. Fidantsef, R.M. Bostok // *J. Chemical Ecology*. – 2002. – Vol. 28, N 6. – P. 1131-1159.

Thrane C. A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*: I. Transformation with the GUS gene by protoplast technology / C. Thrane, M. Lübeck, H. Green, Y. Degefu, S. Allerup, U. Thrane, D.F. Jensen // *Phytopathology*. – 1995. – Vol. 85. – P. 1428-1435.

Thrane C. Endo-1,3-b-glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum* purification and partial characterization, induction of and biological activity against Plant Pathogenic *Pythium* spp. / C. Thrane, A. Tronsmo, D.F. Jensen, J. Eur // *Plant Pathol.* – 1997 – Vol. 103. – P. 331-344.

Tribe H.T. Use of autoclavable plastic bags in fungus culture work / H.T. Tribe, A.H.M. Ahmed // *Transactions of the British Mycological Society*. – 1975. – Vol. 64. – P. 362-363.

Tokimoto K. Lysis of the mycelium of *Lentinus edodes* caused by mycolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* when the two fungi were in antagonists state // *Transactions of the Mycological Society of Japan* – 1982. – Vol. 23. – P. 13-20.

Toyama H. Intraspecific karyoduction in *Trichoderma reesei* QM 9414 using the “smaller nuclei” / H. Toyama, N. Toyama // *Journal of biotechnology*. – 1995. – Vol. 39. – P. 35-40.

- Tronsmo A.* Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species / A. Tronsmo, C. Dennis // Transactions of the British Mycological Society. – 1978. – Vol. 71. – P. 469-474.
- Tronsmo A.* Use of *Trichoderma* spp. in biological control of necrotropic pathogens // Microbiology of the phyllosphere. Fokkema N.J., J. van den Heuvel. – 1986. – P. 348-362.
- Tronsmo A.* *Trichoderma harzianum* used for biocontrol agent of storage rot on carrots // Norwegian Journal of Agricultural Sciences. – 1989. – Vol. 3. – P.151-156.
- Tronsmo A.* Biological and integrated controls of *Botrytis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum* // Biological Control. – 1991. – Vol. 1. – P. 59-62.
- Tronsmo A.* Biological Control with *Trichoderma harzianum*. Potential and Characterization of Chitinolytic enzymes. – 1995. – P. 168.
- Tronsmo A.* *Trichoderma harzianum* used in biological control of diseases on apples in Norway / A. Tronsmo, L.G. Hjeljord // Fifth International Gliocladium and *Trichoderma* workshop. – Beltsville, MD, April 1995. Abstract. – 1995.
- Tu J.C.* The effect of the hyperparasite (*Gliocladium virens*) on *Rhizoctonia solani* and on *Rhizoctonia* root rot of white beans / J.C. Tu, O. Vaartja // Canadian Journal of Botany. – 1981. – Vol. 59. – P. 22-27.
- Ulhoa C.J.* Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum* / C.J. Ulhoa, J.F. Peberdy // Curr. Microbiology. – 1991. – Vol. 23. – P. 285-289.
- Undser D.L.* Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions / D.L. Undser, F.L. Byker // Phytopathology. – 1967. – Vol. 57. – P. 1262-1263.
- Utkhede R.* Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes / R. Utkhede, C. Koch // Biol. Control. – 2004. – Vol. 49. – P. 305-313.
- van Loon L.C.* Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria / L.C. van Loon, P.A.H.M. Bakker, C.M.J. Pieterse // Ann. Rev. Phytopathol. – 1998. – Vol. 36. – P. 453-483.
- Vannacci G.* Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop. Abstract / G. Vannacci, S. Pecchia, C. Mallegni, W. Cortellini, F. Faccini // Petria. – 1991. – Vol. 1. – P. 140-141.
- Vanachter A.* *In vitro* evaluation of the antagonistic properties of *Trichoderma* spp. against *Pyrenochaeta lycopersici* and *Phomopsis sclerotoides* / A. Vanachter, E. Wambeke, C. Assche // Bull. OEPP. – 1988. – V. 18, N 1. – P. 1-7.
- Vazquez-Garciduenas S.* Analysis of the b-1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* / S. Vazquez-Garciduenas, C.A. Leal-Morales, A. Herrera-Estrella // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64, N 4. – P. 1442-1446.
- Viterbo A.* Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM / A. Viterbo, S. Haran, D. Friesem, O. Ramot, I. Chet // FEMS Letters. – 2001. – Vol. 200. – P. 169-174.
- Viterbo A.* Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. / A. Viterbo, O. Ramot, L. Chernin, I. Chet // In the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie van Leeuwenhoek. – 2002. – Vol. 81. – P. 549-556.
- Wao S.L.* Mycoparasitic *Trichoderma* strains are activated by host-derived molecules // 6th European Conference on Fungal Genetics. Abstract Book, 6-9 April 2002, Pisa, Italy. – 2002. – P. 306.
- Wao S.L.* Identifying biocontrol genes in *Trichoderma* spp. and mechanisms activating biocontrol processes // 8th International Congress of Plant Pathology. – Christchurch, New Zealand Abstracts. – 2003. – P. 268.
- Webster J.* Does *Trichoderma* produce gliotoxin and viridin? // Transaction of the British mycological Society / J. Webster, Lomas N. 1964. – Vol. 47. – P. 535-540.
- Weidling R.* *Trichoderma lignorum* as a parasite of soil fungi // Phytopath. – 1932. – Vol. 22, N 7. – P. 837-845.
- Wells H.D.* *Trichoderma* as biological agent // In. Biocontrol of plant diseases. – 1988. – Vol. 1. – P. 71-82.
- Wessels J.G.H.* Cell wall synthesis in apical hyphal growth // Int. Rev. Cytol. – 1986. – Vol. 104. – P. 37-79.
- Whipps J.M.* Effect of media on growth and interactions between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi // New Phytol. – 1987. – Vol. 107, N 1. – P. 1259-1264.
- Whipps J.M.* Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // Journal of Experimental Botany. – 2001. – Vol. 52, N 90001. – P. 487-511.
- Williams J.* Saprotrophic and Mycoparasitic Components of Aggressiveness of *Trichoderma harzianum* Groups toward the Commercial Mushroom *Agaricus bisporus* / J. Williams, J.M. Clarkson, P.R. Mills, R.M. Cooper // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – Vol. 69, N 7. – P. 4192-4199.
- Windham M.T.* A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. / M.T. Windham, Y. Elad, R. Baker // Phytopathology. – 1986. – Vol. 76. – P. 518-521.
- Woo S.L.* Disruption of the ech42 (Endochitinase-Encoding) Gene Affects Biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1 / S.L. Woo, B. Donzelli, F. Scala, R. Mach, G.E. Harman, C.P. Kubicek, G.D. Sorbo, M. Lorito // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 1999. – Vol. 12, N 5. – P. 419-429.

Woo S.L. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol / S.L.Woo, V. Fogliano, F. Scala, M. Lorito // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2002. – Vol. 81. – P. 353-356.

Woo S.L. Molecular factors involved in the interaction between plants, pathogens and biocontrol fungi / S.L.Woo, Ruocco M., Ciliento R., Lanzuise S. // 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Volume of Abstracts. – St. Petersburg, Russia, 18-26 July 2003. – 2003. – P. 368.

Wuest P.J., L.A. Anton, and D.M. Beyer. Mushroom crop losses associated with *Trichoderma* green mold when compost was infested prior to casing and the casing was CAC'd or deep-scratched. *Mushroom Green Mold Round Table*. PSU. 1996. P.43.

Yamano T. Trichoviridin, a new antibiotic / T. Yamano, S. Hemmi, I. Yamamoto, K. Tsubaki // *Japanese Kokai*. – 1970. – Vol. 76. – P. 15435.

Yedidia I. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the control agent *Trichoderma harzianum* / I. Yedidia, N. Benhamou, I. Chet // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65, N 3. – P. 1061-1070.

Yedidia I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203 / I. Yedidia, N. Benhamou, Y. Kapulnik, I. Chet // *Plant Physiol. Biochem.* – 2000. – Vol. 38, N 11. – P. 863-873.

Yedidia I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants / I. Yedidia, A.K. Srivastva, Y. Kapulnik, I. Chet // *Plant Soil*. – 2001. – Vol. 235. – P. 235-242.

Yossen V. Efficiency of solarization and biocontrol agents to improve yield of table beet (*Beta vulgaris*) / V. Yossen, G. Zumehu, L. Gasoni, J. Cozzi, K. Kohayashi, S. Babbitt, V. Ban-era, N. Kahn // 8th International Congress of Plant Pathology. – Chischurch, New Zealand, 2-7 February 2003. – 2003. – P. 35.

Zerra J. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride* / J. Zerra, G.A. Uegrone, M. Barbeni, P.A. Guarda // *Ann. Microbiol.* – 1990. – Vol. 40, N 2. – P. 171-176.

Zhang Y. Studies on the control of *Fusarium oxysporum* f. sp/ *cubense* with *Trichoderma* / Y. Zhang, K. Liu, M. Xiang, R. Liu // *J. of Zhejiang University Agriculture and life sciences Proceedings of Eighth International Workshop on Trichoderma and Gliocladium*. – 2004. – Vol. 30, N 4. – P. 406.

Zimand G. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains / G. Zimand, L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet, S. Manulis // *Mycol. Res.* – 1994. – Vol. 98. – P. 531-534.

Zeilinger S. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host / S. Zeilinger, C. Galhaup, K. Payer, S.L. Woo, R.L. Mach, C. Fekete, M. Lorito, C.P. Kubicek // *Fungal Genet. Biol.* – 1999. – Vol. 26, N 2. – P. 131-140.

Zeilinger S. Signal transduction by Tga3, a novel G protein {alpha} subunit of *Trichoderma atroviride* / S. Zeilinger, B. Reithner, V. Scala, I. Peissl, M. Lorito, R.L. Mach // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – P. 1591-1597.

Mycology Today

Volume I. Edited by Yuri T. Dyakov, Yuri V. Sergeev

Contents

ORIGINS AND EVOLUTION OF FUNGI

Karatygin I.V.

Fossil Fungi: The Present State of the Problem

Laboratory of systematics and geography of fungi, V.L. Komarov RAS Botanical Institute, Saint-Petersburg
ikar34@yandex.ru

Recent progress in the palaeomycological studies is presented in this review. The span of geologic time extending from the Devonian examined for many sources of information in relation to major taxonomic and trophic groups of fungi. Special attention is paid to the following main ecological groups of fungi: parasitic, symbiotrophic and saprotrophic. The fungal-plant root associates known as a mycorrhizal symbiosis appear to have evolved in the Early Devonian. Both the fossil record and molecular sequences data suggest that the Glomeromycota and Ascomycota are older than previously thought. The distribution fungi in time based on fossil evidence, together with rapidly accumulating molecular data, will provide the continuing impetus to characterize more accurately the phylogeny and ecology on the fungi and plants.

BIOLOGY OF FUNGAL CELL

Belozerskaya T.A., Gessler N.N.

Oxidative Stress and Differentiation in Fungi

A.N. Bach RAS Institute of Biochemistry, Moscow
tab@inbi.ras.ru

The action of various stress agents on fungal organism leads to an increase of oxygen radicals inside the cell and to development of oxidative stress. The review cites as evidence that reactive oxygen species (ROS) trigger differentiation in fungi. This raises the question what causes formation of ROS in a fungal cell, what is their sensor, and how the signal is transduced to the transcriptional factors which express genes linked to development including genes of antioxidant defense molecules (AD). One of the most interesting and important problems at present is the investigation of AD systems providing for survival of the fungal organism even in extreme conditions. This investigation will help to find out natural antioxidants, necessary for elimination both abiogenic, and biogenic stress factors together with the information on individual AD cell systems of fungi of different habitats.

Kamzolkina O.V., Matrosova E.V.

Mitochondria in Fungi

Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow
kamzolkina@yandex.ru

Mitochondria, essential and highly dynamic organelles of eukaryotic cells, are in the center of attention of scientists in 21 century. During last 10 years the evidences of mitochondria participation in processes of cell aging and the similarity between filamentous fungi and animals in gene regulation of synthesis of mitochondrial proteins, affecting the lifetime, were obtained. Because of these facts, fungi are considered to be one of the best model systems for aging processes investigations. Nevertheless, there are only a few works, dedicated to investigations of mitochondria of filamentous fungi. In spite of the significant progress in understanding of extremely complicated mechanisms of division, regulating the mitochondria behavior, it's still plenty of unknown. In this review the most important questions about mitochondria of filamentous fungi were examined: distinctive features of morphology and structure of mitochondria, its role in cell aging, inheritance, transport, division of mitochondria, connection with other cell organelles, etc.

FUNGAL GENETICS

Shnyreva A.V.

Population Genetics of Fungi

Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow

shnyreva@herba.msu.ru

The review presents information on population genetics of fungi from different taxons. Fungi exhibit wide variation in reproductive strategies and mating systems. Fungal populations can be sexually reproducing and predominantly outcrossing or asexually reproducing and predominantly selfing or even mixed. Classical experimental population genetics deals with genetic polymorphism and evaluation of main forces which affect the genotypic structure of fungal populations. The main aspects under discussion are microevolutionary processes (such as genetic drift, gene flow, mutation, and natural selection) and mechanisms which shape population structure; population genetic parameters which can be assessed in the analysis. Advantages of using different genetic markers are discussed. Special attention is drawn at the advantage of using molecular markers in population analysis. Highly polymorphic molecular markers has improved resolving power for estimating genetic variation within species and discrimination among closely related populations. Assessing genetic variation within populations and genetic exchange between populations requires an understanding of the distribution and abundance of individual genotypes within the population. The level of diversity in panmictic populations versus clonal ones are under discussion as well as estimating relative contributions of sexual and asexual reproduction to the genetic variability in mixed populations. Analysis of genetic differentiation at the population level is also under consideration. The particular interest concerns the multilocus equilibrium test to assess the population structure, inbreeding rates, sexual and clonal reproduction, and inbreeding effective population numbers. It is also discussed why recombination breaks down linkage disequilibrium generated between genes, i.e. associations between genetic markers, and why the linkage disequilibrium presents in a population in which selection favors specific gene combinations. It is shown that the effective population number provides an estimate of population's size relative to a randomly mating population. Evolutionary trends to panmixis or clonality and population mechanisms of microevolution are discussed. The phenomenon of heterokaryon (somatic) incompatibility is mentioned in connection with its role in limiting outbreeding in certain fungal species. Own author's data on population genetic analysis of the basidiomycetous fungus *Pleurotus pulmonarius* are presented in the second part of the review.

Dyakov Y.T., Elansky S.N.

Population Genetics of *Phytophthora infestans*

Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow

diakov@herba.msu.ru, elansky@yahoo.com

Role of different mechanisms such as mutations, migrations, sexual and asexual recombination, and gene introgressions in intra- and interpopulational variability of *Phytophthora infestans* is discussed. Structure of populations in different regions, changes in genotypic structure of populations during the vegetation season and under the influence of cultivars, different fungicides, and host-plant (tomato or potato) are considered. Physiological (mating type, virulence and resistance to fungicides) and molecular (polymorphism of DNA and proteins) methods of variability research are reviewed and estimated for practical use.

ECOLOGY OF FUNGI

Voronina E.Y.

Mycorrhizae in Terrestrial Ecosystems: Ecological, Physiological and Molecular-Genetic Aspects of Mycorrhizal Symbioses

Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow

mvsadnik@list.ru

The distribution of mycorrhizas among plant and fungal lineages and evolution of different mycorrhizal types was reviewed. The position of mycorrhizal symbioses along the mutualism-parasitism continuum, establishment of mycorrhiza with an emphasis on molecular cross-talking between symbionts and ecological roles of mycorrhizas in the host-plant life and coenosis functioning were outlined in the paper.

Marfenina O.E., Fomicheva G.M.

Potentially Pathogenic Filamentous Microfungi in Human Environment

Department of Soil Biology, Moscow State University, Moscow

marfenina@soil.msu.ru, fomichevagm@gmail.com

Distribution of potentially pathogenic microfungi in human environment is determined by natural and anthropogenic factors. The diversity and abundance of potentially pathogenic molds in outdoor conditions (soils, air) increase from the northern to the southern regions. The highest occurrence of opportunistic and allergenic species in the man-made ecosystems at northern and boreal areas was registered in large cities.

In indoor conditions of various geographic regions the dominating microfungi, as usually, belong to the genera *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*. The abundance of fungi in indoor air differs depending on the premises type. Ecological factors stimulating hazardous microfungi growth and approaches of the health risk estimation are discussed.

MEDICAL MYCOLOGY

Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A.

Pathogenic Fungi: Categorization of Biological Risk and Biodiversity

G.K. Skryabin RAS Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms. All-Russian Collection of Microorganisms – VKM. Moscow

smo@dol.ru, nei@dol.ru, gak@dol.ru

Biodiversity and levels of biological risk of pathogenic fungi according to official documents of different countries are considered.

Tutelyan V.A.¹, Kravchenko L.V.¹, Sergeev A.Y.²

Mycotoxins

¹ RAMS Nutrition Institute, Moscow; ² I.M. Sechenov Moscow Medical Academy

myco@iaci.ru

Numerous toxins produced by fungi may spoil food and human environment, becoming the potential cause of disease in humans and animals – mycotoxicosis. The article reviews major toxins produced by mycelial fungi, with special reference to trichotecenes and prevention of mycotoxicoses in Russia and other regions of the world.

Sergeev Y.V. Medical

Mycology in Russia: Current State and Future Directions

Institute of Allergology and Clinical Immunology, Moscow. science@mycology.ru

Medical mycology in Russia is rapidly developing, involving different branches of medical sciences. Several large clinical centers and medical universities are leading in research of superficial and invasive mycoses, fungal pathogenicity, allergy and toxicoses caused by fungi. All-Russian National Academy of Mycology have initiated special research program to improve diagnosis, treatment and prevention of most common fungal infections. The results of this program and current developments of Russian medical mycologists are discussed.

FUNGAL BIOTECHNOLOGY

Feofilova E.P.¹, Tereshina V.M.¹, Memorskaya A.S.¹, Goncharov N.G.², Alekhin A.I.², Dulkan L.M.²

Modern Approaches to the Biotechnology of Lycopene Production from Mycelial Fungi and Medical Uses of Lycopene

¹ S.N. Vinogradsky RAS Institute of Microbiology, Moscow; ² RAS Central Clinical Hospital, Moscow

feofilov@inmi.host.ru, v.m.tereshina@inbox.ru, secretar.ckb@mail.ru

The article deals with lycopene of mycelial fungi and its biotechnological production. Physical and chemical properties of lycopene, its occurrence in nature, and its biological functions in mycelial fungi are discussed. Special

emphasis is placed on the clinically important properties of lycopene and its employment for the purpose of treating cancer and prostate tumour. Authors present data on Mycolycopene, a biologically active substance, and discuss its effects on prostate cancer in animals

Kolombet L.V.

Fungi of Genus Trichoderma as Biofungicide Producers for Agriculture

Russian FMBA Research Centre for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations, Moscow

kolombet@toxicbio.ru

The article reviews the scientific publications of genus Trichoderma fungi as producers of biocontrol agents against plant diseases.