

**ОБЗОРЫ И ДИСКУССИИ**

УДК 582.28 : 632.51 : 632.937.14

© А. О. Берестецкий, С. В. Сокорнова

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ БИОПЕСТИЦИДОВ  
НА ОСНОВЕ МИКРОМИЦЕТОВ**BERESTETSKIY A. O., SOKORNOVA S. V. PRODUCTION AND STABILIZATION  
OF MYCOPESTICIDES

В настоящее время ведутся фундаментальные, углубленные исследования с целью создания биопестицидов. Поиск и первичная оценка различных антагонистов фитопатогенных микроорганизмов, патогенов сорных растений и насекомых-вредителей давно стали систематическими. За рубежом появляется все большее число публикаций, касающихся разработки новых эффективных микробиологических препаратов для защиты растений. В современной российской научной литературе таких публикаций крайне мало. В статье представлены наиболее значимые, с нашей точки зрения, материалы в области разработки биопестицидов за последние несколько лет.

Микромицеты наряду с бактериями и вирусами являются основной группой микроорганизмов, ограничивающих численность определенных видов растений и насекомых в природе, которые подавляют развитие многих возбудителей заболеваний растений. При этом грибы обладают способностью активно распространяться и проникать в ткани хозяев (Leathers et al., 1993). Проблемы, связанные с разработкой коммерчески успешных микопестицидов, в основном биологические и технологические: мицелиальные грибы, как правило, не спороносят при глубинном культивировании; плохо переносят процессы стабилизации; патогенность или антагонистические свойства грибов находятся в сильной зависимости от внешних условий (Montesinos, 2003). Поэтому в данном обзоре будут рассмотрены различные подходы к решению указанных проблем. Авторы видов микромицетов, использованных в качестве примеров, их хозяева и препараты, созданные на их основе, указаны в таблице.

Особенности получения инфекционного материала грибов-продуцентов биопестицидов. Средняя гектарная норма расхода биопрепаратов, созданных на основе грибов, составляет около  $10^{12}$ — $10^{14}$  конидий или колониобразующих единиц (пропагул). Одной из исследовательских задач является получение инфекционного биоматериала, стоимость которого может конкурировать с затратами на производство химических пестицидов (Barlett, Jaronski, 1988). С другой стороны, в процессе некоторых технологических операций (например, сушки) или в период хранения биопрепаратов жизнеспособность пропагул грибов может значительно снижаться. В природе относительно редко складывается оптимальное для быстрого прорастания грибных спор сочетание температуры и влажности. Прорастание спор может подавляться также действием солнечной радиации. Таким образом, подбор состава питательных сред, способа и условий культивирования грибов должен быть направлен не только на повышение выхода различных видов инокулюма, но и на повышение качества инфекционного материала — устойчивости к стрессовым воздействиям и эффективности в полевых условиях (Wraight et al., 2001).

**Примеры грибов, используемых для создания биопестицидов,  
которые упомянуты в тексте статьи (ссылки в тексте)**

Вид гриба, автор	Целевые объекты	Тип пропагул, препараты
	<b>Биогербициды</b>	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	Посконник железконосный ( <i>Eupatorium adenophora</i> Spreng.)	Мицелий
	Лобелия цейлонская ( <i>Sphenoclea zeylanica</i> Gaertn.)	Конидии
<i>A. cassiae</i> Jurair et A. Khan	Резуха канадская ( <i>Cassia obtusifolia</i> L.)	»
<i>A. crassa</i> (Sacc.) Rands	Дурман вонючий ( <i>Datura stramonium</i> L.)	»
<i>Bipolaris euphorbiae</i> (Hansf.) J. J. Muc-hovej et A. O. Carvalho	Молочай разнолистный ( <i>Euphorbia heterophylla</i> L.)	»
<i>B. sorokiniana</i> (Sacc.) Shoemaker	Подмаренник цепкий ( <i>Galium aparine</i> L.)	Мицелий
<i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallr.) S. Hughes	Канатник Теофраста ( <i>Abutilon theophrasti</i> Medik.)	Конидии
<i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. et Sacc.	Эшиномене виргинская ( <i>Aeschynomene virginica</i> L.)	Конидии, Collego™, США
	Просвирник круглолистный ( <i>Malva pusilla</i> With.)	Конидии, BioMal™, Канада
	Резуха канадская ( <i>Senna obtusifolia</i> L.)	Конидии
<i>C. truncatum</i> (Schwein.) Andrus et W. D. Moore	Сесбания возвышенная ( <i>Sesbania exaltata</i> Raf.)	Микросклероции, конидии
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	Канареечник канарский ( <i>Phalaris canariensis</i> L.)	Конидии
<i>F. lateritium</i> Nees	Анода хохлатая ( <i>Anoda cristata</i> L.), грудника колючая ( <i>Sida spinosa</i> L.), канатник Теофраста ( <i>Abutilon theophrasti</i> Medik.)	»
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>orthoceras</i> (Appel et Wollenw.) Bilai	Заразиха кумская ( <i>Orobanche cumana</i> Wallr.)	»
<i>Gloeocercospora sorghi</i> D. C. Bain et Edgerton ex Deighton	Сорго алеппское ( <i>Sorghum halepense</i> L.)	»
<i>Mycleptodiscus terrestris</i> (Gerd.) Ostaz.	Гиацинт водяной ( <i>Eichornia crassipes</i> Mart.)	Микросклероции
<i>Phytophthora palmivora</i> (E. J. Butler) E. J. Butler	Лоза млечная ( <i>Morrenia odorata</i> L.)	Хламидоспоры, De-Vine™, США
<i>Phomopsis convolvulus</i> Ormeno-Nuñez	Вьюнок полевой ( <i>Convolvulus arvensis</i> L.)	
<i>Rhynchosporium alismatis</i> = <i>Plectosporium tabacinum</i> (J. F. H. Beyma) M. E. Palm, W. Gams et Nirenberg	Подмаренник ложный ( <i>Galim spurium</i> L.)	Хламидоспоры, конидии
<i>Septoria passiflorae</i> Syd.	Пассифлора трехраздельная ( <i>Passiflora tripartita</i> Juss.), пассифлора вонючая ( <i>P. foetida</i> L.)	Конидии
<i>S. polygonorum</i> Desm.	Горец развесистый ( <i>Polygonum lapathifolium</i> L.)	»
<i>Stagonospora convolvuli</i> Dearn. et House	Вьюнок полевой ( <i>Convolvulus arvensis</i> L.)	»
<i>Trematophoma lignicola</i> Petr.	Ширица запрокинутая ( <i>Amaranthus retroflexus</i> L.)	»

Вид гриба, автор	Целевые объекты	Тип пропагул, препараты
<b>Биоинсектициды</b>		
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	Долгоносик табачный ( <i>Anthonomus eugeni</i> Cano), долгоносик хлопковый ( <i>Anthonomus grandis</i> Boheman), белокрылки (Homoptera: Aleyrodidae)	Конидии, Bea-Sin, Мексика
	Жук колорадский ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say), плодовая яблонная ( <i>Cydia pomonella</i> Linnaeus)	Конидии и бластоспоры, Боверин, Россия
	Белокрылки, тли (Homoptera: Aphididae), трипсы (Homoptera: Thysanoptera), саранчовые (Arthropoda: Acridoidea), моль капустная ( <i>Plutella maculipennis</i> Curt.)	Конидии, Mucotrol/BotaniGard, США
	Белокрылки, тли, трипсы	Конидии, Naturalis, США
	Мотылек кукурузный ( <i>Pyrausta nubilalis</i> Hubn.)	Конидии, Ostrinil, Франция
<i>Lagenidium giganteum</i> Couch	Комары кровососущие (Diptera: Culicidae)	Мицелий, Laginex, США
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	Термиты (Isoptera: Termitidae)	Конидии, Bio-Blast, США
	Тараканы (Blattodea: Blattidae)	Конидии, Bio-Path, США
	Хрущ майский (личинки) ( <i>Melolontha melolontha</i> L.)	Конидии, Metarhizium Schweizer, Швейцария
	Долгоносик табачный ( <i>Anthonomus eugeni</i> Cano)	Конидии, Meta-Sin, Мексика
<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> Driver et Milner	Саранчовые	Конидии, Green Muscle, ЮАР
<i>M. flavoviride</i> W. Gams et Rozsypal	Саранча пустынная ( <i>Schistocerca gregaria</i> Forsk.)	Конидии
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (Wize) A. H. S. Br. et G. Sm.	Белокрылки	Конидии, Pac-Sin, Мексика Бластоспоры, PreFeral, США
<b>Биофунгициды</b>		
<i>Aspergillus flavus</i> Link, <i>A. parasiticus</i> Speare (атоксигенные штаммы)	Токсигенные штаммы <i>Aspergillus</i> spp.	Конидии
<i>Coniothyrium minitans</i> W. A. Campb.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	Конидии, Contans®, Германия
<i>Epicoccum nigrum</i> (Link) Schol-Schwarz.	<i>Monilinia laxa</i> (Aderh. et Ruhland) Honey	Конидии
<i>Gliocladium virens</i> J. H. Mill., Giddens et A. A. Foster	<i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kuhn, <i>Pythium</i> spp.	Хламидоспоры, Soil-Gard™, США
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) F. C. Harrison	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. et Sacc.	Бластоспоры
<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. et Nirenberg	<i>Gibberella fujikuroi</i> (Sawada) Wollenw.	Мицелий, Микол, Россия
<i>T. viride</i> Pers.	Возбудители болезней корневой системы растений	Мицелий
<i>Ulocladium atrum</i> Preuss	<i>S. sclerotiorum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	Конидии

Конидии являются наиболее предпочтительным типом инфекционного материала грибов при разработке биопестицидов. Хорошо известно, что мицелий грибов, как правило, менее устойчив к стресс-факторам, чем конидии. Однако такие его образования, как хламидоспоры, микросклероции и склероции, способны к длительному существованию в неблагоприятных условиях и инфицированию организмов-хозяев после прорастания мицелия или образования спороношения (Hoffmann, 2001).

Основным промышленным способом получения конидий грибов является жидко-фазное глубинное культивирование. Однако жидкость — необычная для грибов среда обитания, даже для морских видов. Так, 98 % морских видов грибов выделены из подводных твердых субстратов (Hölker et al., 2004). Конидии грибов, полученные в глубинной культуре, по своим морфологическим и физиологическим свойствам могут значительно отличаться от воздушных, полученных на твердом субстрате. Например, глубинные конидии и бластоспоры *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* отличались пониженной гидрофобностью поверхности (признак, который может отвечать за закрепление спор на кутикуле насекомых), но прорастали быстрее, чем воздушные конидии гриба (Leland et al., 2005). Более того, к спороношению при погруженном культивировании, по-видимому, способны лишь те микромицеты, у которых конидии образуются в результате почкования — при наличии бластического типа конидиогенеза (например, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Septoria*) или при распадения мицелия на фрагменты — артроконидии.

Твердофазная ферментация (ТФ) является более естественной для грибов, поскольку они заселяют преимущественно твердые субстраты. Многочисленные работы показывают, что конидии грибов, полученные при помощи ТФ, обладают повышенной устойчивостью к таким стрессам, как высушивание и перепады температуры (Hölker et al., 2004). Так, конидии *Colletotrichum truncatum*, полученные при помощи ТФ на вермикулите с добавлением различных питательных веществ, были более вирулентными и дольше сохраняли жизнеспособность после сушки, чем конидии гриба, полученные в глубинной культуре на оптимизированной жидкой среде. Авторы связывают это и с тем, что при ТФ конидии гриба обволакиваются внеклеточным матриксом, который может выполнять защитные функции (Silman et al., 1993). Поэтому для определения свойств глубинных конидий их иногда сравнивают с «эталонном» — толерантностью к высушиванию, скоростью прорастания и вирулентностью воздушных конидий.

Когда получение глубинных конидий и бластоспор технологически проблематично (например, для образования спороношения необходимо освещение, споры слишком быстро теряют жизнеспособность), в качестве инокулюма используют мицелий грибов. Так, было показано, что мицелий *Alternaria alternata* значительно эффективнее конидий для борьбы с *Eupatorium adenophora* (Qiang et al., 2006). Разработан микоинсектицид на основе мицелия *Metarhizium anisopliae* против некоторых почвенных вредителей клоувы (Booth et al., 2000).

Многие зарегистрированные и потенциальные биопестициды в качестве активного начала содержат хламидоспоры и микросклероции. Недостатком этого типа пропагул может быть неравномерное прорастание. Однако прорастание глубинных конидий *Rhynchosporium alismatis* было значительно хуже (40 %), чем хламидоспор (90 %) этого гриба, полученных в глубинной культуре (Cliquet et al., 2004). Микроконидии *Fusarium oxysporum* были менее устойчивы к высушиванию, чем хламидоспоры; разработана жидкая питательная среда для получения последних (Müller-Stöver et al., 2001, 2002; Elzein, Kroschel, 2004). При глубинном культивировании *Mycroleptodiscus terrestris* практически не образует конидий, но микросклероции этого гриба после высушивания способны прорасти мицелием и образовывать конидиомы (Shearer, Jackson, 2006). Микросклероции *Colletotrichum truncatum*, полученные в глубинной культуре, лучше переносят сушку, чем конидии (Jackson, Schisler, 1995; Connick et al., 1997).

В надежде предсказать композицию «идеальной клетки» в последнее время стало уделяться внимание изучению свойств клеточной стенки и биохимического состава

пропагул грибов-продуцентов биопестицидов в связи с их устойчивостью к неблагоприятным воздействиям (например, замораживанию или высушиванию) и патогенными свойствами.

Устойчивость грибов к повышенным или пониженным температурам лучше всего изучена на примере дрожжей и некоторых почвенных грибов. Так, по сравнению с мезофильными видами дрожжей клетки ксерофильных и психрофильных грибов более активно накапливают протекторные вещества — полиолы (глицерин, маннитол, арабитол, эритрит и другие) и углеводы (глюкозу, трегалозу и некоторые другие). Эти вещества стабилизируют структуру мембран и конформацию белков при тепловом шоке (Hocking, 1993), замещают воду в мембранах и предотвращают ее кристаллизацию в клетке при пониженных температурах (Smith, 1993). Термофильные грибы содержат заметно больше насыщенных жиров, чем мезофильные (Magan, 2007).

Некоторые из указанных веществ являются резервным питательным материалом клеток грибов и играют определенную роль в цикле их развития. Так, мутантные штаммы фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* Pers., неспособные к синтезу трегалозы, были менее устойчивы к воздействию теплового шока и прорастали хуже, чем штаммы дикого типа, что, однако, не влияло на их вирулентность (Doehlemann et al., 2006). Мутантные штаммы *Stagonospora nodorum* (Berk.) Berk. — возбудителя пятнистости листьев злаков, неспособные к синтезу маннитола, сохраняли вирулентность, но теряли способность к спороношению *in planta* (Solomon et al., 2006). Содержание нейтральных липидов в мицелии вирулентных и авирулентных штаммов фитопатогенных *Verticillium dahliae* и *V. lateritium* не различалось (Тен и др., 1977). Выявлены значительные различия в содержании липидов и их составе в мицелии и конидиях *Metarhizium anisopliae* (Pupin et al., 2000).

Интересно, что качественный и количественный состав протекторов в искусственно полученных на стандартных богатых питательных средах и природных спорах грибов сильно различается. Последние, как правило, содержат больше протекторов, намного агрессивнее, более толерантны к абиотическим факторам. На примере ряда потенциальных биоинсектицидов и биофунгицидов было показано, что конидии их продуцентов, полученные на питательных средах, которые стимулируют накопление в них протекторных веществ, были эффективнее в полевых условиях, чем инокулюм, полученный на обычных богатых субстратах (Magan, 2001; Shah et al., 2005).

Далее будут рассмотрены некоторые достижения в получении пропагул грибов-продуцентов биопестицидов.

**Твердофазное культивирование.** В последнее время наблюдается значительный прогресс в конструировании биореакторов для ТФ. Некоторые биотехнологические компании (например, немецкая фирма Prophyta, [www.prophyta.com](http://www.prophyta.com)) получают инфекционный материал (конидии) для микопестицидов исключительно при помощи ТФ. Для небольших производств предложены специальные «мини»-биореакторы — полипропиленовые пакеты с перфорацией (Barlett, Jaronski, 1988; de Vrije et al., 2001). Полупромышленная технология получения конидий *M. flavoviride* на рисе в полипропиленовых пакетах позволяет получать примерно  $1.5 \times 10^{12}$  конидий/кг субстрата при рабочем цикле 82 кг, 1.6 циклов в неделю (Jenkins et al., 1998). Разработана технология получения конидий *Coniothyrium minitans* (более  $5 \times 10^{14}$  конидий/м<sup>3</sup> ферментера) в промышленных биореакторах для ТФ различного типа на зерне овса (de Vrije et al., 2001; [www.prophyta.com](http://www.prophyta.com)). Некоторые виды грибов (например, из родов *Ascochyta*, *Alternaria*) образуют спороношение только при ближайшем ультрафиолетовом облучении культур, что делает практически невозможным получение конидий при помощи глубинной жидкофазной ферментации. При культивировании их в стеклянных биореакторах эту проблему для ТФ можно решить (Peter Lüth, Prophyta, личное сообщение).

При ТФ можно манипулировать такими начальными параметрами культивирования, как субстрат (питательность, размер частиц, водопоглощающая способность), его влажность, рН питательной среды. Однако в биореакторах для ТФ крайне трудно устранить градиент температуры и концентрации кислорода в слое субстрата (Barlett,

Jaronski, 1988; Hölker et al., 2004). Повышение температуры в результате выделения метаболического тепла может приводить к снижению влажности верхних слоев субстрата или его комкованию в нижних слоях, что может замедлять рост гриба и ингибировать спороношение. Образование конидий *Alternaria cassiae* и *A. crassa* на твердых питательных средах подавлялось при повышенной концентрации углекислого газа (Smart et al., 1992). Данную проблему можно решить путем подбора водоудерживающих добавок к субстрату (например, тресты конопли), соответствующим перемешиванием и аэрацией субстрата (de Vrije et al., 2001).

Для ТФ могут быть использованы разнообразные субстраты: органические (зерно, семена, отходы переработки растительного и пищевого сырья) или неорганические (например, перлит, вермикулит), с добавлением питательных веществ. Известна заявка на патент, где зерно ячменя предлагается как универсальный субстрат для получения конидий энтомопатогенных гифомицетов (Bradley et al., 2002). Высокий выход жизнеспособных конидий ( $0.8\text{—}1.0 \times 10^9$  конидий/г) *Bipolaris euphorbiae* получен на зернах сорго и кукурузы (попкорне) на 15-е сутки роста (Marchiori et al., 2001). Для *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae* лучшим зерновым субстратом было сорго: на 28-е сутки культивирования в темноте при 28 °С гриб образовывал  $2 \times 10^6$  конидий/г субстрата, жизнеспособность которых за 12 месяцев хранения при 24 °С снижалась лишь на 10 % (Masangkay et al., 2000). Кокосовые стружки и кукурузная крупа стимулировали спороношение у *Stagonospora convolvuli* LA39 на уровне  $3\text{—}5 \times 10^8$  конидий/г субстрата на 15-е сутки инкубации при 20 °С и освещении люминесцентными лампами (Pfirter et al., 1999).

Количество несвязанной воды в субстрате (зерне пшеницы) влияло на выход конидий *Epicoccum nigrum* и содержание в них протекторных веществ — полиолов и сахаров. При поддержании пониженной активности воды в субстрате ( $a_w = 0.98$ ) путем смешивания воды с глицерином споропродуктивность гриба была выше, чем при активности воды в зерновом субстрате, равной 0.996. При пониженной активности воды (0.98) в субстрате конидии *E. nigrum* содержали значительно больше глицерина, чем при повышенной активности воды — 0.996 (Pascual et al., 1999). При хранении в виде пасты при температуре 25 °С конидии *E. nigrum*, полученные на картофельно-глюкозной агаризованной среде с пониженной активностью воды ( $a_w = 0.98$ ), сохраняли более высокий уровень выживаемости, чем конидии, образовавшиеся при высоком содержании несвязанной воды ( $a_w = 0.995$ ) (Pascual et al., 2002). Очень часто приходится искать компромисс между качеством инокулюма (содержанием протекторных веществ) и его выходом, поскольку эти характеристики подчас не совпадают. Так, максимальный выход конидий *Beauveria bassiana* на рисе был получен при  $a_w = 0.999$ , рН 5.0—6.0, в то время как максимальное накопление полиолов (глицерина и эритрита) в конидиях гриба наблюдалось при  $a_w = 0.950$  и рН 4.5 (Tarocco et al., 2005).

Значительное количество протекторных веществ (полиолов, трегалозы) было обнаружено в жидкости, при помощи которой смывали конидии *Epicoccum nigrum* с зернового субстрата (Pascual et al., 1999). Возможно, что частично компенсировать потерю защитных веществ, содержащихся во внеклеточном конидиальном матриксе, может смыв конидий с субстрата физиологическим раствором. Предположительно, это приводит к модификации клеточных мембран и последующей повышенной устойчивости конидий некоторых грибов к высушиванию, что показано на примере *Colletotrichum truncatum* (Montazeri, Greaves, 2002).

Жидкофазное культивирование. Возможность полностью контролировать процесс ферментации и ее сравнительно краткая продолжительность (несколько суток) — несомненное преимущество глубинной жидкофазной ферментации (ГЖФ) перед ТФ. Для многих продуцентов биопестицидов разработан состав жидкой питательной среды и условия глубинного культивирования. Так, среда коммерческого типа для получения конидий *Colletotrichum truncatum* включает глюкозу (20 г/л), дрожжевой экстракт (2.5 г/л), Pharmamedia (7.5 г/л, мука из семян хлопчатника) и различные соли. За 72 ч ферментации образуется более  $6 \times 10^7$  конидий/мл (Silman, Nel-

sen, 1993). Для получения высокого титра бластоспор *Paecilomyces fumosoroseus*, устойчивых к высушиванию (лиофилизации), была оптимизирована питательная среда, позволяющая получать  $1\text{--}2 \times 10^9$  спор/мл за 48 ч ферментации. Решающими факторами являлись: высокая концентрация посевного материала, богатый аминокислотами источник азота и микроэлементы (Jackson et al., 2003). Разработаны состав питательной среды и параметры ферментации (2 % посевного материала, длительность 120—160 ч) для стабильного получения высокого титра (более  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл) зрелых хламидоспор *Gliocladium virens* штамма GL-21 (Eyal et al., 1997).

Для получения необходимого титра инфекционного материала, обладающего высокой жизнеспособностью и патогенностью, а также устойчивостью к стрессовым факторам, состав жидкой питательной среды требует оптимизации. Для этого успешно был реализован следующий алгоритм оптимизации состава питательной среды (Jackson, 1997): 1) подбор базовой среды с набором витаминов и микроэлементов, на которой гриб хорошо растет и/или спороносит; 2) подбор источников углерода и азота и определение их оптимальных концентрации и соотношения; 3) замена искусственных источников углерода и азота на дешевые природные. Для повышения выхода конидий *Gloeocercospora sorghi* и *Septoria polygonorum* достаточно быстрой и успешной была классическая методология факториальных экспериментов в сочетании с компьютерным моделированием поверхности отклика (response surface model) (Mitchell, 2003; Mitchell et al., 2003).

Для получения высоких титров конидий *Colletotrichum coccoides* оптимальная концентрация углерода в среде составляла 20 г/л при соотношении C/N = 10 : 1 (Yu et al., 1998). У *Colletotrichum truncatum* микроциклическое спороношение было индуцировано при концентрации углерода в среде 4—16 г/л и C/N от 10 : 1 до 80 : 1. При концентрации углерода более 25 г/л в глубинной культуре этого гриба образовывались микросклеротии. Максимальный выход конидий *C. truncatum* был получен при концентрации углерода 4—8 г/л и C/N = 30 : 1, однако более патогенными и устойчивыми к сушке оказались конидии, выращенные на среде, в которой с C/N = 10 : 1. Такие конидии содержали больше белков, трегалозы и полиолов, но меньше глюкозы и липидов, чем выращенные на средах, в которых C/N = 30 : 1 и 80 : 1 (Jackson, 1997; Wraight et al., 2001; Montazeri, Greaves, 2002; Montazeri et al., 2003). На штаммах энтомопатогенных грибов и антагонистических микромицетов Гао и соавторы показали, что зависимость роста и спорообразования грибов от концентрации и соотношения углерода и азота не только видоспецифическая, но и штаммоспецифическая.

Тоничность жидкой питательной среды, или ее водный потенциал, оказывает заметное влияние на выход и качество пропагул некоторых грибов-продуцентов биопестицидов. Так, впервые было получено спороношение *Ulocladium atrum* в жидкой среде с пониженным водным потенциалом ( $\Psi = -2.1$  МПа) в результате добавления в среду глицерина (7.3 % масса/объем) и хлорида кальция (20 мМ). Глубинные конидии гриба, полученные на среде с пониженным водным потенциалом, сохраняли жизнеспособность на уровне воздушных конидий. Содержание полиолов и трегалозы у воздушных конидий и конидий, полученных на жидкой среде с повышенной тоничностью, было примерно одинаковым (Freu, Magan 2001). Повышенная тоничность (осмоляльность 804—1454 мОsm) жидкой питательной среды, созданная 50—150 г/л полиэтиленгликоля PEG 200, повышала выход погруженных конидий *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* примерно на 25 %. Они обладали повышенной патогенностью и толерантностью к высушиванию (Leland et al., 2005).

Другой стресс-фактор — неоптимальный источник углерода (фруктоза, лактоза, галактоза) стимулировал образование конидий *M. anisopliae*, устойчивых к дальнему ультрафиолетовому облучению (< 290 нм) и накапливающих примерно в 2 раза больше маннитола и трегалозы, чем на питательной среде с глюкозой, на которой наблюдали максимальное образование конидий (Rangel et al., 2006). При культивировании *Beauveria bassiana* на среде, содержащей п-гексадекан в качестве единственного источника углерода, состав липидов в мицелии существенно изменился по сравне-

нию с мицелием, полученным на среде с глюкозой, — содержание насыщенных жиров увеличилось примерно в 2 раза. При этом патогенность конидий, полученных на среде с указанным алканом, была примерно в 3 раза выше, чем у конидий, полученных на среде с глюкозой (Crespo et al., 2002).

**С т а б и л и з а ц и я п р о п а г у л.** Биоматериал, полученный в результате ферментации и отделения его от культуральной жидкости или твердого субстрата, как правило, не подлежит долгому хранению. Даже при пониженной температуре хранения споры грибов, не говоря о мицелии, при достаточной влажности способны к прорастанию, что ведет к их гибели в отсутствие питающего субстрата. Многие биопестициды, полученные на региональных малотоннажных производствах, применяются по этой причине в течение нескольких недель после окончания ферментации, как, например, микрогербицид DeVine™ на основе спор *Phytophthora palmivora* (Wraight et al., 2001; Auld et al., 2003).

На крупных биотехнологических производствах живую основу биопестицидов требуется стабилизировать — на длительное время предотвратить прорастание пропагул (инфекционных единиц). Это достигается в основном концентрированием, сушкой или инкапсуляцией биоматериала в полимерные оболочки и хранением в определенных условиях. Современный биопрепарат в идеале должен храниться не менее 2 лет при 4 °С, около одного года при 20—25°, три месяца при 30°, несколько суток при 40—50 °С (Wraight et al., 2001).

Для некоторых микроорганизмов известны простые и недорогие способы стабилизации и хранения. Например, инфекционный материал антагонистических штаммов *Fusarium oxysporum* получают, сушат и хранят в торфе. Споры гриба не теряют жизнеспособности несколько лет (Alabouvette et al., 2007). Универсальных рецептов, однако, не существует, и для каждого вида гриба, его типа пропагул требуется поиск оптимальных способов стабилизации и условий хранения.

Как известно, рост и развитие грибов сильно зависят от температуры, доступности воды, pH среды и концентрации кислорода. Для стабилизации пропагул грибов манипулируют этими факторами: искусственно понижают pH и активность воды в жидких препаратах, поддерживают низкую температуру, хранят их при пониженном содержании кислорода (Magan, 2007; Teshler et al., 2007).

Споры многих групп микромицетов содержат ингибиторы, предотвращающие их прорастание в плодовых телах, конидиомах и пустулах даже при благоприятных для этого влажности и температуре. Эти ингибиторы, выделенные в чистом виде из спор некоторых ржавчинных грибов и *Colletotrichum* spp., обладали фунгистатическим действием (Macko et al., 1970, 1971; Lax et al., 1985; Inoue et al., 1996; Ley et al., 2003). По мнению специалистов (Sparace et al., 1991), они могут быть использованы как природные консерванты, например для стабилизации глубинных конидий.

Агрегированные в споровместилищах споры многих грибов способны переживать сезон и более длительное время при крайне неблагоприятных переменчивых условиях внешней среды, включая высушивание, солнечную радиацию и низкие зимние температуры. Как правило, такие споры пигментированы, окружены толстой оболочкой (например, пигментированные телеитоспоры ржавчинных и головневых грибов) или заключены во внеклеточный матрикс (например, у целомицетов). Анализ химического состава конидиальной слизи у ряда видов *Ascochyta* и *Phoma* показал, что она содержит пигменты, глюкозу, полисахариды, тирозин и белки. При вымывании слизи конидии хуже прорастают, менее устойчивы к высушиванию и УФ-облучению (Успенская, Решетникова, 1979; Успенская и др., 1980). Аналогичные данные получены при изучении химического состава конидиального матрикса *Phomopsis convolvulus* (Sparace et al., 1991).

Наличие в грибных клетках протекторных веществ (фенольных пигментов, полиолов, сахаров) и толщина клеточной стенки играют важную роль в устойчивости к искусственному высушиванию у мезо- и гигрофильных грибов. Пигменты, особенно фенольные, способны к утилизации свободных кислородных радикалов, образование которых индуцируется в процессе сушки (Hoffmann, 2001; Magan, 2007). Поэтому

при высушивании к биоматериалу добавляют протекторы в концентрации 5—20 %, которые регулируют осмотическое давление и устраняют вредное воздействие кислорода и свободных радикалов. Хранить высушенную биомассу желательно в темноте, при минимальном доступе кислорода. Важным этапом является и обратный процесс — регидратация, которая должна быть постепенной, во влажной атмосфере, в теплой воде, чтобы не повредить клеточные мембраны (Hoffmann, 2001).

**Концентрирование и консервация биомассы.** Приготовление суспензионных концентратов, концентрат-эмульсий и паст с добавлением консервантов (ингибиторов прорастания, антибиотиков и пр.) — наиболее простые способы стабилизации и хранения пропагул грибов, особенно если инфекционный материал неустойчив к высушиванию.

**Концентраты.** Разработана жидкая препаративная форма биофунгицида на основе дрожжей *Rhodotorula minuta* для борьбы с антракнозом манго. Добавление глицирина (20 %) и ксантана (0.5 %) к концентрированной суспензии биоматериала ( $10^9$  КОЕ/мл) предотвращало контаминацию препарата и осаждение клеток. При температуре 4 °С количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в препарате снижалось примерно в 100 раз через 6 месяцев хранения (Patiño-Vera et al., 2005). Для хранения биоинсектицида на основе мицелия *Lagenidium giganteum* разработана концентрат-эмульсия, содержащая 40 % рафинированного кукурузного масла с добавлением эмульгатора и аэросила (AEROSIL Fumed Silica, R974). Последний (в концентрации 0.5 %) предотвращал седиментацию мицелия и его агрегацию. Препарат хранился 12 недель при комнатной температуре без потери эффективности против личинок комаров.

**Пасты.** Мицелий *Trichoderma asperellum* (штамм GSS 03-35), полученный на специально подобранной среде в глубинной культуре, удалось стабилизировать концентрированием (до 6—10 % сухого вещества) в пасту, содержащую кукурузный крахмал (5 %) в качестве загустителя. Мицелий гриба консервировали подкислением пасты до pH 3 и добавлением сульфата меди (20 мг/л). В процессе хранения мицелий гриба постепенно преобразовывался в хламидоспоры и конидии. Препарат хорошо хранился не менее 6 месяцев при 20 °С и был эффективен при защите пшеницы от фузариоза колоса (Коломбет, 2006; Kolombet et al., 2008).

**Сушка.** Высушивание инфекционного материала является основным методом стабилизации инокулюма. Помимо простой сушки теплым воздухом на поддонах используют распылительную сушку, сушку в псевдокипящем слое и лиофилизацию. Способ сушки выбирают в зависимости от его доступности/стоимости и от чувствительности биологического материала к нему.

**Конвекционная сушка.** Биоматериал, смешанный с наполнителями и протекторами, раскладывают в поддонах тонким слоем и сушат током воздуха. Таким образом, получают биофунгицид триходермин (Биотехмаш, Украина) в виде смачивающегося порошка (Старчевский, Самойлов, 2002). Этот простой способ сушки может применяться для небольших партий биоматериала и для предварительных экспериментов. Так, при сушке бластоспор *Paecilomyces fumosoroseus* стерильным воздухом при 26—28 °С в качестве наполнителей и протекторов были испытаны кукурузный крахмал, рисовая мука, талк, диатомовая земля (кизельгур) и каолин. Последний (в концентрации 5 % по массе к объему спорового концентрата) позволял сохранить удовлетворительную жизнеспособность конидий ( $\geq 50$  %) более 7 недель при 4 °С. Конидии *Stagonospora convolvuli* (штамм LA39), полученные на агаризованной питательной среде V-8, высушенные с наполнителем (1 г каолина/ $10^9$  конидий) током воздуха, сохраняли высокую жизнеспособность ( $\geq 70$  %) и патогенность примерно 5 месяцев при температуре 3 °С. На 17-й месяц жизнеспособность сохранилась лишь у 5 % конидий гриба. При температуре хранения 20 °С жизнеспособность конидий снижалась до 20 % в течение недели (Pfirter et al., 1999).

Способ сушки «Старезе» (Stareze) основан на добавлении стабилизатора мембран (сахарозы) еще в процессе культивирования микроорганизма. Сахарозу (40 г/л) внесли в 96-часовую глубинную культуру *Metarhizium anisopliae*; через 72 ч фермен-

тационному продукту добавляли диоксид кремния (HiSil®, 35 г/л), перемешивали, отфильтровывали его от культуральной жидкости и сушили в поддонах током воздуха. Полученные таким образом бластоспоры гриба сохраняли высокий уровень жизнеспособности около 6 месяцев при температуре хранения 2—4 °С (Quimbi et al., 2001).

**Распылительная сушка.** В сушильно-грануляционных установках суспензия биоматериала (с добавкой ПАВ и протекторов) распыляется в нагретом воздухе с последующим быстрым ее высыханием (5—30 с) и формированием гранул сферической формы с гладкой поверхностью диаметром 10—500 мкм. Распыленная суспензия может направляться на «подстилку» из уже высушенного материала, барботируемую воздухом (псевдокипящий слой). Частички материала, образующиеся из распыленного состава, постепенно налипают на частицы подстилки, увеличивая их размер и массу, в результате образуются гранулы ([www.niroinc.com](http://www.niroinc.com) — сайт производителя соответствующего оборудования).

Глубинные конидии *M. anisopliae* с добавлением 20 % обезжиренного молока и 2.5 % сахарного сиропа переносили распылительную сушку лучше, чем лиофилизацию. Однако температура «на входе» и «на выходе» оказывала существенное влияние на их жизнеспособность (Stephan, Zimmermann, 2001). Гранулы коммерческого биофунгицида Contans® получают при помощи высушивания конидий *Coniothyrium minitans* в растворе глюкозы в распылительной сушильной установке; конечный препарат содержит приблизительно 95 % глюкозы и 5 % конидий (около  $1 \times 10^{13}$  конидий/кг), хранится без заметной потери жизнеспособности конидий около 2 лет при температуре 4 °С (de Vrije et al., 2001). Однако этот способ сушки в некоторых случаях неэффективен. Конидии эпифитного гриба *Epicoccum nigrum*, полученные при помощи твердофазной ферментации, после высушивания с различными наполнителями при помощи распылительной сушки (при 150 °С на «входе») практически полностью теряли свою жизнеспособность. Однако при высушивании в псевдокипящем слое при температуре 30—40 °С конидии *E. nigrum*, высушенные без протекторов, сохраняли 100%-ю жизнеспособность более 90 суток (Larena et al., 2003).

**Лиофильная сушка.** При лиофилизации вода под низким давлением удаляется из замороженного материала путем превращения льда в пар, минуя жидкое состояние. Конидии *Septoria passiflorae* хорошо переносили лиофильную сушку при добавлении 10 % обезжиренного молока в качестве протектора; гриб сохранял жизнеспособность при хранении в вакуумной упаковке и температуре 1 °С не менее одного года (Norman, Trujillo, 1995). Бластоспоры *Paecilomyces fumosoroseus* с добавлением протекторов (10 % лактозы + 1 % бычьего альбумина или композиции из крахмала, растительного масла, сахарозы и молока) сохраняли жизнеспособность на уровне 75 % при температуре хранения —20 °С в течение 50 недель, тогда как к этому времени при 4 °С их жизнеспособность снижалась до уровня около 10 %.

И н к а п с у л я ц и я. Концентрированный биоматериал можно заключить в различные полимерные матрицы, которые защищают клетки микроорганизмов от внешних воздействий, прежде всего от контаминации и ультрафиолета. Продукт, полученный в результате процесса инкапсуляции, представляет собой гель, гранулы, капсулы и микрокапсулы. В настоящее время для их получения разработаны промышленные аппараты (Vorlop et al., 2001).

**Альгинатные гранулы.** Процесс основан на полимеризации альгината натрия в растворе хлорида кальция. Например, суспензию биоматериала (1 часть) перемешивают с альгинатом натрия (1.3%-й раствор, 4 части) и каолином (5 % от общего веса); смесь вносят по каплям в 0.25 М раствор хлорида кальция; полученные гранулы отфильтровывают и сушат. Впервые метод был апробирован для *Alternaria cassiae*. Интенсивность спороношения гриба на гранулах зависела от способа получения инокулюма, наполнителей и питательных добавок, которые входили в состав гранул; например, каолин можно эффективно заменить кукурузной мукой грубого помола (Daigle, Cotty, 1992).

Различные варианты альгинатных гранул были испытаны для множества потенциальных и коммерческих продуцентов биопестицидов. Было показано, что хитин (2 %

от веса гранул) с пшеничными отрубями (2 %) значительно повышали спорообразование *Beauveria bassiana* (Gerding-González et al., 2007). Добавление крахмала (0.5 %) ускорило разрыв гранул и колонизацию торфяного субстрата грибом *Trichoderma viride* (Чекалова, 2007). Для полевых испытаний препарата атоксигенного штамма *Aspergillus flavus* в виде альгинатных капсул были испытаны различные питательные добавки (1 % от веса капсул) и фунгициды (0.5—1.25 мг на 50 г смеси альгината натрия с 2.5 г кукурузной мукой грубого помола). Добавка триптона и глутена значительно стимулировала спороношение гриба на альгинатных гранулах. Фунгициды не подавляли развитие антагониста и предохраняли гранулы от контаминации (Daigle, Cotty, 1995).

**Микроинкапсуляция.** Запатентован новый метод микроинкапсулирования микроорганизмов (Winder, Wheeler, 2001). Суспензия биоматериала (конидии, мицелий) в растворе альгината натрия или в смеси агар-агара (1 %) с желатином (1 : 1) эмульгируется в кукурузном масле с *n*-гексадеканом (6 : 4) и лецитином в качестве эмульгатора. Если желатин-агаровые глобулы желировались в полученной эмульсии, то альгинатные микрокапсулы полимеризовались при осаждении в раствор хлорида кальция. Размер микрокапсул варьировал от 10 до 400 мкм в зависимости от соотношения указанных компонентов. Микрокапсулы отделяли от жидкости при помощи вакуумной фильтрации и применяли путем опрыскивания. Данный метод создания искусственных спор успешно опробован в модельных опытах с конидиями *Fusarium avenaceum* и мицелием *Bipolaris sorokiniana*, которые сохранили патогенность в отношении целевых сорных растений — канареечника канадского и подмаренника цепкого (Winder, Wheeler, 2001; Winder et al., 2003).

**Гранулы «Песта» (Pesta).** Базовый процесс получения гранул «Песта» (от итальянского слова *pasta*) основан на технологии получения макаронных изделий: суспензия инокулюма (52 мл), мука из твердых сортов пшеницы (80 г) и каолин (20 г) смешиваются до получения теста; эта смесь пропускается через аппарат для получения макарон, сушится, дробится на гранулы и просеивается. Метод был впервые апробирован для инкапсулирования конидий потенциальных микогербицидов (*Alternaria cassiae*, *A. crassa*, *Colletotrichum truncatum* и *Fusarium lateritium*), а также для хранения энтомопатогенных нематод (Connick, Boyette, 1991; Connick et al., 1991). Он хорошо подходит для инкапсуляции меланизированных грибных структур — хламидоспор, микросклероциев и пигментированных конидий таких грибов, как *Alternaria* spp. Конидии *F. oxysporum*, *C. truncatum*, *Trematophoma lignicola* не перенесли процесс приготовления гранул (Connick et al., 1991, 1997; Müller-Stöver et al., 2001, 2004; Lawrie et al., 2001).

Микросклероции *Colletotrichum truncatum* выживали в гранулах «Песта» более 52 недель при температуре хранения 25 °С и пониженной активности воды ( $a_w = 0.18—0.29$ ), около 10 лет — при 4 °С, сохранив способность вызывать болезнь проростков *Sesbania exaltata* (Connick et al., 1997; Boyette et al., 2007), в то время как конидии этого гриба хранятся не более 32 недель (Connick et al., 1996). Интересно, что на различных этапах процесса приготовления гранул «Песта» на основе конидий *Alternaria alternata* наблюдался рост колониеобразующих единиц за счет разрушения их агрегаций. Патогенность конидий гриба, заключенных в гранулы, сохранялась при пониженной относительной влажности воздуха (12 %) более двух лет (Lawrie et al., 2001).

Состав гранул «Песта» можно легко модифицировать. Так, были опробованы варианты композиций для потенциального биогербицида на основе *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* за счет добавления (примерно 3 % от веса базовой смеси) сахарозы, кукурузной муки, глицерина, крахмала WaterLock B209, целлюлозы, дрожжевого экстракта (Shabana et al., 2003). Последний компонент способствовал лучшей выживаемости не только хламидоспор, но и микроконидий гриба в процессе приготовления гранул и их хранения. Однако у изученных образцов отмечена хорошая выживаемость (60—80 % в течение 12 месяцев) лишь при температуре 3° и относительной влажности воздуха 11—12 %; повышение температуры до 25 °С или влажности до

51—53 % приводило к резкому снижению жизнеспособности гриба уже на 4—8-й месяцы хранения (Shabana et al., 2003).

Для инкапсуляции конидий различных видов грибов-продуцентов биопрепаратов (*Colletotrichum truncatum*, *Alternaria* sp., *Paecilomyces fumosoroseus*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*), полученных при помощи твердофазной и жидкофазной ферментации, в гранулы «Песта» был успешно испытан метод экструзии (twin-screw extrusion). Ингредиенты перемешивали в миксере промышленного аппарата для экструзии, полученные гранулы длиной 1—2 мм высушивали в псевдокипящем слое при 50 °С. Было показано, что на инокулюме, полученном при твердофазной ферментации на рисе, процесс получения гранул проходил намного лучше, чем на биоматериале, полученном в глубинной культуре (Daigle et al., 1998).

Гранулы «Стабилезе» (Stabileze). Основными ингредиентами гранул «Стабилезе» являются: стабилизатор мембран (например, сахароза, 10—65 % от веса гранул), водопоглощающее вещество (крахмал), наполнитель (диатомовая земля, силикагель Hi-Sil® и другие в концентрации 5—20 %). Кроме того, состав гранул может включать растительное масло (около 20 %), УФ-протекторы, консерванты, инертные наполнители и прочее (Quimby et al., 2002). Например, сахарозу (4 части), крахмал (1 часть), нерафинированное растительное масло (1 часть), силикагель (1.5 части) и биосуспензию (4 части) смешивают; полученную пасту высушивают током воздуха, дробят на гранулы или измельчают до порошкообразного состояния. Этот метод в различных модификациях был успешно опробован для потенциальных биогербицидов — *Fusarium oxysporum* (микрoконидии и мицелий) и *Pseudomonas* spp., которые длительное время сохраняли жизнеспособность (Amsellem et al., 1999; Quimby et al., 1999; Zidack, Quimby, 2002). Глубинные конидии штамма *Metarhizium anisopliae* — продуцента микроинсектицида Green Muscle™ плохо переносили процесс инкапсулирования в гранулы «Стабилезе» по сравнению с процессом сушки «Старезе», описанным выше (Quimby et al., 2001).

Таким образом, в последнее время наблюдается значительный прогресс в разработке методов получения и хранения биопестицидов на основе грибных пропагул. Во-первых, большее внимание стало уделяться получению вирулентного и устойчивого к высушиванию инокулюма грибов на основе мицелия и его видоизменений (бластоспор, хламидоспор и микросклероциев) при глубинном культивировании. Во-вторых, значительно улучшена конструкция биореакторов для твердофазного культивирования грибов, что позволяет получать конидии продуцентов биопестицидов, обладающие высокой устойчивостью к внешним воздействиям. В-третьих, на основе изучения выживаемости микромицетов в экстремальных условиях разработаны методы стабилизации пропагул многих видов грибов для длительного хранения биопестицидов. Однако положительно ответить на вопрос: станут ли в ближайшее время микробиологические препараты ощутимой альтернативой химическим пестицидам? — можно будет только при условии стабильно высокой эффективности биопестицидов в полевых условиях в сочетании с их безопасностью для окружающей среды и потребителей.

Благодарим д. б. н. И. И. Новикову (ВНИИ защиты растений) за ценные замечания при подготовке рукописи.

Работа выполнена при поддержке грантов МНТЦ (№ 2939) и Президента РФ (МК-1661.2006.04).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

К о л о м б е т Л. В. Научное обоснование и практическая реализация технологии создания грибных препаратов для защиты растений от болезней: Автореф. дис. ... д. б. н. М., 2006. 47 с.

С т а р ч е в с к и й И., С а м о й л о в Ю. Исследование производства и применения в защите растений биологических препаратов // Информ. бюлл. ВПРС МОББ. 2002. № 33. С. 59—63.

Тен Л. Н., Тыщенко А. А., Степаниенко Н. Н., Гусакова С. Д., Мухамеджанов С. З., Острошенко О. С., Касьяненко А. Г. Метаболиты патогенного гриба *Verticillium dahliae*. VI. Пентакетидные метаболиты и нейтральные липиды вирулентных и авирулентных штаммов // Химия природных соединений. 1977. № 5. С. 632—635.

Успенская Г. Д., Решетникова И. А. Влияние пикнидиальной слизи и некоторых экологических факторов на прорастание конидий грибов родов *Ascochyta* Lib. и *Phoma* Fr. // Микология и фитопатология. 1979. Т. 13, вып. 4. С. 298—301.

Успенская Г. Д., Решетникова И. А., Бабьева Е. Н. Биохимический состав пикнидиальной слизи грибов родов *Ascochyta* Lib. и *Phoma* Fr. // Микология и фитопатология. 1980. Т. 14, вып. 4. С. 334—337.

Чекалова К. В. Разработка новой препаративной формы биологических фунгицидов на основе клеток микроорганизмов *Trichoderma viride* и *Pseudomonas fluorescens*: Автореф. дис. ... к. б. н. М., 2007. 20 с.

Alabouvette C., Olivain C., L'Haridon F., Aime S., Steinberg C. Using strains of *Fusarium oxysporum* to control Fusarium wilts: dream or reality? // Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management / Eds M. Vurro, J. Gressel. Dordrecht: Springer, 2007. P. 157—177.

Amsellem Z., Zidack N. K., Quimby P. C. Jr., Gressel J. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms // Crop Protection. 1999. Vol. 18. P. 643—649.

Auld B. A., Hetherington S. D., Smith H. E. Advances in bioherbicide formulation // Weed Biol. Management. 2003. Vol. 3. P. 61—67.

Barlett M. C., Jaronski S. T. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects // Fungi in biological control systems / Ed. M. N. Burge. New York: Manchester University Press, 1988. P. 61—88.

Boyette C. D., Jackson M. A., Bryson C. T., Hoagland R. E., Connick W. J., Daigle D. J. *Sesbania exaltata* biocontrol with *Colletotrichum truncatum* microsclerotia formulated in «Pesta» granules // BioControl. 2007. Vol. 52. P. 413—426.

Booth S. R., Tanigoshi L., Dewes I. Potential of a dried mycelium formulation of an indigenous strain of *Metarhizium anisopliae* against subterranean pests of cranberry // Biocontrol Sci. Technol. 2000. Vol. 10, N 5. P. 659—668.

Bradley C. A., Wood P. P., Black W. E., Kearns R. D., Britton J. Solid culture substrate including barley: US Patent Application Publication, US Pub. 2002. N 2002/006650 A1.

Cliquet S., Ash G., Cothier E. Production of chlamydo-spores and conidia in submerged culture by *Rhynchosporium alismatis*, a mycoherbicide of Alismataceae in rice crops // Biocontrol Sci. Technol. 2004. Vol. 14, N 8. P. 801—810.

Connick W. J., Boyette C. D. Granular products containing fungi encapsulated in a wheat gluten matrix for biological control of weeds // US Patent. 1991. N 5074902. Dec. 24.

Connick W. J., Boyette C. D., McAlpine J. R. Formulation of mycoherbicides using a pasta-like process // Biol. Control. 1991. Vol. 1. P. 281—287.

Connick W. J., Daigle D. J., Boyette C. D., Williams K. S., Vinyard B. T., Quimby P. C. JR Water activity and other factors that affect the viability of *Colletotrichum truncatum* conidia in wheat flour-kaolin granules («Pesta») // Biocontrol Sci. Technol. 1996. Vol. 6. P. 277—284.

Connick W. J., Jackson M. A., Williams K. S., Boyette C. D. Stability of microsclerotial inoculum of *Colletotrichum truncatum* encapsulated in wheat flour-kaolin granules // World J. Microbiol. Biotechn. 1997. Vol. 13. P. 549—554.

Crespo R., Juárez M. P., Dal Bello G. M., Padín S., Calderón Fernández G., Pedrini N. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana* // BioControl. 2002. Vol. 47. P. 685—696.

Daigle D. J., Cotty P. J. Production of conidia of *Alternaria cassiae* with alginate pellets // Biol. Control. 1992. Vol. 2. P. 278—281.

Daigle D. J., Cotty P. J. Formulating atoxigenic *Aspergillus flavus* for field release // Biocontrol Sci. Technol. 1995. Vol. 5. P. 175—184.

Daigle D. J., Connick W. J., Boyette C. D., Jackson M. A., Dorner J. W. Solid-state fermentation plus extrusion to make biopesticide granules // *Biotechnol. Techniques*. 1998. Vol. 12, N 10. P. 715—719.

De Vrije T., Antoine N., Buitelaar R. M., Bruckner S., Dissevelt M., Durand A., Gerlagh M., Jones E. E., Lüth P., Oostra J., Ravensberg W. J., Renaud R., Rinzema A., Weber F. J., Whips J. M. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. Vol. 56. P. 58—68.

Doehlemann G., Berndt P., Hahn M. Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea* // *Microbiology*. 2006. Vol. 152. P. 2625—2634.

Elzein A., Kroschel J. Influence of agricultural by-products in liquid culture on chlamydospore production by the potential mycoherbicide *Fusarium oxysporum* Foxy 2 // *Biocontrol Sci. Technol.* 2004. Vol. 14, N 8. P. 823—836.

Eyal J., Baker C. P., Reeder J. D., Devane W. E., LumSDen R. D. Large-scale production of chlamydospores of *Gliocladium virens* strain GL-21 in submerged culture // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1997. Vol. 19. P. 163—168.

Frey S., Magan N. Production of the fungal biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. Vol. 56. P. 372—377.

Gerding-González M., France A., Sepulveda M., Campos J. Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation // *Biocontrol Sci. Technol.* 2007. Vol. 17, N 1. P. 105—110.

Hocking A. D. Responses of xerophilic fungi to changes in water activity // *Stress tolerance in fungi* / Ed. D. H. Jennings. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. P. 233—256.

Hoffmann P. Factors influencing survival of dried organisms / Eds E. Koch, P. Leinonen // *Formulation of microbial inoculants* / Proc. of COST Action 830 Meeting. Braunschweig, Germany, 5—6 February 2001. P. 12—15.

Hölker U., Höfer M., Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. Vol. 64. P. 175—186.

Jackson M. A., Schisler D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules // *Mycol. Res.* 1995. Vol. 99, N 7. P. 879—884.

Jackson M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1997. Vol. 19. P. 180—187.

Jackson M. A., Cliquet S., Iten L. B. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* // *Biocontrol Sci. Technol.* 2003. Vol. 13, N 1. P. 23—33.

Jenkins N. E., Heviefio G., Langewald J., Cherry A. J., Lomer C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides // *Biocontrol News and Information*. 1998. Vol. 19, N 1. P. 21—31.

Inoue M., Mori N., Yamanaka H., Tsurushima T., Miyagawa H., Ueno T. Self-germination inhibitors from *Colletotrichum fragariae* // *J. Chem. Ecol.* 1996. Vol. 22, N 11. P. 2111—2122.

Kolombet L. V., Zhigletsova S. K., Kosareva N. I., Bystrova E. V., Derbyshev V. V., Krasnova S. P., Schisler D. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 24, N 1. P. 123—131.

Larena I., De Cal A., Liñán M., Melgarejo P. Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease // *J. Appl. Microbiol.* 2003. Vol. 94. P. 508—514.

Lawrie J., Down V. M., Greaves M. P. Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola* // *Biocontrol Sci. Technol.* 2001. Vol. 11. P. 283—295.

Lax A. R., Templeton G. E., Myer W. L. Isolation, purification, and biological activity of a self-inhibitor from conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* // *Phytopathology*. 1985. Vol. 75. P. 386—390.

Leathers T. D., Gupta S. C., Alexander N. J. Mycopesticides: status, challenges and potential // *J. Ind. Microbiol.* 1993. Vol. 12. P. 69—75.

Leland J. E., Mullins D. E., Vaughan L. J., Warren H. L. Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Pt 2: Effects of media osmolality on cell wall characteristics, carbohydrate concentrations, drying stability, and pathogenicity // *Biocontrol Sci. Technol.* 2005. Vol. 15, N 4. P. 393—409.

Ley S. V., Cleator E., Harter J., Hollowood C. J. Synthesis of (-)-Gloeosporone, a fungal autoinhibitor of spore germination using a  $\pi$ -allyltricarboxyliron lactone complex as a templating architecture for 1,7-diol construction // *Org. Biomol. Chem.* 2003. Vol. 1. P. 3263—3264.

Macko V., Staples R. C., Allen P. J., Renwick J. A. A. Identification of the germination serf-inhibitor from wheat stem rust uredospore // *Science*. 1971. Vol. 173. P. 835—836.

Macko V., Staples R. C., Gershon H., Renwick J. A. A. Serf-inhibitor of bean rust uredospores: Methyl 3, 4-dimethoxycinnamate // *Science*. 1970. Vol. 170. P. 539—540.

Magan N. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents / Eds T. M. Butt et al. // *Fungi as Biocontrol Agents* CAB International, 2001. P. 239—251.

Magan N. *Fungi in Extreme Environments* / Eds C. P. Kubicek, I. S. Druzhinina // *Environmental and Microbial Relationships. The Mycota IV*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 85—103.

Marchiori R., Nachtigal G. F., Coelho L., Yorinori J. T., Pitelli R. A. Comparison of culture media for the mass production of *Bipolaris euphorbiae* and its impact on *Euphorbia heterophylla* dry matter accumulation // *Summa Phytopathologica*. 2001. Vol. 27, N 4. P. 428—432.

Masangkay R. F., Paulitz T. C., Hallet S. G., Watson A. K. Solid substrate production of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae* conidia // *Biocontrol Sci. Technol.* 2000. Vol. 10. P. 399—409.

Mitchell J. K. Development of a submerged-liquid sporulation medium for the potential smartweed bioherbicide *Septoria polygonorum* // *Biol. Control*. 2003. Vol. 27. P. 293—299.

Mitchell J. K., Njalamba-Bertsch M., Bradford N. R., Birdsong J. A. Development of a submerged-liquid sporulation medium for the johnsongrass bioherbicide *Gloeocercospora sorghi* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003. Vol. 30. P. 599—605.

Montazeri M., Greaves M. P. Effects of nutrition on desiccation tolerance and virulence of *Colletotrichum truncatum* and *Alternaria alternata* conidia // *Biocontrol Sci. Technol.* 2002. Vol. 12. P. 173—181.

Montazeri M., Greaves M. P., Magan N. Microscopic and cytochemical analysis of extracellular matrices and endogenous reserves of conidia of *Colletotrichum truncatum* harvested from carbon- and nitrogen-limited cultures // *Biocontrol Sci. Technol.* 2003. Vol. 13, N 7. P. 643—653.

Montesinos E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection // *Int. Microbiol.* 2003. Vol. 6. P. 245—252.

Müller-Stöver D., Kroschel J., Sauerborn J. Viability of different propagules of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* during the formulation into wheat flour-kaolin granules / Eds E. Koch, P. Leinonen // *Formulation of microbial inoculants. Proc. Meeting / Braunschweig, Germany, 5 and 6 February 1999*. 2001. P. 83—89.

Müller-Stöver D., Kroschel J., Thomas H., Sauerborn J. Chlamydospores of *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *orthoceras* (Appel et Wollenw.) Bilai as inoculum for wheat flour-kaolin granules to be used for the biological control of *Orobanche cumana* Wallr. // *Europ. J. Plant Pathol.* 2002. Vol. 108. P. 221—228.

Müller-Stöver D., Thomas H., Sauerborn J., Kroschel J. Two granular formulations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* to mitigate sunflower broomrape *Orobanche cumana* // *BioControl*. 2004. Vol. 49. P. 595—602.

Norman D. J., Trujillo E. E. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *clidemiae* and *Septoria passiflorae* into two mycoherbicides with extended viability // *Plant Dis.* 1995. Vol. 79, N 10. P. 1029—1032.

Pascual S., Melgarejo P., Magan N. Production of the fungal biocontrol agent *Epicoccum nigrum* by solid substrate fermentation: effect of water activity on accumulation of compatible solutes // *Mycopathologia*. 1999. Vol. 146. P. 83—89.

Pascual S., Melgarejo P., Magan N. Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum* // *Mycopathologia*. 2002. Vol. 156. P. 93—100.

Patiño-Vera M., Jiménez B., Balderas K., Ortiz M., Allende R., Carrillo A., Galindo E. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose // *J. Appl. Microbiol.* 2005. Vol. 99. P. 540—550.

Pfirter H. A., Guntli D., Ruess M., Défago G. Preservation, mass production and storage of *Stagonospora convolvuli*, a bioherbicide candidate for field bindweed (*Convolvulus arvensis*) // *BioControl*. 1999. Vol. 44. P. 437—447.

Pupin A. M., Messias C. L., Piedrabuena A. E., Roberts D. W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae* // *Brazilian J. Microbiol.* 2000. Vol. 31. P. 121—128.

Qiang S., Zhu Y., Summerell B. A., Li Y. Mycelium of *Alternaria alternata* as a potential biological control agent for *Eupatorium adenophorum* // *Biocontrol Sci. Technol.* 2006. Vol. 16, N 7. P. 653—668.

Quimby P. C. Jr., Zidack N., Boyette C. D., Grey W. E. A simple method for stabilizing and granulating fungi // *Biocontrol Sci. Technol.* 1999. Vol. 9, N 1. P. 5—8.

Quimby P. C. Jr., Mercadier G., Meikle W., Vega F., Fargues J., Zidack N. Enhancing biological control through superior formulations: a worthy goal but still a work in progress / Eds M. Vurro et al. // *Enhancing biocontrol agents and handling risks*. Amsterdam: IOS Press, 2001. P. 86—95.

Quimby P. C. Jr., Caesar A. J., Birdsall J. L., Connick W. J. Jr., Boyette C. D., Zidack N. K., Grey W. E. Granulated formulation and method for stabilizing biocontrol agents // *US Patent*. 2002. N 6455036 B1.

Rangel D. E. N., Anderson A. J., Roberts D. W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance // *J. Invertebrate Pathol.* 2006. Vol. 93 P. 127—134.

Shah F. A., Wang C. S., Butt T. M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic *Metarhizium anisopliae* // *FEMS Microbiol. Letters*. 2005. Vol. 251. P. 259—266.

Shabana Y. M., Müller-Stöver D., Sauerborn J. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life // *Biol. Control*. 2003. Vol. 26. P. 189—201.

Shearer J. F., Jackson M. A. Liquid culturing of microsclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla // *Biol. Control*. 2006. Vol. 38. P. 298—306.

Silman R. W., Bothast R. J., Schisler D. A. Production of *Colletotrichum truncatum* for use as a mycoherbicide: effects of culture, drying and storage on recovery and efficacy // *Biotechn. Adv.* 1993. Vol. 11. P. 561—575.

Silman R. W., Nelsen T. C. Optimization of liquid culture medium for commercial production of *Colletotrichum truncatum* // *FEMS Microbiol. Letters*. 1993. Vol. 107. P. 273—278.

Smart M. G., Howard K. M., Bothast R. J. Effect of carbon dioxide on sporulation of *Alternaria crassa* and *Alternaria cassiae* // *Mycopathologia*. 1992. Vol. 118. P. 167—171.

Smith D. Tolerance to freezing and thawing / Ed. D. H. Jennings // *Stress tolerance in fungi*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. P. 145—171.

Solomon P. S., Waters O. D. C., Orgens C. I. J., Lowe R. G. T., Rechberger J., Trengove R. D., Oliver R. P. Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch) // *Biochem. J.* 2006. Vol. 399. P. 231—239.

Sparace S. A., Wymore L. A., Menassa R., Watson A. K. Effects of the *Phomopsis convolvulus* conidial matrix on conidia germination and the anthracnose disease of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) // *Plant Dis.* 1991. Vol. 75. P. 1175—1179.

Stephan D., Zimmermann G. Locust control with *Metarhizium flavoviride*: drying and formulation of submerged spores / Eds E. Koch, P. Leinonen // Formulation of microbial inoculants. Proc. Meeting. Braunschweig, Germany, 5 and 6 February 1999. 2001. P. 27—34.

Tarocco F., Lecuona R. E., Couto A. S., Arcas J. A. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Vol. 68. P. 481—488.

Teshler M. P., Ash G. J., Zolotarov Y., Watson A. K. Increased shelf life of a bioherbicide through combining modified atmosphere packaging and low temperatures // *Biocontrol Sci. Technol.* 2007. Vol. 17, N 4. P. 387—400.

Vorlop K. D., Rose T., Patel A. V. Encapsulation technology / Eds E. Koch, P. Leinonen // Formulation of microbial inoculants / Proc. of COST Action 830 Meeting. Braunschweig, Germany, 5—6 February, 2001. P. 45—50.

Winder R. S., Wheeler J. J. Encapsulation of microparticles in teardrop shaped polymer capsules of cellular size // US Patent. 2001. N 6248321 B1.

Winder R. S., Wheeler J. J., Conder N., Otvos I. S., Nevill R., Duan L. Microencapsulation: a strategy for formulation of inoculum // *Biocontrol Sci. Technol.* 2003. Vol. 13. P. 155—169.

Wright S. P., Jackson M. A., de Kock S. L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents / Eds T. M. Butt et al. // *Fungi as Biocontrol Agents*. New York: CAB International, 2001. P. 253—287.

Yu X., Hallet S. G., Shepard J., Watson A. K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccoides* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1998. Vol. 20. P. 333—338.

Zidack N. K., Quimby P. C. Formulation of bacteria for biological weed control using the Stabilize method // *Biocontrol Sci. Technol.* 2002. Vol. 12, N 1. P. 67—74.

ВНИИ защиты растений  
Санкт-Петербург  
aberestetski@yahoo.com

Поступила 26 V 2008

## Р Е З Ю М Е

Обзор литературы посвящен различным аспектам биологии, экологии и биохимии грибов, которые связаны с разработкой эффективных микопестицидов.

Ключевые слова: биопестициды, микромицеты, биология, биохимия, экология, микогербициды, микоинсектициды, микофунгициды, производство, хранение, препараты.

## S U M M A R Y

The review is devoted to connections between fungal biology, biochemistry, their ability to survive in extreme environment and development of effective mycopesticides.

Key words: biopesticides, fungi, biology, biochemistry, ecology, stress tolerance, mycoherbicides, mycoinsecticides, mycofungicides, production, stabilization, formulation.

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА,  
ЭКОЛОГИЯ**

УДК 582.28: 616.992.28

© *Е. В. Богомолова, И. Ю. Кирцидели, Е. А. Миненко***ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ  
ЖИЛЫХ ПОМЕЩЕНИЙ**BOGOMOLOVA E. V., KIRTSIDELI I. Yu., MINENKO E. A.  
POTENTIALLY DANGEROUS MICROFUNGI FROM DWELLING HOUSES

Микромицеты, встречающиеся во внутренней среде жилых помещений, широко изучаются во всем мире (Burge, 1990; Dales et al., 1991; Flannigan, Miller, 1994; Godish, 1995; Anderson et al., 1996; Bogacka, 1997; Hoog et al., 2000; Kemp et al., 2002; Марфенина, 2005; Иванова, Кирцидели, 2007; Марфенина, Фомичева, 2007). Многократно подтверждены факты негативного воздействия микроскопических грибов на здоровье людей (Hoog et al., 2000; Niewerth, Korting, 2002). По принятым в настоящее время нормативам Всемирной организации здравоохранения (WHO, 1990) число спор грибов в воздухе жилых помещений не должно превышать допустимый уровень в 500 КОЕ/м<sup>3</sup>. Однако при повышении влажности воздуха, протечках, скоплении конденсата на стенах и прочих неблагоприятных условиях споры прорастают и грибы начинают активно развиваться во внутренней среде зданий, формируя обильно спорноносные колонии. За счет этого концентрация спор в воздухе резко возрастает, нередко вызывая проблемы со здоровьем у проживающих или работающих в здании людей. Степень риска во многом зависит от того, какие именно микромицеты развиваются внутри помещения, так как разные виды обладают разной степенью потенциальной опасности для человека (от аллергии до глубоких микозов). Патогенность микромицетов определяется комплексом свойств адаптивного характера, позволяющих микромицете колонизировать и инвазировать организм хозяина. К факторам патогенности микроорганизмов традиционно относят такие адаптивные свойства, как способность расти и развиваться при температуре 37 °С и выше, способность к экстраклеточной секреции аспарагиновых протеиназ и фосфолипаз и др. (Cutler, 1991; Hube, 1998; Ghannoum, 2000; Cox et al., 2001; Birch et al., 2004; Fotedar, Al-Hedaithy, 2005; Schaller et al., 2005). От выраженности этих признаков зависит степень патогенности микромицета.

Целью работы было исследование факторов патогенности у доминирующих грибов из внутренней среды жилых и незаселенных квартир в Санкт-Петербурге, а также сравнительное изучение встречаемости этих микромицетов.

Обследовали 45 квартир (из них 11 незаселенных), расположенных в 16-этажном доме, 6 месяцев назад введенном в эксплуатацию. Пробы отбирали в конце ноября—начале декабря при установившемся снеговом покрове. Количество комнат в обследованных квартирах варьировало от двух до четырех. Микромицеты из внутренней среды изолировали двумя способами: отбором проб воздуха прибором Кротова на чашки Петри с агаризованной средой Чапека (с добавлением антибиотиков для подавления роста бактерий) и с помощью соскобов и смывов с поверхностей на чашки Петри с такой же средой. Пробы воздуха отбирали во всех комнатах, на кухне и

в санузлах. Соскобы и смывы с поверхностей отбирали в местах наиболее вероятного развития очагов микопоражения — на застекленных балконах, под подоконниками, в санузлах, в технологических шахтах, по которым проходят фановые трубы (через лючки доступа к водным счетчикам), а также дополнительно в видимых очагах поражения, если таковые имелись. После культивирования в течение 7 суток при температуре  $18 \pm 2$  °С микромицеты идентифицировали на основании культурально-морфологических признаков, оценивали численность грибов и тестировали по 2 изолята из каждой квартиры культуральными методами на потенциальную патогенность (оценивали степень выраженности протеазной, фосфолипазной и гемолитической активности, а также устойчивость к температурам выше 37 °С). Критериями при отборе штаммов для тестирования служили высокая численность и высокая степень потенциальной патогенности (по литературным данным).

Оценку протеазной активности проводили на агаризованной среде с бычьим сывороточным альбумином по стандартной методике (Fotedar, Al-Hedaithy, 2005; Богомолова и др., 2007). После инокуляции чашки Петри инкубировали 7 суток при комнатной температуре, затем проводили измерение диаметра колоний и зоны просветления вокруг них, формирующейся за счет действия внеклеточных протеаз гриба. Расчет коэффициента протеазной активности осуществляли по формуле:  $\Pi = D_{(к+зп)} / D_k$ , где  $\Pi$  — показатель протеазной активности,  $D_k$  — диаметр колонии,  $D_{(к+зп)}$  — диаметр колонии с учетом зоны просветления.

Общую фосфолипазную активность (без разделения на типы фосфолипаз) выявляли на среде с яичным желтком (Fotedar, Al-Hedaithy, 2005; Богомолова и др., 2007). После инокуляции чашки Петри инкубировали при комнатной температуре в течение 7 суток, затем измеряли диаметр колонии и диаметр зоны преципитации. Зона преципитации (помутнения) образуется под воздействием внеклеточных фосфолипаз гриба. Расчет коэффициента фосфолипазной активности проводили по такой же формуле, как и для протеазной активности.

Гемолитическую активность тестировали на кровяном агаре по следующей методике: 5 мл дефибринизированной донорской крови стерильно добавляли к 95 мл незастигнутого агара Чапека при температуре 45 °С (Методы..., 1982). Для предотвращения развития бактерий в среды добавляли антибиотики пенициллин и хлорамфеникол. Гемолитическая активность проявлялась через 7 суток роста в виде зоны просветления вокруг колоний грибов. Индекс гемолитической активности подсчитывали по той же формуле, что и аналогичные индексы протеазной и фосфолипазной активности. В дальнейшем штаммы сравнивали по ферментной активности не только качественно, но и количественно, с использованием упомянутых индексов.

Температурную устойчивость тестировали на агаризованной среде Чапека с добавлением антибиотиков для подавления роста бактерий. Колонии подращивали 2—3 суток при комнатной температуре, затем помещали чашки Петри в термостат при температуре 37 °С. Через 5 суток контролировали природу колоний. Остановку роста или гибель колонии расценивали как неспособность штамма выдерживать указанную температуру.

Очевидно, строить предположения об опасности штаммов целесообразнее на основании суммарного анализа разных факторов патогенности, что и было сделано в данной работе.

При рассмотрении совокупности тестов для каждого изолята была использована 5-балльная шкала оценки факторов потенциальной патогенности, при этом за один балл принимали наличие хотя бы одного из протестированных факторов патогенности: 0 — факторов потенциальной опасности не выявлено; 1 — минимальная степень выраженности факторов потенциальной патогенности; 2 — средняя степень; 3 — сильная степень; 4 — очень сильная степень выраженности факторов потенциальной патогенности.

В результате проведенной работы установлено, что превышения нормативов ВОЗ по численности грибных спор в воздухе нет ни в одной из обследованных квартир. Содержание пропагул микромицетов в воздухе жилых квартир составляло в среднем

75 КОЕ/м<sup>3</sup>, варьируя от 0 до 250 КОЕ/м<sup>3</sup>, а в воздухе жилых — в среднем 100 КОЕ/м<sup>3</sup>, варьируя от 25 до 340 КОЕ/м<sup>3</sup>. Всего из внутренней среды жилого дома было выделено 48 видов микромицетов, принадлежащих к 22 родам. Среди выявленных видов грибов к группе условно-патогенных (в соответствии с «Санитарными правилами СП 1.2.731—99») относятся следующие виды: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Candida* sp., *Cephalosporium* sp. (= *Acremonium* sp.), *Penicillium notatum* (= *Penicillium chrysogenum*).

Важно отметить, что споры грибов, обнаруженные в квартирах, могут иметь как «экзогенное», так и «эндогенное» происхождение. Они могут быть занесены с уличным воздухом, на одежде либо могут скапливаться в домашней пыли, развиваться в цветочных горшках, на стенах и т. д. Большинство из обнаруженных нами микроскопических грибов являются обычными компонентами воздуха жилых помещений. Однако массовое развитие этих грибов может приводить к серьезным аллергическим заболеваниям человека, а в ряде случаев — к глубоким микозам, поражающим внутренние органы и ткани человека. Были выявлены и виды, более типичные для почвы и растительных остатков, — например *Botrytis cinerea*, *Curvularia* sp., *Phoma glomerata*, *Torula* sp., *Wardomyces* sp. С большой долей вероятности эти виды можно считать занесенными.

При культуральном тестировании факторов патогенности у 90 изолятов из заселенных и незаселенных квартир (см. таблицу) было установлено, что 4.4 % (4) из них не имеют ни одного из факторов патогенности (0 баллов), 20.0 % (18) имеют лишь

**Результаты культурального тестирования доминирующих изолятов микромицетов, выделенных из воздуха и с поверхностей в обследованных квартирах**

Культуры микромицетов (номера изолятов)	Протеазная активность	Фосфолипазная активность	Гемолитическая активность	Рост при температуре 37 °С	Статус (заселенная/ незаселенная)
<i>Acremonium strictum</i> (1)	2.5	—	—	+	З
<i>A. strictum</i> (2)	—	—	—	+	З
<i>Alternaria alternata</i> (1)	—	—	—	+	З
<i>A. alternata</i> (2)	—	—	—	+	З
<i>A. alternata</i> (3)	—	—	—	+	З
<i>A. alternata</i> (4)	—	—	—	+	З
<i>A. alternata</i> (5)	+	—	—	+	З
<i>A. alternata</i> (6)	+/-	—	—	+	З
<i>A. alternata</i> (7)	+	—	—	+	Н
<i>A. alternata</i> (8)	—	—	—	—	Н
<i>A. alternata</i> (9)	—	—	—	+	Н
<i>A. alternata</i> (10)	—	—	—	+	Н
<i>A. alternata</i> (11)	—	—	—	+	Н
<i>Alternaria</i> sp. (1)	+/-	—	+/-	+	З
<i>Aspergillus flavus</i> (1)	+/-	—	—	+	З
<i>A. flavus</i> (2)	—	1.3	+	+	З
<i>A. flavus</i> (3)	—	+	+	+	Н
<i>A. fumigatus</i> (1)	—	—	—	+	Н
<i>A. niger</i> (1)	+/-	+	1.1	+	З
<i>A. niger</i> (2)	—	1.5	1.2	+	З
<i>A. niger</i> (3)	—	+	1.6	+	З
<i>A. sydowii</i> (1)	—	+	—	+	З
<i>Aspergillus</i> sp. (1)	—	—	+/-	+	З

Культуры микромицетов (номера изолятов)	Протеазная активность	Фосфолипазная активность	Гемолитическая активность	Рост при температуре 37 °С	Статус (заселенная/ незаселенная)
<i>Aureobasidium</i> sp. (1)	—	+	1.7	+	З
<i>Aureobasidium</i> sp. (2)	—	+	1.3	+	З
<i>Aureobasidium</i> sp. (3)	—	+	4.0	—	З
<i>Aureobasidium</i> sp. (4)	—	+	3.2	—	З
<i>Aureobasidium</i> sp. (5)	—	+	1.1	+	Н
<i>Aureobasidium</i> sp. (6)	+	+	2.3	—	Н
<i>Botrytis cinerea</i> (1)	2.0	+	+	—	З
<i>Candida</i> sp. (1)	—	—	4.3	+	З
<i>Candida</i> sp. (2)	—	2.5	—	—	З
<i>Candida</i> sp. (3)	—	1.5	+/-	—	З
<i>Candida</i> sp. (4)	—	1.3	1.4	—	Н
<i>Candida</i> sp. (5)	—	+	4.0	—	Н
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (1)	+	—	+/-	+	З
<i>C. cladosporioides</i> (2)	1.4	—	2.2	—	З
<i>C. cladosporioides</i> (3)	2.5	—	+	—	З
<i>C. cladosporioides</i> (4)	+/-	—	1.6	—	З
<i>C. cladosporioides</i> (5)	—	—	—	—	З
<i>C. cladosporioides</i> (6)	—	—	—	—	Н
<i>C. herbarum</i> (1)	+	—	+	+	З
<i>Chaetomium</i> sp. (1)	—	+	+	—	З
<i>Curvularia</i> sp. (1)	—	—	—	+	Н
<i>Fusarium</i> sp. (1)	—	+	+	+	З
<i>Fusarium</i> sp. (2)	—	—	+	—	З
<i>Fusarium</i> sp. (3)	1.7	+	+	—	З
<i>Fusarium</i> sp. (4)	—	—	1.1	—	Н
<i>Paecilomyces variotii</i> (1)	1.3	+	1.4	+	З
<i>P. variotii</i> (2)	1.6	+/-	—	+	З
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1.2	+	1.6	+	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (1)	+	+	2.0	+	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (2)	1.1	+	1.5	+	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (3)	—	+	1.4	—	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (4)	—	+	1.3	—	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (5)	—	+	1.2	—	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (6)	—	+	1.2	—	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (7)	—	+	1.3	—	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (8)	—	+	1.6	+	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (9)	—	+	1.2	+	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (10)	—	+	1.4	+	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (11)	—	+	1.6	+	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (12)	—	+	1.6	+	З
<i>P. aurantiogriseum</i> (13)	—	+	+	—	Н
<i>P. aurantiogriseum</i> (14)	—	+	1.6	—	Н
<i>P. aurantiogriseum</i> (15)	—	+	1.7	+	Н
<i>P. brevi-compactum</i> (1)	—	+	1.5	+	З

Культуры микромицетов (номера изолятов)	Протеазная активность	Фосфолипазная активность	Гемолитическая активность	Рост при температуре 37 °С	Статус (заселенная/ незаселенная)
<i>Penicillium camemberti</i> (1)	—	+	1.7	+	З
<i>P. canescens</i> (1)	—	—	1.3	—	З
<i>P. chrysogenum</i> (1)	—	+	+	—	З
<i>P. chrysogenum</i> (2)	—	+	+	—	З
<i>P. chrysogenum</i> (3)	—	+	+	+	З
<i>P. expansum</i> (1)	—	+	1.2	—	Н
<i>P. herqueri</i> (1)	1.5	+	1.6	+	Н
<i>P. simplicissimum</i> (1)	—	+	1.6	+	З
<i>P. turbatum</i> (1)	—	+	2.0	+	З
<i>Phoma</i> sp. (1)	—	—	—	+	З
<i>Rhodotorula</i> sp. (1)	—	1.6	2.2	—	З
<i>Rhodotorula</i> sp. (2)	—	1.4	2.0	—	З
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (1)	—	—	—	—	З
<i>S. brevicaulis</i> (2)	1.6	+/-	—	+	Н
<i>S. candida</i> (1)	1.2	+	+/-	+	З
<i>Trichoderma viride</i> (1)	—	—	+	+	З
<i>T. viride</i> (2)	—	+	+	+	З
<i>Trichotecium roseum</i> (1)	—	—	—	+	З
<i>Wardomyces</i> sp. (1)	—	+/-	+/-	+	З
<i>Wardomyces</i> sp. (2)	—	—	+	—	З
<i>Wardomyces</i> sp. (3)	2.6	—	+/-	—	З
<i>Ulocladium consortiale</i> (1)	—	—	—	+	Н
<i>U. consortiale</i> (2)	+/-	—	—	+	Н

один из факторов (1 балл), 36.7 % (33) обладают двумя из протестированных факторов патогенности (2 балла), у 30.0 % (27) отмечена активность трех факторов патогенности (3 балла) и у 8.9 % (8) — активность всех четырех протестированных свойств, т. е. имели очень сильную степень выраженности факторов потенциальной патогенности (4 балла). Сравнительный анализ факторов патогенности у изолятов из заселенных и незаселенных квартир показал, что в незаселенных квартирах доля «безопасных» изолятов выше, а «опасных» — ниже, чем в заселенных (рис. 1). Исходя из полученных результатов, можно сделать предварительный вывод о том, что заселение квартир способствует постепенному формированию в жилом здании сообщества микромицетов, обладающих более высокой степенью потенциальной вирулентности, определяемой по сумме факторов. Доля микромицетов, соответствующая 3—4 баллам по шкале потенциальной патогенности, возрастает в заселенных квартирах почти

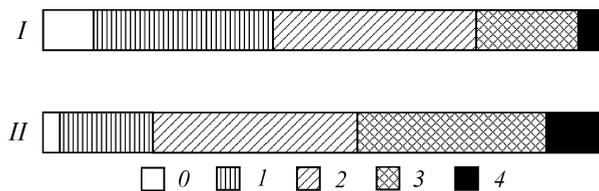


Рис. 1. Изменение соотношения долей (%) изолятов разных групп патогенности (от 0 до 4 баллов) в незаселенных (I) и заселенных (II) квартирах.

вдвое по сравнению с незаселенными уже через полгода эксплуатации дома. Данные проведенного исследования свидетельствуют о том, что по мере заселения людьми микобиота жилищ приобретает характерные черты — преобладание 2—3 мелкоспоровых видов со склонностью к ксерофильному образу жизни, возрастание доли видов-биодеструкторов и накопление термотолерантных штаммов, что согласуется с данными других авторов (Kemp et al., 2002). Постепенно роль привносимых извне видов становится менее значимой за счет формирования внутренних очагов роста микромицетов.

Интересно отметить, что выраженность отдельных факторов патогенности во многих случаях имеет штаммовый характер (см. таблицу) и профили активности разных изолятов одного вида не всегда совпадают. Тем не менее нами не было выявлено какой-либо корреляции между степенью потенциальной опасности изолятов одного и того же вида и статусом квартир (заселенная/незаселенная).

Тестирование термотолерантности грибов из обследованных квартир показало, что более половины изолятов (61.1 %) способны расти и давать спороношение при температуре 37 °С, в то же время часть микромицетов активно развивалась и при гораздо более высоких значениях температуры (рис. 2). Наиболее термотолерантными оказались представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*. У двух штаммов *P. aurantiogriseum* отмечен рост и спороношение при температуре до 45 °С, от 45 до 52 °С эти штаммы были способны к росту со средней скоростью, однако спороношение практически не отмечено. Полученные данные еще раз подтверждают необходимость предупреждения плесневого поражения жилых помещений и контроля численности грибных пропагул в воздушной среде, так как термотолерантные мелкоспоровые виды легко проникают в организм через дыхательные пути и способны в них развиваться. Любые нарушения в системе защитных иммунных реакций могут приводить к серьезным последствиям для здоровья людей, проживающих в зараженных помещениях.

Несмотря на то что представленные результаты получены лишь в культуральных тестах, а не в клинических экспериментах на животных, можно сделать вывод о том, что во внутренней среде жилых домов присутствуют потенциально опасные штаммы микромицетов. До тех пор пока внутренний микроклимат в здании подавляет развитие спор грибов и их численность остается ниже допустимого предела, ситуацию можно считать благополучной. Однако в случае наступления неконтролируемых аварийных ситуаций или нарушения микроклиматических условий потенциально опасные штаммы могут начать развиваться, создавая угрозу здоровью людей.

Проведенная работа еще раз подтверждает значимость микромицетов как одного из важных факторов экологического состояния внутренней среды закрытых помещений. Поддержание низкой численности грибных пропагул в воздушной среде жилых зданий — неотъемлемое условие сохранения здоровья людей.

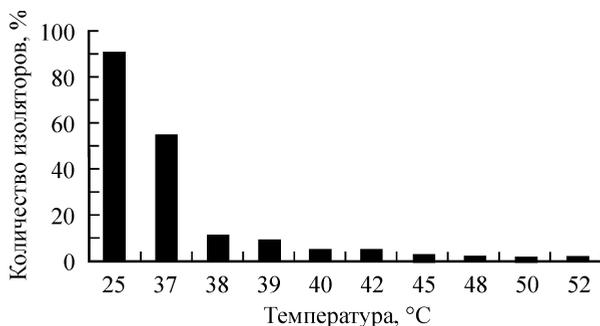


Рис. 2. Результаты исследования термотолерантности изученных штаммов грибов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Богомолова Е. В., Миненко Е. А., Кирцидели И. Ю. Потенциальная патогенность микромицетов, изолированных из музейных помещений // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41(2). С. 113—119.

Иванова А. М., Кирцидели И. Ю. Комплексы микроскопических грибов в воздухе Санкт-Петербурга // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41. С. 40—47.

Марфенина О. Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005. 196 с.

Марфенина О. Е., Фомичева Г. М. Потенциально патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции / Под ред. Ю. Т. Дьякова, Ю. В. Сергеева // Микология сегодня. Т. 1. М.: Национальная академия микологии, 2007. С. 235—266.

Методы экспериментальной микологии. Киев: Наук. думка, 1982. 550 с.

Anderson K., Morris G., Kennedy H. Aspergillosis in immunocompromised paediatric patients: Associations with building hygiene, design, and indoor air // Thorax. 1996. Vol. 51. P. 256—261.

Birch M., Denning D. W., Robson G. D. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates // Med. Mycol. 2004. Vol. 42. P. 81—86.

Bogacka E. Sick building syndrome // Mikol. Lekarska. 1997. Vol. 4. P. 233—237.

Burge H. Bioaerosols: prevalence and health effects in the indoor environment // Journ. of Allergy and Clinical Immunol. 1990. Vol. 86. P. 687—701.

Cox G. M., McDade H. C., Chen S. C., Tucker S. C., Gottfredsson M., Wright L. C., Sorrell T. C., Leidich S. D., Casadevall A., Ghannoum M. A., Perfect J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans* // Molec. Microbiol. 2001. Vol. 39. P. 166—175.

Cutler J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans* // Ann. Rev. Microbiol. 1991. Vol. 45. P. 187—218.

Dales R. E., Burnett R., Zwanenburg H. Adverse health effects among adults exposed to home dampness and molds // Amer. Rev. Respir. Dis. 1991. Vol. 143. P. 505—509.

Flannigan B., Miller J. D. Health implications of fungi in indoor environments — an overview / Eds R. A. Samson, B. Flannigan, M. E. Flannigan, A. P. Verhoeff, O. C. G. Adan, E. S. Hoekstra // Health implications of fungi in indoor environments. Amsterdam: Elsevier, 1994. P. 1—28.

Fotedar R., Al-Hedaidy S. S. A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* // Mycoses. 2005. Vol. 48. P. 62—67.

Ghannoum M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis // Clinical Microbiol. Rev. 2000. Vol. 13. P. 122—143.

Godish T. Sick buildings: Definition, diagnosis and mitigation. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995.

Hoog G. C. de, Guarro J., Gene J., Figueras M. J. Atlas of clinical fungi. Utrecht: CBS; Spain: Reus, 2000. 1126 p.

Hube B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections // Rev. Iberoam. Micol. 1998. Vol. 15. P. 65—68.

Kemp P. C., Neumeister-Kemp H. G., Murray F., Lysek G. Airborne fungi in non-problem buildings in a southern-hemisphere mediterranean climate: Preliminary study of natural and mechanical ventilation // Ind. Built Environ. 2002. Vol. 11. P. 44—53.

Niewerth M., Kortling H. G. *Candida albicans* and the principle of opportunism. An essay // Mycoses. 2002. Vol. 45. P. 253—258.

Schaller M., Borelli C., Kortling H. C., Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans* // Mycoses. 2005. Vol. 48. P. 365—377.

WHO. Indoor air quality: biological contaminants // Report on a WHO meeting. Copenhagen: WHO Regional publications, 1990. N 31. P. 1—67.

## Р Е З Ю М Е

Представлены данные по сравнительному изучению потенциально вирулентных штаммов микромицетов, выделенных из воздуха и с поверхностей в 34 жилых и 11 незаселенных квартирах в новом доме. Тестировали по 2 доминирующих изолята из каждой квартиры культуральными методами на потенциальную патогенность (степень выраженности протеазной, фосфолипазной и гемолитической активностей, устойчивость к температуре 37 °С). Из 90 изолятов лишь 4.4 % не имели ни одного из факторов патогенности, 20.0 % имели один из факторов, 36.7 % обладали двумя из протестированных факторов патогенности, 30.0 % проявили активность трех факторов патогенности и 8.9 % показали активность всех четырех протестированных свойств, т. е. имели очень сильную степень выраженности факторов потенциальной патогенности. Сделан вывод о том, что заселение квартир приводит к постепенному формированию в жилом здании сообщества микромицетов, обладающих более высокой степенью потенциальной вирулентности.

Ключевые слова: оппортунистические грибы, факторы патогенности, микобиота жилых помещений.

## S U M M A R Y

The data on comparative study of potentially virulent fungal strains from air and surfaces from 34 inhabited apartments and 11 not yet inhabited apartments in a newly constructed house are presented. Two dominating isolates from each apartment have been tested culturally for potential virulence (defined as levels of protease, phospholipase and hemolytic activities as well as temperature tolerance up to 37 °C). From 90 isolates tested, only 4.4 % had no virulence factors, 20.0 % had one of the factors, 36.7 % had two virulence factors, 30.0 % manifested activity of three factors, and 8.9 % showed activity of all virulence factors tested, i. e. were highly virulent by cultural test. Comparative analysis of the data allowed us to make a conclusion that settling of apartments leads to gradual development of fungal mycobiota with increased potential virulence.

Key words: opportunistic fungi, virulence factors, mycobiota of dwelling houses.

**ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ,  
БИОТЕХНОЛОГИЯ**

УДК 582.282:615.779.932

© М. Л. Георгиева, И. В. Толстых,  
Е. Н. Биланенко, Г. С. Катруха**СПЕКТР АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ  
У МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ЩЕЛОЧНЫХ  
ЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВ**GEORGIEVA M. L., TOLSTYKH I. V., BILANENKO E. N., KATRUKHA G. S.  
ANTIMICROBIAL ACTIVITY SPECTRUM IN MYCELIAL FUNGI  
FROM ALKALINE SALINE SOILS

Получение препаратов биологически активных веществ — сложный и многоступенчатый процесс, начальными этапами которого можно считать поиск и выделение продуцентов в природе, определение условий биосинтеза, изучение спектра антимикробной активности. Одно из направлений поиска — исследование организмов, выделенных из экстремальных местообитаний (Iwai, Omura, 1982; Phoebe et al., 2001; Basilio et al., 2003; Verdy, 2005), в том числе из содовых солончаков, где высокие значения pH почв сочетаются со значительными количествами солей (Grant, 1992). Щелочные (содовые) биотопы давно служат источниками галоалкалофильных бактерий, метаболиты которых широко используются в биотехнологии (Oren, 2002; Horikoshi, 2006). Исследования алкалофильных актиномицетов показали, что биологически активные вещества производятся ими в среде с pH около 9.0 (Sato et al., 1985; Tsujibo et al., 1988; Vasavada et al., 2006). Однако практически ничего не известно о вторичных метаболитах галоалкалофильных (галоалкалотолерантных) грибов, что обуславливает привлекательность их поиска и изучения. Японские ученые отметили, что антимикробные вещества у алкалотолерантных изолятов микромицетов (*Paecilomyces lilacinus* и *Verticillium lecanii*) продуцируются только в щелочных условиях культивирования (Sato et al., 1983, 1991).

Разработка методов учета и выделения мицелиальных грибов из щелочных засоленных почв позволила изолировать галоалкалотолерантное сообщество микромицетов. Основу комплекса составляют виды рода *Acremonium* (доминируют *A. rutilum*, *A. strictum*, *A. charticola* и ряд других), а также *Acremonium*-подобные анаморфы аскомицетов порядка *Hypocreales* (*Emericellopsis* cf. *minima*, *Heleococcum alkalinum*), большинство из которых способны к росту в широком диапазоне кислотности с небольшим оптимумом около 9.0—10.0 pH (Bilanenکو et al., 2005; Биланенко, Георгиева, 2005; Георгиева, 2006). Среди представителей родов *Emericellopsis* и *Acremonium* известны продуценты биологически активных веществ, из которых β-лактамы и полипептидные антибиотики широко применяются в медицине (Elander, 2003; Muñiz et al., 2007; Sarookhani, Moazzami, 2007).

Настоящее сообщение посвящено подбору среды культивирования и изучению спектра биологической активности у изолятов галоалкалотолерантных грибов из щелочных засоленных почв.

## Материал и методы

Проведена оценка антимикробной активности у 7 видов (15 изолятов) грибов, выделенных из образцов щелочных засоленных почв Центральной Азии (Кулундинская и Кункурская степи, Забайкалье, Северо-Восточная Монголия) и Африки (Танзания) (табл. 1).

Для определения антимикробной активности использовали 10 штаммов тест-микроорганизмов (табл. 2).

Глубинное культивирование исследуемых изолятов проводили на щелочной жидкой среде (ЩЖС) и солодовом экстракте (С).

Среда ЩЖС была следующего состава (г/л):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 24,  $\text{NaHCO}_3$  — 6,  $\text{NaCl}$  — 6,  $\text{KNO}_3$  — 1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.5; солодовый экстракт (15° Баллинга) — 200 мл, дрожжевой экстракт — 1, крахмал — 6;  $\text{H}_2\text{O}$  дистиллированная — 800 мл; pH 10.0—10.5. Для приготовления ЩЖС отдельно стерилизовали минеральную основу, а также  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и остальные компоненты в течение 30 мин при избыточном давлении 0.5 атм. Все компоненты среды объединяли при 50 °С.

В состав среды С входил солодовый экстракт (15° Баллинга) — 200 мл/л и  $\text{H}_2\text{O}$  — 800 мл; pH 6.5—7.0.

Для поверхностного культивирования грибных и бактериальных тест-культур использовали модифицированную среду Гаузе (г/л): глюкоза — 10, пептон — 5, триптон — 3,  $\text{NaCl}$  — 5, агар — 20; вода водопроводная; pH 7.2—7.4.

Таблица 1

Краткая характеристика мест выделения исследуемых изолятов микромицетов

Вид	Номер изолята	Регион отбора проб	Характеристика почвенного образца		
			pH	сумма солей, г/кг	тип засоления почвы
<i>Acremonium charticola</i> (Lindau) W. Gams	T12	Забайкалье	9.1	—	Содовый
<i>A. rutilum</i> W. Gams	A112	Северо-Восточная Монголия	10.1	33.0	»
	A113	То же	11.0	57.0	»
	A126	Забайкалье	10.1	1.9	»
<i>A. strictum</i> W. Gams	A132	Кункурская степь	9.5	—	»
	A133	Северо-Восточная Монголия	10.7	26.0	»
<i>Acremonium</i> sp.	A138	Забайкалье	8.5	3.7	Сульфатно-содовый
	A139	Северо-Восточная Монголия	10.4	48.0	Содовый
<i>Acremonium</i> sp. 1	A71	Забайкалье	10.3	139.0	Сульфатно-содовый
<i>Emericellopsis</i> cf. <i>minima</i>	E101	Кулундинская степь	10.1	73.0	Содовый
<i>Heleococcum alkalinum</i> Bilanenko et Ivanova	F7	Кункурская степь	—	—	»
	F9	» »	—	—	»
	F10	Танзания	10.0	—	»
	F11	Северо-Восточная Монголия	10.7	49.0	»
	F12	То же	10.5	82.0	»

Примечание. Прочерк — данные отсутствуют.

**Тест-культуры, используемые для определения  
антимикробной активности**

Вид	Штамм
Грамположительные бактерии	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633 (=RIA 445)
<i>B. mycoides</i>	537
<i>Micrococcus luteus</i>	NCTC 8340
<i>Staphylococcus aureus</i>	FDA 209P (MSSA) ИНА 00761 (MRSA)*
Грамотрицательные бактерии	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Comamonas terrigena</i>	ВКПМ В-7571 (=ATCC 8461)
Грибы	
<i>Aspergillus niger</i>	ИНА 00760
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RIA 259
<i>Candida albicans</i>	ИНА 00763*

Примечание. Звездочкой обозначены клинические изоляты.

Исследуемые изоляты грибов культивировали в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды, на качалках со скоростью вращения 220 об./мин при 25 °С. Посевной материал для ферментационной среды выращивали в течение 10 суток на ЩЖС.

Глубинное культивирование исследуемых изолятов проводили в течение 14 суток на средах ЩЖС и С. Мицелий отделяли от культуральной жидкости центрифугированием. Биологически активные вещества из мицелия выделяли экстракцией этанолом при нейтральном и кислом значениях рН. Выделение биологически активных веществ из культуральной жидкости (90—100 мл) проводили методом сорбции на амберлите ХАД-2 (объем сорбента составлял примерно 5 мл) с последующей элюцией смесью органических растворителей ацетон—н.-бутанол—вода (1 : 1 : 1) при нейтральном и кислом значениях рН. Объем каждого элюата составлял примерно 5 мл. Элюаты и экстракты выпаривали в вакууме до сухого остатка, который растворяли в 1 мл этанола. Для биологических испытаний использовали следующие растворы: Кн — концентрат веществ, выделенных из нативного раствора при нейтральном значении рН; Кк — из нативного раствора при кислом значении рН; Мн — из мицелия при нейтральном значении рН; Мк — из мицелия при кислом значении рН. Концентраты Кн, Кк, Мн и Мк получали из каждого изолята гриба. Всего проанализировано 72 концентрата.

Антимикробную активность определяли методом диффузии в агар (метод дисков). В чашки Петри диаметром 10 см разливали по 20 мл агаровой среды. На застывшую поверхность среды высевали газоном тест-культуры (табл. 2). Экстракты и элюаты (по 10 мкл) наносили на диски фильтровальной бумаги диаметром 6 мм, которые помещали на поверхность агаровой среды. Тест-культуры инкубировали при температуре 28 (3 штамма грибов и *Comamonas terrigena*) и 37 °С (остальные — бактериальные штаммы) в течение 17—24 ч на среде Гаузе (в темноте). Антимикробную активность определяли по наличию зон задержки роста тест-организмов (в мм), с учетом диаметра бумажного диска.

## Результаты и обсуждение

Исследование показало, что биологически активные вещества содержатся как в концентратах из мицелия, так и в концентратах из нативного раствора, с преобладанием антимикробной активности мицелиальных экстрактов.

Биологическую активность изолятов сравнивали при культивировании их на двух разных средах — ЩЖС (рН 10.0) и С (рН 6.5). На солодовой среде антимикробная активность проявлялась в значительно меньшей степени, чем при культивировании на ЩЖС. Например, у *A. rutilum* (A126) и *Acremonium* sp. 1 (A71) при использовании солодовой среды активностью обладали только концентраты из нативного раствора (Кк), а на ЩЖС активны были и другие концентраты — Мн, Мк и Кн (табл. 3). В дальнейшем изучение антибиотической активности у галоалкалотолерантных грибов из содовых солончаков проводили только на щелочной среде (табл. 4).

В результате исследования выявлены культуры, продуцирующие вещества как с широким, так и с узким спектром биологической активности. У ряда изолятов — *Acremonium* sp. (A138), *A. rutilum* (A126), *Acremonium* sp. 1 (A71), *Emericellopsis* cf. *minima*

Таблица 3

Антимикробная активность у изолятов грибов на солодовой и щелочной среде

Виды грибов	Среда культивирования	Концентраты	Тест-культуры						
			<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (клинический изолят)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Comamonas terrigena</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Acremonium rutilum</i> A126	ЩЖС	Мн	x	12	—	—	—	x	x
		Мк	x	12	—	9	—	x	x
		Кн	10	10	11	9	—	x	x
		Кк	7	7	9	8	—	x	x
	С	Мн	—	x	—	—	—	—	—
		Мк	—	x	—	—	—	—	—
		Кн	—	x	—	—	—	—	—
		Кк	7	x	—	7	—	7	—
<i>Acremonium</i> sp.1 A71	ЩЖС	Мн	14	15	10	21	—	x	x
		Мк	14	15	13	16	—	x	x
		Кн	11	8	9	10	—	x	x
		Кк	7	+	8	8	—	x	x
	С	Мн	—	x	—	—	—	—	—
		Мк	—	x	—	—	—	—	—
		Кн	—	x	—	—	—	—	—
		Кк	7	x	—	7	—	7	—
<i>Emericellopsis</i> cf. <i>minima</i> E101	ЩЖС	Мн	—	x	—	—	—	—	—
		Мк	—	x	—	—	+	+	—
		Кн	7	x	—	—	—	—	—
		Кк	8	x	+	7	—	9	—
	С	Мн	—	x	—	—	—	—	—
		Мк	—	x	—	—	—	—	—
		Кн	+	x	—	7	—	—	—
		Кк	7	x	+	7	—	8	—

Примечание. Зоны подавления роста тест-культур: «-» — подавления нет; «+» — следовые количества антимикробных веществ (зона менее 7 мм в диам.); 7—21 мм — диаметр зон подавления роста; x — активность не проверяли. То же для табл. 4. Активность по отношению к *Bacillus mycoides*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* не была обнаружена.

## Антимикробная активность у изолятов на щелочной среде

Виды грибов	Концентраты	Тест-культуры							
		Bacillus subtilis	Bacillus mycoides	Micrococcus luteus	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus (клинический изолят)	Comamonas terrigena	Aspergillus niger	Saccharomyces cerevisiae
<i>Acremonium charticola</i> T12	Мн	—	—	9	—	—	—	—	—
	Мк	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кн	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кк	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. rutilum</i> A112	Мн	—	—	—	—	—	—	10	—
	Мк	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кн	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кк	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. rutilum</i> A113	Мн	—	—	—	—	—	—	—	—
	Мк	—	+	—	—	—	+	9	9
	Кн	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кк	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Acremonium</i> sp. A138	Мн	x	—	15	+	15	x	—	x
	Мк	x	—	15	7	18	x	—	x
	Кн	9	—	8	10	9	x	—	x
	Кк	+	—	—	8	9	x	—	x
<i>Acremonium</i> sp. A139	Мн	—	—	—	—	—	—	—	—
	Мк	—	—	—	—	—	—	—	8
	Кн	—	—	—	—	—	—	—	8
	Кк	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Heleococcum alkalinum</i> F9	Мн	—	—	—	—	—	—	12	—
	Мк	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кн	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кк	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>H. alkalinum</i> F10	Мн	7	—	—	—	—	7	—	—
	Мк	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кн	—	—	—	—	—	—	—	—
	Кк	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>H. alkalinum</i> F11	Мн	—	+	—	—	—	+	12	—
	Мк	—	+	—	—	—	—	—	—
	Кн	—	—	—	—	—	—	8	—
	Кк	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. Активность по отношению к *Escherichia coli* и *Candida albicans* не была обнаружена.

*ta* (E101) выявлена антибиотическая активность по отношению к разным грамположительным бактериальным тест-культурам, среди которых существует высокая активность по отношению к *S. aureus* и его клиническому метициллинрезистентному изоляту (табл. 3, 4). У некоторых культур (*Acremonium* sp., *A. rutilum*, *Heleococcum alkalinum*) отмечена антифунгальная активность (табл. 4). Изоляты *Acremonium strictum* (A132, A133) и *Heleococcum alkalinum* (F7, F12) не проявили антибиотической активности по отношению к используемым тест-микроорганизмам.

Изучение спектра антимикробной активности было проведено у изолятов доминирующих видов грибов из содовых солончаков, большинство из которых по морфоло-

гическим признакам отнесено к роду *Acremonium*. В современном понимании род *Acremonium* — чрезвычайно гетерогенная группа, которая еще недостаточно подробно разработана в систематическом отношении (Gams, 1971; Glenn et al., 1996; Rossman et al., 1999). Определение таксономического положения ряда выделенных грибов, которые по своим морфологическим и физиологическим (выраженная галоалкалотолерантность) особенностям отличаются от всех известных представителей рода, пока не завершено.

Грибы рода *Acremonium*, особенно *A. chrysogenum*, являются хорошо исследованными продуцентами β-лактамовых антибиотиков (цефалоспорины P, N, C), которые имеют важнейшее практическое значение (Brakhage, 1998; Demain, Elander, 1999; Elander, 2003; Muñiz et al., 2007; Sarookhani, Moazzami, 2007; Cuadra et al., 2008). Среди исследованных нами изолятов рода *Acremonium* из содовых солончаков биологическая активность была выявлена у *A. charticola* и *A. rutilum*, наиболее активными в отношении исследованных тест-организмов оказались изоляты *Acremonium* sp. и *Acremonium* sp. 1.

Особенно интересно исследование галоалкалотолерантного изолята *Emericellopsis* cf. *minima*, выделенного из содового солончака Кулундинской степи, у которого отмечен широкий спектр антимикробной активности (табл. 3). У видов рода *Emericellopsis* выявлены биологически активные вещества, относимые к группе β-лактамовых антибиотиков, — цефалоспорины P, N, C; синнематин А; эмерицеллопсины А и Б (Grosklags et al., 1957; Bhuyan, Johnson, 1958; Kavanagh et al., 1958; Cole, Rolinson, 1961; Ott et al., 1962; Elander, 2003). Также виды этого рода продуцируют различные полипептидные антибиотики группы пептаиболов (Argoudelis, Johnson, 1974; Argoudelis et al., 1974; Berg et al., 1996; Ishiyama et al., 2000; Rogozhkina et al., 2000; Nagaraj et al., 2001; Galbraith et al., 2003; Degenkolb et al., 2007). Исследование ряда изолятов вида *Heleococcum alkalinum*, доминирующего в содовых солончаках, выявило незначительную антимикробную активность, спектр которой варьировал в зависимости от изолята.

Таким образом, микромицеты из содовых солончаков могут представлять интерес как продуценты биологически активных веществ, что требует дальнейшей работы по подбору условий культивирования, а также по выявлению и анализу их антибактериальной и антифунгальной активности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биланенко Е. Н., Георгиева М. Л. Микромицеты солончаков Южной Сибири (Кулундинская степь) // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, вып. 4. С. 6—13.
- Георгиева М. Л. Микромицеты в щелочных засоленных почвах: Дис. ... к. б. н. М.: МГУ, 2006. 167 с.
- Argoudelis A. D., Johnson L. E. Emerimicins II, III and IV, antibiotics produced by *Emericellopsis microspora* in media supplemented with trans-4-n-propyl-l-proline // J. Antibiotics. 1974. Vol. 27, N 4. P. 274—282.
- Argoudelis A. D., Dietz A., Johnson L. E. Zervamicins I and II, polypeptide antibiotics produced by *Emericellopsis salmosynnemata* // J. Antibiotics. 1974. Vol. 27, N 5. P. 321—328.
- Basilio A., Gonzalez I., Vicente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A., Genilloud O. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity // J. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 95, N 4. P. 814—823.
- Berdy J. Bioactive Microbial Metabolites // J. Antibiotics. 2005. Vol. 58, N 1. P. 1—26.
- Berg A., Ritzau M., Ihn W., Schlegel B., Fleck W. F., Heinze S., Gräfe U. Isolation and structure of bergofungin, a new antifungal peptaibol from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059 // J. Antibiotics. 1996. Vol. 49, N 8. P. 817—820.
- Bhuyan B. K., Johnson M. J. Chemically defined media for synnematin production // J. Bacteriol. 1958. Vol. 76. P. 376—384.
- Bilanenko E., Sorokin D., Ivanova M., Kozlova M. *Heleococcum alkalinum*, a new alkali-tolerant ascomycete from saline soda soils // Mycotaxon. 2005. Vol. 91. P. 497—507.

- Brakhage A. A. Molecular regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in filamentous fungi // *Microbiol. molec. boil. rev.* 1998. Vol. 62, N 3. P. 547—585.
- Cole M., Rolinson G. M. 6-Aminopenicillanic acid. II. Formation of 6-aminopenicillanic acid by *Emericellopsis minima* (Stolk) and related fungi // *Proc. Roy. Soc.* 1961. B. 154. P. 490—497.
- Cuadra T., Fernandez F. J., Tomasini A., Barrios-Gonzalez J. Influence of pH regulation and nutrient content on cephalosporin C production in solid-state fermentation by *Acremonium chrysogenum* C10 // *Lett. Appl. Microbiol.* 2008. Vol. 46. P. 216—220.
- Degenkolb T., Kirschbaum J., Brückner H. New sequences, constituents, and producers of peptaibiotics: an updated review // *Chemistry and Biodiversity*. 2007. Vol. 4. P. 1052—1067.
- Demain A. L., Elander R. P. The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present, and future // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999. Vol. 75. P. 5—19.
- Elander R. P. Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. Vol. 61. P. 385—392.
- Galbraith T. P., Harris R., Driscoll P. C., Wallace B. A. Solution NMR studies of anti-amoebin, a membrane channel-forming polypeptide // *Biophys. J.* 2003. Vol. 84, I. 1. P. 185—194.
- Gams W. *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1971. 261 p.
- Glenn A. E., Bacon C. W., Price R., Hanlin R. T. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications // *Mycologia*. 1996. Vol. 88, N 3. P. 369—383.
- Grant W. D. Alkaline environments // *Encyclopedia of Microbiology*. 1992. Vol. 1. P. 73—80.
- Grosklags J. H., Swift M. E. The perfect stage of an antibiotic-producing *Cephalosporium* // *Mycologia*. 1957. Vol. 49. P. 305—317.
- Horikoshi K. *Alkaliphiles — genetic properties and applications of enzymes*. Springer, 2006. 270 p.
- Ishiyama D., Satou T., Senda H., Fujimaki T., Honda R., Kanazawa S. Heptaibin, a novel antifungal peptaibol antibiotic from *Emericellopsis* sp. BAUA8289 // *J. Antibiotics*. 2000. Vol. 53, N 7. P. 728—732.
- Iwai Y., Omura S. Culture conditions for screening of new antibiotics // *J. Antibiotics*. 1982. Vol. 35, N 2. P. 123—141.
- Kavanagh F., Tunin D., Wild G. Antibiotics formed by species of *Emericellopsis* // *Mycologia*. 1958. Vol. 50. P. 370—372.
- Muñiz C. C., Zelaya T. E. C., Esquivel G. R., Fernández F. J. Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective // *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2007. Vol. 49. P. 88—98.
- Nagaraj G., Uma M. V., Shivayogi M. S., Balaran H. Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi // *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 2001. Vol. 45, N 1. P. 145—149.
- Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications // *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 28. P. 56—63.
- Ott J. L., Godzeski C. W., Pavey D., Farran J. D., Horton D. R. Biosynthesis of cephalosporin C. I. Factors affecting the fermentation // *Appl. Microbiol.* 1962. Vol. 10. P. 515—523.
- Phoebe C. H., Combie J., Albert F. G., Tran K. V., Cabrera J., Correia H. J., Guo Y., Lindermuth J., Rauert N., Galbraith W., Selitrennikoff C. P. Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds // *J. Antibiotics*. 2001. Vol. 54, N 1. P. 56—65.
- Rogozhkina E. A., Lapshina M. B., Eremin S. V., Shvets V. I., Skladnev D. A. Cultivation of *Emericellopsis salmosynnemata* mycelium fungus — producer of the peptide antibiotic zervamicin IIB. Pt 1. HPLC analysis of zervamicin // *Pharm. Chem. J.* 2000. Vol. 34, I. 6. P. 332—335.
- Rossmann A. Y., Samuels G. J., Rogerson C. T., Lowen R. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes) // *Studies in Mycology*. Baarn Delft The Netherlands: CBS, 1999. N 42. 249 p.
- Sarookhani R. M., Moazzami N. Isolation of *Acremonium* species producing cephalosporine C (CPC) from forest soil in Gilan province, Iran // *Afr. J. Biotech.* 2007. Vol. 6, N 22. P. 2506—2510.

Sato M., Arima K., Beppu T. Fermentation of antimycin by alkalophilic *Streptomyces* and taxonomical studies on the producing strain // *Biotechnol. Letters*. 1985. Vol. 7, N 3. P. 159—164.

Sato M., Beppu T., Arima K. Studies on antibiotics produced at high alkaline pH // *Agr. Biol. Chem.* 1983. Vol. 47. P. 2019—2027.

Sato M., Okamoto R., Beppu T. Enhanced production of antibiotics by *Paecilomyces lilacinus* under alkaline conditions associated with morphological change // *Agr. Biol. Chem.* 1991. Vol. 55, I. 2. P. 555—562.

Tsujibo H., Sato T., Inui M., Yamamoto H., Inamori Y. Intracellular accumulation of phenazine antibiotics produced by an alkalophilic actinomycete. I. Taxonomy, isolation and identification of the phenazine antibiotics // *Agr. Biol. Chem.* 1988. Vol. 52, I. 2. P. 301—306.

Vasavada S. H., Thumar J. T., Singh S. P. Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1 // *Curr. Sci.* 2006. Vol. 91, N 10. P. 1393—1397.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Поступила 19 V 2009

Учреждение Российской академии медицинских наук

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН

Москва

i-marina@yandex.ru

### Р Е З Ю М Е

Спектр антимикробной активности был исследован у галоалкалотолерантных изолятов доминирующих в содовых солончаках видов микромицетов *Emericellopsis cf. minima*, *Heleococcum alkalinum*, *Acremonium charticola*, *A. rutilum*, *A. strictum*, *Acremonium* sp. В результате было выявлено, что изоляты галоалкалотолерантных грибов при культивировании на щелочных средах способны продуцировать антибиотические вещества, обладающие как антибактериальной активностью с широким и узким спектром действия, так и антифунгальной активностью. Исследованные изоляты оказались наиболее активными в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Aspergillus niger* и практически неактивными в отношении *Candida albicans* и *Escherichia coli*.

Ключевые слова: антимикробная активность, *Acremonium*, *Emericellopsis*, галоалкалотолерантные микромицеты, содовые солончаки.

### S U M M A R Y

The spectrum of antimicrobial activity was investigated among haloalkalitolerant fungal isolates, dominated in alkaline soils: *Emericellopsis cf. minima*, *Heleococcum alkalinum*, *Acremonium charticola*, *A. rutilum*, *A. strictum*, *Acremonium* sp. It was shown that some isolates of haloalkalitolerant fungi were capable of producing compounds with high and low spectrum of antibacterial and antifungal activity. The investigated isolates were more active against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Aspergillus niger*; they were practically inactive against *Candida albicans* and *Escherichia coli*.

Key words: antimicrobial activity, *Acremonium*, *Emericellopsis*, haloalkalitolerant micromycetes, alkaline soil.

УДК 582.288 : 575.21

В. Ю. Крюков,<sup>1</sup> О. Н. Ярославцева,<sup>1</sup> М. В. Левченко,<sup>2</sup>  
Г. Р. Леднев,<sup>2</sup> В. В. Глузов<sup>1</sup>

### ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA*

KRYUKOV V. Yu., YAROSLAVTSEVA O. N., LEVCHENKO M. V.,  
LEDNEV G. R., GLUPOV V. V. PHENOTYPICAL VARIABILITY IN NATURA  
ISOLATES OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *BEAUVERIA BASSIANA*

Гриб *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. является патогеном для широкого круга насекомых из разных отрядов. Штаммы этого вида значительно различаются по морфологическим, физиологическим и вирулентным свойствам. В данном случае под вирулентностью авторы понимают количественную меру патогенности (Вайзер, 1972). Известно, что географическая изоляция является основным фактором внутривидовой дифференциации *B. bassiana* (Rehner, Buckley, 2005). При этом внутривидовая изменчивость гриба исследована недостаточно. Неоднократно специалисты пытались установить взаимосвязи между морфологией колоний *B. bassiana*, интенсивностью спороношения и вирулентностью (Евлахова, 1966; Алешина и др., 1972; Огарков, Огаркова, 2000; Гештовт, 2002; Крюков и др., 2007). Однако однозначного ответа на данный вопрос до сих пор найти не удалось. При этом было установлено, что наиболее вирулентными и перспективными для массового культивирования являются штаммы гриба с мучнистой гладкой структурой колоний, а культуры с войлочной и ватообразной структурой оказываются менее вирулентными и слабо спороносящими. В ряде работ показана связь между вирулентностью штаммов *B. bassiana* и активностью протеолитических, липолитических и хитинолитических ферментов (Павлюшин, 1979; Гештовт, 2002). Другие специалисты (Борисов и др., 2001) такой корреляции не обнаружили. Остается открытым вопрос о приуроченности штаммов *B. bassiana* к определенной группе хозяев. Неизвестно, зависит ли вирулентность штамма гриба от таксономической принадлежности хозяина, из которого он был выделен. Некоторые авторы предполагают, что в результате адаптации к местным популяциям насекомых в биоценозе могут формироваться расы гриба, отличающиеся высокой специфичностью по отношению к тем или иным хозяевам (Андронов и др., 1981; Крюков и др., 2007). Однако приуроченность к насекомым определенных групп у рода *Beauveria* прослеживается только на уровне видов, при этом весьма не отчетливо (Rehner, Buckley, 2005). В то же время у других широко специализированных гифомицетов, например, у *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, установлена внутривидовая специализация к насекомым разных отрядов (Humber, 1997) или видов (Fargues, Robert, 1983). Следует отметить, что изучение полиморфизма и трофических

<sup>1</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск.

<sup>2</sup> ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург.

преференций *B. bassiana* весьма актуально также с позиций практической экологии, в особенности для разработки программ по созданию искусственных эпизоотий в популяциях насекомых.

Цель данной работы — изучение морфофизиологических и вирулентных свойств изолятов *B. bassiana* одной географической популяции (Новосибирская обл.), выделенных из насекомых различных групп.

### Материал и методы

Основная часть изолятов *B. bassiana* (33 культуры) была выделена из различных насекомых в восточной части Новосибирской обл. (54°35'—55°05' с. ш., 82°45'—84°00' в. д.) в июле—сентябре 2006 г. Также в работе использованы два штамма (Сар-31, ББК-1), выделенные на юге Новосибирской обл. в окрестностях г. Карасук (53°03' с. ш., 78°03' в. д.) в 2000—2001 гг. Насекомые-хозяева гриба принадлежали к следующим таксонам: Heteroptera — Miridae sp. (2), Pentatomidae sp. (2); Orthoptera — Calliptamus italicus L. (2); Homoptera: Cicadidae sp. (1); Coleoptera — Brachysomus echinatus Bonsd. (9), Polydrusus undatus F. (1), Eudipnus mollis Strom (1), Staphylinidae sp. (2), Cisidae sp. (1), Chrysomelydae sp. (1), Carabidae sp. (1), Elateridae sp. (1); Lepidoptera — Thyatiridae sp. (1), Macroheterocera sp. (3); Hymenoptera — Cimbex sp. (1), Formicoidea sp. (2); Diptera — Asellidae sp. (1), Cyclorrhapha sp. (1); Insecta sp. (2). Выделение и поддержание культур в лабораторных условиях проводили по общепринятым методикам (Бойкова, Новикова, 2001).

При определении биомассы воздушного мицелия и количества спор изолятов использовали газонный посев на агаризованную среду Ваксмана (Литвинов, 1969) в чашки Петри диаметром 90 мм (64 см<sup>2</sup>). Через 45 суток культивирования при 25 °С воздушный мицелий и споры грибов соскабливали со среды шпателем, просушивали в течение 10 суток при той же температуре, взвешивали и размельчали в ступке. Подсчет конидий проводили в камере Горяева.

Для оценки скорости роста грибов использовали точечный посев на среды Ваксмана и Сабуро с последующим измерением диаметра колоний с интервалом в 2 суток в течение одного месяца. Рельефность колоний оценивали на 30-е сутки визуально по 3-балльной системе: 1 — нерельефные, 2 — слаборельефные, 3 — сильно-рельефные.

Протеолитическую и липолитическую активность изолятов определяли экспресс-методом на агаризованных средах с добавлением обезжиренного сухого молока (2 %) или Твина-80 (Павлюшин, 1979). На данные среды помещали агаровые блоки диаметром 7 мм с 3-суточным мицелием грибов. Показателем ферментативной активности служила ширина зон протеолиза на 3-и сутки и зон липолиза на 6-е сутки инкубирования при 25 °С.

Вирулентность изолятов оценивали на личинках II и III возраста колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say), на нимфах II и III возраста пустынного пруса (*Calliptamus barbarus* Costa), азиатской саранчи (*Locusta migratoria* L.) и в ряде опытов на гусеницах III возраста крапивницы (*Aglais urticae* L.). Чтобы осуществить заражение, насекомых однократно окунали в водные суспензии конидий гриба. Личинок помещали в пластиковые контейнеры объемом 700 мл и накрытые сверху сеткой. Все эксперименты проводили как минимум в 3 повторностях, по 10—15 особей в каждой. Смену корма и учет погибших насекомых проводили ежедневно в течение 10—17 суток в зависимости от уровня их смертности.

Для сравнительного анализа вирулентности изолятов использовали показатели смертности нимф саранчовых и гусениц крапивницы на 8—10-е сутки после инфицирования, а колорадского жука — на 12—15-е сутки после инфицирования. Уровень смертности, зарегистрированный в указанные сроки, характеризовался максимальной дисперсией, что позволило наиболее точно провести дифференциацию изолятов по признаку вирулентности.

## Результаты и обсуждение

При культивировании изолятов на средах Ваксмана и Сабуро было выявлено пять типов колоний (рис. 1). У штаммов первого типа колонии мучнистые нерельефные (*a*), у изолятов второго типа — войлочные нерельефные (*б*), у третьего типа — войлочно-мучнистые рельефные (*в*), у четвертого — войлочные рельефные (*г*) и у пятого — ватообразные (*д*). Наиболее часто встречались морфоварианты *г* (18 изолятов) и *б* (8 изолятов), реже — *a*, *б* и *д* (по 3 изолята). Установлено, что наибольшие биомасса и титр конидий характерны для культур с мучнистой структурой колоний (рис. 2). Самые низкие показатели биомассы и титра отмечены у морфовариантов *б* и *г*. Следует отметить, что для морфотипа *a* характерно также наиболее быстрое формирование спороншения — на 9—13-е сутки. У других морфовариантов основная масса спор образуется на 20—35-е сутки.

В экспериментах на личинках колорадского жука установлено, что низко-, средне- и высоковирулентные изоляты могут относиться к любым морфовариантам, при этом доля высоковирулентных культур выше среди изолятов с более рельефной структурой колоний (рис. 3). Аналогичная тенденция наблюдалась в экспериментах на пустынном прусе.

Выяснено, что все изучаемые изоляты проявляли протеолитическую и липолитическую активность. Ширина зон протеолиза варьировала от 1 до 8 мм, а ширина зон липолиза — от 16 до 26 мм. На данной группе изолятов *B. bassiana* не выявлено достоверной корреляции между вирулентностью и активностью протеаз ( $r < 0.27$ ,  $p > 0.05$ ). Также не обнаружено взаимосвязи между вирулентностью и скоростью радиального роста колоний на разных средах ( $r < 0.14$ ,  $p > 0.05$ ). Установлены слабые положительные корреляции на уровне 0.38—0.45 ( $p < 0.05$ ) между липазной активностью и вирулентностью изолятов по отношению к саранчовым и колорадскому жуку, а также достоверные ( $p < 0.05$ ) корреляции на уровне 0.35—0.48 между продуктивностью конидий, рельефностью колоний и вирулентностью для тест-насекомых.

При сравнительной оценке вирулентности культур по отношению к разным насекомым на первом этапе работы было изучено два изолята *B. bassiana* — Сар-31 и ББК-1. Данные культуры многократно тестировали на насекомых в течение 4 лет в 2005—2008 гг. Следует отметить, что изучаемые изоляты весьма стабильны по морфокультуральным и вирулентным свойствам, выделены из одного вида насекомого (*Calliptamus italicus* L.) в одном и том же географическом пункте (окрестности

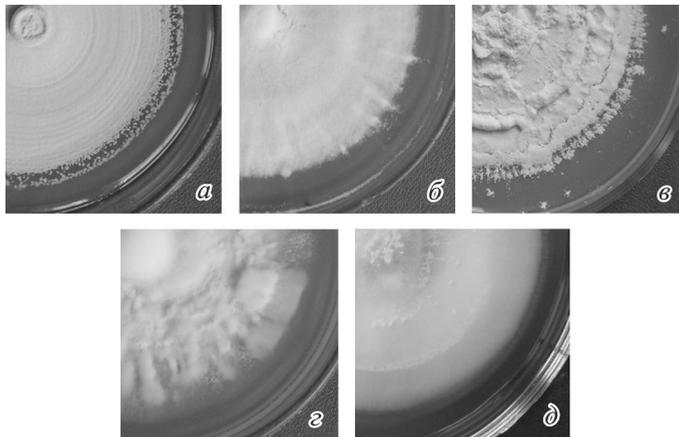


Рис. 1. Морфоварианты *Beauveria bassiana* на агаризованной среде Ваксмана.

*a* — мучнистые нерельефные, *б* — войлочные нерельефные, *в* — войлочно-мучнистые рельефные, *г* — войлочные рельефные, *д* — ватообразные.

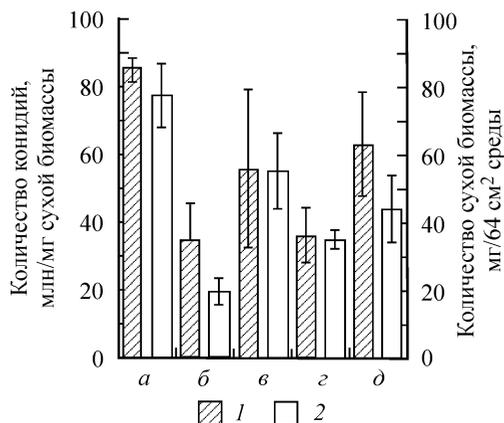


Рис. 2. Интенсивность спороношения и выход биомассы у изолятов *B. bassiana*, относящихся к разным морфовариантам, на среде Ваксмана.

1 — количество конидий, 2 — биомасса. Интервалы — ошибка средней арифметической.

г. Карасук) и имеют одинаковый тип колоний (а). Установлено что изолят с высокой вирулентностью по отношению к представителям одного отряда насекомых оказался в то же время высокоактивным и для других отрядов насекомых. Так, ББК-1 вызывал более высокую смертность азиатской саранчи, колорадского жука и крапивницы по сравнению с культурой Сар-31 (рис. 4). Следует также отметить, что аналогичные результаты были получены нами ранее при исследовании вирулентности двух штаммов другого энтомопатогенного гриба — *Metarhizium anisopliae* на этих же насекомых (Крюков и др., 2008).

На втором этапе исследовали 35 природных изолятов *B. bassiana*. Установлена тесная достоверная связь между вирулентностью данных культур для пустынного пруса и колорадского жука (рис. 5). Такой же эксперимент с использованием 26 изолятов повторили на личинках колорадского жука и азиатской саранчи. Как и в первом случае, корреляция оказалась высокой и достоверной ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.00001$ ). Полученные факты свидетельствуют о возможном отсутствии специализации данных изолятов по отношению к насекомым указанных отрядов. Отличия по вирулентности между группами изолятов, выделенных из насекомых разных отрядов, оказались

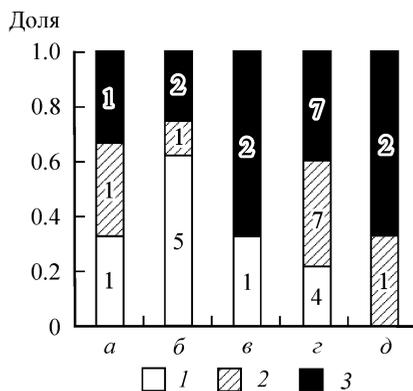


Рис. 3. Соотношение изолятов с разным уровнем вирулентности для колорадского жука среди морфовариантов *B. bassiana* (15-е сутки после инокуляции, титр  $5 \times 10^6$  конидий/мл).

1 — низковирулентные (смертность 10—40 %), 2 — средневирулентные (40—70 %), 3 — высоковирулентные (70—100 %). Цифры на столбцах — число изолятов.

**Вирулентность изолятов *Beauveria bassiana*, выделенных из различных отрядов насекомых, по отношению к личинкам колорадского жука и пустынного пруса**

Отряд насекомого-хозяина	Число изолятов	Смертность колорадского жука из отряда Coleoptera, %	Смертность пустынного пруса из отряда Orthoptera, %
Homoptera	1	93	100
Heteroptera	4	38 ± 9	74 ± 14
Orthoptera	2	44 ± 17	65 ± 20
Coleoptera	17	55 ± 6	71 ± 6
Lepidoptera	4	68 ± 14	84 ± 12
Hymenoptera	3	34 ± 8	57 ± 14
Diptera	2	25 ± 3	48 ± 15

Примечание. Концентрация инокулюма при заражении колорадского жука составляла  $5 \times 10^6$  конидий/мл, смертность на 15-е сутки опыта, для пруса —  $1 \times 10^6$  конидий/мл, смертность на 8-е сутки. После знака «±» указана ошибка средней арифметической.

недостовверными. Отмечены высокие показатели вариабельности в смертности насекомых (см. таблицу). Наиболее вирулентным для колорадского жука и пустынного пруса оказался штамм, изолированный из цикады. Относительно высокая вирулентность для обоих видов отмечена у культур, выделенных из чешуекрылых и жуков, а для пустынного пруса также у штаммов, выделенных из клопов. Меньшая вирулентность у культур — из прямокрылых, двукрылых, перепончатокрылых. Установлено, что штаммы, выделенные из одного вида насекомого в конкретном месте, могут сильно отличаться по вирулентности. Так, 8 изолятов *B. bassiana*, выделенных из жука-долгоносика *V. echinatus* на локальном участке (100 м<sup>2</sup>), проявили самую различную активность по отношению к колорадскому жуку (смертность от 10 до 83 %) и пустынному прусу (от 40 до 100 % смертности).

Таким образом, в популяциях *B. bassiana* существует несколько морфотипов, при этом внутри каждого имеются штаммы с различным уровнем вирулентности. Большая доля вирулентных изолятов отмечена среди морфовариантов с рельефными и ватообразными колониями. Эти результаты несколько отличаются от ранее полученных данных по полиморфизму *B. bassiana* (Огарков, Огаркова, 2000; Крюков и др., 2007)

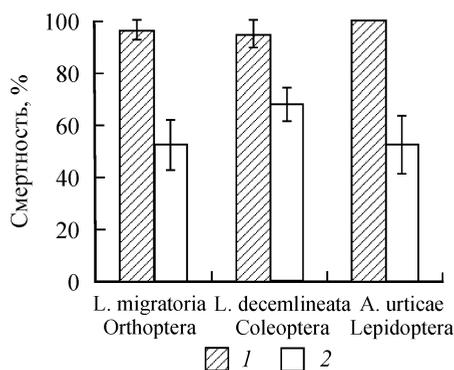


Рис. 4. Вирулентность двух изолятов *B. bassiana* по отношению к насекомым различных отрядов (10-е сутки опыта для перелетной саранчи и гусениц крапивницы, 12-е сутки опыта для колорадского жука, титр  $1 \times 10^7$  конидий/мл).

1 — ББК-1, 2 — Сар-31.

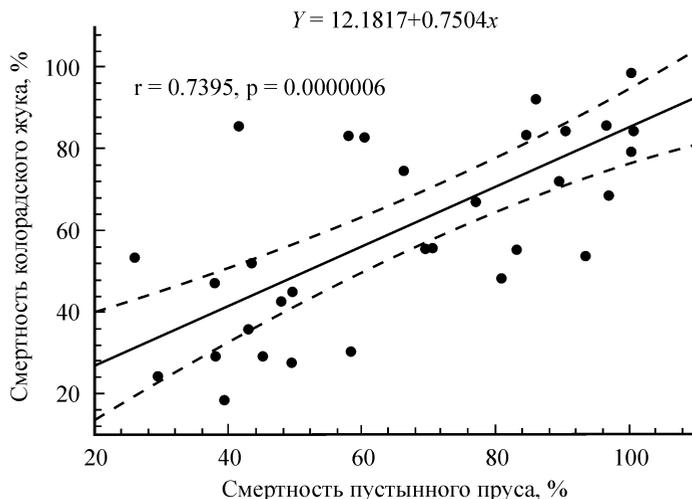


Рис. 5. Вирулентность изолятов *B. bassiana* по отношению к личинкам колорадского жука (15-е сутки опыта, титр  $5 \times 10^6$  конидий/мл) и пустынного пруса (8-е сутки опыта, титр  $1 \times 10^6$  конидий/мл).

и согласуются с результатами по спонтанной изменчивости *M. anisopliae* (Serebrov et al., 2007). С практической точки зрения наиболее перспективным является отбор штаммов с мучнистыми нерельефными колониями, поскольку у данных культур отмечаются наибольшая биомасса и высокий титр конидий. Низкий уровень корреляций между различными морфофизиологическими признаками изолятов и их вирулентностью подтверждает тот факт, что вирулентность — комплексный признак, обусловленный многими свойствами энтомопатогенных микромицетов (Вайзер, 1972; Митина и др., 1997; Борисов и др., 2001).

Культуры *B. bassiana*, выделенные на небольшой территории или даже в определенном пункте из одного вида насекомого, очень вариабельны по вирулентности. Установлено, что изолят, обладающий высокой активностью по отношению к насекомым определенного отряда, со значительной долей вероятности оказывается высоковирулентным к насекомым других отрядов. Трофической специализации у исследуемой группы изолятов не выявлено. Полученные результаты согласуются с данными других авторов. В частности, по мнению специалистов (Огарков, Огаркова, 2000), вирулентность изолятов *B. bassiana* по отношению к тепличной белокрылке *Trialeurodes vaporariorum* Wstw. не зависит от источников выделения. При исследовании генетического полиморфизма *B. bassiana* было показано, что основную роль во внутривидовой дифференциации играют территориальные факторы, а не хозяева патогена (Rehner, Buckley, 2005). Используемый нами подход не позволяет полностью отрицать существование специализации к тем или иным хозяевам внутри популяций гриба. Во-первых, возможно, что уровень смертности насекомых не является критерием специфичности изолятов *B. bassiana* к разным насекомым. Ранее было показано, что не на всех хозяевах разные штаммы гифомицетов могут успешно завершать жизненный цикл и давать интенсивный конидиогенез (Крюков и др., 2008). Во-вторых, известно что «физиологический» круг хозяев патогена, определяемый в лабораторных экспериментах, и его «экологический» круг хозяев в природе могут не совпадать, поскольку это связано со средой обитания, поведением, особенностями жизненного цикла хозяев и другими факторами, действующими в естественных условиях (Jagonski et al., 2003). Кроме того, мы не имеем представления, среди каких групп насекомых циркулировал определенный штамм до того, как он был выделен из конечного погибшего насекомого. Для исследования вопроса о возможности формирования рас, специфичных к определенной группе насекомых-хозяев у такого широкоспециализированного вида, как *B. bassiana*, необходимо исследование изменений морфо-

физиологических и вирулентных свойств штаммов в серии пассажей через разных хозяев.

Авторы признательны коллективу Лаборатории биотехнологии Казахского института защиты и карантина растений (г. Алма-Ата) за помощь в организации экспериментов, а также А. А. Легалову (Институт систематики и экологии животных СО РАН) за идентификацию жуков Curculionidae.

Работа выполнена при частичной поддержке фондов Интеграция СО РАН (грант № 46), Президента РФ (грант МК-1431.2009.4) и РФФИ (грант № 09-04-00380).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андросов Г. К., Андросова Л. Н., Соболева Л. А. Экология энтомопатогенных микроорганизмов таежной зоны Европейского Северо-Востока // Использование микроорганизмов для борьбы с вредными насекомыми в сельском и лесном хозяйстве. Иркутск, 1981. С. 139—150.

Алешина О. А., Ильичева С. Н., Кононова Э. В., Коляда Н. А. Основные критерии для отбора штаммов гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. для производственных целей // Микология и фитопатология. 1972. Т. 6, вып. 4. С. 341—344.

Бойкова И. В., Новикова И. И. Выделение энтомопатогенных дейтеромицетов / Под ред. В. В. Глупова // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год, 2001. С. 698—708.

Борисов Б. А., Серебров В. В., Новикова И. И., Бойкова И. В. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты / Под ред. В. В. Глупова // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год, 2001. С. 352—427.

Вайзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. М.: Колос, 1972. 640 с.

Гештовт Н. Ю. Энтомопатогенные грибы (биотехнологические аспекты). Алма-Ата: НИИЗР, 2002. 288 с.

Евлахова А. А. Спонтанная и индуцированная изменчивость грибов рода *Beauveria* // Тез. докл. Междунар. конгр. по микробиологии. 1966. С. 315.

Крюков В. Ю., Леднев Г. Р., Дубовский И. М., Серебров В. В., Левченко М. В., Ходырев В. П., Сагитов А. О., Глупов В. В. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Hyphomycetes) для регуляции численности насекомых // Евразийский энтомол. журн. 2007. Т. 6, № 2. С. 195—204.

Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Левченко М. В., Леднев Г. Р. Вирулентность штаммов *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae* по отношению к насекомым различных отрядов // Матер. V Всерос. съезда паразитологического общества при Российской академии наук «Паразитология в XXI веке — проблемы, методы, решения». 2008. Т. 2. С. 97—98.

Литвинов М. А. Методы изучения микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969. 124 с.

Митина Г. В., Сергеев Г. Е., Павлюшин В. А. Влияние химических и морфолого-культуральных особенностей природных изолятов *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas на вирулентность в отношении личинок оранжевой белокрылки // Микология и фитопатология. 1997. Т. 31, вып. 1. С. 57—64.

Огарков Б. Н., Огаркова Г. Р. Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири. Иркутск: Изд-во Иркутск. ун-та, 2000. 134 с.

Павлюшин В. А. Факторы вирулентности гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. и патогенез мускардиноза насекомых: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. Л., 1979. 24 с.

Fargues J. F., Robert P. H. Effects of passaging through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae* // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29, N 5. P. 576—583.

Humber R. A. Fungi: Identification / Ed. L. A. Lacey // Manual of techniques in insect pathology. Acad. Press, 1997. P. 153—185.

Jaronski S. T., Goettel M. S., Lomer C. J. Regulatory requirements for ecotoxicological assessments of microbial insecticides — how relevant are they? / Eds H. M. T. Hokkanen, A. E. Hajek // *Environmental Impacts of Microbial Insecticides*. The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. P. 237—260.

Rehner S. A., Buckley E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs // *Mycologia*. 2005. Vol. 97. N 1. P. 84—98.

Serebriv V. V., Maljarchuk A. A., Shternshis M. V. Spontaneous variability of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. strains as an approach for enhancement of insecticidal activity // *Plant Sci.* (Sofia). 2007. Vol. 44. N 3. P. 236—239.

Институт систематики и экологии животных СО РАН

Поступила 19 V 2009

Новосибирск  
ВНИИ защиты растений  
Санкт-Петербург  
krukoff@mail.ru

### Р Е З Ю М Е

Изучены 35 изолятов *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., выделенных из различных насекомых в Новосибирской обл. Установлено, что среди разных морфовариантов гриба встречаются низко-, средне- и высоковирулентные культуры. Между вирулентностью изолятов и их морфологическими признаками (липазная и протеазная активность, биомасса, скорость радиального роста, продуктивность конидий, рельефность) отмечены низкие коэффициенты корреляции ( $r < 0.48$ ). Выяснено, что изоляты, обладающие высокой вирулентностью для насекомых определенного отряда, оказываются также высокоактивными для насекомых других отрядов. Показана тесная взаимосвязь ( $r > 0.74$ ) между вирулентностью культур для колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) и саранчовых (*Calliptamus barbarus* Costa, *Locusta migratoria* L.). При этом установлено, что изоляты, выделенные из одного вида насекомого в одном пункте, могут сильно отличаться по вирулентности.

Ключевые слова: *Beauveria bassiana*, морфовариант, вирулентность, изолят, колорадский жук, *Leptinotarsa decemlineata*, саранчовые, *Calliptamus barbarus*, *Locusta migratoria*.

### S U M M A R Y

Thirty-five *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. isolates from different insects in Novosibirsk region were investigated. It was found out that low-, medium- and high- virulent isolates are present at various fungus morphotypes. The low correlation between virulence and morphophysiological features (lipolytic and proteolytic activity, biomass, radial growth rate, conidia productivity, relief) was noted ( $r < 0.48$ ). The isolates characterized by high virulence to the insects of certain order were virulent to the other insect orders at the same level. The close correlation ( $r > 0.74$ ) between isolates virulence against the potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and locusts (*Calliptamus barbarus* Costa, *Locusta migratoria* L.) was shown. It was found that isolates obtained from insects of the same species in the same place may be very different in virulence.

Key words: *Beauveria bassiana*, morphotypes, virulence, isolate, potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, locusts, *Calliptamus barbarus*, *Locusta migratoria*.

УДК 582.241 (571.151)

© Yu. K. Novozhilov,<sup>1</sup> M. Schnittler,<sup>2</sup> A. V. Vlasenko,<sup>3</sup> K. A. Fefelov<sup>4</sup>

## MYXOMYCETE DIVERSITY OF THE CHUYSKAYA DEPRESSION (ALTAY, RUSSIA)

НОВОЖИЛОВ Ю. К., ШНИТЛЕР М., ВЛАСЕНКО А. В., ФЕФЕЛОВ К. А.  
РАЗНООБРАЗИЕ МИКСОМИЦЕТОВ ЧУЙСКОЙ КОТЛОВИНЫ (АЛТАЙ, РОССИЯ)

Although myxomycetes are well known in the boreal forest (taiga) zone of Russia the species associated with this vegetation in south-eastern Siberia very little studied. Thus far only few attempts have been made to estimate the myxomycete diversity for local species inventory in Siberia (Taimyr Peninsula: Novozhilov et al., 1999; the southern part of the Krasnoyarsk territory: Kosheleva et al., 2008). Before this study only 41 species have been registered in the Altay Mts in Russia (Lavrov, 1929; Novozhilov, 1987; Barsukova, 2000). These data are based on published records, obtained mostly from field collections in different taiga communities of the central and north regions of the Altay Mts, especially at the Teletzkoe lake (the Altay State reservation). However, myxomycete biota of the arid regions of the southern Altay Mts has been not studied in Russia.

Material was collected during four weeks in August 2008 in central and east-southern Altay Mts. and adjacent region near Barnaul city. Other survey in this region has been done by K. A. Fefelov in 2002. The field studies were made to record or collect myxomycete sporocarps (fruit bodies) of myxomycetes and to obtain samples of various types of organic substrata to be used in the preparation of moist chamber cultures. Specific objectives of the study were (1) to obtain additional baseline data on myxomycete abundance and biodiversity in Russian Altay Mts (2) to determine the composition of the assemblages of species associated with all of the different microhabitats potentially available to myxomycetes in the different vegetation types being studied. This paper contains a part of this work relevant to the steppe and forest steppe habitats. Other portion of the data related to the different humid boreal types of vegetation (taiga) we plan to publish in another paper.

### Material and methods

The Altay mountains in southern Siberia form the major mountain range in the western Siberia biogeographic region and is situated in the borderland between two subcontinents — Northern and Central Asia and stretches from 44°30' to approximately 54° N and from

<sup>1, 3</sup> V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, 197376 St. Petersburg, Russia.

<sup>2</sup> Institute of Botany and Landscape Ecology, Ernst-Moritz-Arndt University, D-17487 Greifswald, Germany.

<sup>4</sup> Institute of Plant and Animal Ecology of the Russian Academy of Sciences, Ural Division, 620144 Yekaterinburg, Russia.

80°30' (—82°)—92°30' (—98°E) (Fig. 1). It's a square of about 550 000 km<sup>2</sup> bound within the territories of Russia, Kazakhstan, China, and Mongolia. The climate of the Altay Mountain Country is sharply continental, and, because of absolutely open exposure to migrations of arctic air masses, is very severe. However, highly complicated relief considerably changes climatic conditions in different parts of the region. In general, the local climate is determined by the position of the locality regarding the altitudinal zonation, which differs in various parts of Altay (Kamelin et al., 2005). For example the average year temperature and precipitation in the Yaylu settlement near the Teletzkoe lake (Altay State Reservation, 480 m above sea level) is about 2.8 °C and 855—1200 mm correspondingly, whereas in the Chuyskaya depression near the Kosh-Agach settlement in the Kuray steppe (1760 m above sea level) is about -6.7 °C and 100—150 mm correspondingly.

Soils of Altay Mts is extremely diverse (Kuminova, 1960). Complexity of the soil structure depends on zonal factors of relief and vegetation. Different variants of chestnut soils — from light and typical to dark on higher altitudes — are well developed in the are developed in southern regions of Altay Mts (mostly in Zaissan and Barun-Khurai depressions) and several parts of the Chuyskaya depression. These soils are often salty enough, and usually they are combined with typical solonchaks (Dergachova et al., 2007). The less podzoled variants are developed under the park *Larix sibirica* forests (and *Pinus sibirica*—*Larix sibirica* forests in the lowest part of subalpine steppe).

Diversity of natural conditions and considerable richness of flora lead to development in the Altay Mountain Country of a highly diverse vegetation. For the following ecological analysis of myxomycete assemblages only the main vegetation types were distinguished (Kamelin et al., 2005). Locality numbers written in bold in the following brief descriptions refer to Fig. 1; all sampled localities are assigned to the respective major vegetation types.

**I. S t e p p e.** Tuvianian-Mongolian steppe province is represented in Russian Altay Mts by a smaller part, whereas the main part of it stretches widely eastward in Mongolia. It inc-

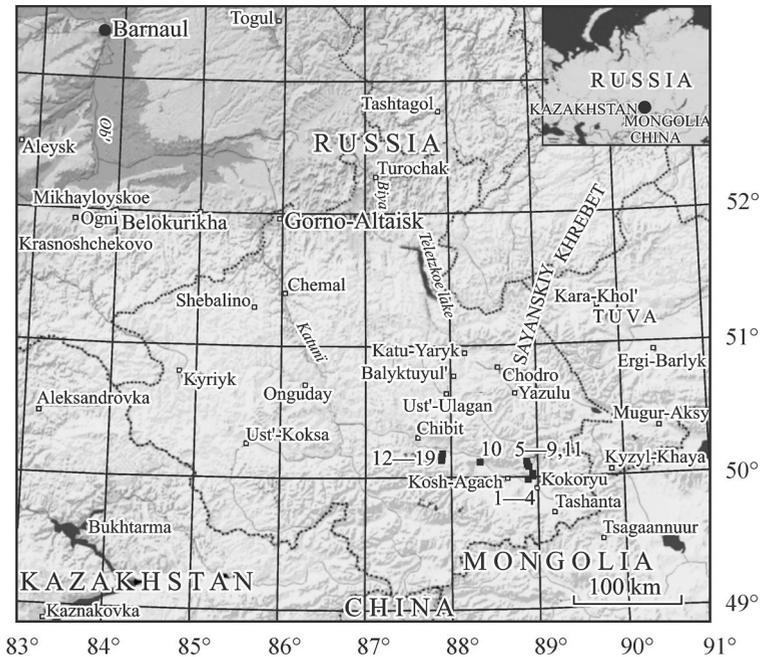


Fig. 1. Map of the Altay Mountain Country. Sampled localities are indicated by black rectangles. Lakes, rivers and valley forests are marked grey. Numbers refer to the localities listed in the text. A dotted black line indicates the border between countries. Insert: geographical position of the study area (delimited by the black circle). Source: Microsoft Encarta Reference Library, 2002 (modified) and the Google Earth (modified).

ludes Chuysky district of the Altay-Khangai subprovince of Altay-Sayan province (Kamelin et al., 2005). The main feature of the vegetation of the province is extremely low role of forest communities in the vertical zonality of the overwhelming majority of its ranges. Different variants of mountain steppes and shrub steppes prevail in the profile of altitudinal zonality of mountains of the province. In lower belts they are usually represented by the mountain variants of desert steppes in various combinations with specific semidesert and even North Gobian desert communities, desert-steppes and petrophytic desert-like steppes. In higher belts the steppes (mountain polydominant firm-bunch grass steppes), spread at the southern slopes, and meadow-steppes, combined with fragments of mesophilous shrub communities are to be met together with specific high mountain complexes.

There are a lot of regions with extremely low amounts of precipitations (Kuminova, 1960; Kharlamova, 2004), such as sites of extensive intermountain depressions (Chuyskaya «steppe» up to 200 mm with some localities of 110—150 mm). Communities of microtherm (rarely — mesotherm) xerophilous (predominantly — scleroxerophilous) herbs, first of all — bunch grasses, but also *Artemisia* sps. (e. g. *A. frigida*, *A. gmelinii*), shrubs (e. g. *Caragana leucophloea*, *Spiraea hypericifolia*) and *Potentilla fruticosa* near rivulets in swampy habitats, abundant set of dicotyls, especially from the Fabaceae family. Steppes, occupying diverse habitats, represent very heterogenous type of vegetation with montane-semidesert species including *Chenopodium frutescens*, *Kochia krylovii*, *Potentilla astragalifolia*, *Astragalus* sps., *Stipa glareosa*, *Agropyron cristatum*, species of *Artemisia* (Kamelin et al., 2005). **Kosh-Agach Loc. 1:** shallow SW-exp., slope with very dry feather-grass steppe, 1850 ± 50 m a. s. l., 49°58'46" N 88°53'07" E; **Loc. 2:** shallow SW-exp. slope with very dry shrub/feather-grass steppe, 2082 ± 50 m a. s. l., 50°00'05" N 88°56'52" E; **Loc. 3:** shallow saddle with very dry, desert-like steppe, 2084 ± 50 m a. s. l., 50°01'26" N 88°57'10" E; **Loc. 5:** heavily grazed steppe vegetation on gneiss, NE-exp. steep slope, 2159 ± 50 m a. s. l., 50°04'27" N 88°54'21" E; **Loc. 6:** extremely grazed dry steppe, 2030 ± 50 m a. s. l., 50°05'00" N 88°54'28" E; **Loc. 11:** cryophilous steppe with shrubs of *Lonicera* and *Artemisia* at a S-exp. slope, 2252 ± 50 m a. s. l., 50°07'16" N 88°52'56" E.

**II. Mountain forest-steppe.** An extent areas in Central and south-eastern Altay within of the steppe region there are localities where annual precipitations can reach 250—400 mm (Kharlamova, 2004) and expositional forest-steppe communities with larch can be developed. The only tree species is *Larix sibirica* form subalpine «park» larch forest, dark coniferous species are absent here, in exception with small areas with spruce (*Picea obovata*), developed within the river valleys of the northern slope, where also a stripe of *Pinus sibirica* in some sites of the timberline is present. **Kosh-Agach Loc. 4:** second-growth subalpine light coniferous forest (*Larix sibirica*) at a N-exp. slope, 2229 ± 50 m a. s. l., 50°04'16" N 88°54'07" E; **Loc. 7:** second-growth subalpine light coniferous forest (*Larix sibirica*), at a N-exp. slope, 2126 ± 50 m a. s. l., 50°05'46" N 88°53'11" E; **Loc. 8:** subalpine light coniferous forest (*Larix sibirica*) with overgrazed mountain steppe and scattered larch trees at a N-exp. slope, 2126 ± 50 m a. s. l., 50°05'46" N 88°53'11" E; **Loc. 9:** subalpine light coniferous forest (*Larix sibirica*) with extremely overgrazed mountain steppe and scattered larch trees, 2098 ± 50 m a. s. l., 50°05'56" N 88°53'36" E; **Kuray Loc. 10:** dry, grazed, opened mixed larch forest with *P. laurifolia*, with *Lonicera* sp. and *Juniperus sabina* in understory, 1750 ± 50 m a. s. l., 50°07'04" N 88°20'42" E; **Loc. 12:** subalpine light coniferous forest (*Larix sibirica*), steep N-exp. canyon with coniferous forest, with community of *Comarum salessowii* Bunge near rivulet, 1615 ± 50 m a. s. l., 50°08'11" N 87°53'26" E; **Loc. 15:** subalpine light coniferous forest (*Larix sibirica*), steppe meadows near a larch gallery forest, Kokoria river, 1535 ± 25 m a. s. l., 50°10'3" N 87°53'50" E; **Loc. 17:** subalpine light coniferous forest (*Larix sibirica*), steppe meadows near a larch gallery forest near a river, 1531 ± 25 m a. s. l., 50°10'21" N 87°54'33" E; **Loc. 18:** open steppe, mesophilous deciduous shrubs near a larch gallery forest, community with *Potentilla fruticosa* and *Salix* sps., in swampy habitat, near river, 1530 ± 25 m a. s. l., 50°10'27" N 87°54'00" E; **Loc. 19:** transition belt from forest-steppe to coniferous mountain vegetation, shady coniferous forest with *Picea obovata* and *Larix sibirica* near river, 1700 ± 20 m a. s. l., 50°15'00" N 87°51'00" E.

A total of 76 substrate samples were collected for preparation of moist chamber cultures. These included: bark from living trees and shrubs (22 samples), plant leaf litter (1 samples), litter of grasses and herbaceous plants (9 samples), litter of coniferous cones (22 samples), litter of twigs (5 samples), samples of coarse woody debris (6 samples) of different trees, dung samples (22 samples) of various herbivores including cattle, camel, horse, sheep, goat and rodents.

Moist chamber cultures were prepared in the manner described by Härkönen (1977, 1981). All cultures consisted of moist filter paper in Petri dishes (10 cm in diam.) and were incubated under ambient light and at room temperature (ca 20–24 °C) for up to 90 days and examined for the presence of myxomycetes on six occasions (days 2–4, 6–8, 11–14, 20–22, 40–44 and 85–90). A record is defined herein as one or more fruiting bodies of a species originated from one culture.

Species diversity (alpha-diversity) was calculated using Shannon's diversity index  $H' = -\sum P_i \log P_i$ , where  $P_i$  is the relative abundance (the proportion of the total number of individuals or records represented by species) of a particular species (Magurran, 2004). For determination, sporocarps were preserved as permanent slides in lactophenol and/or glycerol gelatine, to distinguish between limeless and lime-containing structures. All microscope measurements and observations were made under a light microscope with differential interface contrast (DIC) Zeiss Axio Imager A1 with material mounted directly in polyvinyl lactophenol. Spore measurements were made of 10 spores from each of the collections. Air-dried sporocarps were studied with a stereomicroscope Zeiss Stemi 2000, and a JSM-6390 LA scanning electron microscope, at 10–15 kV in the Komarov Botanical Institute RAS (St. Petersburg). For the latter, specimens were mounted on copper stubs using double-sided sticky film and sputter-coated with gold. Species were identified according to Martin and Alexopoulos (1969) and various original descriptions from the literature, basically applying a morphospecies concept. Nomenclature follows that of Lado (2001) and Hernández-Crespo and Lado (2005) except for the two genera *Collaria* Nann.-Bremek., *Stemonitopsis* Nann.-Bremek. and the conserved names of several other genera (Lado et al., 2005) approved recently by the Committee for Fungi of the IAPT (Gams, 2005). Authorities are cited according to Kirk and Ansell (1992).

All species recorded are arranged alphabetically in the annotated list given below. The abbreviation 'cf.' in the name of a taxon indicates that it could not be assigned to this name without remaining doubts. One asterisk indicates a species recorded as new for the Altay Mts, whereas two indicate a new record for the Russia.

Names of vascular plants are those listed by Czerepanov (1995). After each name, an estimate of abundance is given in brackets. This estimate is based upon the proportion of a species in relation to the total number of records (74 identified to species level): **R** — rare (< 2 %, fewer than 2 record), **O** — occasional (2–4 %, 2 records), **C** — common (4–5 %, 3–4 records), **A** — abundant (> 5 % or more than 4 records). Abundance and the number of field records and records obtained in the moist chamber cultures given through «/» for a species is set in brackets. Next, the occurrence of a species in different vegetation types (indicated by Roman numerals) and microhabitats (indicated by letters) is listed. Six vegetation types were differentiated and described in the part «Study sites» (I — dry mountain steppe, II — mountain forest-steppe). Abbreviations for substrate types are b — bark of living trees and shrubs, d — dung of herbivorous animals, ll — leaf litter, lt — litter of twigs, lg — litter of grasses and herbaceous plants, w — large dead woody debris of trees and shrubs, c — litter of cones of coniferous, g — living grasses, f — fruit bodies of fungi, m — mosses, s — soil. All study sites where a species was found are given in parentheses. Finally, the collection numbers are given. Voucher specimens are deposited in the collection of the first author in the fungal herbarium of the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Systematics and Geography of Fungi (LE), and in the collection of fourth author (KAF) in the Institute of Plant and Animal Ecology of the Russian Academy of Sciences. The string «...» indicates common species for which not all collection numbers were listed.

## Results and discussion

*Arcyria cinerea* (Bull.) Pers. [R, 0/1] II: 1, b: 1 (Loc. 17). LE 255163. — This specimen with typical for var. *cinerea* ellipsoid grey sporothecae 1.5—2 mm in length obtained from the moist chamber culture on bark of *Larix sibirica*.

*A. incarnata* (Pers. ex J. F. Gmel.) Pers. [C, 3/0] II: 3, lt: 2, w: 1 (Loc. 19). KAF 3153, 3155, 3157. — One specimen was recorded on coarse woody debris of *L. sibirica*, another two specimens on litter of twigs of *L. sibirica*.

*A. insignis* Kalchbr. et Cooke [R, 0/1] II: 1, c: 1 (Loc. 17). LE 255179. — On litter of cones of *L. sibirica*, obtained in moist chamber culture.

*A. pomiformis* (Leers) Rostaf. [O, 1/1] II: 2, ll: 1, lt: 1 (Loc. 17, 19). LE 255171; KAF 3156. — On litter of needles and twigs of *L. sibirica* in moist chamber cultures. The sporocarps are yellow, and beige, ovoid. The capillitium is open, elastic consists of filaments 2—6 mkm in diam.; ornamentation of the capillitium in upper and lower part in the form of cogs and spinules. Spores yellowish in mass, 7—8 mkm in diam. with a few scattered verrucae.

*Badhamia dubia* Nann.-Bremek. [O, 0/2\*] II: 2, b: 2 (Loc. 9, 10). LE 255137, 255589. — New for the Altay Mts. Both specimens obtained in moist chamber culture: one on bark of *Artemisia gmelinii* Weber ex Stechm. and another on bark of *Populus laurifolia* Ledeb. Sporocarps spherical, 0.5—1 mm in diam., pale bluish-grey, shining and iridescent. Capillitium a rather wide-meshed net of tubules, filled with white lime. Spore-mass black. Spores purple-brown, forming persistent clusters of 7—12 spores, the separate spores spherical or ovoid, 9—12 mkm diam., capped with spines or warts on the outside of the cluster and with a few low warts on the remainder.

*Ceratiomyxa fruticulosa* (O. F. Müll.) T. Macbr. [C, 3/0] II: 3, lt: 1, w: 2 (Loc. 19). KAF 3150, 3151, 3164. — Two specimens found on coarse woody debris of *L. sibirica* and one on litter of twigs, in shady situations in larch woodland near rivulet. This common species has been included, as it has traditionally been listed among myxomycetes, although it is related to another group of Eumycetozoa, the Protostelids (Olive, 1975). We use the conserved name for this species as proposed by Lado et al. (2005) and accepted by the IAPT (Gams, 2005).

*Comatricha ellae* Härk. [A, 0/7\*] II: 7, b: 5, ll: 1, w: 1 (Loc. 9, 10, 12, 15, 17). LE 255136, 255155, 255141, 255583, 255585. — New for the Altay Mts. One of the commonest corticolous species in study area. It penetrates within forest steppe through arboreal intrazonal communities. This corticolous species is the commonest and most widely distributed species in the larch forests of southern Altay Mts. Specimens obtained in moist chamber cultures on bark of *L. sibirica* (2 records), *Picea obovata* Ledeb (2 records) and *P. laurifolia* (1 record) and on the decayed wood and litter of needles of *L. sibirica*. Differing from the closely related *C. nigra* by smaller size (0.5—1 mm), shorter stalk and a well-developed surface net on the capillitium and the coppery colour of sporocarps. Our specimens have all these characters excluding color of sporocarps; our sporocarps are duller than it was given in the type description.

*C. nigra* (Pers. ex J. F. Gmel.) J. Schröt. [R, 1/0] II: 1, lt: 1 (Loc. 19). KAF 3159. — On litter of twigs of *L. sibirica*.

*Dianema mongolicum* Novozh. [R, 0/1\*\*] II: 1, b: 1 (Loc. 10). LE 255586. — New for Russia. Prominent characters of this species is stiff capillitium that has rounded or elliptic acetabuliform swellings of 1—10 mkm in diam., a thick peridium appearing opaque yellowish-brown that is impregnated with refuse material, and pale yellow, spinulos spores (9.5—)10.0—10.5(—11.0) mkm in diam. This rare corticolous species has been described from Mongolia (Novozhilov, Golubeva, 1986) on bark of *Populus diversifolia* and recently was found on bark of *Artemisia tridentata* in Arizona (David Mitchell, pers. comm.). All of our sporocarps, were found on the bark of *Populus laurifolia* in moist chamber cultures near with Russian-Mongolian border in the dry mixed opened larch-poplar forest with scattered shrubs of *Lonicera* sps. and *Juniperus sabina*. This locality situates about 500 km north-western of the type locality and is similar by the climatic characters with the type locality.

*Didymium anellus* Morgan [R, 1/0\*] II: 1, w: 1 (Loc. 19). KAF 3161. — New for the Altay Mts. On coarse woody debris of *L. sibirica*.

*D. difforme* (Pers.) Gray [R, 0/1\*] II: 1, w: 1 (Loc. 4). LE 255168. — New for the Altay Mts. On coarse woody debris of *L. sibirica*.

*D. quitense* (Pat.) Torrend [R, 0/1\*] II: 1, d: 1 (Loc. 4). LE 255177. — New for the Altay Mts. This specimens came together with other coprophilic species *Kelleromyxa fimicola* and *Licea tenera* from weathered dung of horse cultivated in moist chamber. Specimen has numerous scattered sporocarps in the form of pulvinate, sporangia 0.5—1.5 mm in diam., white or cream. Peridium double, outer layer shell-like, composed of compacted crystals. Inner layer of peridium membranous, bluish. Capillitium sparse consists of short very pale by transmitted light threads with dark expansions. The spore size of specimens matches well *D. quitense* as described by Martin and Alexopoulos (1969), with very purplish brown by transmitted light spores (10—)11—13(—14) mkm in diam. The spore densely spinulose with the spines more or less united to form an imperfect reticulate pattern. However, *D. quitense* is described with strongly warted spores, which leaves some doubt as to the placement of this specimen in this taxon.

*Echinostelium colliculosum* K. D. Whitney et H. W. Keller [C, 0/3\*] II: 3, b: 3 (Loc. 10). LE 255111, 255132. — New for the Altay Mts. Typical corticuloid species, on bark of trees, shrubs and dwarf-shrubs, in particular *Lonicera tataricum* L., *P. laurifolia*, *Picea obovata*. Our specimens include large colonies of shining, pinkish or colourless, very small (60—100 mkm in height) sporocarps, spores clustered in groups of 20—50, bearing discs at points of spore-to-spore contact, always with a spore-like columella. The articular surfaces of spores of *E. colliculosum*, are less prominent than those of *E. coelocephalum*, and are not of uniform thickness (Whitney, 1980).

*E. corynophorum* K. D. Whitney [O, 0/2\*\*] II: 2, w: 1, c: 1 (Loc. 9). LE 255109. — This is a new record for Russia. Both specimens obtained in moist chamber cultures, one on litter of cones of *L. sibirica* and another on coarse woody debris of larch. It was first reported from the California by Whitney (1980) on bark of *Juniperus occidentalis*. All of our collections were obtained on slightly acidic substrate (mean pH 6.03 ± 0.07) including bark, cones and wood of *Larix sibirica* and *Picea obovata* in moist chamber culture and exhibit the typical characters of this species. This species is close to *E. brooksii*, from which it is separated by the light lenticular columella in transmitted light and spores with circular areas at points of spore-to-spore contact.

*E. cribrarioides* Alexop. [R, 0/1\*] II: 1, b: 1 (Loc. 10). LE 255133. — New for the Altay Mts. On bark of *Lonicera tataricum* in moist chamber culture. The overall habit of this specimen best fits that of *E. cribrarioides*, the capillitium forms a complete globose net with large meshes which is unique for this genus.

*E. minutum* de Bary [O, 0/2\*] II: 2, b: 1, c: 1 (Loc. 9, 12). LE 255142. — New for the Altay Mts. Both specimens obtained in moist chamber cultures on bark of *Comarum salesowii* and another litter of cones of *Picea obovata*.

*E. papillatum* (Pers.) Rostaf. [R, 1/0] II: 1, lt: 1 (Loc. 19). KAF 3149. — On litter of twigs of *L. sibirica*.

*Kelleromyxa fimicola* (Dearn. et Bisby) Eliasson [C, 0/3\*] I: 1, II: 2, d: 3 (Loc. 12, 13, 18). LE 255160, 255169, 255175. — New for the Altay Mts. and the second record of the species for Russia. It was only previously known on dung of herbivorous animals from the several localities in desert of the Caspian lowland (Novozhilov et al., 2006). All specimens were found in the driest part of the Altay Mts — the Chuyskaya «steppe». This species has a strong preference for dung. The distinguishing characteristics of this species are shiny black, spindle-shaped sporangia; rather thick, cartilaginous peridium often dehiscent by the preformed suture; simple capillitium consists of solid threads and spores with thick wall and ornamented by scattered sometimes aggregated large spines.

*Leocarpus fragilis* (Dicks.) Rostaf. [R, 1/0] II: 1, lt: 1 (Loc. 19). KAF 3152. — This specimens found on litter of twigs of *L. sibirica*, in shady situations in larch woodland near rivulet. As well as *C. ellae* this species penetrates within forest steppe and steppe through arboreal intrazonal communities.

*Licea parasitica* (Zukal) G. W. Martin [O, 0/2\*] II: 2, b: 1, lt: 1 (Loc. 10, 17). LE 255135, 255165. — New for the Altay Mts. Both specimens obtained in moist chamber culture, one — on bark of *P. laurifolia* and another on litter of twigs of *A. gmelinii*.

*L. tenera* E. Jahn [R, 0/1] I: 1, d: 1 (Loc. 5\*) mc 17080. — New for the Altay Mts. Obtained in moist chamber cultures together with *K. fimicola* and *D. quitense* on dung of horse. This species approaches *Perichaena liceoides* in habit and substrate preferences. Our specimens of *L. tenera* have a peridium in which the outer layer lacks the granular deposits as found in *P. liceoides* but is characterized by amorphous deposits. Spores minutely roughened (asperulate), requiring oil immersion to observe, spinulose (delicately spiny) under SEM, spines 0.2—0.3 mkm high. This is another example of a strictly coprophilous myxomycete.

*L. testudinacea* Nann.-Bremek. [R, 0/1\*] II: 1, ll: 1 (Loc. 17). LE 255164. — New for the Altay Mts. This specimen was found in a moist chamber culture on the needles of *L. sibirica*. *Licea testudinacea* appears to be most closely related to *L. minima* and *L. chelonoides*. It is distinguished from *L. minima* by the darker, more olive and not rusty-coloured spore mass. In the latter species, the spores are always reddish brown by transmitted light and the peridium has two or three layers. *L. chelonoides* differs by having dull black sporocarps not shining when dry, platelet margins with 5 or more rows of tubercles, and spores measuring 15—18 mkm in diam.

*Lycogala epidendrum* (L.) Fr. [R, 1/0] II: 1, w: 1 (Loc. 19). KAF 3162. — On coarse woody debris of *L. sibirica*, in shady situations in larch woodland near rivulet. As well as some other lignicolous species, *L. epidendrum* penetrates within forest steppe and steppe through arboreal intrazonal communities.

*L. exiguum* Morgan [R, 1/0\*] II: 1, lt: 1 (Loc. 19). KAF 3163. — New for the Altay Mts. On litter of twigs of *L. sibirica*. Our specimen consists from several small subglobose aethalia, 2—4 mm in diam. with typical characters of this inconspicuous species. Cortex yellow-brown, thickly covered with dark, purplish-brown or black scales, these pulvinate at first with homogeneous contents, tending to become divided internally into numerous chambers and finally appearing flat and tessellate. Pseudocapillitium composed of colourless or yellow branching tubules arising from the middle cortex layer, often smooth at the base, roughened or transversely wrinkled elsewhere, 2—10 mkm in diam. Spores nearly colourless, marked by faint, irregular warts and lines, sometimes appearing nearly smooth, 4.5—6 mkm in diam.

*Macbrideola oblonga* Pando et Lado [R, 0/1\*] II: 1, b: 1 (Loc. 10). LE 255129. — New for the Altay Mts. Obtained only one time in moist chamber culture on bark of *P. laurifolia* collected in extremely arid locality of the Chuyskaya steppe. The oblong shape of the sporotheca and the presence of free spores differentiate this species of *Macbrideola*. Comparisons with material obtained from Kazakhstan (Schnittler, Novozhilov, 2000; Zemlianskaia, Adamonyte, Krivomaz and Novozhilov, unpubl. data), Mongolia (Novozhilov et al., 2008), the Orenburg area of Russia (Novozhilov, unpubl. data), the Colorado Plateau of the western United States (Novozhilov et al., 2003) allow us to assign our specimens to *M. oblonga*. Common in arid regions.

*Paradiacheopsis fimbriata* (G. Lister et Cran) Hertel ex Nann.-Bremek. [C, 0/4\*] II: 4, b: 3, c: 1 (Loc. 4, 7, 9, 17). LE 255156, 255154... — New for the Altay Mts. Our material includes numerous sporocarps obtained in moist chamber cultures, with typical capillitial threads finishing by swollen and club-shaped tips. This species definitely connected with extremely acidic bark of *L. sibirica* ( $3.62 \pm 0.41$ ), but can be found on litter of cones of this tree also (1 record).

*Perichaena depressa* Lib. [R, 0/1\*] II: 1, d: 1 (Loc. 17). LE 255180. — New for the Altay Mts. Obtained in moist chamber culture on dung of sheep.

*P. luteola* (Kowalski) Gilert [O, 0/2\*] I: 1, II: 1, d: 2 (Loc. 10, 13). LE 255170... — New for the Altay Mts. Both specimens obtained in moist chamber cultures on dung of horse. The distinguishing characters of this species are the transparent thin peridium with smooth inner surface, olive shiny globose sporocarps with a bright yellow spore mass that looks as a dense globe within the sporocarp when observed with a dissecting microscope. Capillitium yellow, composed of a network of branched and anastomosed tubules 1—4 mkm in diam., with

a few free ends that are weakly attached to the peridium. This is a strictly coprophilous myxomycete.

*P. vermicularis* (Schwein.) Rostaf. [R, 0/1\*] I: 1, II: 1 (Loc. 2), mc 17088. — New for the Altay Mts. The specimen came from leaf litter cultivated in moist chamber.

*Physarum cinereum* (Batsch) Pers. [O, 0/2] II: 2, b: 1, lt: 1 (Loc. 17). LE 255166, 255167. — One specimen from litter of twigs of *A. gmelinii*, and another from bark of living shrubs of *Juniperus communis* L.

*Ph. decipiens* M. A. Curtis [A, 0/5\*] I: 1, II: 4, b: 1, ll: 2, lt: 1, lg: 1 (Loc. 9, 11, 17, 18). LE 255138, 255199, 255152, 255153, 255580. — New for the Altay Mts. This species occupies different substrates including leaf litter (1 record), litter of twigs (1 record) and bark of living *A. gmelinii* (1 record), litter of *J. sabinii* (1 record) and litter of grasses.

*Ph. notabile* T. Macbr. [A, 0/10] I: 4, II: 6, b: 2, d: 2, ll: 2, lt: 1, lg: 3 (Loc. 2, 6, 10, 13, 14, 17, 18). LE 255587, 255230, 255134, 255159, 255116, 255130, 255131, 255593, 255581... — This species as a previous species occupies different kinds of substrates: leaf litter (1), dung of herbivorous animals (2), bark of living trees (2), litter of twigs (1), litter of grasses (3), and litter of needles of *J. sabina* (1). According the literature (Martin, Alexopoulos, 1969), *P. notabile* is reported mostly on wood in temperate and boreal deciduous and coniferous forests and characterized by dark, limeless cupulate base of sporotheca and abundant capillitium. This species is reported from the Altay State Reservation in the Central Altay (Barsukova, 2000). Specimens from arid regions of southern Altay obtained in moist chamber cultures fit to forms recently described from arid regions of western Kazakhstan (Schnittler, Novozhilov, 2000) and the Caspian Lowland (Novozhilov et al., 2006) and Mongolia (Novozhilov et al., 2008).

*Trichia favoginea* (Batsch) Pers. [O, 2/0] II: 2, b: 1 (Loc. 19). KAF 3158, 3166. — One specimen found in the field on bark of coarse woody debris of *L. sibirica*, another — on old fruit bodies of poliporoid fungi developed on log in shaded habitat, near rivulet. This is example of lignicolous species having a wide range and penetrated within of steppe zone through habitats with arboreal vegetation.

*T. varia* (Pers. ex J. F. Gmel.) Pers. [C, 3/0] II: 3, lt: 1 (Loc. 19). KAF 3154, 3160, 3165. — This boreal lignicolous species penetrated far to steppe zone through habitats with arboreal vegetation. Two specimens found on old fruit bodies of poliporoid fungi developed on log in shaded woodland, and one specimen on litter of twigs, in shaded habitat, near rivulet.

Since only 18 records were obtained in the field almost all data of this survey from steppe and forest-steppe originate from moist chamber cultures (Fig. 2). A total of 56 records

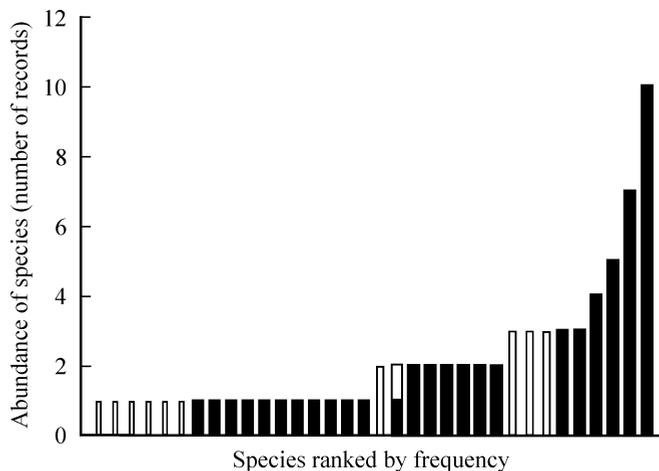


Fig. 2. Frequency distribution of all 73 records of 34 species (records from the field and from moist chamber cultures) for the Altay Mts. Grey bars represent species found in the field. Dark sectors of the bars indicate records obtained from moist chamber cultures.

were obtained from 76 moist chamber cultures (excluding 12 records of non-fruiting plasmodia) and 18 field collections of fruit bodies, representing 34 species from 16 genera and 7 families. Overall, the myxomycete diversity and species richness from the Chuyskaya steppe were found to be relatively moderate ( $H' = 3.25$ , 34 species). However, 17 species were classified as rare for whole studied area. Records from the field and from moist chamber cultures mostly complement each other (Fig. 2). Eleven species were observed in the field, whereas 24 species were registered in moist chamber cultures. Only *Arcyria pomiformis* was found in the field as well as in moist chamber culture.

Only two common species found in the field (4 records) and confined to wood debris and old fruit bodies on decayed wood was *Trichia varia* and *Ceratiomyxa fruticulosa*. Other lignicolous species *Trichia favoginea*, *Comatricha nigra*, *Enerthenema papillata*, *Lycogala epidendrum*, *L. exiguum* were rare for this region and present element of myxomycete biota of taiga communities in the Altay Mts. All of these species are widely distributed and often abundant in temperate deciduous forests and are also well known from the taiga. This suggests that the zonal limits of myxomycete distribution are relative. In the forest communities they are found in a variety of microhabitats in watersheds and in damp depressions. In the steppe zone they also occur in appropriate situations in intrazonal arboreal habitats near rivulets where there is a rich supply of coarse woody debris.

The diversity of myxomycetes differs considerably in forest steppe arboreal habitats and in zonal open dry steppe and desert habitats (Table 1). The high species richness in intrazonal habitats is due primarily to the general rarity of lignicolous species and litter-inhabiting species in steppe. As the specificity of the environment increases with the prevailing conditions of the open zonal habitats of steppe and desert, the number of rare species decreases and the proportion of abundant species increase. This follows the pattern that species domi-

Table 1

Statistical data for steppe and forest steppe vegetation types of the southern Altay Mts (Russia)

Parameter	I	II
Mean elevation, m	1945	1657
Mean annual precipitation, mm	110	300
Substrate pH, mean $\pm$ SE	7.21 $\pm$ 0.03	6.79 $\pm$ 0.03
Sampled localities	8	10
<sup>a</sup> Rec (fc/mc)	9 (0/9)	65 (18/47)
Number of MC	19	57
MC positive, %	52.6	56.1
<sup>b</sup> Rec	13	60
S/MC	0.68	1.05
S (fc/mc)	6 (0/6)	32 (11/22)
G	4	16
S/G	1.5	2.0
H'	1.5	3.2
D	0.26	0.05

Notes. Vegetation types (see details in the part «Material and methods»): I — desert steppe/dwarf shrub communities of the plains, treeless landscapes; II — mountain forest-steppe with subalpine «park» larch forest and deciduous tall shrub communities; Mean elevation calculated for all studied localities; Mean annual precipitation calculated for all studied localities; <sup>a</sup>Rec — records of determined species including field collections (fc) and obtained from moist chamber cultures (mc); <sup>b</sup>Rec — records obtained only from moist chamber cultures including undetermined taxa and non-fruiting plasmodia; MC — number of moist chamber cultures; S — number of species including found in the field (fc) and moist chamber cultures (mc); G — number of genera; H' — Shannon's index; D — Simpson's index.

nance in zonal treeless steppe habitats with extreme conditions is higher ( $D = 0.26$ ) than in the more stable and diverse habitats of forest steppe habitats where lignicolous myxomycetes can find shelters and substrates in shaded habitats e. g. near rivulets ( $D = 0.05$ ).

The most abundant species in treeless steppe and forest steppe habitats ( $> 6\%$  of all 76 records) was *Physarum* cf. *notabile* (ubiquitous species). Other common species (3–4% of all records) were *Arcyria incarnata*, *Comatricha ellae*, *Echinostelium colliculosum*, *Paradiacheopsis fimbriata*, and *Kelleromyxa fimicola* (obligate coprophilic species). The total of 34 taxa includes, 2 species which are new records for Russia: *Echinostelium corrynophorum* and *Kelleromyxa fimicola* and 21 species new for the Altay Mts.

Interestingly, *Fuligo cinerea*, which was found only once in the Altay Mts. in taiga community of the Altay Mts. (Barsukova, 2000), and was not registered in the Chuyskaya steppe. In contrast it was recently reported as a common species in the dry steppe and desert regions of the Caspian lowland in Russia and western Kazakhstan (Novozhilov et al., 2006). This fact is corresponded with data about distribution of this species in Mongolia and eastern Kazakhstan, where it is very rare (Novozhilov et al., 2008). This fact supports a hypothesis about moderate endemism of some species within Eurasian arid area.

The majority of the species of the Altay Mts. have polyzonal ranges and widely distributed. About 20% of the 34 species recorded in this study can be regarded as regularly occurring at the steppe and desert regions. These are *Dianema mongolicum*, *Echinostelium colliculosum*, *Kelleromyxa fimicola*, *Macbrideola oblonga*, *Physarum* cf. *notabile*. The steppe and forest steppe communities of the Chuyskaya depression are relatively rich in *Physaraceae* (21 species), *Trichiaceae* (16 species), *Stemonitidaceae* (14 species), but species of *Cribrariaceae* which are widely distributed in taiga forests are absent.

Both species richness and diversity varied considerably within groups of substrates (Table 2) and decreased from bark of living plants (14 species,  $H' = 2.45$ ) and litter of twigs (12 species,  $H' = 2.46$ ), to the dung of herbivorous and leaf litter (6 species,  $H' = 1.20$ ), litter of cones of coniferous (4 species,  $H' = 1.33$ ) to the coarse of woody debris (7 species,  $H' = 1.17$ ).

The most abundant corticolous species were *Comatricha ellae* (5 records on bark of 7 registered), *Echinostelium colliculosum* and *Paradiacheopsis fimbriata* (3 records on bark

Table 2

Statistical data for all investigated substrates in steppe and forest steppe vegetation types of the southern Altay Mts (Russia)

Substrates	<sup>a</sup> Rec	MCs	MC positive, %	<sup>b</sup> Rec	S/MC	S	G	S/G	H'	D
b	19	22	60	27	1.23	14	12	1.17	2.45	0.10
d	9	22	50	12	0.55	6	5	1.20	1.52	0.23
ll	7	1	50	11	1.00	6	5	1.20	1.55	0.22
lt	12	5	100	3	3.00	12	9	1.33	2.37	0.10
lg	4	9	40	6	1.20	2	2	1.00	0.56	0.63
w	5	6	30	6	0.67	7	6	1.17	1.61	0.20
c	4	22	50	5	0.83	4	3	1.33	1.39	0.25
g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
f	3	0	0	0	0	2	1	2.00	0.64	0.56
m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
s	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Notes. b — bark of living plants; d — dung of herbivorous animals; ll — leaf litter; lt — litter of small twigs; lg — litter of grasses and herbaceous plants; w — coarse woody debris; c — litter of coniferous cones; g — living grasses and herbaceous plants; f — fruit bodies of fungi; m — mosses and liverworts; s — soil. Other abbreviations as given in the Table 1.

of 3 registered) and *Badhamia dubia* (2 records on bark of 2 registered). All this species were registered only in moist chamber cultures. The dominant litter-inhabiting forms was *Physarum notabile* (3 records of total 10 registered), *Trichia botrytis* (15), *Didymium squamulosum* (22), *Hemitrichia pardina* (31) and *Didymium difforme* (36).

The most specific myxomycete assemblage occurs on dung of herbivorous animals. This group of species included typical litter-inhabitants such as *Didymium quitense* (1 record), and some common species which are known to tolerate a wide range of ecological amplitude and can sometimes utilize dung, such as *Physarum notabile* (2 records), obligate coprophils were: *Licea tenera* (1 record), *Perichaena lutea* (2 records), *Kelleromyxa fimicola* (3 records). Wood-inhabiting (lignicolous) myxomycetes represented the poorest myxomycete assemblage in the steppe and forest steppe communities of the Chuyskaya depression. Two species (*Ceratiomyxa fruticosa*, *Lycogala epidendrum*) were found only on this substrate in shadowed habitats near rivulets and a few species are known to sporadically (1 record) occur in moist chamber cultures such as *Didymium anellus*, *D. difforme*, *Comatricha ellae*, *Arcyria incarnata*, *Echinostelium corynophorum*.

This work was supported in part by grants (N 07-04-00353) from the Russian Foundation for Basic Research [RFBR] and from the scientific program of the Russian Academy of Science «Biodiversity», «Structure and role of soil organisms in biogeocenoses».

#### REFERENCES

- Barsukova T. N. Myxomycetes from Teletskoe lake vicinity, Altay State Reserve // Mikologiya i Fitopatologiya. 2000. Vol. 34. P. 6 [in Russ.].
- Czerepanov S. K. Vascular Plants of Russia and Adjacent States (the former USSR). St. Petersburg: World and Family-95 Ltd., 1995. 992 p. [in Russ.].
- Dergacheva M. I., Kovaleva E. I., Riabova N. N. Humus of soils of the Altay Mountains // Pochvovedenie. 2007. N 12. P. 1416—1421 [in Russ.].
- Gams W. Report of the Committee for Fungi // Taxon. 2005. Vol. 54. P. 828—830.
- Härkönen M. Corticolous Myxomycetes in three different habitats in southern Finland // Karstenia. 1977. Vol. 17. P. 19—32.
- Härkönen M. Myxomycetes developed on litter of common Finnish trees in moist chamber cultures // Nord. J. Bot. 1981. Vol. 1. P. 791—794.
- Hernandez-Crespo J. C., Lado C. An on-line nomenclatural information system of Eumycetozoa. <http://www.nomen.eumycetozoa.com> (24 X 2009).
- Kamelin R. V., Kutzev M. G., Shaulo D. N., Shmakov A. I., Tikhonov D. V., Viane R. L. L. Flora Altayca / Ed. R. V. Kamelin. Lycopodiophyta, Equisetophyta, Polypodiophyta. Barnaul: Azbuka, 2005. Vol. 1. 340 p.
- Kharlamova N. F. Climatic characters of the plateau Ukok and adjacent territories // Izvestia of Altayskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 2004. Vol. 3, N 33. P. 71—77 [in Russ.].
- Kirk P. M., Ansell A. E. Authors of fungal names. A list of authors of scientific names of fungi, with recommended standard forms of their names, including abbreviations // Index of Fungi. Supplement. CAB International. Plymouth: Latimer Trend and Co. Ltd., 1992. 95 p.
- Kosheleva A. P., Novozhilov Yu. K., Schnittler M. Myxomycete diversity of the state reserve «Stolby» (south-eastern Siberia, Russia): a preliminary report // Fungal diversity. 2008. Vol. 31. P. 45—62.
- Kuminova A. V. Vegetation cover of Altay. Novosibirsk: Nauka, 1960. 450 p. [in Russ.].
- Lado C. A nomenclatural taxabase of Myxomycetes. Madrid: CSIC, 2001. P. 224.
- Lado C., Eliasson U., Stephenson S. L., Estrada-Torres A., Schnittler M. Proposals to conserve the names Amaurochaete against Lachnobolus, Ceratiomyxa against Famintzina, Cribraria Pers. against Cribraria Schrad. ex J. F. Gmel. and Hemitrichia against Hyporhamma (Myxomycetes) // Taxon. 2005. Vol. 54. P. 543—545.

- Lado C., Pando F. Myxomycetes. I. Ceratiomyxales, Echinosteliales, Liceales, Trichales // Flora Mycologica Iberica. Madrid; Berlin; Stuttgart: J. Cramer, 1997. Vol. 2. 323 p.
- Lavrov N. N. Formae novae myxomycetum Sibiriae // Sistematicheskie zametki po materialam gerbaria Tomskogo Universiteta. 1929. N 4—5. P. 1—3 [in Latin].
- Magurran A. E. Measuring Biological Diversity. Oxford, UK: Blackwell Publ., 2004. 256 p.
- Martin G. W., Alexopoulos C. J. The Myxomycetes. Iowa City: Univ. of Iowa Press, 1969. 561 p.
- Modina T. D., Sukhova M. G. Climate and agroclimatic resources of Altay. Novosibirsk: Novosibirsk Univ. Press, 2007. 180 p. [in Russ.].
- Novozhilov Yu. K., Schnittler M. Nivicole Myxomycetes of the Khibine Mountains (Kola Peninsula) // Nord. J. Bot. 1996. Vol. 16, N 5. P. 549—561.
- Novozhilov Yu. K., Schnittler M., Stephenson S. L. Myxomycetes of the Taimyr Peninsula (north-central Siberia) // Karstenia. 1999. Vol. 39. P. 77—97.
- Novozhilov Yu. K. Myxomycetes of the Altay Nature reserve // Novosti sistematiki nizsich rastenij. 1987. Vol. 24. P. 113—114 [in Russ.].
- Novozhilov Yu. K., Mitchell D. W., Schnittler M. Myxomycete biodiversity of the Colorado Plateau // Mycol. Progress. 2003. Vol. 2. P. 243—258.
- Novozhilov Yu. K., Mitchell D. W., Schnittler M. Myxomycete biodiversity of the Colorado Plateau // Mycol. Progress. 2003. Vol. 2. P. 243—258.
- Novozhilov Yu. K., Schnittler M. Myxomycete diversity and ecology in arid regions of the Great Lake Basin of western Mongolia // Fungal diversity. 2008. Vol. 30. P. 97—119.
- Novozhilov Yu. K., Zemlyanskaya I. V., Schnittler M., Stephenson S. L. Myxomycete diversity and ecology in the arid regions of the Lower Volga River Basin (Russia) // Fungal diversity. 2006. Vol. 23. P. 193—241.
- Whitney K. D., Kellner H. W. A new species of Echinostelium // Mycologia. 1980. Vol. 72. P. 640.

Komarov Botanical Institute  
Russian Academy of Sciences  
St. Petersburg

Received 18 V 2009

## РЕЗЮМЕ

Целью данной работы было изучение таксономического и экологического разнообразия миксомицетов в условиях сухих степей и горной лесостепи юго-восточного Алтая в Чуйской котловине. Было зарегистрировано 74 образца плодовых тел миксомицетов, из которых 56 получены во влажных камерах и 18 собраны в поле. Всего было найдено 34 вида, относящихся к 16 родам и 7 семействам. Семнадцать видов были отнесены к группе редких на данной территории. Одиннадцать видов были найдены в поле, тогда как 24 вида были изолированы методом влажной камеры. В аннотированном списке приведены сведения о морфологии, экологии и распространении видов, дана характеристика таксономического и экологического разнообразия, описание особенностей их распространения. Выявлены некоторые тренды в изменении разнообразия миксомицетов на различных субстратах. Среди 7 групп субстратов (кора живых деревьев и кустарников, опад листьев, опад веточек, опад шишек хвойных, опад трав, остатки гнилой древесины, помет растительноядных животных) на коре формируется наиболее разнообразная и богатая биота миксомицетов, тогда как на выветрившемся помете растительноядных животных обитает наименьшее число видов, однако с наибольшей специализацией к данному субстрату. Среди 21 вида, новых для Алтая на территории России, два (*Dianema mongolicum* и *Echinostelium corynophorum*) отмечены впервые.

Ключевые слова: биоразнообразие, экология, слизевики, Алтай, горная лесостепь, сухие степи.

## S U M M A R Y

The primary objective of the present study was to obtain data on taxonomical and ecological diversity of myxomycetes (plasmodial slime moulds) in the dry steppe communities of the south-eastern Altay. A total of 56 records were obtained from 74 moist chamber cultures (excluding 12 records of non-fruiting plasmodia) and 18 field collections of fruit bodies, representing 34 species from 16 genera and 7 families. Seventeen species were classified as rare for the whole studied area. Eleven species were observed in the field, whereas 24 species were registered in moist chamber cultures. Taxonomic descriptions and ecological observations of rare and/or tentatively new taxa found in the study area are provided in the annotated checklist. Among seven different groups of substrata (bark of living trees and shrubs, ground leaf litter, ground litter of twigs, litter of coniferous cones, litter of grasses, coarse wood debris and dung of herbivores) diverging trends in species richness and substrate specificity of the species were found: bark of living plants had the richest myxomycete biota, dung the poorest but most specific myxomycete assemblage. Twenty one species are herein first reported for the Altay Mts and 2 are new records for Russia: *Dianema mongolicum* и *Echinostelium corynophorum*.

Key words: biodiversity, ecology, slime moulds, Altay mountain forest steppe, dry steppe.

## ГРИБЫ — ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 582.288:577.15

© N. Özer

### PECTOLYTIC ENZYMES PRODUCED BY *ALTERNARIA ALTERNATA* IN CULTURE AND DURING COLONIZATION OF COMMON WHEAT KERNELS

ОЗЕР Н. ПЕКТОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ *ALTERNARIA ALTERNATA* В КУЛЬТУРЕ И ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫ

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler is the fungus most commonly associated with black point disease in common wheat (*Triticum aestivum* L.). The disease is characterized by a brown to black discoloration at embryo end, the surrounding area and crease (Machacek, Greaney, 1938; Greaney, Wallace, 1943; Kilpatrick, 1968; Bhowmink, 1969; Conner, Thomas, 1985; Fernandez et al., 1994). Studies of host resistance, isolate virulence, environmental influence and the importance of kernel growth stages are restricted to the symptomatological observation or isolation of pathogen from ripe wheat kernels in the field or greenhouse (Machacek, Greaney, 1938; Adlakha, Joshi, 1974; Conner, Davidson, 1985; Conner, Thomas, 1985; Conner, 1987; Conner, 1989; Conner et al., 1990). In order to study the host-parasite relationship, it was also necessary to determine the ability of the pathogen for pectolytic enzyme production during kernel colonization.

Pectolytic enzymes such as pectin lyase (PNL) and polygalacturonase (PG) may have important roles in the infection process (Bateman, Basham, 1976; Collmer, Keen, 1986). PNL and PG have been shown to be produced in vitro by *A. alternata* isolated from rotting fruits of tomato, apple and lemon, only quantitatively (Mehta et al., 1974, 1975; Tak et al., 1985; Mahmoud, Omar, 1994; Omar, Mahmoud, 1994; El Shaieb, Malibari, 1995). Their role during the pathogenesis has been investigated only on tomato fruits (Mehta et al., 1974; Omar, Mahmoud, 1994). Differences in peroxidase from resistant and susceptible wheat cultivars to black point caused by *A. alternata* were observed using the isoelectric focusing (Williamson, 1997). To my knowledge, no information is available on the involvement of pectolytic enzymes in the development of *A. alternata* on wheat kernels.

The present study describes the capacity of *A. alternata* obtained from black pointed kernels to produce pectolytic enzymes and isoenzymes in culture and during the colonization of the common wheat kernels at different growth stages.

#### Material and methods

Seven *A. alternata* isolates, A1, A15, A18, A35, A46, A52, A60, obtained from embryo tissues of common wheat kernels with symptoms of black point in 2000 and 2001 were used in this study. They were cultured on potato carrot agar (PCA) containing white potato (20 g L<sup>-1</sup>), carrot (20 g L<sup>-1</sup>) and agar (20 g L<sup>-1</sup>) at 21 °C for 10 days (Simmons, 1994). For the enzyme preparation, isolates were surface-cultured in Czapek's liquid medium (pH 5.0)

containing 10 g L<sup>-1</sup> of citrus pectin (Sigma) as sole carbon source. The inoculum was one agar disc (6 mm in diam.) cut from the edge of cultures on PCA was used for inoculation. The cultures were statically grown for 7 days at 21 °C in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml medium.

Healthy common wheat kernels (cv. Flamura 85) were collected from the experimental area of the Faculty of Agriculture in Tekirdap at five different growth stages including anthesis (Growth Stage, G. S. 10.5.2, Feekes scales; Large 1954), flowering complete (G. S. 10.5.4), milk (G. S. 11.1), mid-dough (G. S. 11.2) and ripe (G. S. 11.4). The kernel samples were surface-sterilized by immersion in 1 % sodium hypochlorite solution for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water and dried on absorbent paper. Then, they were placed on sterile filter paper (blotter method) moistened with sterile distilled water in petri dishes. One isolate of *A. alternata*, producing the highest amount PNL and PG, was selected for inoculation of kernels. Inoculation followed the procedure described by Statler et al. (1975) with some modification. One drop of spore suspension, consisting of 1 × 10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup> in a 0.1 % aqueous solution of Tween 20, was placed on to each kernel. Eight drops of 25 % lactic acid were added to 1000 ml of the conidia suspension to retard bacterial growth. Kernels were incubated in Petri dishes enclosed in aluminum foil for 5 days at 21 °C. As a control, an aqueous spore-free solution of Tween 20 was used. Black point incidence was determined based on the percentage of kernels with symptoms of black point (a dark, brown to black discoloration). To check for the absence of contaminants, some infected kernels were aseptically placed on PCA in sterile Petri dishes, but only *A. alternata* grew under these conditions.

The experimental unit was a Petri dish containing ten kernels and there were twenty-five replicate Petri dishes of each growth stage arranged in a completely randomized design.

Seven days-old cultures of *A. alternata* isolates were collected from liquid media and the mycelium was removed by filtration in a Buchner funnel.

The enzyme preparations from the kernels were obtained by grinding infected tissues in an ice-cooled mortar in 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.8 (g tissue/mL<sup>-1</sup>), containing 0.1 M KCl, 5 g L<sup>-1</sup> cysteine and 10 g L<sup>-1</sup> insoluble polyvinylpyrrolidone (Sigma). The slurry was then strained through three layers of cheesecloth.

Filtrates from liquid culture and inoculated kernels were centrifuged at 15 000 g for 20 min at 4 °C. The supernatant was dialyzed against several changes of distilled water at 4 °C and filter-sterilized through a 0.22 μm membrane (Millipore). The same procedures were applied to uninoculated kernels.

All the activities were first assessed to determine pH and temperature conditions required for optimal enzyme activity. Activities were quantified under the pre-established optimal conditions.

PNL activity was assayed spectrophotometrically by measuring the absorbance at 235 nm. An increase in absorbance of 1.73 indicated the formation of 1 μmol of unsaturated uronide (Zucker, Hankin, 1970). One unit of enzyme activity catalyzed the formation of 1 μmol of unsaturated uronide min<sup>-1</sup> from 2.5 g L<sup>-1</sup> (w/v) citrus pectin in Tris HCl buffer (0.1 M, pH 8.5) at 35 °C.

PG activity was determined by measuring the increase of reducing-end groups over time. Reducing groups were measured by a modified method of Nelson (1944), using D-galacturonic acid (Sigma) as a standard. One unit of PG activity produced 1 μmol of reducing group min<sup>-1</sup> from 2.5 g L<sup>-1</sup> polygalacturonic acid (Sigma) in sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), at 35 °C. All the enzyme assays were repeated three times.

Isoenzyme separation by isoelectric focusing (IEF) was realized horizontally on Mini IEF cell apparatus (Bio Rad) by using 0.4 mm thick polyacrylamide gels containing 5 % (v/v) ampholyte (Sigma) covering the pH range of 3.5–10.0. The gels were run at 200, 450, 600 and 950 V for 15, 30, 20 and 25 minutes, respectively. After IEF, the gels were overlaid with ultrathin (0.4 mm) agarose gels for PNL and PG isoenzyme detection, prepared as described by Ried and Collmer (1985). For PNL isoenzyme detection, the 10 g L<sup>-1</sup> agarose (Sigma) gel contained 1 g L<sup>-1</sup> pectin buffered at pH 8.5 with 50 mM Tris-HCl; for PG detection the 10 g L<sup>-1</sup> agarose gel, contained 1 g L<sup>-1</sup> polygalacturonic acid in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5.

IEF polyacrylamide gels overlaid with ultrathin agarose gel were incubated at 100 % humidity for 60 min at 35 °C. Activity bands were visualized by staining the agarose overlay for 30 min in 0.5 g L<sup>-1</sup> ruthenium red (Sigma), followed by rinsing in distilled water. PNLs and PGs appeared as white bands. The isoelectric point (pI) values of pectolytic isoenzymes were estimated from a regression equation of standard protein versus the distance migrated.

Data on disease incidence, PNL and PG activity were analyzed using variance and means were separated according to Duncan Multiple Range Test (P = 0.05).

## Results and discussion

PNL and PG production by seven *A. alternata* isolates grown in a medium containing pectin as sole carbon source are shown in Table 1. All isolates produced PNL and PG. However, there were significant differences among the isolates, A18 and A52 had the highest ability to produce PNL in culture. PG production from the isolate A52 was also significantly higher than from other isolates, therefore it was chosen to inoculate the kernels.

The optimum temperatures and pH were 35 °C and 8.5 for PNL production and, 35 °C and 4.5 respectively, for PG production.

Black point symptoms were observed in the kernels inoculated with *A. alternata* at all growth stages but with significant differences in disease incidence (Table 2).

Black point incidence was significantly higher in the kernels at the stages of anthesis and complete flowering. However the inoculated kernels at the stage of flowering complete resulted in the highest level of black point.

PG production was observed in the extracts from the infected kernel at all growth stages tested (Table 2). However, PNL activity was not found in any of the extracts. PG activity was significantly higher during the colonization of the kernels by *A. alternata* at the stages of anthesis and flowering complete, especially in the latter stage. The activity decreased in the kernels of the following growth stages.

No PG or PNL activity was detected in the extracts from control kernel samples.

The dialysed extracts from culture filtrates and infected wheat kernels were subjected to thin layer polyacrylamide gel IEF and evaluated for PNL and PG isoenzymes. Two faint PNL bands with pI 9.3 and 8.9 were observed in the culture filtrates of the isolates A18, A46 and A52 (data not shown). Five PG isoenzyme bands focusing at pI 4.5, 5.2, 5.8, 7.5 and 8.4 were detected from the extracts of the isolates (Fig. 1).

All isolates produced the acidic pI 4.5, 5.2 and 5.8 bands. However, the pI 5.8, acidic PG band appeared very faint in the extract from the isolates A15, A18 and A46. In extracts from

Table 1

### Pectin lyase and polygalacturonase activity produced by the *Alternaria alternata* isolates on liquid medium

Isolates	Pectin lyase activity	Polygalacturonase activity
A1	1.43 b	1.11 bc
A15	0.86 bcd	1.53 bc
A18	2.78 a	1.83 b
A35	0.66 cd	1.71 b
A46	1.21 bc	0.88 c
A52	2.73 a	3.04 a
A60	0.57 d	1.53 bc

Note. Values presented are the means of three replicates. Means within a column followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05).

Table 2

**Polygalacturonase activity from kernels inoculated  
with *Alternaria alternata* isolate A52 and disease  
incidence on kernel samples**

Growth stage	Disease incidence, %*	Polygalacturonase activity**
Anthesis	48.00 a***	1.52 b
Flowering complete	55.21 a	1.89 a
Milk	22.53 b	0.17 c
Mid-dough	10.81 c	0.11 c
Ripe	10.22 c	0.09 c

\* Disease incidence is expressed as percent black pointed kernels after inoculation with *A. alternata*. Values presented are the means of twenty-five replicates.

\*\* Activity in reducing units per gram weight of extracted black pointed kernels after inoculation with *A. alternata*. Values presented are the means of three replicates.

\*\*\* Means within a column followed by the same letter are not significantly different ( $P = 0.05$ ).

the isolates A1, A15, A18, A35, A52 and A60, alkaline PG bands at pI 7.5 and 8.4 were found, pI 7.5 being less distinct in A1, A18 and A52. The same isoenzyme patterns were not detected in extracts of the isolate A46.

Five PG isoenzymes at pI 4.5, 5.2, 8.1, 8.4 and 8.6 were detected from the kernels inoculated with the isolate A52 at the stages of anthesis and complete flowering (Fig. 2).

Two PG bands at pI 5.8 and 6.5 were also observed in the latter stage. The kernels inoculated with the pathogen at the stages of milk and mid-dough exhibited one PG bands at pI 8.6. The pathogen produced a PG band at only pI 7.5 in the kernels at the ripe stage. In accordance with the results obtained from quantitative PNL assays, no PNL isoenzymes were found after IEF in wheat kernels at all growth stages tested.

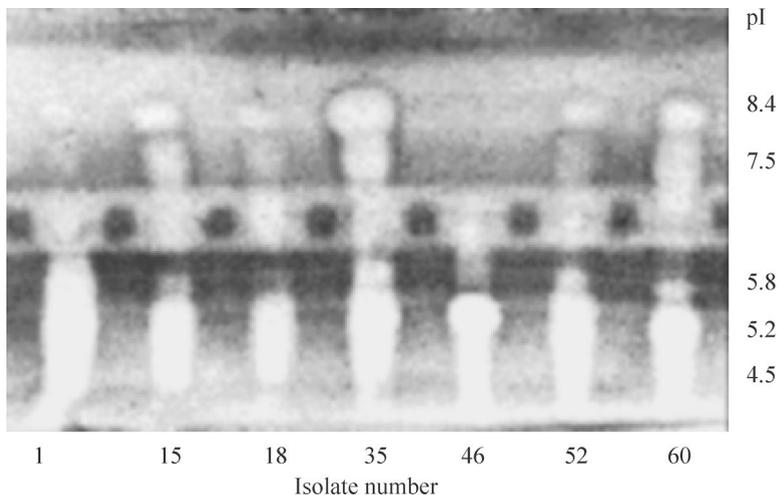


Fig. 1. Polygalacturonase isoenzyme pattern from culture filtrates of seven *Alternaria alternata* isolates grown in liquid medium supplemented with pectin as carbon source. Position and pI values of the polygalacturonase bands are indicated on the right axis.

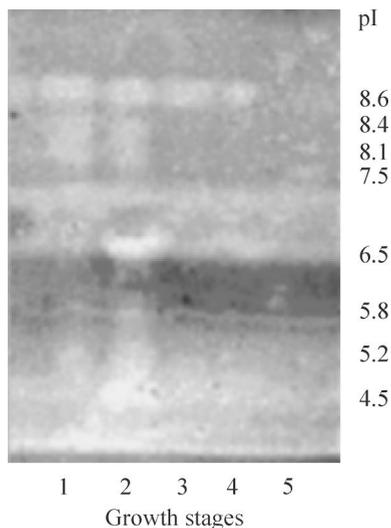


Fig. 2. Polygalacturonase isoenzyme pattern from inoculated wheat kernels with *Alternaria alternata* isolate A52 at five different growth stages, (1) anthesis, (2) complete flowering, (3) milk, (4) mid-dough, (5) ripe. Position and pI values of the polygalacturonase bands are indicated on the right axis.

PG and PNL production have previously been detected in crude extracts of *A. alternata* isolated from tomato, apple and lemon (Mehta et al., 1974, 1975; Tak et al., 1985; Mahmoud, Omar, 1994; Omar, Mahmoud, 1994; El Shaieb, Malibari, 1995). In the current report, it was shown that PG and PNL are expressed in the *A. alternata* isolates obtained from naturally infected common wheat kernels with black point disease. When isolate A52, with high PG and PNL production in liquid culture, was inoculated to wheat kernels at different growth stages, only PG was found. This result is not consistent with the finding of Mehta et al. (1974) and Omar and Mahmoud (1994) who recorded the role of both PG and PNL in tomato fruits infected with *A. alternata*. Pectolytic activity detected in inoculated wheat kernel appeared to be of fungal origin, since neither PG nor PNL activity was recorded in control tissues.

Three isolates produced very faint bands of PNL isoenzymes. The situation of PNL isoenzymes from the *A. alternata* isolates tested in present study might be due to the experimental conditions chosen for the growth of the isolates on culture medium. However, the absence of PNL and multiple PNL isoenzyme patterns from infected kernels indicates that this enzyme is not a cell wall-depolymerising factor during host tissue colonization.

*A. alternata* isolates in liquid culture had five PG isoenzymes, that were either acidic or alkaline. Acidic PG forms (pI 4.5, 5.2 and 5.8) were detected in extracts from all isolates. Isolates A1, A15, A18, A35, A52 and A60 expressed also basic PGs at pI 7.5 and 8.4. Isolate A52, selected for inoculation tests, produced all of them during fungal invasion of inoculated kernels at different growth stages.

The stage, at which plants were infected by *A. alternata* in the field, significantly influences the incidence of black point. Machacek and Greaney (1938) speculated that the infection occurred either at anthesis or during late stages of kernel development. Adlakha and Joshi (1974) reported high rates of infection at anthesis. Conner (1987, 1989) stated that black point incidence increased as the amount of irrigation and precipitation received during the milk, mealy or mid-dough stages increased. However, several reports noted that high black point incidences on ripe kernels could occur in susceptible common wheat cultivars artificially inoculated with *A. alternata* at anthesis (Conner, Davidson, 1985; Conner, Thomas, 1985; Conner et al., 1990) or mid-dough stage (Conner, Thomas, 1985). On the basis of these results, in vitro production of symptoms and pectolytic enzymes by inoculation of

detached kernels at different growth stages with spores of *A. alternata* may be warranted in order to clarify the role of the growth stages of the kernels for black point infection.

Pectolytic enzymes are supposed to be important virulence factors (Collmer, Keen, 1986; Alghisi, Favaron, 1995; Mendgen et al., 1996). In the present study, isolate A52 exhibited the highest PG activity and multiple PG isoenzyme patterns, and had the highest ability to infect wheat kernels at the stage of anthesis and complete flowering, especially at the latter stage. PGs at pI 4.5, 5.2, 5.8 and 8.4 from liquid culture were present in extracts from inoculated kernels at the stage of complete flowering. This result suggests that these PGs may be determinants for the colonization of wheat kernel. Three new PG isoenzymes at pI 6.5, 8.1 and 8.6 were also detected in the extracts from the kernels at this stage. However the pathogen did not produce PG isoenzymes at pI 5.8 and 6.5 in the kernels at anthesis stage.

My results demonstrated different degrees of susceptibility among the growth stages of wheat kernel, «complete flowering» being the most susceptible and «ripe» the most resistant. From the present study it also appears that some PG isoforms produced during invasion of different kernel tissues may be a pre-requisite for the infection of *A. alternata*.

#### AEFERENCES

- Adlakha K. L., Joshi L. M. Black Point of Wheat // Ind. Phytopathol. 1974. Vol. 27. P. 41—44.
- Alghisi P., Favaron F. Pectin-Degrading Enzymes and Plant-Parasite Interactions // Eur. J. Plant Pathol. 1995. Vol. 101. P. 365—375.
- Bateman D. F., Basham H. G. Degradation of Plant Cell Walls and Membranes by Microbial Enzymes. In Physiological Plant Pathology / Eds R. Heitefuss, P. H. Williams. Berlin: Springer-Verlag, 1976. P. 316—355.
- Bhowmink T. P. Alternaria Seed Infection of Wheat // Plant Dis. Rep. 1969. Vol. 53. P. 77—80.
- Collmer A., Keen N. T. The Role of Pectic Enzymes in Plant Pathogenesis // Ann. Rev. Phytopathol. 1986. Vol. 24. P. 383—409.
- Conner R. L. Influence of Irrigation Timing on Black Point Incidence in Soft White Spring Wheat // Can. J. Plant Pathol. 1987. Vol. 9. P. 301—306.
- Conner R. L. Influence of Irrigation and Precipitation on Incidence of Black Point in Soft White Spring Wheat // Can. J. Plant Pathol. 1989. Vol. 11. P. 388—392.
- Conner R. L., Davidson J. G. N. Resistance in Wheat to Black Point Caused by *Alternaria alternata* and *Cochliobolus sativus* // Can. J. Plant Sci. 1985. Vol. 68. P. 351—359.
- Conner R. L., Thomas J. B. Genetic Variation and Screening Techniques for Resistance to Black Point in Soft White Spring Wheat // Can. J. Plant Pathol. 1985. Vol. 7. P. 402—407.
- Conner R. L., Kozub G. C., Kuzyk A. D. Influence of Pollen on Black Point Incidence in Soft White Spring Wheat // Can. J. Plant Pathol. 1990. Vol. 12. P. 38—42.
- El Shaieb M. K. Z., Malibari A. A. Enzymatic Activities of Soft Rot Causal Organisms Affecting Vegetables and Fruits in Saudi-Arabia // Alexandria J. Agr. Res. 1995. Vol. 40. P. 293—304.
- Fernandez M. R., Clarke J. M., DePauw R. M., Irvine R. B., Knox R. E. Black Point and Red Smudge in Irrigated Durum Wheat in Southern Saskatchewan in 1990—1992 // Can. J. Plant Pathol. 1994. Vol. 16. P. 221—227.
- Greaney F. J., Wallace H. A. H. Varietal Susceptibility to Kernel Smudge in Wheat // Sci. Agr. 1943. Vol. 24. P. 126—134.
- Kilpatrick R. A. Factors Affecting Black Point of Wheat in Texas 1964—67 // Texas Agr. Exp. Sta. Miscellaneous Public. 1968. Vol. 884. P. 3—11.
- Large E. C. Growth Stages in Cereals. Illustration of the Feekes scale // Plant Pathol. 1954. Vol. 3. P. 128—129.
- Machacek J. E., Greaney F. J. The Black Point or Kernel Smudge Disease of Cereals // Can. J. Res. 1938. Vol. 16. P. 84—113.

- Mahmoud A. L. E., Omar S. A. Enzymatic Activity and Mycotoxin Producing Potential of Fungi Isolated from Rotted Lemons // *Cryptogamie Mycol.* 1994. Vol. 15. P. 117—124.
- Mehta P., Vyas K. M., Saksena S. B. Production of Pectolytic and Cellulolytic Enzymes by *Alternaria* spp., During Pathogenesis of Tomato Fruits // *Hindustan Antibiotics Bull.* 1974. Vol. 16. P. 210—214.
- Mehta P., Vyas K. M., Saksena S. B. Effect of Native Carbon Sources and pH on Pectolytic Enzymes of *Alternaria solani* and *A. tenuis* // *Proc. the Indian National Academy, India.* 1975. Vol. 40. P. 433—439.
- Mendgen K., Hahn M., Diesing H. Morphogenesis and Mechanisms of Penetration by Plant Pathogenic Fungi // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1996. Vol. 34. P. 367—386.
- Nelson N. A. Photometric Adaptation of the Somogyi Method for Determination of Glucose // *J. Biol. Chem.* 1944. Vol. 153. P. 375—380.
- Omar S. A., Mahmoud A. L. E. Post-Harvest Rots of Tomato in Relation to Lyases and Mycotoxin Production in vitro and in vivo // *Cryptogamie Mycol.* 1994. Vol. 15. P. 273—281.
- Ried J. L., Collmer A. Activity Stain for Rapid Characterization of Pectic Enzymes in Isoelectric Focusing and Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. Vol. 50. P. 615—622.
- Simmons E. G. *Alternaria* Themes and Variations (106—111) // *Mycotaxon* 1994. Vol. 50. P. 409—427.
- Statler G. D., Kiesling R. L., Busch R. H. Inheritance of Black Point Resistance in Durum Wheat // *Phytopathology.* 1975. Vol. 65. P. 627—629.
- Tak S. K., Verma O. P., Gupta A. K., Pathak V. N. Influence of pH and Incubation Period on Enzymes Produced by *Alternaria alternata* (Fries) Keissler Causing Fruit Rot of Apple // *Summa Phytopathologica.* 1985. Vol. 11. P. 70—73.
- Williamson P. M. Black Point of Wheat: in vitro Production of Symptoms, Enzymes Involved and Association with *Alternaria alternata* // *Aust. J. Agr. Res.* 1997. Vol. 48. P. 13—19.
- Zucker M., Hankin L. Regulation of Pectate Lyase Synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora* // *J. Bacteriol.* 1970. Vol. 104. P. 13—18.

Trakya University  
Turkey  
nurayozcer@hotmail.com

Received 8 IV 2009

## РЕЗЮМЕ

Проведена оценка активности пектинлиазы (PNL) и полигалактуроназы (PG) из культуральных фильтратов семи изолятов *Alternaria alternata*, полученных из семян мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*), которые поражены черным зародышем. В результате изоэлектрического фокусирования были определены их изоэнзимы. Изоляты различались по активности ферментов. У трех изолятов наблюдались два слабых бэнда PNL. Все изоляты образовывали PG изоэнзимные паттерны с бэндами, различающимися по интенсивности и значениям pI. Здоровые зерна были отобраны в стадиях раннего цветения, полного цветения, молочной, молочно-восковой, восковой и полной спелости и затем инокулированы изолятами с высокой активностью ферментов. Определена частота встречаемости зерен с черным зародышем, а также PNL и PG активность. Ни в одной из стадий не было обнаружено активности PNL и ее изоферментов. Однако изоляты *A. alternata* различались по вирулентности, качественной и количественной продукции PG в зернах в различных стадиях роста. Полученные результаты показали, что PG может определять вирулентность в течение колонизации зерен.

Ключевые слова: *Alternaria alternata*, *Triticum aestivum*, пектинлиаза, полигалактуроназа.

## SUMMARY

The culture filtrates of seven *Alternaria alternata* isolates obtained from the black pointed kernels of common wheat (*Triticum aestivum*) were assayed for pectin lyase (PNL) and polygalacturonase (PG) activity. After isoelectric focusing the patterns of their isoenzymes were defined. PNL and PG activity were detected in all isolates and the differences were also found in the activities of the isolates. Two faint PNL bands were observed in three isolates. All isolates produced PG isoenzyme patterns with bands differing in intensity and in pI values. Healthy wheat kernels were collected at the stages of anthesis, complete flowering, milk, mid-dough and ripe separately, and they were inoculated with an isolate being able to high enzyme activity. Infected kernels were sampled for the black point incidence and assayed for PNL and PG activity. No PNL activity and isoenzymes were found in inoculated kernels in any stage. However the isolates of *A. alternata* differed in virulence and in quantitative and qualitative PG production in the kernels at different growth stages. The results suggest that particular PGs from *A. alternata* may contribute to virulence during kernel colonization.

Key words: *Alternaria alternata*, *Triticum aestivum*, pectolytic enzymes.

УДК 582.24.5:581 42

© Е. Л. Постнова, Е. С. Сколотнева

**КОМПЛЕКСНЫЙ ВИД *GANODERMA LUCIDUM*:  
ВНУТРИВИДОВЫЕ ГРУППЫ ШТАММОВ  
С ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

POSTNOVA E. L., SKOLOTNEVA E. S. THE COMPLEX SPECIES  
*GANODERMA LUCIDUM*: INTRASPECIES GROUPS  
OF STRAINS WITH INDIVIDUAL CHARACTERISTICS

Комплексный вид *Ganoderma lucidum* (Curtis : Fr.) P. Karst. объединяет внутривидовые группы, филогенетическая концепция которых до сих пор не разработана (Moncalvo, 2000; Zmitrovich et al., 2006).

Значительные трудности при описании штаммов гриба по морфологии и культуральным свойствам вызваны их высокой степенью вариабельности в зависимости от условий культивирования (Seo, Kirk, 2000). Характеристика штаммов, ограниченная данными признаками, не может являться удовлетворительной и не позволяет сравнивать результаты разных исследований.

Генетическая эволюция многих видов грибов, приводящая к частичной или полной репродуктивной изоляции (интерстерильности), опережает морфологическую эволюцию, и зачастую морфологические виды представляют собой ассоциации видов-двойников. Вместо концепции высокополиморфных видов возникло представление о виде как о совокупности в разной степени изолированных, самостоятельно эволюционирующих «биологических» особей (Дьяков, 1993). Чтобы внести ясность и избежать недоразумений при разделении видов и внутривидовых группировок базидиальных грибов, был проведен анализ генетической (репродуктивной) изоляции между особями. Так, был выделен самостоятельный вид *G. tsugae* (Murrill) Overh. на основе половой несовместимости с полиморфным видом *G. lucidum* (Adaskaveg, Gilbertson, 1986).

В последнее время широко применяются в систематике грибов молекулярные методы. В частности, с их помощью была показана высокая гетерогенность комплексного вида *G. lucidum* (Moncalvo, 1995; Hseu et al., 1996; Buchanan, 2001). Молекулярно-филогенетический анализ американских, азиатских и европейских коллекций *G. lucidum* с использованием маркеров рДНК позволил выделить несколько внутривидовых групп: *G. lucidum sensu stricto*, *G. resinaceum complex sensu lato*, *G. curtisii complex*, *G. tropicum complex sensu lato* (Moncalvo, 2000). Отсутствие корреляции между филогенией по рДНК и морфологическим разделением комплекса *G. lucidum* стимулирует поиск новых молекулярных маркеров, способных стать исчерпывающим инструментом при описании штаммов.

Использованные в данной работе штаммы *G. lucidum* обладают противоопухолевой и антибактериальной активностью (Краснопольская и др., 2003; Автономова, 2006). Поэтому выяснение их внутривидового статуса не только обеспечит до-

ступность сравнения с другими известными штаммами, но и позволит описать новые источники биологически активных веществ.

С целью уточнения внутривидового статуса исследуемых штаммов *G. lucidum* был проведен анализ изоферментного и RAPD-полиморфизма наряду с оценкой вегетативной и репродуктивной изоляции, а также некоторых морфологических признаков, исследованных ранее (Завьялова и др., 2005).

## Материалы и методы

Дикариотические штаммы *Ganoderma* spp. были получены из коллекции культур кафедры микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова, Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ). Символы штаммов приведены в статье, опубликованной ранее (Постнова и др., 2009). Два штамма *G. applanatum* (Pers.) Pat. были использованы в качестве контроля.

Культуры хранили при 4 °С на пшеничном агаре, содержащем опилки лиственных пород. Пересев на свежеприготовленную среду осуществляли 1 раз в год.

Изучение характера роста штаммов в совместной культуре проводили в чашках Петри на сусло-агаре (4° по Баллингу) в термостате при температуре 25 °С путем сращивания дикариотических штаммов между собой во всех возможных комбинациях.

Вегетативную несовместимость определяли визуально в зоне контакта штаммов по характеру антагонистического ответа: нейтральная, срастание, отталкивание, нарастание (Гарибова, Мокеева, 1976; Дьяков, Долгова, 1995). В качестве контроля использовали культуры, полученные при внутриштаммовых скрещиваниях.

Для проведения анализа половой несовместимости использовали монокариотические культуры, полученные путем последовательных серийных разведений спорных суспензий. Споры трех штаммов (G. L 4, G. L 8 и G. L 9) брали с отпечатков, полученных по методике, предложенной Стеметсом (Stamets, 1993). При отсутствии на мицелии пряжек колонии отсеивали в пробирки и маркировали индексом «m» (monokaryon).

Монокариотические тестеры выделяли по методу Эггера (Egger, 1978). В результате для трех штаммов *G. lucidum* были получены 4 группы монокариотических тестерных культур, различающихся между собой аллелями локусов спаривания: A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>.

Определение типов спаривания и выявление общих факторов половой совместимости проводили путем мон-мон-скрещиваний (монокарион на монокарион) между моноспоровыми изолятами и полученными тестерами. Анализ факторов половой совместимости осуществляли по стандартным методикам (Egger, 1978).

Скрещивание между дикариотическими природными штаммами и монокариотическими тестерами, т. е. ди-мон-скрещивание (дикарион на монокарион), является более быстрым, но менее точным способом определения видовой принадлежности базидиомицетов, чем мон-мон-скрещивание. На чашку Петри с сусло-агаром попарно высаживали дикарион и тестер. Спустя 2 недели инкубации в термостате при температуре 25 °С у мицелия моноспорового тестера исследовали наличие пряжек с противоположной от дикариона стороны. Образование пряжек означало половую совместимость штамма с данным тестером и принадлежность к данной интерстерильной группе.

Для проведения RAPD-PCR анализа выделяли ДНК из мицелия, полученного при культивировании на жидком 1.5%-м сусле на 10-е сутки роста по методике Diatom TM DNA Prep 100 (Биоком), разработанной для выделения ДНК из свежего биологического материала.

Реакцию амплификации геномной ДНК проводили на программируемом термоджеле марки «Терцик» первой модели. Для проведения реакций амплификации использовали готовые наборы для амплификации «PCR-core», Биоком (ингибированная Taq-DNA-pol, dNTP — по 200 мкМ каждого, MgCl<sub>2</sub> — 2.5 мМ). Реакции проводили

в общем объеме реакционной смеси 25 мкл с добавлением следующих компонентов: 5 мкл смеси «PCR-coге», 5 мкл исследуемой ДНК, 5 мкл праймера (0.5 мкМ), 10 мкл ПЦР-растворителя. Чтобы предотвратить испарение, на смесь наносили минеральное масло.

Для RAPD-PCR анализа образцов были использованы пять олигонуклеотидных праймеров Синтол: R1 (5'-TGCCGAGCTG-3'), R2 (5'-AGTCAGCCAC-3'), R3 (5'-AATCGGGCTG-3'), R4 (5'-GAAACGGGTG-3'), R5 (5'-GCGATCCCCA-3') (Hseu et al., 1996). Реакцию амплификации для каждого праймера проводили в трех повторностях. Условия реакции амплификации были следующими: первый шаг (1 цикл): 98 °С — 2, 36° — 1, 72° — 2 мин; второй шаг (45 циклов): 95° — 1, 36° — 1, 72° — 2 мин; третий шаг (1 цикл): 72° — 5, 72° — 3, 72° — 2 мин (Hseu et al., 1996).

Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли в 2%-м агарозном геле при напряжении 80 В. Гели окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали полученные фрагменты на УФ-трансиллюминаторе. PCR-продукты регистрировали с помощью цифровой фотокамеры Canon Digital IXUS 800 IS. В качестве маркера длины ДНК фрагментов использовали GeneRuler TM 1kb DNA Ladder, Fermentas.

Сравнение изоферментных спектров мицелиальных культур одиннадцати штаммов *Ganoderma* spp. проводили методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле по методике Дэвиса с некоторыми модификациями (Davis, 1964; Завьялова и др., 2005) в камере фирмы Хеликон. Наличие активности у пяти ферментов (неспецифическая эстераза (КФ: 3.1.1.2), кислая фосфатаза (КФ: 3.1.3.2), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ: 1.1.1.49), полифенолоксидаза (КФ: 1.10.3.2), малатдегидрогеназа (КФ: 1.1.1.37)) определяли окрашиванием по методикам, приведенным в ряде публикаций (Салменкова, Малинина, 1976; Корочкин и др., 1977).

Для оценки достоверности топологии дендрограмм, полученных с помощью анализа изоферментных и RAPD-спектров, использовали алгоритм бутстрепа (bootstrap), выражая уровень достоверности в процентах. Степень различия образцов оценивали по результатам кластерного анализа UPGMA бинарных матриц, описывающих паттерны (изоферментные и молекулярные фенотипы). Для кластерного анализа с последующей оценкой достоверности использовали программу Treecon for Windows (version 3.1).

## Результаты и обсуждение

При попарном сращивании на агаризованной питательной среде всех дикариотических штаммов коллекции в зоне контакта формировался мицелиальный валик (барраж), который является фенотипическим проявлением реакции вегетативной несовместимости. Это позволило заключить, что исследуемые штаммы не являются клонами, а представляют собой генетически изолированные индивидуумы.

Все штаммы *G. lucidum* проявили наиболее сильную антагонистическую реакцию при сращивании со штаммами *G. applanatum*, взятыми для оценки некоторых результатов на уровне вида.

В зоне контакта генетически идентичных штаммов активно образовывались анастомозы, с последующим слиянием.

Для трех дикариотических природных изолятов (G. L 4, G. L 8 и G. L 9) были выделены монокариотические штаммы-тестеры — по четыре моноспоровых штамма, различающихся аллелями локусов половой совместимости.

В результате мон-мон-скрещивания (монокарион на монокарион) природные изоляты G. L 8 и G. L 9 (Кавказский регион и Крым соответственно) оказались совместимыми между собой и продемонстрировали половую несовместимость с штаммом G. L 4 из Франции (табл. 1). На основе полученных данных штаммы G. L 8 и G. L 9 были отнесены к интерстерильной группе I, а штамм G. L 4 — к интерстерильной группе II.

Мон-мон-скрещивания штаммов *G. lucidum*

Штамм	Монокариотические культуры	G. L 4				G. L 8				G. L 9			
		4м1	4м2	4м6	4м7	8м1	8м3	8м5	8м9	9м1	9м2	9м4	9м7
G. L 4	4м1	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4м2	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4м6	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	4м7	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G. L 8	8м1	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	8м3	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+
	8м5	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+
	8м9	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+
G. L 9	9м1	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	—
	9м2	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	+
	9м4	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
	9м7	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—

Примечание. G. L — *G. lucidum*; 4м1, 4м2 и т. д. — монокариотические культуры. То же для табл. 2.

Штаммы G. L 8 и G. L 9 имели сходные морфолого-культуральные признаки и при культивировании образовывались типичные по форме и размерам «лакированные» базидиомы. При культивировании штамма G. L 4 образовывались матовые консолевидные плодовые тела (рис. 1).

Уточнение совместимости остальных штаммов коллекции проводили с помощью ди-мон-скрещивания (дикарион на монокарион). По сравнению с мон-мон-скрещиванием данный метод значительно менее трудоемкий и требует меньше времени, что особенно актуально при культивировании природных штаммов *Ganoderma*.

Половую совместимость между дикариотическими изолятами и монокариотическими тестерами определяли по наличию пряжек на мицелии тестера (табл. 2).

Монокариотические тестеры штаммов G. L 8 и G. L 9 оказались совместимыми только со штаммом G. L 2 с Кавказа. У штамма G. L 927 из Австрии отмечена совместимость с тестерами штамма G. L 4 из Франции.

RAPD-анализ коллекции штаммов *Ganoderma* spp. был проведен с использованием набора праймеров, уже применявшихся для характеристики этого вида (Hseu et al.,



Рис. 1. Консолевидные матовые базидиомы штамма G. L 4 (а) и лакированные веерообразные базидиомы штамма G. L 8 (б) соответственно.

Ди-мон-скрещивания штаммов *G. lucidum*

Штамм	G. L 4				G. L 8				G. L 9			
	4м1	4м2	4м6	4м7	8м1	8м3	8м5	8м9	9м1	9м2	9м4	9м7
G. L 2	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
G. L 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G. L 4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G. L 5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G. L 6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G. L 7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G. L 8	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
G. L 9	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
G. L 927	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—

1996). Обнаружена высокая степень молекулярного полиморфизма данной выборки. Наибольшее количество переменных признаков (продуктов амплификации) было получено с праймерами R1, R3 и R5 (88 % — 8 переменных полос из 9 в электрофоретическом спектре, 85 % — 11 из 13, 87 % — 7 из 8 соответственно).

При сравнении молекулярных профилей (паттернов амплификации), полученных с помощью праймера R1, обнаружен фрагмент размером 620 пар нуклеотидов (п. н.), амплифицирующийся только у штаммов *G. lucidum*. В составе RAPD-спектров штаммов *G. applanatum* данный фрагмент не присутствует, что позволяет предположить его видоспецифичность (рис. 2, 3).

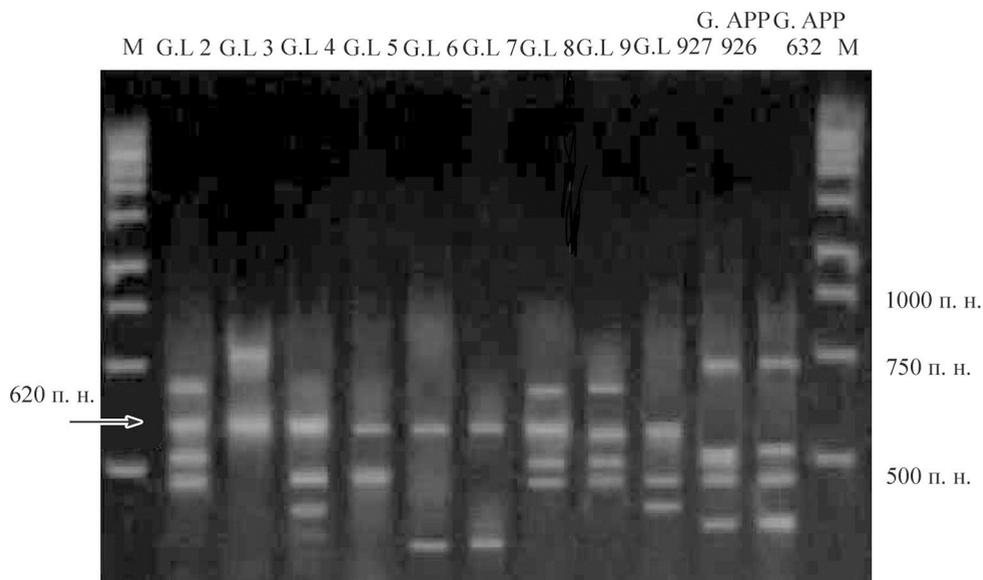


Рис. 2. Электрофореграмма RAPD-полиморфизма штаммов рода *Ganoderma*, полученная при использовании праймера R1.

Стрелкой обозначен фрагмент, видоспецифичный для штаммов *G. lucidum*; M — маркер GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas. Размеры маркерных фрагментов (п. н.) указаны справа от фотографии. G. L — *G. lucidum*, G. APP — *G. applanatum*.

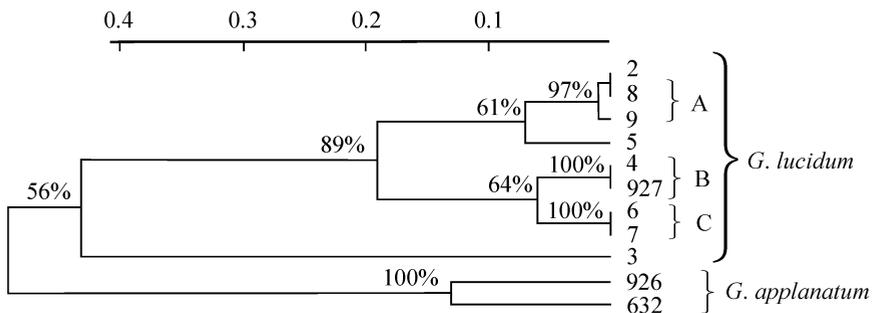


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма генетического сходства RAPD-профилей штаммов *Ganoderma* spp.

Данные RAPD-полиморфизма были обработаны с помощью метода кластерного анализа. Все дендрограммы обладали сходной топологией; наиболее устойчивой оказалась дендрограмма, полученная на основе анализа суммарной матрицы по всем паттернам амплификации; среднее значение индекса бутстрепа — 82 % (рис. 3).

Основной кластер дендрограммы включал все штаммы *G. lucidum*. Штаммы, принадлежащие к виду *G. applanatum*, образовывали отдельную внешнюю группу, монофилия которой поддерживалась высокими значениями индекса бутстрепа (до 100 %).

По данным кластерного анализа RAPD-маркеров, вид *G. lucidum* оказался высокогетерогенным, объединяя штаммы на протяжении широкого интервала условных единиц генетической дистанции (от 0.1 до 0.42).

Внутри вида *G. lucidum* на всех дендрограммах можно видеть три стабильные группы изолятов: А — штаммы G. L 2, G. L 8 с Кавказа и G. L 9 из Крыма, В — штаммы G. L 4 и G. L 927 из Франции и Австрии соответственно и С — штаммы G. L 6 и G. L 7 из Московской обл. (рис. 3).

Полученные группы штаммов характеризовались высокой степенью гомогенности RAPD-маркеров (индекс бутстрепа для группы А — до 97 %, для групп В и С — до 100 %). Представленные в данной выборке штаммы G. L 6 и G. L 7 из Московской обл. (С), не являясь клонами по результатам тестов на вегетативную несовместимость, обладали идентичными молекулярными RAPD-профилями. Высокое сходство отмечено у штаммов G. L 4 и G. L 927 (В), объединяемых в отдельную группу с вероятностью 100 %. Изоляты G. L 2, G. L 8 с Кавказа и G. L 9 из Крыма (А) объединились в 97 % случаев на уровне 0.01 усл. ед. генетической дистанции. Таким образом, RAPD-полиморфизм вида *G. lucidum* позволил выделить несколько групп.

Географически удаленный штамм G. L 3 из Кореи занял обособленное место на расстоянии 0.42 усл. ед. генетической дистанции, демонстрируя наибольшее отличие

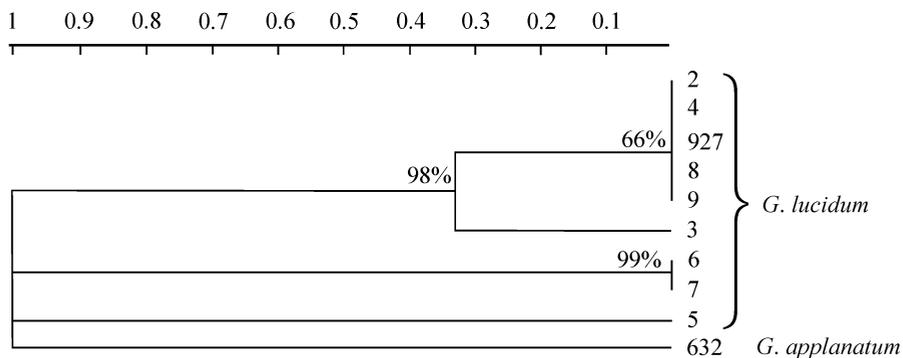


Рис. 4. Дендрограмма сходства штаммов *G. lucidum* и *G. applanatum* по спектру изоферментов МДГ.

Сравнение результатов анализа полиморфизма штаммов *G. lucidum*

Характеристика штаммов	Критерии анализа					
	степень гомологии RAPD-маркеров, %	степень гомологии изоферментных МДГ-спектров, %	результаты мон-мон-скрещивания	результаты ди-мон-скрещивания	наличие хламидоспор (Завьялова и др., 2005)	плодовые тела
G.L 2, G.L 8 (Кавказ), G.L 9 (Крым)	97	66	Интерстерильная группа I	Совместимы только внутри группы	Есть	Веерообразные матовые сидячие
G.L 4 (Франция), G. L 927 (Австрия)	100	66	Интерстерильная группа II	То же	»	Веерообразные «лакированные» с ножкой
G.L 6, G.L 7 (Московская обл.)	100	99	Не проводились	Несовместимость	Нет	Не получены

внутри кластера *G. lucidum* по всем RAPD-маркерам. Что касается штамма из США (G. L 5), то его степень объединения с группой из южных регионов была относительно невысокой, до 61 % индекса бутстрепа.

Из пяти использованных изоферментных систем наиболее репрезентативной оказалась малатдегидрогеназа (МДГ), что согласуется с данными для *G. lucidum*, приведенными в литературе (Abdullah, 1996). Метод белкового электрофореза с использованием МДГ подтвердил выявленные ранее различия штаммов разного географического происхождения.

На дендрограмме сравнения МДГ-спектров наибольшее отличие отмечено у штаммов *G. applanatum* и G. L 5 из США, которые объединялись с остальными географическими изолятами *G. lucidum* только на уровне 10 усл. ед. генетической дистанции (рис. 4).

Штаммы G. L 6 и G. L 7 из Московской обл. объединялись в одну группу, что соответствовало 99 % индекса бутстрепа. У остальных штаммов (G. L 2, G. L 4, G. L 8, G. L 9 и G. L 927) обнаружен 66 % гомологии МДГ-спектров. Штамм из Кореи вновь занял обособленную позицию на уровне 0.34 усл. ед. генетической дистанции.

Исследование изменчивости штаммов *G. lucidum* с помощью разных методов позволило сопоставить результаты анализа (табл. 3). Так, штаммы из южных регионов страны и ближнего зарубежья, объединенные по данным RAPD-анализа в группу А, имели сходные спектры малатдегидрогеназы и составили интерстерильную группу I. У них была отмечена способность образовывать в чистой культуре хламидоспоры (Завьялова и др., 2005), а также были получены веерообразные «лакированные» плодовые тела с ножкой.

У европейских штаммов, объединенных в RAPD-группу В, были обнаружены высокая степень гомогенности по изоферментам, принадлежность к интерстерильной группе II, наличие хламидоспор и матовые консолевидные плодовые тела. Что касается штаммов из Московской обл. (RAPD-группы С), то у них отмечена наибольшая степень сходства по МДГ-спектрам, отсутствуют хламидоспоры в чистой культуре, а также они не способны развивать нормальные базидиомы в искусственных условиях.

Штаммы из Кореи (G. L 3) и США (G. L 5) не только имели по всем RAPD-маркерам и изоферментам наибольшее отличие внутри кластера *G. lucidum*, но и при проведении фертильных скрещиваний оказались репродуктивно изолированными.

Таким образом, для каждой RAPD-группы была получена индивидуальная характеристика, отличающаяся высокой степенью гомогенности (однородности) по выбранным маркерам и географическому происхождению.

Путем сравнения молекулярных профилей штаммов коллекции выявлена возможность создания на базе RAPD-маркеров специфических зондов для идентификации вида *G. lucidum*.

Благодаря использованному набору RAPD-праймеров, уже применявшихся для анализа *G. lucidum*, появилась возможность в будущем сравнить молекулярные фенотипы штаммов нашей выборки и мировой коллекции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Автономова А. В. *Ganoderma lucidum* (Curt. : Fr.) P. Karst., трутовик лакированный: штаммовое разнообразие, антибиотические свойства и противоопухолевое действие: Дис. ... к. б. н. М., 2006. 120 с.

Дьяков Ю. Т. Критерии биологического вида у грибов (с обзором таксономической структуры ризоктониеподобных грибов) // Микология и фитопатология. 1993. Т. 27, вып. 6. С. 68—82.

Дьяков Ю. Т., Долгова А. В. Вегетативная несовместимость у фитопатогенных грибов. М.: МГУ, 1995. 161 с.

Гарибова Л. В., Мокеева В. Л. Использование метода межвидовых скрещиваний для установления филогенетических связей внутри рода (на примере рода *Agaricus*) // Микология и фитопатология. 1976. Т. 10, вып. 1. С. 53—54.

Завьялова Л. А., Чистякова Е. Л., Инсарова И. Д., Антимонова А. В. Штаммовое разнообразие трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, вып. 1. С. 27—34.

Краснопольская Л. М., Антимонова А. В., Белицкий И. В., Бухман В. М., Исакова Е. Б., Либензон А. В., Завьялова Л. А., Гарибова Л. В. Лекарственный базидиальный гриб трутовик лакированный *Ganoderma lucidum* (Curt. : Fr.) P. Karst.: погруженное культивирование и противоопухолевые свойства // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. М., 2003. Вып. 9. С. 46—55.

Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1997. 278 с.

Салменкова Е. А., Малинина Т. В. Применение электрофоретических методов в популяционно-генетических исследованиях продуктивности видов рыб // Типовые методики исследования продуктивности видов рыб в пределах их ареалов. Вильнюс: Моксалас, 1976. С. 82—92.

Постнова Е. Л., Завьялова Л. А., Инсарова И. Д. Формирование атипичных плодовых тел и примордиев *Ganoderma lucidum* in vitro и влияние на этот процесс абиотических факторов // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43, вып. 4. С. 299—306.

Abdullah F. Taxonomic and electrophoretic studies of selected species of *Ganoderma* Karst.: Dissertation. Thesis. Universiti Putra Malaysia, 1996.

Adaskaveg J. E., Gilbertson R. L. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex // Mycologia. 1986. Vol. 78(5). P. 694—705.

Buchanan P. K. A taxonomic overview of the genus *Ganoderma* with special reference to species of medicinal and nutraceutical importance // Proc. Int. Symposium *Ganoderma* SCI. Auckland, 2001. P. 27—29.

Davis Y. V. Disk electrophoresis. Method and application to human serum problems // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. Vol. 121. P. 404—427.

Egger G. Biology and breeding of *pleurotus* / Eds S. T. Chang, W. A. Hayes // In the Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. 1978. P. 497—519.

Hseu R. S., Wang H. H., Wang H. F., Moncalvo J. M. Differentiation and grouping of Isolates of the *Ganoderma lucidum* Complex by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Compa-

red with Grouping on the Basis of Internal Transcribed Spacer Sequences // Appl. Environm. Microbiol. 1996. P. 1354—1363.

Moncalvo J. M., Wang H. F., Hseu R. S. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences // Mycol. Res. 1995. Vol. 99. P. 1489—1499.

Moncalvo J. M. Systematics of *Ganoderma* // *Ganoderma Disease of Perennial Crops*. CABI Publishing, 2000. P. 23—52.

Seo G. S., Kirk P. M. Systematics of *Ganoderma* // *Ganoderma Disease of Perennial Crops*. CABI Publishing, 2000. P. 3—22.

Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 1993. P. 335—337.

Zmitrovich I. V., Wasser S. P., Didukh M. Ya., Spirin W. A., Malysheva V. F. Morphological Traits of *Ganoderma lucidum* Complex. Ruggell, 2006. P. 188—120.

Московский государственный  
университет им. М. В. Ломоносова  
3210j@mail.ru

Поступила 19 V 2009

### Р Е З Ю М Е

Проведен детальный сравнительный анализ внутривидового разнообразия штаммов *Ganoderma lucidum* различного географического происхождения на основе морфологических, генетических, биохимических и молекулярных признаков. Полученные в настоящем исследовании результаты важны для понимания внутривидовой структуры комплексного вида *G. lucidum*.

Ключевые слова: половая несовместимость, РАПД-анализ, изоферментный анализ, *G. lucidum*.

### S U M M A R Y

Mating incompatibility, RAPD-polymorphism, isozyme polymorphism and some morphological characteristics of geographical isolates of *Ganoderma lucidum* were analysed to determine their phylogeny. By different methods, there were three stable groups found within this complex species.

Key words: mating incompatibility, RAPD-polymorphism, isozyme polymorphism, *G. lucidum*.

УДК 582.284(571.16)

© А. Г. Ширяев, Н. Н. Агафонова

**РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ КЛАВАРИОИДНЫХ  
ГРИБОВ В ТАЕЖНЫХ ЛЕСАХ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ**SHIRYAEV A. G., AGAPHONOVA N. N. DIVERISTY AND DISTRIBUTION  
OF CLAVARIOID FUNGI IN BOREAL FORESTS OF TOMSK REGION

Среди природно-зональных комплексов клавариоидных грибов России таежный комплекс является наиболее изученным (Shiryayev, 2007; Ширяев, 2009). Основные исследования проведены в горно-таежных районах Урала, Алтая и Дальнего Востока. Обширные территории Западно-Сибирской равнины с ее крупнейшими массивами бореальных лесов выпали из внимания большинства исследователей. Среди регионов равнины Томская обл. является удобным полигоном для выявления общего биоразнообразия, а также особенностей распределения грибов в Западной Сибири, что связано с неоднородностью климатических, почвенных и лесорастительных условий, представляющих непрерывный широтно-зональный ряд от средней тайги до лесостепи (Евсеева, 2001). Этот регион также характеризуется продолжительной историей микологических исследований (Лавров, 1938).

Данные о клавариоидных грибах Западно-Сибирской равнины немногочисленны, причем для Томской обл. они особенно скудны. Упоминания об исследуемой группе грибных организмов имеются в работах Н. Н. Лаврова (1938, 1951), Э. Х. Пармасто (1965), А. М. Жукова (1973, 1980), а также в статьях Л. С. Миловидовой и соавторов (1973, 1980а, 1980б), Н. В. Перовой, А. И. Горбуновой (2001), А. П. Кошелевой, Н. Л. Кутафевой (2004), Н. Н. Агафоновой и соавторов (2007). Всего в этих работах для области упоминается 19 видов клавариоидных грибов.

Томская обл. расположена в юго-восточной части Западно-Сибирской равнины, ее площадь составляет 316 тыс. км<sup>2</sup>. Климат континентальный, средняя годовая температура воздуха составляет –3.5° на севере и –0.3 °С на юге области (Евсеева, 2001). Абсолютная минимальная температура равна –55 °С, максимальная — 39.6 °С при продолжительности безморозного периода 115 суток. Средняя многолетняя продолжительность вегетационного периода на севере (Александровский район) составляет 159, а на крайнем юге области — 183 суток. По количеству атмосферных осадков большая часть территории области относится к зоне достаточного увлажнения и варьирует от 358 мм на юго-западе до 571 мм на западе области. Наибольшее количество осадков приходится на теплый период года — июль и август. Широко распространена вечная мерзлота, встречающаяся по всей северной и центральной части области (Евсеева, 2001).

В ботанико-географическом отношении Томская обл. располагается в тайге, а ее крайний юг входит в лесо-степную зону (рис. 1). Территория области равнинная, поэтому между природными зонами резкой границы нет. Северная часть представлена средней тайгой, для которой характерны болотные, торфяно-подзолистые почвы с доминированием *Pinus sibirica*, *P. sylvestris* и *Picea obovata* и вторичные мелколиственные леса, представленные березами и осинкой (*Betula pendula*, *B. pubescens*, *Populus*

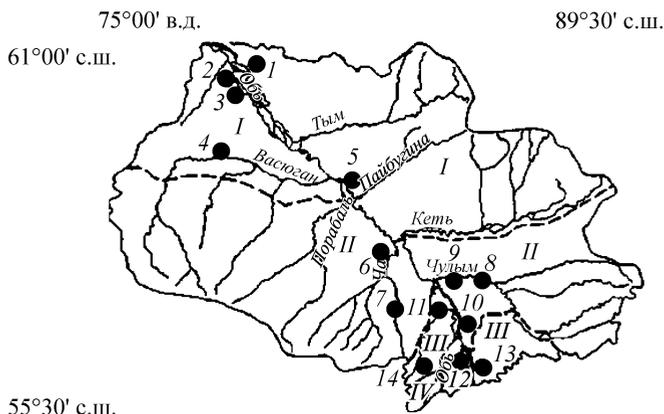


Рис. 1. Места сбора клавариоидных грибов и природное районирование Томской обл. (по: Евсева, 2001).

Римскими цифрами отмечены растительные природно-зональные комплексы Томской обл.: I — средняя тайга (СТ), II — южная тайга (ЮТ), III — подтайга (ПТ), IV — лесостепь (ЛС). Арабскими цифрами отмечены места работ. СТ: 1 — Александровский район, окр. пос. Стрежевой (60°44' с. ш. и 77°41' в. д.); 2 — Александровский район, окр. пос. Медведево (60°36' с. ш. и 77°20' в. д.); 3 — Александровский район, окр. пос. Александрово (60°23' с. ш. и 77°53' в. д.); 4 — Каргацковский район, окр. пос. Новый Тевриз (59°07' с. ш. и 77°31' в. д.); 5 — Парабельский район, 7 км восточнее пос. Нарым (58°56' с. ш. и 81°42' в. д.). ЮТ: 6 — Чаинский район, 3 км юго-западнее пос. Новогорное (58°13' с. ш. и 82°35' в. д.); 7 — Бачкарский район, окр. дер. Рождественка (57°51' с. ш. и 82°37' в. д.); 8 — Молчановский район, окр. пос. Батурино (57°42' с. ш. и 85°08' в. д.); 9 — Молчановский район, окр. дер. Черкесово (57°49' с. ш. и 84°11' в. д.); 10 — Томский район, 2,5 км восточнее пос. Самушь (56°45' с. ш. и 84°44' в. д.). ПТ: 11 — Кривошеинский район, окр. пос. Кривошеино (57°18' с. ш. и 83°54' в. д.); 12 — Томский район, окр. пос. Тимирязевский (56°27' с. ш. и 84°51' в. д.); 13 — окр. г. Томска (56°24' с. ш. и 84°59' в. д.); 14 — Шегарский район, окр. дер. Сафроновка (56°20' с. ш. и 83°54' в. д.).

tremula). Велика роль болот. В южнотаежных лесах, распространенных практически по всему югу области, повсеместно встречается *Abies sibirica*, образуя смешанные леса с кедром, елью и сосной. Под пологом растут *Sorbus sibirica*, *Padus racemosa*, *Viburnum opulus*, *Lonicera* sp., *Rosa* spp., *Spirea* spp. По древним ложбинам стока, на песчаных почвах, доминируют сосновые боры. На крайнем юге области встречаются подтаежные леса (подзона характерна только для Западной Сибири и не встречается западнее Урала и в Восточной Сибири) на серых лесных дерново-глеевых почвах. Основу растительности составляют мелколиственные (березовые и осиновые) леса, в смеси с интразональной растительностью, представленной *Salix* spp., *Populus tremula*, *P. nigra*, *Padus racemosa*, *Alnus incana*. Болота крайне редки. Небольшой участок на крайнем юге области занят лесостепью на серых лесных почвах и выщелоченных черноземах. Здесь березовые и осиновые колки чередуются с остепненными лугами (Евсева, 2001).

Полевые работы проводили в течение пяти лет А. Г. Ширяев (2004—2005 г.) и Н. Н. Агафонова (2004—2008 гг.) во всех природно-зональных комплексах Томской обл. Полученные материалы обобщены в табл. 1. В схожие сроки было просмотрено максимально полное количество потенциальных типов субстратов (местообитаний) для каждого природно-зонального комплекса. Под образцом (единицей учета)  $i$ -го вида принята группа (колония, скопление) плодовых тел  $i$ -го вида, отстоящая от другой аналогичной группы не менее чем на 15 м. Обнаружение базидиом  $i$ -го вида в группе рассматривается как одна единица учета независимо от количества базидиом и размера группы. Для оценки обилия  $i$ -го вида рассчитан показатель встречаемости, как отношение числа единиц учета  $i$ -го вида к общему числу единиц учета (Новожилов, 2005). Также за единицу учета принято упоминание  $i$ -го вида в литературе, если указывается относительно точное местонахождение — район или окрестности населенного пункта и субстрат.

Видовое разнообразие вычислено с помощью индекса Шеннона:  $H' = -\sum P_i \log P_i$ , где  $P_i$  относительное обилие  $i$ -го вида, равное  $n_i/N$ ,  $n_i$  — число регистраций (единиц учета) каждого вида,  $N$  — общее число единиц учета всех видов в анализируемом





Таблица 1 (продолжение)

Вид	Субстрат	Средняя тайга						Южная тайга						Подтайга		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
<i>Ramaria pallida</i> (Schaeff.) Ricken	my	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	
<i>R. patulosa</i> (S. Lundell) Schild	my	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>R. rubella</i> (Schaeff.) R. H. Petersen	w	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>R. spinulosa</i> (Pers.) Quéf.	my	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
* <i>R. stricta</i> (Pers.) Quéf.	w	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	
<i>R. subdecurrens</i> (Coker) Corner [= ? <i>R. altaica</i> Schwarzman et Filimonova]	s	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>R. suecica</i> (Fr.) Donk	l	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	—	—	—	—	
<i>R. testaceoflava</i> (Bres.) Corner	my	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	
<i>Ramariopsis biformis</i> (G. F. Atk.) R. H. Petersen	l	—	—	1	—	1	—	2	—	2	—	—	—	—	2	
<i>R. crocea</i> (Pers.) Corner	s, l	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
<i>R. kunzei</i> (Fr.) Corner	l	1	1	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	
* <i>R. pulchella</i> (Boud.) Corner	s, l	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>R. subtilis</i> (Pers.) R. H. Petersen [= <i>Clavaria dichotoma</i> Gobey, <i>C. macropus</i> Pers., <i>C. subtilis</i> Pers.]	l	—	—	1	1	—	—	—	2	—	—	—	—	—	1	
<i>R. tenuiramosa</i> Corner	l	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>R. vestitipes</i> (Peck) Corner	l	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
* <i>Sparassis crispa</i> (Wulfen) Fr.	wp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Typhula abietina</i> (Fuekel) Corner	l	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>T. capitata</i> (Pat.) Berthier	l	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>T. caricina</i> P. Karst.	l	1	—	2	—	2	—	3	1	2	—	—	—	—	1	
<i>T. chamaemori</i> L. Holm et K. Holm	l	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>T. crassipes</i> Fuekel [= <i>T. corallina</i> Quéf.]	l	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>T. culmigena</i> (Mont. et Fr.) Berthier	l	—	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	
<i>T. erythropus</i> (Pers.) Fr.	l	2	1	3	2	3	3	4	4	5	3	4	7	3	3	



наборе данных (Magurran, 2004). Для вычисления доминирования использован индекс Симпсона:  $D = \sum P_i^2$ . Для сравнения видового состава различных сообществ использован коэффициент Сёренсена—Чекановского:  $C_s = 2C/(A+B)$ , где  $A$  — общее количество видов в первом сообществе,  $B$  — общее количество видов во втором сообществе,  $C$  — количество общих видов для сравниваемых сообществ. Специфичность выявленных природно-зональных комплексов оценивали с помощью коэффициента специфичности:  $C_c = n_1/N / n_2/N$ , где  $n_1$  — количество специфических видов для комплекса,  $n_2$  — количество видов в комплексе,  $N$  — общее количество видов во всех комплексах. Дендрограмма построена по программе Statistica 6.0, где использован метод кластеризации Варда, а в качестве меры различий выступает коэффициент Пирсона. Оценка обилия видов (см. ранее) проводилась согласно следующим критериям (Новожил, 2005):  $R$  — редкий (< 0.5 % от всех находок),  $O$  — случайный (> 0.5—1.5 %),  $C$  — обычный (> 1.5—3 %),  $A$  — обильный (> 3 % от всех находок).

В результате проведенных исследований собрано 570 образцов (единиц учета), включающих 268 полевых образцов, 243 записи в полевом дневнике и 59 литературных заметок. В общем для средней тайги имеются 200 ед. учета, для южной тайги — 236 и для подтайги — 133 (табл. 2). Собранный материал хранится в Микологическом гербарии Института экологии растений и животных УрО РАН в Екатеринбурге (SVER) и коллекционном фонде «Mycota» при музейном комплексе Томского государственного университета.

Кортициоидные грибы родов *Ramaricium*, *Kavinia*, *Clavulicium* и кантареллоидный — *Gomphus*, а также гетеробазидиальные — *Tremelloendropsis* (*Aphelaria*), *Calocera* и *Eocronartium* не рассматриваются в данной работе. В аннотированном списке (табл. 1) таксономия, номенклатура и сокращения фамилий авторов таксонов клавариоидных грибов приведены в соответствии с базой данных Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>).

Изучение 570 образцов клавариоидных грибов, относящихся к 91 виду базидиальных грибов, показало, что из 16 выявленных родов крупнейшими являются *Typhula* (24 вида) и *Ramaria* (19 видов); остальные включают не более девяти видов — *Clavaria* (9), *Ramariopsis* (7), *Clavulinopsis* (6), *Clavariadelphus* (4), *Clavulina* (4), *Lentaria* (4), *Mucronella* (3), *Multiclavula* (3), *Macrotyphula* (2), *Pterula* (2); по одному виду из четырех родов — *Artomyces*, *Ceratellopsis*, *Clavicornona* и *Sparassis*. Коэффициент видовой насыщенности рода составляет 5.7. Высокая доля представителей тифуловых грибов свидетельствует о доминировании бореальных черт, однако большое количество рамариевых грибов говорит о сильных позициях неморальной группы. Вероятно, можно констатировать, что выявленный комплекс клавариоидных грибов характерен для региона, занимающего промежуточную позицию между таежной и неморально-степной биотой, с преобладанием «северных» черт в средней тайге и «южных» в подтайге, при этом в южной тайге происходит закономерное смешивание характеристик. Таксономический спектр выявленного комплекса сходен с таковыми других бореальных регионов Евразии и может рассматриваться как полночленный на уровне родов (Ширяев, 2006).

Семь видов (*Clavariadelphus truncatus*, *Clavicornona taxophila*, *Clavulinopsis fusiformis*, *Ramaria fennica*, *R. flavicingula*, *Ramariopsis crocea*, *R. vestitipes*) впервые упоминаются для таежного комплекса Западно-Сибирской равнины, где на данный момент насчитывается 120 видов клавариоидных грибов. Большая часть выявленных видов являются широко распространенными — космополитными, голарктическими или евроазиатскими, что дает высокий уровень схожести ( $C_s = 0.78 \pm 0.12$ ) с таежными комплексами других регионов Евразии (рис. 2). Восемь видов являются наиболее обильными (> 3 % от 570), что составляет 41 % от всех собранных образцов, но при этом они включают лишь 8.8 % видов выявленного комплекса; одновременно редкими (< 0.5 % от 570) являются около половины всех видов (45 %), которые включают лишь 10.5 % всех отмеченных образцов.

У большинства видов, встречающихся во всех трех природных зонах со схожим или малозначимо высоким обилием в той или другой зоне, не обнаружено замет-

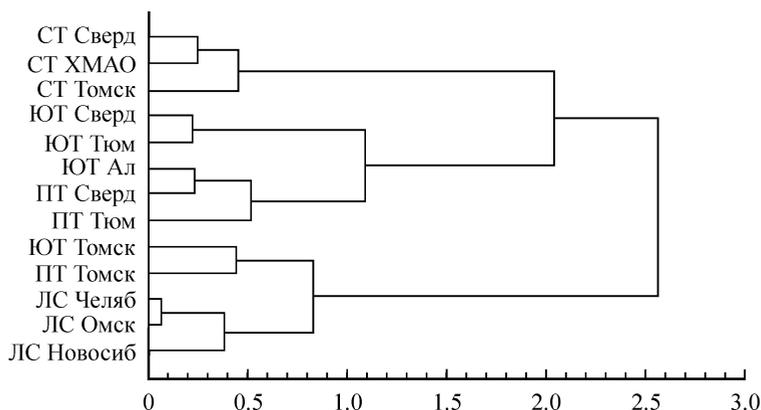


Рис. 2. Сходство видового состава комплексов клавариоидных грибов Урало-Сибирского региона.

СТ Сверд — средняя тайга Свердловской обл.; СТ ХМАО — средняя тайга Ханты-Мансийского АО; СТ Томск — средняя тайга Томской обл.; ЮГ Сверд — южная тайга Свердловской обл.; ЮГ Тюм — южная тайга Тюменской обл.; ЮГ Ал — южная тайга северо-западного склона Алтая; ПТ Сверд — подтайга Свердловской обл.; ПТ Тюм — подтайга Тюменской обл.; ЮГ Томск — южная тайга Томской обл.; ПТ Томск — подтайга Томской обл.; ЛС Челяб — лесостепь Челябинской обл.; ЛС Омск — лесостепь Омской обл.; ЛС Новосиб — лесостепь Новосибирской обл.

ной зональной динамики. В Западной Сибири, как и в других таежных регионах (Ширяев, 2004), к группе эврибионтов относятся *Clavaria argillacea*, *Clavulina cinerea*, *Clavulinopsis helvola*, *Lentaria byssiseda*, *Macrotyphula juncea*, *Typhula erythropus*, *T. setipes*, но некоторые проявляют выраженную приуроченность к южным (*Artomyces ruxidatus*, *Clavaria fragilis*, *Clavulina rugosa*, *Ramariopsis tenuiramosa*, *Typhula micans*) или к северным регионам (*Clavariadelphus sachalinensis*, *Pterula gracilis*, *Ramaria abietina*, *Typhula capitata*, *T. caricina*, *T. incarnata*, *T. lutescens*, *T. sclerotioides*). Все специфические виды для южной тайги представляют «южный» элемент среди выявленного бореального комплекса — *Clavaria rosea*, *Clavariadelphus truncatus*, *Clavulina amethystina*, *Clavulinopsis umbrinella*, *Ramaria flavicingula*, *R. testaceoflava* и др. Для подтайги такой вид лишь один — *Ramariopsis crocea*, но в сумме группа видов, отмеченных только в этих двух зонах (19) или с ценооптимумом в южной части региона, составляет треть всех видов. В противоположность видам, преобладающим в южной части, виды северного распространения, для которых южной границей является южная тайга или с ценооптимумом в средней тайге (*Clavaria sphagnicola*, *Clavicornona taxophila*, *Multiclavula corynoides*, *M. vernalis*), составляют 17 % от всего видового состава.

В природно-зональном ряду наиболее богатой является южная тайга, где отмечены 87 видов, что составляет 95.6 % от общего видового состава, а в районах с более пессимальными условиями этот показатель закономерно снижается, составляя в средней тайге 84.6 %, а в подтайге — 73.6 % (табл. 2). Для южной тайги характерен наивысший коэффициент специфичности, более чем в 3 раза превосходящий таковой для средней тайги и в 6 раз подтаежный. Для южнотаежного комплекса характерны максимальные показатели коэффициента видовой насыщенности рода и семейства, а также индекса разнообразия ( $H = 3.9$ ) и минимальный индекс доминирования ( $D = 0.019$ ). Это подтверждает тезис об оптимальных экологических условиях данной природной зоны (Евсеева, 2001), следствием чего является закономерное усложнение структуры комплекса клавариоидных грибов (Ширяев, 2006).

Более 87 % клавариоидных грибов региона встречается в лесных ценозах, среди которых 70 видов являются лесными. Несмотря на то что комплексы клавариоидных грибов хвойных и лиственных лесов имеют схожее видовое богатство (70 и 66 видов соответственно), они сильно различаются по составу образующих их таксонов. Эти различия выражаются в большом количестве специфических видов для каждого класса формаций — 20 видов для хвойных ( $C_c = 0.29$ ;  $V/P = 7.9$ ) и 14 видов для листвен-

Таблица 2

**Видовое богатство и разнообразие комплекса клавариоидных грибов  
в таежных подзонах Томской обл.**

Категория оценки	Средняя тайга	Южная тайга	Подтайга	Томская обл.
Число образцов	200	236	133	570
Число видов	73	87	67	91
Число родов	15	16	15	16
V/P	4.9	5.5	4.5	5.7
C <sub>c</sub>	0.04	0.13	0.02	—
H'	3.71	3.92	3.62	—
D	0.027	0.019	0.036	—

Примечание. V/P — коэффициент видовой насыщенности рода; V/C — коэффициент видовой насыщенности семейства; C<sub>c</sub> — коэффициент специфичности; H' — индекс разнообразия Шеннона; D — индекс доминирования Симпсона.

ных лесов (C<sub>c</sub> = 0.21; V/P = 6.1). Наибольшее количество видов клавариоидных грибов отмечено в доминирующих типах лесных формаций региона — сосновых и березово-осиновых лесах.

Практически все выявленные клавариоидные грибы ведут сапротрофный образ жизни (табл. 3), образуя плодовые тела на отмершей древесине, подстилке, травах или на почве. При этом наименьшая их доля отмечена в южной тайге (69 %), а в средней тайге и подтайге этот показатель возрастает до 84 и 88 % соответственно. Виды из рода *Ramaria* (*R. botrytis*, *R. fennica*, *R. flavicingula*, *R. flavobrunnescens*, *R. formosa*, *R. pallida* и др.), способные образовывать эктомикоризы, достигают максимальной представленности в южной тайге (14 %). Однако, по последним данным, микоризу образуют все клавариоидные грибы, встречающиеся на почве, отмершей древесине и подстилке, за исключением тифуловых грибов (*U. Kõljalg*, личное сообщение).

Таблица 3

**Трофическая структура комплекса клавариоидных грибов  
в таежных подзонах Томской обл.**

Трофическая группа	Средняя тайга	Южная тайга	Подтайга
Сапротрофные	65/62	73/60	61/59
На древесине	11/7	12/8	11/6
хвойных	9/4	10/4	5/2
лиственных	7/1	8/1	9/2
На подстилке	48/37	55/37	51/38
хвойных	13/6	19/9	18/7
лиственных	17/7	25/8	21/8
травянистых	23/10	25/14	25/16
Среди мхов	11/1	15/0	4/0
Гумусовые	16/4	28/8	23/7
Паразитические	5/2	5/2	3/1
Микоризные	6/6	12/12	5/5

Примечание. В числителе — общее количество видов в трофической группе, в знаменателе — количество видов, специфичных для этой трофической группы.

Лишь два выявленных вида (*Sparassis crispa* и *Typhula ishikariensis*) являются облигатными паразитическими биотрофами.

Наибольшее количество сапротрофных клавариоидных грибов таежных сообществ, как и тундровых (Ширяев, 2008б, 2009), отмечено на подстилке, при этом преобладают виды, образующие плодовые тела на отмерших травах. Очевидно, что их доля (в целом/субстратспецифичных) схожа для всего лесного комплекса равнины ( $0.3 \pm 0.03/0.15 \pm 0.03$ ), и лишь в подтаежных лесах, как и в безлесных районах, эти показатели начинают расти ( $0.37/0.24$ ). Наивысшая доля специфичных видов на отмерших травах (табл. 3) характерна для средней тайги (2.3), а в южной тайге и подтайге этот показатель уменьшается (1.78 и 1.56 соответственно) благодаря сокращению доступного субстрата, а также экологическим особенностям видов, образующих эту группу. Группа видов на отмерших травах, как и близкая на отмерших листьях, — это преимущественно представители рода *Typhula* (на 90 и 80 % соответственно), характеризующегося наивысшими показателями богатства и разнообразия в таежной зоне (Ширяев, 2008а, 2008б). В Западной Сибири ценооптимум для группы подстилочных сапротрофов находится в южной тайге, однако внутри этой группы наблюдается очевидное разделение центров активности для группы видов, образующих плодовые тела на отмерших травах (ценооптимум в средней тайге), а для видов, образующих плодовые тела на отмерших листьях, — в южной тайге.

Второе место среди сапротрофов занимают напочвенные, гумусовые виды, подчиняющиеся зональным закономерностям гумусообразования, выражающегося в увеличении доли напочвенных видов (табл. 3) и уровня специфичности, от северных районов (средняя тайга) к южной тайге и подтайге ( $0.25/0.29/0.31$  соответственно). Это согласуется с правилом, что с севера на юг содержание гумуса в почве увеличивается, а вместе с этим и количество видов напочвенных видов нарастает, достигая максимума в лесостепях, степях, степных поясах гор (Бурова, 1986), что хорошо подтверждается данными по распространению клавариоидных (Hansen, Knudsen, 1997; Ширяев, 2006) и агарикоидных грибов других регионов.

Способность к развитию на отмершей древесине проявляют 13 видов, из которых 9 являются облигатными ксилотрофами (69.2 %), а наибольшее их количество отмечено на основных лесообразующих породах — пихте, сосне, ели, березе и осине (табл. 3). Большая часть ксилотрофных клавариоидных грибов в Томской обл. отмечается в южнотаежных лесах (табл. 3). Половина из них являются политрофами, развиваясь как на хвойных, так и на лиственных породах. Максимальной степенью политрофности характеризуются *Artomyces pyxidatus* и *Ramaria stricta*, развивающиеся на древесине всех отмеченных пород примерно со схожим уровнем обилия. Однако у большинства политрофных видов обнаружена субстратная специализация, что проявляется в приуроченности к определенному кругу древесных растений в избирательности по отношению к отдельным видам пород хозяев в различных условиях (Мурашкинский, 1939; Мухин, 1993; Ширяев, 2006).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Агафонова Н. Н., Крючкова О. Е., Кутафьева Н. П., Гашкова С. И. Макромицеты Томской области (Западная Сибирь). 2. Афиллофоровые грибы // Новости систематики низших растений. 2007. Т. 41. С. 92—101.

Бурова Л. Г. Экология грибов макромицетов. М.: Наука, 1986. 222 с.

Евсеева Н. С. География Томской области: природные условия и ресурсы. Томск: Томск. ун-т, 2001. 222 с.

Жуков А. М. Новые для флоры Сибири грибы порядка Aphyllophorales // Водоросли, грибы и лишайники лесостепной и лесной зон Сибири. Новосибирск, 1973. С. 109—116.

Жуков А. М. Дереворазрушающие грибы Приобья // Водоросли, грибы и лишайники лесостепной и лесной зон Сибири. М.: Наука, 1980. С. 144—183.

Кошелева А. П., Кутафьева Н. П. Биота макромицетов междуречья Оби и Томи (Томская область, Западная Сибирь) // *Новости систематики низших растений*. 2004. Т. 37. С. 106—115.

Лавров Н. Н. Флора грибов и слизевиков Сибири и смежных областей Европы, Азии и Америки // *Тр. БИН*. 1938. Т. 3, вып. 2. С. 1—167.

Лавров Н. Н. Флора грибов и слизевиков Сибири и смежных областей Европы, Азии и Америки / *Тр. Томск. ун-та. Сер. биол.* 1951. Вып. 4. 311 с.

Миловидова Л. С., Плац М. Ш., Толстова Н. Ю. Видовой состав базидиальных грибов томского Приобья // *Водоросли, грибы и лишайники юга Сибири*. М.: Наука, 1980а. С. 183—213.

Миловидова Л. С., Плац М. Ш., Толстова Н. Ю. Гомобазидиальные грибы томского Приобья // *Вопр. биологии*. Томск: Томск. ун-т, 1980б. С. 65—68.

Миловидова Л. С., Толстова Н. Ю., Шейкина С. И. О развитии грибов-макромицетов в некоторых районах Томской области летом 1972 года // *Сб. работ молодых ученых «Вопросы ботаники, зоологии и почвоведения»*. Вып. 1. Томск: Томск. ун-т, 1973. С. 43—47.

Мурашкинский К. Е. Горно-таежные трутовики // *Тр. Омского с.-х. ин-та*. 1939. Т. 17. С. 75—108.

Мухин В. А. Биота ксилотрофных базидиомицетов Западно-Сибирской равнины. Екатеринбург: Наука, 1993. 231 с.

Новожилов Ю. К. Миксомицеты (класс Mucoromycetes) России: таксономический состав, экология и география: Дис. ... д-ра биол. наук: СПб., 2005. 48 с.

Пармасто Э. Х. Определитель рогатиковых грибов СССР (сем. Clavariaceae). М.; Л.: Наука, 1965. 167 с.

Перова Н. В., Горбунова И. А. Макромицеты юга Западной Сибири. Новосибирск: СО РАН, 2001. 158 с.

Ширяев А. Г. Клавариоидные грибы Урала. I. Бореально-лесная зона // *Микология и фитопатология*. 2004. Т. 38, вып. 4. С. 59—72 (на англ.).

Ширяев А. Г. Клавариоидные грибы Урала: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2006. 24 с.

Ширяев А. Г. Биоразнообразие и распространение грибов семейства Turphulaceae Juelich в России (предварительный результат) // *Матер. конф. «Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества»* (Москва, МГУ, 3—6 февраля 2008 г.). М.: Восток—Запад, 2008а. С. 136—142.

Ширяев А. Г. Изменения микобиоты Урало-Сибирского региона в условиях глобального потепления и антропогенного воздействия // *Вест. экологии, лесоведения и ландшафтоведения*. 2008б. № 9. С. 67—83.

Ширяев А. Г. Клавариоидные грибы бореальных лесов Урало-Сибирского региона: разнообразие, распространение, экологическая роль // *Матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Макромицеты бореальной зоны»*. Красноярск, 2009 (в печати).

Hansen L., Knudsen H. (eds). *Nordic Macromycetes. Vol. 3: Heterobasidioid, aphylophoroid and gastromycetoid Basidiomycetes*. Copenhagen: Nordsvamp, 1997. 444 p.

Magurran A. E. *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing, 2004. 218 p.

Shiryayev A. G. A preliminary check-list of the clavarioid fungi in Russia // *Abstracts of the XV Congress of European Mycologists*. St. Petersburg: TREEART LLC, 2007. P. 147—148.

Институт экологии растений и животных УрО РАН

Поступила 3 III 2009

Екатеринбург

26081978@mail.ru

Томский государственный университет

НИИ биологии и биофизики

Томск

## Р Е З Ю М Е

В таежных лесах Томской обл. собран 91 вид клавариоидных грибов, включая семь новых видов для всей таежной зоны Западно-Сибирской равнины, где на данный момент известно 120 видов. Таксономическая структура выявленного комплекса схожа с таковыми для других таежных регионов Евразии. Восемь наиболее обильных видов включают 41 % всех собранных образцов, в противоположность чему более половины списка видов составляют редкие виды, включающие лишь 10.5 % собранных образцов. Более половины выявленных видов являются эврибионтами (выявлены во всех природных зонах равнины). Доминируют широко распространенные виды. Южнотаежный комплекс является наиболее богатым, в силу того что здесь отмечено 95.6 % видов, известных для региона. Выявлены наивысший уровень специфичности (в 3 раза выше, чем в средней тайге, и в 6 раз, чем в подтайге), максимальный коэффициент видовой насыщенности рода (5.5) и индекс разнообразия Шеннона (3.9), при минимальном уровне индекса доминирования Симпсона (0.019). Данные характеристики в очередной раз подтверждают тезис о том, что микобиота получает максимальное развитие в регионах с оптимальными гидротермическими условиями, которые в условиях Западно-Сибирской равнины характерны для южнотаежных лесов.

Ключевые слова: таежная зона, клавариоидные грибы, Западная Сибирь.

## S U M M A R Y

Ninety-one species of clavarioid fungi (Basidiomycota) found in the boreal forests of the Tomsk district (SE of West-Siberian plain) including seven new species for the whole plain, where 120 species are known nowadays. Taxonomical spectrum of the revealed complex is similar to those of other boreal regions of Eurasia and can be considered as adequate on genera level. Eight species are abundant and they counting 41 % of whole collected specimens, as opposed about half of check-list are rare includes 10.5 % of whole specimens. More than half of species are euribionts (present in whole nature zones of the West Siberia, wide spread). As a rule, wide spread species are most abundant. Most rich zone is southern taiga, with 95.6 % species from total list, with highest level of specialization (in three times higher than middle taiga and six times than subtaiga), maximum species/genus ratio (5.5) and Shannon diversity index (3.9) as well as lowest Simpson dominance index (0.019). As a whole these characteristics fit well with thesis, that the most complicated structure of the clavarioid fungi's complex is in the nature zone with optimal hydrothermal conditions.

Key words: boreal zone, clavarioid fungi, taiga, West Siberia.

УДК 582.28 : 577.354.3

© А. О. Шпаков

**ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВАЯ ХЕМОКОММУНИКАЦИЯ У ГРИБОВ**

SHPAKOV A. O. INTRA- AND INTERSPECIES CHEMOCOMMUNICATION IN FUNGI

В настоящее время достаточно хорошо исследована внутри- и межвидовая коммуникация между бактериями (quorum sensing), в основе которой лежит обмен химическими сигналами, называемыми аутоиндукторами (АИ) (Waters, Bassler, 2005; Reading, Sperandio, 2006; Шпаков, Перцева, 2008; Шпаков, 2009а, 2009б). С помощью этих сигналов бактериальные клетки «измеряют» плотность собственной популяции и популяций других сосуществующих с ними живых организмов, формируют адекватный ответ на меняющиеся условия окружающей среды и наличие в ней доступных питательных веществ. У бактерий имеются хемочувствительные сигнальные системы, которые предназначены для опознавания АИ и родственных им сигнальных молекул и опосредуют их регуляторное влияние на активность внутриклеточных эффекторных систем, определяющих протекание жизненно важных процессов в бактериальной клетке. Активируемые АИ сигнальные каскады предназначены также для контроля синтеза и секреции самих АИ, что обеспечивает процесс их ауторегуляции.

Первые данные о сигнальных молекулах у грибов, функционально сходных с АИ бактерий, были получены еще четверть века назад и обобщены в ряде фундаментальных обзоров (Sprague, Thorne, 1992; Gooday, Adams, 1993). Исследования последних лет, выполненные с применением методов молекулярной биологии и биохимии, значительно расширили круг сигнальных молекул и опознающих их хемосигнальных систем у грибов. Результаты этих исследований свидетельствуют о широкой распространенности внутри- и межвидовой хемокommunikации (quorum sensing) в царстве грибов, что указывает на ее универсальность в живом мире (Lengeler et al., 2000; Феодилова, 2006; Hogan, 2006; Kothe, 2008). Несмотря на то что «классических» АИ у грибов пока выявлено немного, к этому типу сигнальных молекул могут быть причислены феромоны и некоторые факторы вирулентности, как это имеет место у бактерий. Сигнальные молекулы, вовлеченные в Quorum Sensing, объединяют в семейство QS-молекул. Предметом настоящего обзора является систематизация и анализ данных по QS-молекулам грибов, а также по сигнальным системам, которые являются мишенями их регуляторного действия.

Производные терпенов. Несколько лет назад у гриба *Candida albicans* были идентифицированы сесквитерпен *E,E*-фарнезол (3,7,11-триметил-2,6,10-додекатриен-1-ол) и родственная ему фарнезилловая кислота (рис. 1), которые вырабатываются в ответ на повышение плотности культуры клеток гриба (Hornby et al., 2001; Oh et al., 2001; Ramage et al., 2002). Они блокируют образование гиф и предотвращают образование поверхностных пленок, что приводит к снижению патогенности *C. albicans*. Фарнезилловая кислота выполняет функции QS-молекулы только у одного штамма гриба (ATCC 10231), в то время как фарнезол является активным регулятором гифообразования у большинства других штаммов *C. albicans*, а также у родственных ему

грибов *C. tropicalis* и *C. dubliniensis* (Hornby et al., 2001; Jabra-Rizk et al., 2006; Martins et al., 2007). У гриба *C. parapsilosis* фарнезол подавляет образование поверхностных пленок, но не влияет на процесс гифообразования (Rossignol et al., 2007). В основе механизма разрушения поверхностных пленок, образуемых *C. albicans* и родственными им грибами, лежит достижение в них вследствие увеличения плотности клеток таких концентраций фарнезола, в которых он способен регулировать экспрессию генов, ответственных за синтез белков, определяющих структурную организацию поверхностных пленок (Ramage et al., 2002; Cao et al., 2005). Среди таких генов, а их насчитывается более 270, можно выделить ген *CSH1*, который кодирует локализованный в плазматической мембране CSH-гидрофобин.

У гриба *Aspergillus niger* фарнезол блокирует образование конидий, причем его регуляторные эффекты реализуются через посредство ингибирования активности аденилатциклазы (АЦ) и снижения внутриклеточного уровня цАМФ (Lorek et al., 2008). Как полагают, этот сесквитерпен связывается с поверхностным рецептором, который сопряжен с гетеротримерным G-белком, ингибирующим АЦ. Фарнезол вызывает апоптоз у *A. nidulans*, несмотря на то что этот гриб не способен его секретировать (Semighini et al., 2006).

Влияние фарнезола происходит в концентрациях 1—50 мкМ, в то время как фарнезиловая кислота эффективна в более высоких концентрациях (Kim et al., 2002). В то же время концентрации фарнезола в нормально развивающихся культурах клеток грибов рода *Candida* на два-три порядка ниже эффективных его концентраций. И это вполне оправданно, поскольку только при значительном увеличении плотности культуры, когда локальные концентрации фарнезола достигают значений его эффективных концентраций, начинает выявляться ингибирующее влияние фарнезола на развитие гриба. Фарнезол является высоко гидрофобным веществом, поэтому он способен прочно связываться с липидным матриксом мембраны, что ведет к накоплению его на поверхности клеток гриба и ускоряет процесс достижения эффективных концентраций этого сесквитерпена. Синтезированы модифицированные гетероциклами и оксимами аналоги фарнезола, которые имитируют его действие на рост мицелия гриба *C. albicans* (Shchepin et al., 2008). Разработка таких аналогов позволяет создавать на основе QS-молекул синтетические препараты, которые могут контролировать внутри- и межвидовую хемокоммуникацию и вирулентность грибов.

Производные аминокислот. Одними из важнейших QS-молекул у дрожжевых грибов *C. albicans* и *Saccharomyces cerevisiae* являются ароматические спирты — тирозол, 2-фенилэтанол и триптофол, метаболиты аминокислот (рис. 1) (Dickinson et al., 2003; Chen et al., 2004; Alem et al., 2006; Chen, Fink, 2006). Они контролируют половое размножение гриба, регулируют соотношение свободно плавающих клеток гриба и его мицелиальной формы, влияют на рост гиф и образование поверхностных пленок, участвуют в межклеточной коммуникации.

Тирозол, 2-(4-гидроксифенил)этанол, является производным тирозина и впервые, как QS-молекула, был идентифицирован у гриба *C. albicans* (Chen et al., 2004). В отношении *S. cerevisiae* этот ароматический спирт мало активен. Поскольку тирозол яв-

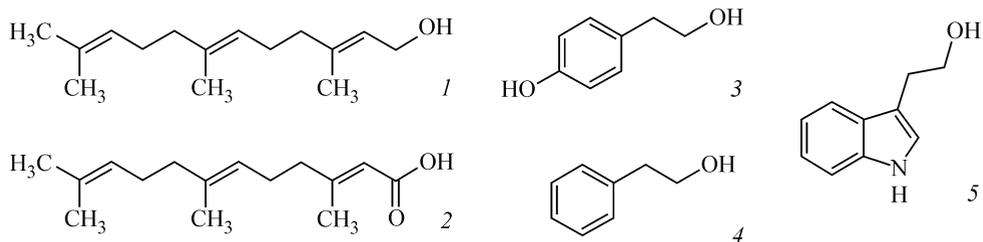


Рис. 1. QS-молекулы грибов.

1 — фарнезол, 2 — фарнезиловая кислота, 3 — тирозол, 5 — 2-фенилэтанол; 4 — триптофол.

ляется антагонистом фарнезола, то их согласованное влияние лежит в основе как позитивного (тирозол), так и негативного (фарнезол и его метаболиты) контроля морфогенеза *S. albicans*. Взаимодействие между сигнальными каскадами, регулируемые фарнезолом и тирозолом, определяет рост гиф на ранних стадиях формирования грибом поверхностных пленок и обеспечивает оптимальную их пространственную организацию, что необходимо для нормальной жизнедеятельности клеток гриба, образующих такие пленки. Тирозол выполняет функцию QS-молекулы как у гриба в мицелиальной форме, так и у свободно плавающих клеток гриба, хотя в первом случае тирозол выделяется в 1.5 раза больших количествах. Предполагается, что тирозол и продуцируемый *S. albicans* простагландин, который близок по структуре простагландинам позвоночных животных и, подобно тирозолу, стимулирует образование гиф, ответственные за те патологические изменения, которые наблюдаются в пораженных кандидамикозом тканях (Novert et al., 2001). Следует отметить, что простагландин, вырабатываемый *S. albicans*, не относится к QS-молекулам, поскольку не вовлечен в межвидовую хемокоммуникацию у грибов (Alem, Douglas, 2005).

Два других ароматических спирта — 2-фенилэтанол и триптофол, производные фенилаланина и триптофана, являются важнейшими QS-молекулами у дрожжевых грибов *S. cerevisiae* и *C. albicans* (Dickinson et al., 2003). Однако, если у *S. cerevisiae* они ускоряют морфогенез, то у *C. albicans*, наоборот, ингибируют его, являясь, таким образом, высоко специфичными QS-молекулами для каждого вида.

У *S. cerevisiae* 2-фенилэтанол и триптофол стимулируют переход дрожжевых клеток в мицелиальную форму, что характеризуется ростом псевдогиф у диплоидных клеток и ускорением роста гаплоидных клеток. В основе этого процесса лежит активация ароматическими спиртами цАМФ-зависимого сигнального каскада, ответственного за стимуляцию экспрессии гена *FLO11*, который кодирует локализованный на поверхности плазматической мембраны белок гидрофобин, обеспечивающий тесную ассоциацию дрожжевых клеток при образовании ими мицелиальной формы (Pan, Neitman, 2002). Предполагается, что ароматические амины связываются с рецепторами серпантинного типа, которые через посредство гетеротримерных G-белков сопряжены с АЦ, катализирующей образование цАМФ.

Продукция 2-фенилэтанола и триптофола дрожжевыми клетками вызывается повышением их плотности, а также недостатком источников азота во внешней среде. Механизм, посредством которого повышение плотности *S. cerevisiae* влияет на синтез и секрецию ароматических аминов, включает стимуляцию фактора транскрипции Ago80p и вызываемое им усиление экспрессии сопряженных с синтезом ароматических спиртов генов *ARO9* и *ARO10* (Lee et al., 2002). Продуцируемые грибом 2-фенилэтанол и триптофол стимулируют экспрессию генов *ARO9* и *ARO10* и усиливают, таким образом, собственный синтез, действуя как классические АИ. В условиях дефицита азота в значительной степени повышается экспрессия генов, кодирующих трансаминазы, декарбоксилазы и дегидрогеназы — ферменты, ответственные за синтез ароматических спиртов. Как полагают специалисты (Chen, Fink, 2006), и в этом случае молекулярные механизмы регуляции продукции 2-фенилэтанола и триптофола включают белки, кодируемые генами *ARO9* и *ARO10*. Добавление солей аммония в высоких концентрациях вызывает повышение содержания азота в инкубационной среде, что блокирует экспрессию генов, кодирующих трансаминазы, декарбоксилазы и дегидрогеназы, и, как следствие, ведет к снижению продукции ароматических спиртов и предотвращает формирование клетками *S. cerevisiae* мицелиальных структур.

Пептидные феромоны. Одним из многочисленных и наиболее хорошо изученных классов QS-молекул у грибов являются пептидные феромоны. Они, как и пептидные АИ бактерий, связываются с поверхностными рецепторами и запускают сигнальные каскады, через которые осуществляется регуляция экспрессии генов, ответственных за вирулентность грибов, образование ими гиф и поверхностных пленок (Bakkeren et al., 2008; Kothe, 2008). Феромоны выполняют функцию QS-молекул как у гетероталлических грибов, у которых половой процесс заключается в объединении ядер двух гаплоидных клеток различного происхождения, так и у гомоталлических

грибов, у которых диплоидная клетка образуется вследствие объединения двух ядер с гаплоидным набором хромосом, возникших из одной и той же клетки (Poggeler, 2000; Paoletti et al., 2005, 2007).

Первые данные об обнаружении пептидных феромонов и их рецепторов у грибов относятся еще к середине 1980-х годов, когда у дрожжей *S. cerevisiae* были выявлены  $\alpha$ - и *a*-феромоны и опознающие их рецепторные белки Ste2 и Ste3 (Burkholder, Hartwell, 1985; Hagen et al., 1986). Гаплоидные клетки *S. cerevisiae* по чувствительности к феромонам подразделяют на два типа — *MATa* и *MAT $\alpha$* , первые из которых, *MATa*-клетки, чувствительны к  $\alpha$ -фактору и секретируют во внешнюю среду *a*-фактор, в то время как вторые, *MAT $\alpha$* -клетки, чувствительны к *a*-фактору и секретируют  $\alpha$ -фактор.

$\alpha$ -Фактор *S. cerevisiae* представляет собой положительно заряженный пептид WHWLQLKPGQPMY, который специфически связывается с рецептором Ste2 *MATa*-клеток (рис. 2). Он синтезируется в форме двух белков-предшественников — MF $\alpha$ 1 и MF $\alpha$ 2, имеющих длину 165 и 120 аминокислотных остатков (АКО), С-концевая часть которых включает соответственно четыре и две копии  $\alpha$ -фактора (рис. 3). Молекулы  $\alpha$ -фактора высвобождаются из белка-предшественника вследствие сайт-специфичного протеолиза, мишенями которого являются сегменты Lys-Arg (KR-сайты), расположенные после участков первичной структуры, соответствующих  $\alpha$ -фактору. *a*-Фактор представлен пептидом YIKGVFWDPAC, который модифицирован гидрофобной фарнезильной группой и опознается рецептором Ste3 *MAT $\alpha$* -клеток. Предшественники MF $\alpha$ 1 и MF $\alpha$ 2 этого фактора в отличие от MF $\alpha$  содержат только одну последовательность, соответствующую *a*-фактору, а также N-концевую лидерную последовательность и С-концевой гидрофобный сегмент V(I/V)(A/M), которые удаляются в ходе процессинга белка-предшественника (рис. 4). С-концевой сегмент необходим для модификации фарнезильной группой SH-группы остатка цистеина (Cys<sup>33</sup> в MF $\alpha$ 1 и Cys<sup>35</sup> в MF $\alpha$ 2), который в молекуле феромона является С-концевым, и для метилирования COOH-группы этого остатка. Модификация *a*-фактора гидрофобной фарнезильной группой необходима как для его эффективного связывания с рецептором, так и для его секреции, которая осуществляется через посредство транспортного белка Ste6 (Chen et al., 1997).

Секретируемые во внешнюю среду  $\alpha$ - и *a*-феромоны специфически связываются с рецепторами Ste2 и Ste3 соответственно, которые функционально сопряжены с гетеротримерным G-белком Gpa1(G $\alpha$ )-Ste4(G $\beta$ )-Ste14(G $\gamma$ ) и вызывают его диссоциацию на Gpa1-субъединицу и Ste4-Ste14-димер (Pryciak, Huntress, 1998; Hoffman, 2005). Образовавшийся Ste4-Ste14-димер в дальнейшем активирует каскад митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК), включающий три протеинкиназы — Ste11 (киназу киназы МАПК), Ste7 (киназу МАПК) и Fus3 (МАПК), которые удерживаются вместе, находясь в комплексе с белком Ste5, обеспечивающим их транслокацию к плазматиче-

А		Б	
1, 2	<b>WHWLQLKPGQPMYKR</b>	9, 10	<b>WC-RIHQSCWKAKR</b>
3	<b>WHWLSVRPGQPIYKR</b>	11	<b>WCLRFVQGSCW--KR</b>
4	<b>WHWLELDNGQPIYKR</b>	12	<b>WCL-FHGEGCWKVKR</b>
5	<b>WHWLRLSYGQPIYKR</b>	13	<b>WC-RFRGQVCGKAKR</b>
6	<b>WHWLSFSKGEPMYKR</b>	14, 15	<b>WC-HLPGQGC AKAKR</b>
7	<b>WSWITLRLPGQPIFKR</b>	16	<b>WC-WLPGQGC LKVKR</b>
8	<b>WHWVRLRKQGLFRR</b>	17	<b>WCGHI-GQGCYKAKR</b>

Рис. 2. Феромоны  $\alpha$ -типа грибов аскомицетного аффинитета, гомологичные  $\alpha$ -фактору *Saccharomyces cerevisiae* (тип А) и mF $\alpha$ -1 *Neurospora crassa* (тип Б).

1 — *Saccharomyces cerevisiae* (P01149); 2 — *S. paradoxus* (CAD56315); 3 — *Kluyveromyces delphensis* (AAO25615); 4 — *Vanderwaltozyma polyspora* (EDO19420); 5 — *Saccharomyces naganishii* (BAC00922); 6 — *Lachancea kluyveri* (P06648); 7 — *Kluyveromyces lactis* (CAG99901); 8 — *Candida glabrata* (AAO25610); 9 — mF $\alpha$ -1 *Neurospora crassa* (Q03301); 10 — mfm *Podospora anserina* (AY829471); 11 — ppg1 *Sordaria macrospora* (CAB96172); 12 — *Cryphonectria parasitica* (AAC39328); 13 — *Aspergillus nidulans* (EAA62884); 14 — *Neosartorya fischeri* (EAW15854); 15 — *Aspergillus fumigatus* (EAL88490); 16 — *Aspergillus terreus* (EAU31669); 17 — *Penicillium chrysogenum* (CAP17329).

A

1 1 MRFPS-IFTAVLFAAS--SALAAPV-NTTTE--DETAQIPAEAVIGYLDL  
2 1 MRFCS-VFTAFSFAAS--SALAAPV-NTTTE--DEMARI PAEAIIGYLDL  
3 1 MKFSK-ILIAAASILT--AVQAAPV--ENV---DDSAQVPEEAIIGYIDF  
4 1 MKFST-VLSTVALAAT--AVSAAPI\*NETVESVESGLNVPAEAVLGYLDF  
5 1 MKFIS-TFLTIFILAAV--S-----VTASSDEDIAQVPAEAIIGYLDL  
6 1 MKFST-ILAASTALIS--VVMAAPV-STETDIDDLPIVPEEALIGFLDL  
7 1 MRFLRFISTVALLITG--LATAQPV-GEEL--GETVEVPSEAFIGYLDL  
8 20 PI-EQPEQ-DLNSTTIPAEAIISYLDL  
9 4 FTT-LSASLIFIHSLGSTRAPV-TGDESSVE----IPEESLIGFLDL  
10 3 LRSTAILSAVV-FT-S--VALSAP----TSGQNID-IDFPDESIAGALPL

1 45 EGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIA-AKEE-GVSLDKRE----AE  
2 45 EGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIANIA-AEEE-GVTLNKRE----AD  
3 45 EGASDVAILPFSNSTDSGLMFVNTTIYNEA-TTAVEGESVEKRE----AK  
4 51 GEKDDVAVLPFSNGTSGLLFVNTTIYDAA\*SDDESASLAKRDA----E  
5 40 GGDHDIAPLPFSNATASGLLFINTTIAEAA-EKEQ-NTTLAKRE--AVAD  
6 47 TGD-EVSLLPVNGTHTGLFLNNTTIAE-A-AFAD-KDDLKRE--ADAS  
7 45 GATNDVAILPISNKTNNNGLLFVNTTLYNQ-ATKGEKLS-DFTK--RDAN  
8 45 EGDKDIADVFPFSNATDSGLLFVNTTILAQA-NKEA-GTPLQKREADADAN  
9 46 AGD-DISVFPVSNETHYGLMLVNSTIVNLA-RSES-A-----  
10 44 S--YDLVPIIGSYQQQNVILIVNSTIAAAS-EAAA-SEGKSKRD----AN

1 89 AWHWLQLKPGQPMYKR-----EAEAEA--WHWLQLKPGQPMYKR----  
2 89 AWHWLQLKPGQPMYKR-EA--EAEADAEA--WHWLQLKPGQPMYKREAEA  
3 88 -WHWLSVRPGQPIYKR-----EAEAEA-KWHWLSVRPGQPIYKR----  
4 98 AWHWRLRYGEPYIKR\*EGVEKREANADADAWHWRLRYGEPYIKREDSE  
5 86 AWHWLNLRPGQPMYKR-----EANADA--WHWLQLKPGQPMY  
6 91 PWSWITLRPGQPIFKR-EA--NADANAESPWSWITLRPGQPIFKREANA  
7 91 P-----DAEAEA--WHWVKIRKQGLFRR----  
8 93 AWHWRLSYGQPIYKR---DANADADADADAWHWRLSYGQPIYKRDANA  
9 80 -----NFKG-----KR-----EADAEP--WHWLSFSKGEPMYKR----  
10 86 AWHWTSYGVFEPG-KR-----DANANAAPWHWTSYGVFEPG-KR----

1 126 -EADAEA----WHWLQLKPGQPMYKR-EADAE----AWHWLQLKPGQPMY  
2 134 -EADAEA----WHWLQLKPGQPMYKR\*EADAE----AWHWLQLKPGQPMY  
3 125 -EAEAEA----KWHWLSVRPGQPIYKR-EAEADAEA-RWHWLSVRPGQPIY  
4 150 SVEKREAAAEPPWHWRLRYGEPYIKR\*NADAD----AWHWRLRYGEPYI  
6 138 -DANADAS--PWSWITLRPGQPIFKR\*EAEADAKPSAWSWITLRPGQPIF  
7 113 -SADASPEAEAWHWVRLRKQGLFRR-SADASPEAEAWHWVRLRKQGLF  
8 140 -DADADAD--AWHWRLSYGQPIY  
9 107 -EADAEP----WHWLSFSKGEPMY  
10 123 -DANADAA--PWHWTSYGVFEPG-KR

Рис. 3. Предшественники феромонов  $\alpha$ -типа грибов аскомицетного аффинитета.

A. 1 —  $\alpha 1$  *S. cerevisiae* (P01149); 2 —  $\alpha$  *S. paradoxus* (CAD56326.1); 3 —  $\alpha 2$  *K. delphensis* (AAO25615.1); 4 —  $\alpha$  *V. polyspora* (EDO17727.1); 5 —  $\alpha 2$  *S. cerevisiae* (P32435); 6 —  $\alpha$  *K. lactis* (CAG99901.1); 7 —  $\alpha$  *C. glabrata* (XP\_446929.1); 8 —  $\alpha$  *S. naganishii* (BAC00922.1); 9 —  $\alpha$  *L. kluyveri* (P06648); 10 —  $\alpha$  *Pichia stipitis* (XP\_001385478.1). Звездочками обозначены участки 155—158 (EAEA)  $\alpha$  *S. paradoxus*, 23—26 (SRAS), 81—83 (FAD), 114—116 (EDS) и 176—186 (EDSESVKREA)  $\alpha$  *V. polyspora*, 161—164 (EANP)  $\alpha$  *K. lactis*.

Б. 1 — ceg-4 *N. crassa* (Q01301); 2 — ppg1 *S. macrospora* (CAB96172); 3 — mfm *P. anserina* (AAV90428); 4 —  $\alpha 1$  *C. parasitica* (AAC39328); 5 —  $\alpha$  *Magnaporthe grisea* (EDJ97154). Звездочками обозначены участки 166—189 (WCRHGGQSCWKKR DAAPAEAPAE) ceg-4 *N. crassa*, 277—288 (SEEAGSSAATSL)  $\alpha 1$  *C. parasitica*, 68—79 (NEARD-VATTSP) и 208—215 (VEDSGADL)  $\alpha$  *M. grisea*.

Жирным прямым шрифтом выделены участки, соответствующие  $\alpha$ -феромонам; жирным курсивом выделены сайты протелитического расщепления.

Б

```

1 1 MKFTLPLVIFAAVASATPVAQFNAAEAEQ-WCRIHGQSCWKVKRVADAF
2 1 MKFTLPLVIFAAVASATPVAQPIAAEAEQ-WCRIHGQSCWKVKRVAEAFS
3 1 MKFSTPLALLVAADVAAVVQE----DKR-WCNTEGQACNTVARAAEAFT
4 137 AAPAPEADPEAWCLFHGEGCWKVKRAVYAF
5 42 Q-WCPRRGQPCWKVKRAVDAFA

1 50 NAIQG-MGGLPP-RD-ESGHQ---PAQVAKRQVDELAGI IALTQEDVNAV
2 50 TAIQG-MGGLPT-SD-ESGHL---PAQVAKRQVDELAGI IALTQEDVNAV
3 46 NAIKA-SGVVA--RDDSAA-----AQVAARQVDQLALAI SASQADPITF
4 168 NAIRG-AAGIPESRSAEISNMRGGAAYNAKRAVQDIATMMAGRTSEPF
5 63 SAMHS*SDGHLTARD--LSHLPGGAAYNAKRSVNALAALLASTQYDPEAF

1 94 YDSLQLQEKFAPSTE-----EKKT--EKVAKREAEA--
2 94 YDSLNLQDKFAPSTE-----EKKD--EKVAKRDAEA--
3 87 YTALGLGDQF---TL-----EKP-----
4 217 LKQLFILEHFHFGPDANITAFGPPPTDADAAPIST--DDDSTTKRDADAE-
5 122 YNDLYLDRYFDPTS-----VDAKAVDEKPDAAKTEKRDEEGGH

1 124 -EA-QWCRIHGQSCWK---KREAE---AQWC-RIHGQS-CW--KRDALPE
2 124 -EA-QWCRIHGQSCWKK-AKREAE---AQWC-RIHGQS-CW-KRDAAPE
3 103 -----HAE-----KREAA---PWCLRFVQGS-CW--KRNAAPE
4 264 ----PWCLFHGEGCWKR*ATRDASPAAAAF-C-PFEGSSTCYASKRDF--
5 162 LEARQWCPRRGQPCWKR----DVEHDK-RHCN-SAGEA-CDVAKR-AVGA

1 162 AEPQ*ANPQWCRIHGQSCWKAKRAAEAVMTAIQSAEAE SALLLRDTTFSP
2 165 AAPE-ANPQWCRIHGQSCWKAKRAAEAVMTAIQSAEAE SALLLRDTTFSP
3 131 DV----KR--CTAEDGACTKAKRAAEAVINAI---EAS-----
4 318 AA----DKRA-CNQPGACYVARCAAEAI VTEIAS-----WAP
5 204 LLSA*AKRQWCPRRGQPCW--KR--DNVFEV-----ALGRRDVSDAE

1 235 VDRVGKR--DPQVCMNRLHPKVCWKRDASPE--AACNAPDG SCTKATRD
2 214 VDRVGKREADPQWC--RIHGQS-CWKRYASPE--AACNAPDG SCTKATRD
3 160 ADNLAKREAAPQWC-LRFVQGS-CWKRNAAPE--AACNAPDGACTKATRD
4 351 AKRSAEAVAA-RWC--LFHGEG-CWKRDAMDVVVARCNADDGAC SQARRD
5 250 ADVLTKR----QWC--PRRGQP-CWKR

```

Рис. 3 (продолжение).

ческой мембране. Активация каскада МАПК в свою очередь ведет к активации фактора транскрипции Ste12 и в конечном итоге к изменению экспрессии более 200 генов, что составляет около 3 % генома *S. cerevisiae*. Через посредство фактора транскрипции Ste12 феромоны блокируют G1 фазу клеточного цикла, ориентируют рост дрожжевой клетки в направлении ее полового партнера и обеспечивают слияние ядер гаплоидных *MAT $\alpha$* - и *MAT $\alpha$* -клеток с образованием диплоидной клетки. В логарифмической фазе роста дрожжей концентрации феромонов достигают больших значений (в случае *a*-фактора — до 30 тыс. молекул на одну дрожжевую клетку). Процессы синтеза и секреции феромонов и белков, участвующих в передаче генерируемого феромонами сигнала, находятся под контролем локализованного в геноме *S. cerevisiae* *MAT*-локуса, который кодирует факторы транскрипции, регулирующие экспрессию трех категорий генов — *a*-,  $\alpha$ - и гаплоид-специфичные гены (Herskowitz et al., 1992).

У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* также выявлены два типа гаплоидных клеток —  $h^-$  и  $h^+$ , продуцирующих феромональные факторы М и Р соответственно (Davey, 1992; Imai, Yamamoto, 1994). Фактор Р связывается с рецептором Mam2, локализованным в  $h^-$ -клетках, фактор М — с рецептором Map3 в  $h^+$ -клетках (Kitamura, Shimoda, 1991; Tanaka et al., 1993). Связывание факторов М и Р с рецепторами Mam2 и Map3, как и у дрожжей *S. cerevisiae*, ведет к активации сопряженного с ними гетеро-

1	M-PS--TTAQTK-----	<b>VPQTSTNFN</b> SYC <sup>*</sup> VVVM
2	M-PS--TAASTR-----	<b>VPQTTMNF</b> NGYCVVVM
3	M-PS--TAASTK-----	<b>VPQTTMNF</b> NGYCVVVM
4	M-PS---NTQTS-----	<b>NSSMGVVG</b> YSYCVVVM
5	MSPST-KNIPAP-----	<b>VAGARAGPI</b> HYCVIM
6	MQPSTATAAPKE--KT	SSEKKN <b>YIIKGV</b> FWD <b>PAC</b> VIA
7	MQPITTASTQATQKDKS	SSEKKN <b>YIIKGL</b> FWD <b>PAC</b> VIA
8	MQPSTVTAAPKD--KT	SAEKKN <b>YIIKGV</b> FWD <b>PAC</b> VIA
9	MQSTTY-AAQKN----	SSEKKN <b>YIVK</b> GWFW <b>PEC</b> VIA
10	MQPTIE-ATQKD---NT	QEKRD <b>YIVK</b> GWFW <b>SPDC</b> VIA
11	MQ--LT--NNTNKD---	ESTENKDN <b>WIAKGY</b> M <b>WTP</b> QCVIV

Рис. 4. Предшественники феромонов  $\alpha$ -типа грибов аскомицетного аффинитета.

1 — mfp *P. anserina* (AAV90629.1); 2 — mfa-1 *N. crassa* (AAN03594); 3 — ppg2 *S. macrospora* (CAB96171); 4 — mf2-1 *C. parasitica* (AAC39329); 5 — MF1-1 *M. grisea* (XP\_365750.2); 6 — mfa-1 *S. cerevisiae* (P34165); 7 — mfa-2 *S. cerevisiae* (P34166); 8 — *S. paradoxus* (CAD56301.1); 9 — *V. polyspora* (XP\_001646178.1); 10 — *C. glabrata* (CAR58006.1); 11 — *Ashbya gossypii* (AAS50575.1).

Жирным шрифтом выделены участки, соответствующие феромонам  $\alpha$ -типа; звездочкой отмечен остаток цистеина — мишень для модификации фарнезильной группой.

тримерного G-белка Gpa1(G $\alpha$ )-Git5(G $\beta$ )-Git11(G $\gamma$ ) и его диссоциации на Gpa1-субъединицу и Git5-Git11-димер. Однако за передачу феромонального сигнала у *S. pombe* ответственна Gpa1-субъединица, а не Git5-Git11-димер, как это происходит в случае *S. cerevisiae* (Ladds et al., 2005). Gpa1-субъединица активирует каскад МАПК, который включает Буr2 (киназу киназы МАПК), Буr1 (киназу МАПК) и Spk1 (МАПК), что ведет к активации факторов транскрипции и регуляции генной экспрессии. В этой связи следует отметить, что у *S. cerevisiae* Gpa1-субъединица в отсутствие феромона негативно регулирует каскад МАПК и блокирует экспрессию контролируемых им генов.

Предшественники  $\alpha$ -феромонов, обладающие структурной гомологией по отношению к MF $\alpha$  *S. cerevisiae*, и генерируемые вследствие их гидролиза  $\alpha$ -феромоны выявлены у большинства грибов аскомицетного аффинитета, в том числе у *C. albicans* (Bennett et al., 2003), *Candida glabrata* (Wong et al., 2003), *Magnaporthe grisea* (Shen et al., 1999), *Aspergillus fumigatus* (Poggeler, 2000, 2002), *A. nidulans* (Paoletti et al., 2007), *Neurospora crassa* (Bobrowicz et al., 2002), *Sordaria macrospora* (Poggeler, 2000), *Cryphonectria parasitica* (Zhang et al., 1998), *Podospora anserina* (Coppin et al., 2005), *Penicillium marneffeii* (Woo et al., 2006), *P. chrysogenum* (Hoff et al., 2008). Во всех предшественниках  $\alpha$ -феромонов грибов аскомицетного аффинитета локализованы по несколько копий молекул  $\alpha$ -феромона, каждая из которых с С-конца ограничена KR-сайтом (в редких случаях RR-сайтом), являющимся мишенью для протеолитического расщепления. Проведенный нами сравнительный анализ первичных структур предшественников  $\alpha$ -феромонов позволил разделить их на две группы (рис. 3). Первая, более обширная группа включает  $\alpha$ -предшественники грибов аскомицетного аффинитета, гомологичные MF $\alpha$  *S. cerevisiae*. Большинство из них имеют по 3—4 копии молекул  $\alpha$ -феромонов, локализованных в С-концевой части молекулы. В некоторых прекурсорах копии феромонов различаются одним или двумя близкими по физико-химическим свойствам АКО (участки 87—99 и 108—120 в предшественнике  $\alpha$ 2-феромона *S. cerevisiae*, участки 98—110 и 123—135 в предшественнике  $\alpha$ -феромона *C. glabrata*) (рис. 3). Вторая группа включает предшественники  $\alpha$ -феромонов, гомологичных по отношению к csg-4 *N. crassa*. В них копии молекул  $\alpha$ -феромонов встречаются по всей длине молекулы, причем в предшественниках  $\alpha$ -феромонов *C. parasitica* (AAC39328) и *Gibberella zeae* (XP\_385237), имеющих длину 530 и 421 АКО, число копий достигает шести и восьми соответственно. Идентичность первичной структуры при попарном сравнении белков-предшественников внутри указанных групп колеблется от 35 до 82 % и в значительной степени повышается в участках, которые соответствуют молекулам  $\alpha$ -феромонов и следующим за ними сайтам-мишеням для протеолитического расщепления.

Подобно их предшественникам,  $\alpha$ -феромоны грибов аскомицетного аффинитета также могут быть разделены на две группы (см. рис. 2). Первая из них включает  $\alpha$ -феромоны, которые гомологичны  $\alpha$ -фактору *S. cerevisiae* и имеют консенсусную последовательность WHWLXHXGQP(I/M)(I/F). Вторая группа включает более варибельные по структуре  $\alpha$ -феромоны с консенсусной последовательностью WCX(R/H)XXGQXCX, гомологичные  $a$ -феромону *N. crassa*. У многих  $\alpha$ -феромонов второй группы между С-концевой АКО, которая чаще представлена остатком триптофана или другой гидрофобной аминокислоты, и KR-сайтом для протеолитического расщепления располагается вставка длиной от одной до пяти АКО, содержащая остатки лизина и алифатических аминокислот. Вероятно, она необходима для процессинга молекулы феромона. Следует отметить, что в одном и том же предшественнике имеются копии  $\alpha$ -феромона, как имеющие такую вставку, так и лишенные ее. Например, *ppg1 S. macrospora* включает четыре копии молекул феромона со вставками, причем в каждом случае разными (KV, KKA, K и KA), и одну копию, лишенную такой вставки (рис. 3).

У большинства грибов аскомицетного аффинитета обнаружены предшественники  $a$ -феромонов, структурно близкие  $a$ -фактору *S. cerevisiae*. Некоторые из них, в частности предшественники  $a$ -феромонов *M. grisea* (Shen et al., 1999), *N. crassa* (Bobrowicz et al., 2002) и *P. anserina* (Coppin et al., 2005), в настоящее время детально охарактеризованы. Проведенное нами сравнительное изучение предшественников  $a$ -феромонов не выявило высокой консервативности их первичных структур, даже в С-концевой части, где расположены молекулы  $a$ -феромонов (рис. 4). Исключение составляет расположенный на С-конце молекул  $a$ -феромонов остаток цистеина, который является мишенью для фарнезилирования и метилирования и играет определяющую роль в функциональной активности феромона.

У базидиомицетов отсутствуют предшественники  $\alpha$ -феромонов, но широко представлены предшественники феромонов, которые структурно близки  $a$ -феромонам грибов аскомицетного аффинитета. При этом у базидиомицетов выявлено несколько вариантов предшественников, которые генерируют различные формы  $a$ -подобных феромонов. В частности, у гомоталлического базидиомицета *Schizophyllum commune* выявлены шесть предшественников, процессинг которых ведет к шести различным  $a$ -подобным феромонам. Степень консервативности первичной структуры предшественников и генерируемых из них феромонов очень низка. Так, сравнение шести  $a$ -подобных феромонов *S. commune* не позволяет выявить в них ни одной идентичной АКО, за исключением остатков цистеина и следующего за ним валина в С-концевом сайте, который является мишенью для фарнезилирования (Vaillancourt et al., 1997). Много вариантов  $a$ -подобных феромонов и их предшественников выявлено у других базидиомицетов — *Cryptococcus neoformans* (Moore, Edman, 1993; Lengeler et al., 2002), *Ustilago maydis* (Hartmann et al., 1996), *Coprinus cinereus* (Riquelme et al., 2005). Их первичная структура очень вариабельна при сравнении феромонов как одного вида грибов, так и различных их видов, исключая расположенный на С-конце СААХ-сайт для фарнезилирования. Это может указывать на то, что одной из важнейших молекулярных детерминант, ответственных за биологическую активность  $a$ -подобных феромонов, является модифицированный изопреноидным радикалом остаток цистеина в СААХ-сайте.

Молекулярные механизмы действия на клетку большинства феромонов грибов аскомицетного аффинитета и базидиомицетов сходны с таковыми для  $\alpha$ - и  $a$ -факторов *S. cerevisiae* и также осуществляются через рецепторы серпантинного типа, которые через посредство  $\beta\gamma$ -димера гетеротримерного G-белка регулируют функциональную активность каскада МАПК и экспрессию зависимых от него генов, в том числе генов, ответственных за синтез самих феромонов. В активации каскада МАПК может принимать участие и  $\alpha$ -субъединица G-белка, как это происходит у дрожжей *S. pombe*, хотя ее роль в регуляторных эффектах феромонов не столь значительна, как роль  $\beta\gamma$ -димера, а в ряде случаев до конца не выяснена. Это отличает феромональные каскады грибов аскомицетного аффинитета и базидиомицетов от таковых дрожжей *S. cerevisiae*,

у которых  $\alpha$ -субъединица является ингибитором передачи гормонального сигнала. Описанная выше модель, включающая активацию каскада МАПК как  $\beta\gamma$ -димером (основной путь), так и  $\alpha$ -субъединицей G-белка, доказана для дрожжей *Kluyveromyces lactis* и базидиомицетов *C. neoformans* и *U. maydis* (Alspaugh et al., 1997; Lengeler et al., 2000; Wang et al., 2000; Coria et al., 2006). Показано, что у мутантных линий грибов с неактивными  $\beta\gamma$ -димером и  $\alpha$ -субъединицей G-белка нарушен процесс передачи феромонального сигнала и блокирован клеточный ответ на действие феромона.

У грибов аскомицетного аффинитета выявлены, а в некоторых случаях и охарактеризованы рецепторы как для  $\alpha$ -феромонов, так и для  $a$ -феромонов (CaSte2 и CaSte3 *C. albicans*, MpgSte2 и MpgSte3 *M. grisea*, AnGprA и AnGprB *A. nidulans*, PreB и PreA *A. fumigatus*, Pre2 и Pre1 *N. crassa* и др.), которые обладают высокой гомологией первичной структуры, в том числе в области лигандсвязывающего сайта, по отношению к рецепторам Ste2 и Ste3 *S. cerevisiae* соответственно (Han et al., 2004; Шпаков, 2007; Shpakov, Pertseva, 2008; Xue et al., 2008). У базидиомицетов отсутствуют рецепторы, гомологичные Ste2-подобным рецепторам грибов аскомицетного аффинитета, что связано с отсутствием у них  $\alpha$ -феромонов, лигандов этих рецепторов. В то же время у базидиомицетов в отличие от грибов аскомицетного аффинитета имеются по два и более Ste3-подобных рецептора (Ste3 $\alpha$ , Ste3 $a$  и Cpr2 *C. neoformans*, Pra1 и Pra2 *U. maydis*, Rcb1, Rcb2 и Rcb3 *C. cinereus* и др.), что хорошо согласуется с множественностью форм  $a$ -подобных феромонов, которые являются их лигандами (Casselton, 2002; Xue et al., 2008). Контроль продукции и секреции феромонов и функциональной активности феромональных сигнальных систем осуществляется через посредство MAT-локусов. У грибов аскомицетного аффинитета эти локусы, как правило, не включают гены, кодирующие феромоны и сопряженные с ними сигнальные белки. В то же время у базидиомицетов MAT-локусы содержат гены, которые наряду с факторами транскрипции кодируют компоненты феромонального сигнального пути, включая как сами феромоны, так и их рецепторы и сопряженные с ними гетеротримерные G-белки (Lengeler et al., 2000, 2002; Fraser et al., 2007; Bakkeren et al., 2008; Kothe, 2008).

Феромоны, производные каротина. У грибов, относящихся к порядку *Mucorales* класса *Zygomycetes* (*Mucor mucedo*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Zygorhynchus moeleri*, *Blakeslea trispora*), функции феромонов выполняют вещества непептидной природы — триспорная кислота и ее производные, предшественником которых является  $\beta$ -каротин (Яковлева и др., 1980; Sutter, Whitaker, 1981; Schachtschabel et al., 2005; Schachtschabel, Boland, 2007). Триспорная кислота повышает интенсивность синтеза каротиноидов в клетках гриба, регулирует процесс полового развития и вызывает образование половых спор — зигоспор. Поскольку триспорная кислота является метаболитом  $\beta$ -каротина, то осуществляемая ею регуляция каротиногенеза лежит в основе механизма ауторегуляции, вследствие чего триспорная кислота и ее производные выполняют функции как феромонов, так и QS-молекул. В этой связи следует отметить, что триспорная кислота вовлечена не только во внутривидовую хемокоммуникацию, но для некоторых паразитических грибов, например *Parasitella parasitica*, определяет их взаимоотношения с хозяином (Schultze et al., 2005). Экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты синтеза триспорной кислоты, в частности 4-дигидрометилтриспоратдегидрогеназу, влияет не только на половое размножение гриба, но и на реализацию программы паразитизма.

На начальном этапе из  $\beta$ -каротина получается 4-дигидротриспорин, причем его способны синтезировать грибы, относящиеся к обоим типам спаривания: (–) и (+) (рис. 5). Однако в дальнейшем грибы (+)-типа синтезируют 4-дигидрометилтриспорат, а грибы (–)-типа — триспорин, которые в дальнейшем способны превращаться в предшественников триспорной кислоты, метилтриспорат и триспорол только в клетках гриба противоположного пола. Вследствие этого 4-дигидрометилтриспорат и триспорин сначала секреторируются во внешнюю среду и улавливаются гифами грибов, относящимся соответственно к (–)- и (+)-типам спаривания, и только затем превращаются в метилтриспорат и триспорол, из которых в конечном итоге синтезируется

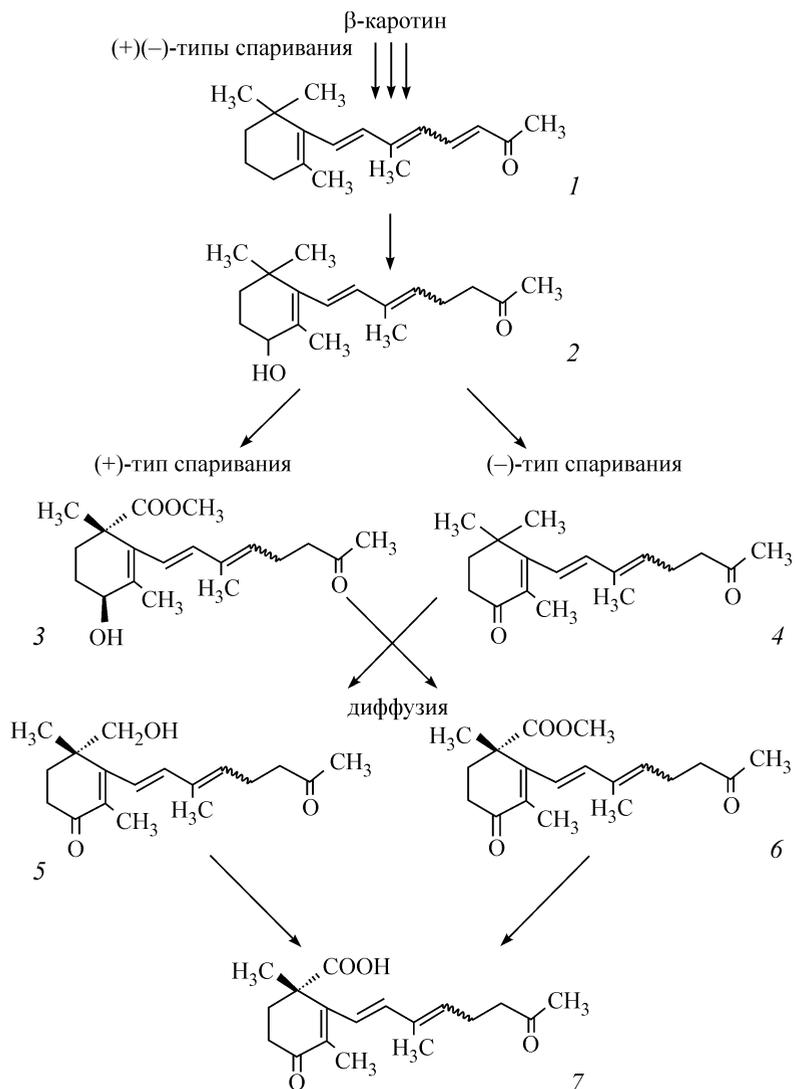


Рис. 5. Биосинтетические пути синтеза триспоровой кислоты из β-каротина у грибов, относящихся к различным типам спаривания.

1 — β-С<sub>18</sub>-кетон, 2 — 4-дигидротриспорин, 3 — 4-дигидрометилтриспорат, 4 — триспорин, 5 — триспорол, 6 — метилтриспорат, 7 — триспоровая кислота.

триспоровая кислота (Schachtschabel, Boland, 2007). Мутантные линии грибов, лишённые способности секретировать предшественники триспоровой кислоты во внешнюю среду, не способны индуцировать синтез триспоровой кислоты грибами противоположного типа спаривания и не вызывают образование зигоспор.

**Циклический аденозинмонофосфат.** Ещё одной QS-молекулой у грибов является цАМФ, который синтезируется ферментом АЦ. У большинства организмов цАМФ является внутриклеточным вторичным посредником, который вырабатывается в ответ на стимуляцию АЦ гормонами или другими факторами и контролирует широкий спектр цАМФ-зависимых сигнальных путей. Однако у грибов и некоторых одноклеточных организмов цАМФ может секретироваться во внеклеточное пространство и выполнять функцию гормона, первичного посредника, действуя на спе-

цифически опознающие его поверхностные рецепторы, относимые к семейству цАМФ-рецепторов (Manahan et al., 2004; Brunner et al., 2008; Шпаков и др., 2009).

Первым организмом, у которого были выявлены и охарактеризованы цАМФ-рецепторы, изучена их регуляция внеклеточным цАМФ и исследованы молекулярные механизмы действия цАМФ на эффекторные системы клетки, стал миксомицет *Dictyostelium discoideum* (Kimmel, Parent, 2003; Manahan et al., 2004). У него были выявлены четыре типа цАМФ-рецепторов (cAR13—cAR4). Все они относятся к рецепторам серпантинного типа, которые 7 раз пронизывают плазматическую мембрану и функционально сопряжены с гетеротримерными G-белками. Основная функция cAR состоит в обеспечении агрегации индивидуальных клеток гриба в многоклеточное образование, которая вызывается цАМФ и находится под его контролем. Клетки *D. discoideum*, расположенные в центрах агрегации, периодически генерируют цАМФ-сигнал, который передается на соседние клетки, вызывает их поляризацию и движение к центрам агрегации по возрастающему градиенту концентрации цАМФ. Связывание цАМФ с cAR вызывает стимуляцию различных эффекторных систем, в том числе АЦ А-типа, специфичной в отношении процесса агрегации амёб, которая обеспечивает синтез и секрецию новых порций цАМФ и, таким образом, многократно усиливает первоначальный сигнал. Сигнал, генерируемый цАМФ, не только обеспечивает движение клеток гриба при агрегации, но и контролирует их движение на других стадиях жизненного цикла, а также является основным регулятором экспрессии генов, ответственных за процессы развития и дифференцирования *D. discoideum* (Dornmann et al., 2001). Следует отметить, что поскольку цАМФ регулирует активность фермента, осуществляющего его синтез (ауторегуляция), и влияет на экспрессию генов, кодирующих белки — компоненты запускаемого им сигнального каскада, то он полностью удовлетворяет критериям, предъявляемым к QS-молекулам.

Проведенный нами и другими авторами анализ геномов грибов аскомицетного аффинитета и базидиомицетов позволил выявить в них гены, кодирующие рецепторы, гомологичные cAR *D. discoideum*, причем во многих случаях в геноме гриба выявляется по три-четыре типа cAR-подобных рецепторов (Lafon et al., 2006; Шпаков, 2007; Brunner et al., 2008; Shpakov, Pertseva, 2008; Xue et al., 2008). Для грибов рода *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. virens*) получены прямые доказательства в пользу того, что такие cAR-подобные рецепторы специфически опознают цАМФ, который выполняет функцию хемоаттрактанта и регулятора важнейших клеточных функций (Nemcovic, Farkas, 1998; Mukherjee et al., 2007; Brunner et al., 2008). Совокупность всех этих данных указывает на важную роль цАМФ как первичного посредника в жизненном цикле грибов.

## Заключение

У грибов, как и у бактерий, имеется широкий спектр различных по химической природе QS-молекул и регулируемых ими сигнальных путей, которые определяют межклеточную внутри- и межвидовую коммуникацию в сообществах клеток грибов, относящихся к различным их таксономическим группам. Сравнение QS-молекул грибов и бактерий показывает черты сходства у большинства из них. Так, имеющие гидрофобные цепи фарнезол и фарнезилловая кислота структурно близки N-ацилированным производным гомосеринлактонов, выполняющим функцию АИ у большинства грамотрицательных бактерий, и цис-11-метил-2-додекановой кислоте, являющейся QS-молекулой у *Xanthomonas campestris*, а производные ароматических аминокислот тирозол, 2-фенилэтанол и триптофол сходны с адреналиноподобными АИ 3-го типа и производными индола и хинолина бактерий, которые регулируют межклеточную коммуникацию в сообществах бактериальных клеток и их вирулентность. Пептидные феромоны  $\alpha$ -типа, которые, как правило, заряжены положительно, близки по структурно-функциональной организации поликатионным пептидным АИ грамположительных бактерий, в то время как пептидные феромоны  $\alpha$ -типа, содержащие гидро-

фобный фарнезилный радикал, являются структурными гомологами коротких бактериальных пептидов ComX-семейства с феромональной активностью, которые также модифицированы фарнезилной группой. Все это указывает на то, что предшественниками QS-молекул грибов могут являться различные классы бактериальных АИ, а QS-системы грибов, возможно, имеют прокариотические корни (Шпаков, Перцева, 2008; Shpakov, Pertseva, 2008). У QS-молекул грибов обнаруживаются черты структурного и функционального сходства с гормональными и гормоноподобными молекулами высших эукариот — биогенными аминами, являющимися производными ароматических аминокислот, нуклеотидами, жирными кислотами и пептидными гормонами. Таким образом, нельзя исключить, что QS-система грибов может быть включена в систему хемокоммуникации, которая определяет взаимоотношения между филогенетически удаленными организмами (Bahn et al., 2007).

Изучение QS-молекул, определяющих жизненный цикл грибов, многие из которых являются фитопатогенными или патогенными для человека и животных, имеет большое значение для создания на их основе эффективных регуляторов фундаментальных жизненных процессов в клетках грибов, в том числе препаратов с фунгицидной активностью. Понимание молекулярных механизмов действия QS-молекул грибов и расшифровка структурно-функциональной организации регулируемых ими QS-систем необходимы также для биотехнологии, основанной на применении грибов для производства биологически активных веществ, поскольку процессы размножения грибов и их развития, а также их биосинтетическая активность находятся под непосредственным контролем этих систем.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Феофилова Е. П. Гетероталлизм муковых грибов: биологическое значение и использование в биотехнологии // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. С. 501—519.
- Шпаков А. О. Рецепторы серпантинного типа и гетеротримерные G-белки дрожжевых грибов: структурно-функциональная организация и молекулярные механизмы действия // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2007. Т. 43. С. 3—23.
- Шпаков А. О. Сигнальные молекулы бактерий непептидной природы QS-типа // Микробиология. 2009а. Т. 78, № 2. С. 163—175.
- Шпаков А. О. Пептидные аутоиндукторы бактерий // Микробиология. 2009б. Т. 78, № 3. С. 291—303.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Перцева М. Н. Стимуляция аденилатциклазы циклическим аденозинмонофосфатом в клеточной культуре инфузории *Dileptus anser* // ДАН. 2009. Т. 424, № 2. С. 270—272.
- Шпаков А. О., Перцева М. Н. Системы сигнальной трансдукции прокариот // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2008. Т. 44. С. 113—130.
- Яковлева И. М., Вакулова Л. А., Феофилова Е. П., Бехтерева М. Н., Самохвалов Г. И. Влияние синтетических соединений, структурно близких триспорным кислотам, на каротиногенез и липогенез мукового гриба *Blakeslea trispora* // Микробиология. 1980. Т. 49. С. 274—278.
- Alem M. A., Douglas L. J. Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms // J. Med. Microbiol. 2005. Vol. 54. P. 1001—1005.
- Alem M. A., Oteef M. D., Flowers T. H., Douglas L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development // Eukaryot. Cell. 2006. Vol. 5. P. 1770—1779.
- Alspaugh J. A., Perfect J. R., Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein  $\alpha$  subunit Gpa1 and cAMP // Genes Dev. 1997. Vol. 11. P. 3206—3217.
- Bahn Y. S., Xue C., Idnurm A., Rutherford J. C., Heitman J., Cardenas M. E. Sensing the environment: lessons from fungi // Nature Rev. Microbiology. 2007. Vol. 5. P. 57—69.

- Bakkeren G., Kamper J., Schirawski J. Sex in smut fungi: structure, function and evolution of mating-type complexes // *Fungal Genet. Biol.* 2008. Vol. 45. P. 15—21.
- Bennett R. J., Uhl M. A., Miller M. G., Johnson A. D. Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 23. P. 8189—8201.
- Bobrowicz P., Pawlak R., Correa A., Bell-Pedersen D., Ebbole D. J. The *Neurospora crassa* pheromone precursor genes and regulated by the mating type locus and the circadian clock // *Mol. Microbiol.* 2002. Vol. 45. P. 795—804.
- Brunner K., Omann M., Pucher M. E., Delic M., Lehner S. M., Domnanich P., Kratochwill K., Druzhinina I., Denk D., Zeilinger S. Trichoderma G protein-coupled receptors: functional characterization of a cAMP receptor-like protein from *Trichoderma atroviride* // *Curr. Genet.* 2008. Vol. 54. P. 283—299. DOI 10.1007/s00294-008-0217-7.
- Burkholder A. C., Hartwell L. H. The yeast  $\alpha$ -factor receptor: structural properties deduced from the sequence of the STE2 gene // *Nucleic Acids Res.* 1985. Vol. 13. P. 8463—8475.
- Cao Y. Y., Cao Y. B., Xu Z., Ying K., Li Y., Xie Y., Zhu Z. Y., Chen W. S., Jiang Y. Y. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2005. Vol. 49. P. 584—589.
- Casselton L. A. Mate recognition in fungi // *Heredity.* 2002. Vol. 88. P. 142—147.
- Chen H., Fink G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20. P. 1150—1161.
- Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101. P. 5048—5052.
- Chen P., Sapperstein S. K., Choi D., Michaelis S. Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone  $\alpha$ -factor // *J. Cell Biol.* 1997. Vol. 136. P. 251—269.
- Coppin E., de Renty C., Debuchy R. The function of the coding sequences for the putative pheromone precursors in *Podospora anserina* is restricted to fertilization // *Eukaryot. Cell.* 2005. Vol. 4. P. 407—420.
- Coria R., Kawasaki L., Torres-Quiroz F., Ongay-Larios L., Sanchez-Paredes E., Velazquez-Zavala N., Navarro-Olmos R., Rodriguez-Gonzalez M., Aguilar-Corachan R., Coello G. The pheromone response pathway of *Kluyveromyces lactis* // *FEMS Yeast Res.* 2006. Vol. 6. P. 336—344.
- Davey J. Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone // *EMBO J.* 1992. Vol. 11. P. 951—960.
- Dickinson J. R., Salgado L. E., Hewlins M. J. E. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 8028—8034.
- Dornmann D., Kim J. Y., Devreotes P. N., Weijer C. J. cAMP receptor affinity controls wave dynamics, geometry and morphogenesis in *Dictyostelium* // *J. Cell Sci.* 2001. Vol. 114. P. 2513—2523.
- Fraser J. A., Hsueh Y. P., Findley K. M., Heitman J. Evolution of the mating-type locus: the Basidiomycetes / Eds J. Heitman // *Sex in Fungi*. Washington, DC.: ASM Press, 2007. P. 19—34.
- Gooday G. W., Adams D. J. Sex hormones and fungi // *Adv. Microb. Physiol.* 1993. Vol. 34. P. 69—145.
- Hagen D. C., McCaffrey G., Sprague G. F. Evidence the yeast STE3 gene encodes a receptor for the peptide pheromone  $\alpha$ -factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. Vol. 83. P. 1418—1422.
- Han K. H., Seo J. A., Yu J. H. A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans* // *Mol. Microbiol.* 2004. Vol. 51. P. 1333—1345.
- Hartmann H. A., Kahmann R., Bolker M. The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis* // *EMBO J.* 1996. Vol. 15. P. 1632—1641.
- Herskowitz I., Rine J., Strathern J. N. Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae* / Eds E. W. Jones et al. // *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*. Cold Spring Harbor Lab. Press. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1992. Vol. 2. P. 583—656.

- Hoff B., Poggeler S., Kuck U. Eighty years after its discovery, Fleming's *Penicillium* strain discloses the secret of its sex // *Eukaryot. Cell*. 2008. Vol. 7. P. 465—470.
- Hoffman C. S. Except in every detail: comparing and contrasting G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* // *Eukaryot. Cell*. 2005. Vol. 4. P. 495—503.
- Hogan D. A. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi // *Eukaryot. Cell*. 2006. Vol. 5. P. 613—619.
- Hornby J. M., Jensen E. C., Lisec A. D., Tasto J. J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. P. 2982—2992.
- Imai Y., Yamamoto M. The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner // *Genes Dev.* 1994. Vol. 8. P. 328—338.
- Jabra-Rizk M. A., Shirliff M., James C., Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance // *FEMS Yeast Res.* 2006. Vol. 6. P. 1063—1073.
- Kim S., Kim E., Shin D. S., Kang H., Oh K. B. Evaluation of morphogenic regulatory activity of farnesoic acid and its derivatives against *Candida albicans* dimorphism // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002. Vol. 12. P. 895—898.
- Kimmel A. R., Parent C. A. The signal to move: *D. discoideum* go orienteering // *Science*. 2003. Vol. 300. P. 1525—1527.
- Kitamura K., Shimoda C. The *Schizosaccharomyces pombe* *mam2* gene encodes a putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces cerevisiae* *Ste2* protein // *EMBO J.* 1991. Vol. 10. P. 3743—3751.
- Kothe E. Sexual attraction: on the role of fungal pheromone/receptor systems // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2008. Vol. 55. P. 125—143.
- Ladds G., Goddard A., Davey J. Functional analysis of heterologous GPCR signalling pathways in yeast // *Trends Biotechnol.* 2005. Vol. 23. P. 367—373.
- Lafon A., Han K. H., Seo J. A., Yu J. H., d'Enfert C. G-protein and cAMP-mediated signaling in aspergilli, a genomic perspective // *Fungal Genet. Biol.* 2006. Vol. 43. P. 490—502.
- Lee T. I., Rinaldi N. J., Robert F., Odom D. T., Bar-Joseph Z., Gerber G. K., Hannett N. M., Harbison C. T., Thompson C. M., Simon I. Transcriptional regulatory network in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science*. 2002. Vol. 298. P. 799—804.
- Lengeler K. B., Davidson R. C., D'Souza 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. Vol. 64. P. 746—785.
- Lengeler K. B., Fox D. S., Fraser J. A., Allen A., Forrester K., Dietrich F. S., Heitman J. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes // *Eukaryot. Cell*. 2002. Vol. 1. P. 704—718.
- Lorek J., Poggeler S., Welde M. R., Breves R., Bockmuhl D. P. Influence of farnesol on the morphogenesis of *Aspergillus niger* // *J. Basic Microbiol.* 2008. Vol. 48. P. 99—103.
- Manahan C. L., Iglesias P. A., Long Y., Devreotes P. N. Chemoattractant signaling in *Dictyostelium discoideum* // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2004. Vol. 20. P. 223—253.
- Martins M., Henriques M., Azeredo J., Rocha S. M., Coimbra M. A., Oliveira R. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells // *Eukaryot. Cell*. 2007. Vol. 6. P. 2429—2436.
- Moore T. D. E., Edman J. C. The  $\alpha$ -mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene // *Mol. Cell. Biol.* 1993. Vol. 13. P. 1962—1970.
- Mukherjee M., Mukherjee P. K., Kale S. P. cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens* // *Microbiology*. 2007. Vol. 153. P. 1734—1742.
- Nemcovic M., Farkas V. Stimulation of conidiation by derivatives of cAMP in *Trichoderma viride* // *Folia Microbiol.* 1998. Vol. 43. P. 399—402.

Noverr M. C., Phare S. M., Toews G. B., Coffey M. J., Huffnagle G. B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins // *Infect. Immun.* 2001. Vol. 69. P. 2957—2963.

Oh K. B., Miyazawa H., Naito T., Matsuoka H. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. P. 4664—4668.

Pan X., Heitman J. Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation // *Mol. Cell. Biol.* 2002. Vol. 22. P. 3981—3993.

Paoletti M., Rudholm C., Schwier E. U., Anderson M. J., Szakacs G., Lutzoni F., Debeaupuis J. P., Latge J. P., Denning D. W., Dyer P. S. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* // *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15. P. 1242—1248.

Paoletti M., Seymour F. A., Alcocer M. J., Kaur N., Calvo A. M., Archer D. B., Dyer P. S. Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans* // *Curr. Biol.* 2007. Vol. 17. P. 1384—1389.

Pogeller S. Two pheromone precursor genes are transcriptionally expressed in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora* // *Curr. Genet.* 2000. Vol. 37. P. 403—411.

Pogeller S. Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus* // *Curr. Genet.* 2002. Vol. 42. P. 153—160.

Pryciak P. M., Huntress F. A. Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the G $\beta$  $\gamma$  complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway // *Genes Dev.* 1998. Vol. 12. P. 2684—2697.

Ramage G., Saviile S. P., Wickes B. L., Lopez-Ribot J. L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. Vol. 68. P. 5459—5463.

Reading N. C., Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. Vol. 254. P. 1—11.

Riquelme M., Challen M. P., Casselton L. A., Brown A. J. The origin of multiple B mating specificities in *Coprinus cinereus* // *Genetics.* 2005. Vol. 170. P. 1105—1119.

Rossignol T., Logue M. E., Reynolds K., Grenon M., Lowndes N. F., Butler G. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. Vol. 51. P. 2304—2312.

Schachtschabel D., Boland W. Efficient generation of a trisporoid library by combination of synthesis and biotransformation // *J. Org. Chem.* 2007. Vol. 72. P. 1366—1372.

Schachtschabel D., Schimek C., Wostemeyer J., Boland W. Biological activity of trisporoids and trisporoid analogues in *Mucor mucedo* // *Phytochemistry.* 2005. Vol. 66. P. 1358—1365.

Schultze K., Schimek C., Wostemeyer J., Burmester A. Sexuality and parasitism share common regulatory pathways in the fungus *Parasitella parasitica* // *Gene.* 2005. Vol. 348. P. 33—44.

Semighini C., Hornby J., Dumitru R., Nickerson K., Harris S. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi // *Mol. Microbiol.* 2006. Vol. 59. P. 753—764.

Shchepin R., Navarathna D. H., Dumitru R., Lippold S., Nickerson K. W., Dussault P. H. Influence of heterocyclic and oxime-containing farnesol analogs on quorum sensing and pathogenicity in *Candida albicans* // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16. P. 1842—1848.

Shen W., Bobrowicz P., Ebbole D. J. Isolation of pheromone precursor genes of *Magnaporthe grisea* // *Fungal Genet. Biol.* 1999. Vol. 27. P. 253—263.

Shpakov A. O., Pertseva M. N. Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2008. Vol. 269. P. 151—282.

Sprague G. F., Thorner J. W. Pheromone response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae* / Eds E. W. Jones et al. // *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression.* Cold Spring Harbor Lab. Press. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1992. Vol. 2. P. 657—744.

- Sutter R. P., Whitaker J. P. Zygothore-stimulating precursors (pheromones) of trisporic acids active in (-)-Phycomyces blakesleeanus // J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256. P. 2334—2341.
- Tanaka K., Davey J., Imai Y., Yamamoto M. Schizosaccharomyces pombe map3<sup>+</sup> encodes the putative M-factor receptor // Mol. Cell. Biol. 1993. Vol. 13. P. 80—88.
- Vaillancourt L. J., Raudaskoski M., Specht C. A., Raper C. A. Multiple genes encoding pheromones and a pheromone receptor define the B $\beta$ 1 mating-type specificity in Schizopyllum commune // Genetics. 1997. Vol. 146. P. 541—551.
- Wang P., Perfect J. R., Heitman J. The G-protein  $\beta$  subunit GPB1 is required for mating and haploid fruiting in Cryptococcus neoformans // Mol. Cell. Biol. 2000. Vol. 20. P. 352—362.
- Waters C. M., Bassler B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2005. Vol. 21. P. 319—346.
- Wong S., Fares M. A., Zimmermann W., Butler G., Wolfe K. H. Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the «asexual» pathogenic yeast Candida glabrata // Genome Biol. 2003. Vol. 4. P. R10.
- Woo P. C., Chong K. T., Tse H., Cai J. J., Lau C. C., Zhou A. C., Lau S. K., Yuen K. Y. Genomic and experimental evidence for a potential sexual cycle in the pathogenic thermal dimorphic fungus Penicillium marneffeii // FEBS Lett. 2006. Vol. 580. P. 3409—3416.
- Xue C., Hsueh Y. P., Heitman J. Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi // FEMS Microbiol. Rev. 2008. Vol. 11. P. 1—23.
- Zhang L., Baasiri R. A., Van Alfen N. K. Viral repression of fungal pheromone precursor gene expression // Mol. Cell. Biol. 1998. Vol. 18. P. 953—959.

Институт эволюционной физиологии  
и биохимии им. И. М. Сеченова РАН  
Санкт-Петербург  
alex\_shpakov@list.ru

Поступила 19 XI 2008

## Р Е З Ю М Е

В обзоре проанализированы и систематизированы данные по сигнальным молекулам, через посредство которых осуществляется внутри- и межвидовая хемокоммуникация (quorum sensing) у грибов. Функции QS-молекул у грибов выполняют производные терпенов (фарнезол) и ароматических аминокислот (тирозол, 2-фенилэтанол и триптофол), а также обширная группа феромонов. Рассмотрены две основные группы феромонов — олигопептиды, выполняющие функцию феромонов спаривания и QS-молекул у аскомицетов и базидиомицетов, и производные каротина — триспорная кислота и ее метаболиты, ответственные за хемокоммуникацию у зигомицетов. Обсуждаются хемосигнальные системы, которые опознают QS-молекулы и опосредуют их регуляторные эффекты на фундаментальные клеточные процессы у грибов.

Ключевые слова: аутоиндуктор, грибы, пептид, сигнальная система, триспорная кислота, фарнезол, феромон, хемокоммуникация.

## S U M M A R Y

In the review the data on signal molecules participating in intra- and interspecies chemocommunication (quorum sensing) in fungi are analyzed and systematized. The functions of QS-molecules in fungi are realized by derivatives of terpenes (farnesol) and aromatic amino acids (tyrosol, 2-phenylethanol and tryptophol) and by large group of pheromones. Two main groups of pheromones, namely the oligopeptides functioning as mating pheromones and QS-molecules in ascomycetes and basidiomycetes and the derivatives of carotene (trisporic acid and its metabolites) responsible for chemocommunication in zygomycetes, are considered. The chemosignaling systems that recognize QS-molecules and mediate their regulatory effects on fundamental cellular processes in fungi are discussed.

Key words: autoinducer, chemocommunication, farnesol, fungi, peptide, pheromone, signaling system, trisporic acid.