

СРАВНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНЦЕПЦИЙ ВИДА НА ПРИМЕРЕ КОМПЛЕКСА '*ALTERNARIA INFECTORIA*'

Ганнибал Ф.Б.

Всероссийский НИИ защиты растений

Санкт-Петербург

Существующая в настоящее время система рода *Alternaria* опирается на традиционную морфологическую (типологическую) концепцию вида, которая удовлетворительно справляется с функцией каталогизации биоразнообразия. Однако при исследовании экологии, генетики и эволюции адекватным является оперирование видами, которые описаны с использованием биологически содержательных концепций, включающих в себя эволюционные гипотезы и соответствующих популяционно-генетическому мышлению.

Появление в арсенале микологов молекулярно-биологических методов в последние десятилетия усилило экспансию таксономических школ, ориентированных на реконструкцию филогенеза. Филогенетическая концепция видов в её операциональном варианте (phylogenetic species recognition) (Taylor et al., 2000) – один из набирающих популярность методов делимитации видов. Суть его заключается в определении наименьших терминальных монофилетических групп, состав которых стабилен и не зависит от набора исследуемых признаков (обычно, участков генома). Концепция филогенетического распознавания вида близка биологической концепции тем, что разделяет виды по наличию/отсутствию обмена генетической информацией между индивидами и группами.

Среди рода *Alternaria* выделяется группа так называемых мелкоспоровых видов, которые обнаруживаются повсеместно и с высокой частотой. Ранее многие из этих видов объединяли под одним названием – *A. Alternata*. Благодаря использованию в таксономической практике новых более стабильных морфологических признаков, начиная с 80-х годов прошлого века, активно шло описание новых мелкоспоровых видов рода. Ряд фитопатологических, биохимических и молекулярно-генетических исследований подтверждал гетерогенность этой группы. К настоящему моменту описано около 100 мелкоспоровых видов (Simmons, 2007). Среди них выделяют комплекс '*A. Infectoria*', который насчитывает около 30 морфологических видов. В этой группе мы и решили выявить филовиды. Для этой цели были определены нуклеотидные последовательности трёх функционально различных локусов генома (гены, кодирующие рРНК, фермент и структурный белок) для 14 штаммов.

На дендрограммах, построенных для отдельных локусов, стабильными оказались только 2 группы. Мажорная группа включала 8 репрезентативных (эталонных) штаммов разных морфовидов и два штамма *Alternaria sp.* К этой же большой группе, вероятно, относятся и 3 вида, нуклеотидные последовательности рДНК которых были заимствованы из Генбанка. Другая группа состояла из 4 штаммов *Alternaria sp.*, формировавших во всех случаях хорошо обособленный кластер. Причём ни один из включённых в анализ штаммов известных видов не кластеризовался вместе с указанными четырьмя штаммами.

Для каждой из двух групп было характерно то, что топология деревьев при сравнении генеалогий разных генов показала низкий уровень согласованности. Это указывает на отсутствие генетической изоляции внутри каждой из групп и наличие рекомбинации. Представленные результаты сходны с данными, полученными ранее методами мультилокусного ДНК-фингерпринтинга.

Используя филогенетическую концепцию вида можно утверждать, что комплекс '*A. Infectoria*' состоит из небольшого количества филогенетических видов. По крайней мере, 11 включённых в исследование морфологических видов этого комплекса являются формами одного филовида.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-00096.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *LECCINUM SCHISTOPHILUM* ПО ДАННЫМ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА УЧАСТКОВ ЯДЕРНОЙ РИБОСОМАЛЬНОЙ ДНК

Иванов Д.М.

Санкт-Петербургский государственный университет

Санкт-Петербург

При изучении видов рода *Leccinum* S.F. Gray с применением методов анализа ДНК было установлено, что восемь образцов существенно отличаются от других представителей субсекции *Scabra* Pilát & Dermek, объединяющей дикорастущие съедобные грибы подберезовики. Указанные образцы по размеру образуемых после рестрикционного анализа фрагментов амплифицированных участков рДНК и сравнению полученных результатов с последовательностями NCBI были идентифицированы как *Leccinum schistophilum* Bon. Морфологические и микроскопические характеристики этого вида перекрываются с признаками *L. scabrum* (Bull. : Fr.) S.F. Gray – подберезовика обыкновенного, за исключением посинения нижней части ножки, наблюдаемого между чешуйками.

Цель работы – идентифицировать *L. schistophilum* методами анализа ДНК и охарактеризовать экологические условия его местообитания.

Материалы: проанализировано 300 гербарных образцов видов рода *Leccinum*, собранных в 2004-2008 г.г. в Ленинградской и Мурманской областях, Республике Карелия и Краснодарском крае.

Методы: выделение ДНК с протеиназой K, амплификация области внутренних транскрибируемых спейсеров и гена 5,8S участка ITS1-5,8S-ITS2 с праймерами ITS1F и ITS4B и области межгенного интервала IGS1 с праймерами CNL12 и 5SA рибосомальной ДНК. Для расщепления полученных фрагментов использовали рестриктазу HinfI, сайт узнавания G↓ANTC, где N - любой нуклеотид. Вместе с тем, анализировался водородный показатель pH водных вытяжек почвы в местах проведения сборов.

Установлено, что размер ITS1-5,8S-ITS2 *L. schistophilum* – 1160 п.н. После проведения рестрикционного анализа наблюдается следующий набор фрагментов (п.н.): 130, 150, 410, 470. Полученные данные согласуются с анализом последовательностей существующих в NCBI для 5,8S-ITS2 (AY853543, AY853544, AY538848) и 28S (DQ534615) на наличие сайтов рестрикции. Размер межгенного интервала IGS1 *L. schistophilum* – 980 п.н. После воздействия рестриктазы в геле наблюдается ряд фрагментов: 175, 290, 320 п.н. В NCBI соответствующая последовательность отсутствует.

Необычно местообитание образцов этого вида в Ленинградской области - обочины проселочных дорог, отсыпанных известковым щебнем. Водные вытяжки из этого субстрата обладают pH 6,5-8,0.

Название вида *L. schistophilum* [лат. schistosus щепнистый + гр. phileo люблю] точно отражает его местообитания, например терриконы угольных копей на севере Франции (Bon, 1981). Также для последовательности DQ534615 приводятся данные о месте сбора - береза на осыпях карьеров от разработок (*Betula* on spoil heaps). Экологической характеристикой данного вида является произрастание совместно с березой на щелочных песчаных почвах, однако отмечается, что распространение *L. schistophilum* в пределах Европы изучено недостаточно (Den Bakker & Noordeloos, 2005).

Таким образом, указанный вид относится к базофильным организмам, произрастающим в облигатных эктомикоризных отношениях с березой на почвах с нейтральной и слабощелочной реакцией среды и, вероятнее всего, его местообитание шире указанных выше. Обнаружение и идентификация *L. schistophilum* и его экологические характеристики имеют большое значение для понимания филогенетических процессов внутри изучаемого рода.

Работа проведена в рамках программы Рособразования и CRDF «Фундаментальные исследования и высшее образование» (РНП 2.2.2.3.16048, Y5-B-12-02).

MORCHELLA STEPPICOLA – СЕКЦИЯ ADNATAE ИЛИ СЕКЦИЯ DISTANTES?

Кутковая О.В., Сухомлин М.Н.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

Киев, Украина

На сегодняшний день одной из наиболее сложных проблем современной микологии является достоверное разграничение видов. Эта проблема вызвана отсутствием четких диагнозов для многих видов и сложностью использования понятия «вид» для грибных индивидов. Сложность состоит и в том, что процесс видообразования у грибов сопровождается значительным уровнем как генетической, так и фенотипической изменчивости признаков. Решение этого вопроса в отношении промышленно важных грибов, к которым относятся и морхеловые грибы (представители р. *Morchella*), имеет не только теоретическое, но и прикладное значение.

Установление таксономически важных морфологических признаков сморчков на уровне вида и комплексное их исследование представляет интерес, как для практического использования в биотехнологии и селекции, так и для теоретических вопросов эволюционного развития данных видов.

Предложенное еще Е. Boudier в одной из первых систематических работ, посвященных сморчкам (1897), разделение рода на секции *Adnatae* (желтые сморчки) и *Distantes* (черные сморчки), подтверждено исследованиями последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера rг-ДНК (Wipf и др., 1996, 1999; Singh и др., 2004). D.J. Royle с соавторами (1990) также подтверждают, что существуют лишь две главные группы видов: *Morchella angusticeps* (содержит морфологически идентифицированные виды *M. angusticeps*, *M. conica* и *M. elata*) и *M. esculenta* (*M. esculenta*, *M. crassipes* и *M. deliciosa*). Корневыми соседями, которые объединяют эти две группы считаются *M. semilibera* и *Verpa conica*. В.А. Bunyard с соавторами (1994), основываясь на исследованиях р-ДНК разных видов сморчков также признали существование двух таксономических групп: черные сморчки, представленные *M. angusticeps*, *M. elata* и *M. conica*, и желтые сморчки – *M. esculenta*, *M. crassipes* и *M. deliciosa*. Они допускают, что эти две группы представляют лишь два вида.

В связи с тем, что *M. steppicola* не отнесен ни к одной из секций, перед нами возникла задача определения положения сморчка степного относительно описанных секций. Основываясь на макроморфологии плодовых тел данного вида, а именно на цвете ребер, можно предположить, что данный вид входит в секцию *Adnatae* (желтые сморчки). В качестве дополнительных признаков, подтверждающих или опровергающих наше предположение, были использованы размеры аскоспор, а на их основе рассчитаны коэффициенты дивергенции (КД). Коэффициент дивергенции предложенный С.Р. Царапкиным (Шмидт, 1984), основанный на исследовании степени различия сравниваемых признаков объектов, помогает установить близость различных видов.

Коэффициенты дивергенции были рассчитаны для следующих видов: *M. esculenta*, *M. crassipes*, *M. conica*, *M. semilibera* та *M. elata*. Размеры аскоспор *M. steppicola* принимались за стандарт. В результате полученных данных наиболее близкими видами к *M. steppicola* по микроморфологическим признакам оказались *M. esculenta* (КД=7,97) и *M. crassipes* (КД=8,08), т.к. значения КД этих видов были наименьшими. Более отдаленными видами от сморчка степного являются *M. conica* (КД=8,72), *M. semilibera* (КД=8,86) и *M. elata* (КД=9,81).

Таким образом, наше предположение, что *M. steppicola* входит в группу желтых сморчков, сделанное на основе макроморфологических признаков, было подтверждено микроморфологическими показателями.

Исследования проводились при финансовой поддержке гранта № 25.5/066 ГФФИ.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Наумова Е.С., Серпова Е.В., Наумов Г.И.

ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Москва

В современной науке и практике все больше привлекаются новые перспективные микроорганизмы с необычными, важными свойствами, к числу последних относятся дрожжеподобные грибы *Yarrowia lipolytica*, продуценты разнообразных физиологически активных веществ, включая гидролитические ферменты (липазы, протеазы и др.). Успешное выполнение как прикладных, так и фундаментальных работ не может обойтись без видо- и штаммо-специфичного анализа генома дрожжей *Y. lipolytica*.

Принципиально важную информацию о хромосомном составе геномов дрожжей можно получать с помощью пульс-электрофореза нативных хромосомных ДНК. Этот метод, представляющий своего рода “молекулярную кариологию”, широко применяется для исследований в области эволюции и систематики различных дрожжей (Naumov et al., 1992; Voekhout, Naumova, 2003; Voekhout et al., 1993). На материале 43 штаммов различного географического и экологического происхождения мы изучили молекулярно-генетические особенности генома дрожжей *Y. lipolytica*. Видовую идентификацию штаммов проводили с помощью секвенирования района D1/D2 гена 26S рРНК. Большинство штаммов по последовательностям этого района не отличались от типовой культуры CBS 6124, у штамма CBS 6660 обнаружена одна нуклеотидная замена, а у 8 штаммов – вставка одного нуклеотида. Все изученные штаммы также имели сходные последовательности более варибельного участка рРНК, внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2. В тоже время, пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК выявил значительный полиморфизм кариотипов дрожжей *Y. lipolytica*. Обнаруженные различия по молекулярным кариотипам не связаны с географическим происхождением штаммов и источником их выделения. Хромосомная ДНК различных штаммов разделилась на 4-7 электрофоретических полос. Размеры индивидуальных хромосом значительно варьировали у разных штаммов. Все штаммы имели две хромосомные полосы размером от 2300 до 2800 т.п.н., которые у некоторых штаммов мигрировали в дуплете. Используя различные кариотипические режимы, нам удалось разделить дуплетные полосы на две хромосомы. Наибольший диапазон размеров хромосомных полос (от 1400 т.п.н. до 6200 т.п.н.) отмечен у штаммов CBS 6124.1, CBS 6660 и ВКПМ У-34, а наименьший – у штаммов CBS 599, CBS 7504 и CBS 5570 (от 2000 т.п.н. до 4000 т.п.н.). По сходству кариотипических профилей все штаммы были разделены на 4 группы, а 22 штамма, имеющие уникальные кариотипы, не попали ни в одну из групп. Размеры геномов различных природных штаммов дрожжей *Y. lipolytica*, по-видимому, составляют от 12700 до 22100 т.п.н. Следует отметить, что штаммы CBS 6124.1 и CBS 6124.2, которые являются моноспоровыми сегрегантами типовой культуры CBS 6124, сильно отличаются по размерам хромосомных полос. Нельзя исключить, что типовая культура *Y. lipolytica* CBS 6124 имеет гетерозиготное гибридное происхождение. Согласно проведенному кариотипическому анализу гаплоидное число хромосом дрожжей *Y. lipolytica* равно 6, тогда как штаммы с большим количеством хромосомных полос являются анеуплоидными. Обсуждается эволюционная динамика дрожжевых хромосом.

Данная работа поддержана из средств ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" Госконтракта РФ # 02.531.11.9003.

РАЗНООБРАЗИЕ ГРИБОВ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ БАНКЕ

Озерская С.М., Кочкина Г.А., Чигинева Н.И., Иванушкина Н.Е.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К.Скрябина РАН

Пушино

Представлены результаты систематической обработки таксономического разнообразия мицелиальных грибов и дрожжей, данные о которых внесены во всемирный генетический банк NCBI (The National Center for Biotechnology Information National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, www.ncbi.nlm.nih.gov). Известно, что таксономическая составляющая этой базы данных не основана на специальных значительных таксономических или филогенетических работах и не поддерживается каким-либо экспертным советом со стороны специалистов по таксономии и филогении. В настоящее время из более чем 48946 наименований образцов грибных последовательностей, внесенных в NCBI на 19 февраля 2009 года, только чуть более 18000 имеют определенные видовые названия. Остальные представлены на уровне более высоких таксонов – семейств, порядков, отделов и классов. Значительная часть (около 10000) образцов вообще не имеет какого-либо определенного таксономического статуса и обозначена как неидентифицированные или некультивируемые грибы, отобранные из природной среды.

Разработанный во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН) формат базы данных по таксономическому разнообразию грибов в генетическом банке (Microsoft Office, Access 2003) позволяет оценивать степень представленности в NCBI грибных таксонов разного уровня в целом по всему царству FUNGI. Полученные результаты показали, в каких именно таксонах наибольшее количество «белых пятен», а какие из них имеют наибольший показатель по количеству представленного материала. Проведение подобного анализа имеет несомненную актуальность в связи с возросшим интересом исследователей к использованию молекулярно-биологических методов в идентификации грибов, найденных в различных природных условиях. Надежды на скорый и надежный результат при такой идентификации часто оказываются неоправданными, поскольку база данных имеющихся последовательностей еще очень далека от полного покрытия известных таксонов. Кроме того, при определении видовой принадлежности нередко ситуации, когда последовательность ДНК со стопроцентной вероятностью показывает филогенетическое родство с различными видами. Так, например, последовательность ДНК длиной 550 н.п. показала 100% идентичность для видов *Mycena plumbea* (Fr.) Sacc., *Mycena galericulata* (Scop.) Gray и 99% для *Mycena amicta* (Fr.) Qué. и *Mycena pura* (Pers.) P. Kumm. Количество вносимых данных в генбанк NCBI с каждым днем растет все быстрее, увеличивая и пестроту указанных авторами наименований исследованных образцов.

В связи с вышесказанным особое значение приобретают исследования, основанные на типовом и аутентичном/типичном материале, сохраняющемся в коллекциях и гербариях. Внесение таких данных в генетический банк NCBI позволит расширить таксономическую основу молекулярно-биологических исследований, что в свою очередь уменьшит возможный риск получения ошибочных или не совсем точных выводов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛЕТОК *HISTOPLASMA CAPSULATUM*

Ткаченко Г.А., Вьючнова Н.В., Гришина М.А., Антонов В.А., Лесовой В.С., Липницкий А.В.

ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора
Волгоград

Histoplasma capsulatum — диморфный микромицет, возбудитель тяжелого инфекционного заболевания. Разнообразие клинических проявлений наряду с отсутствием патогномичных симптомов являются причинами трудностей диагностики гистоплазмоза [Кашкин Н.П., 1978, Guimardes A.J.etal, 2006]. Для подтверждения диагноза необходима изоляция *H.capsulatum* на специфической питательной среде. Однако выделение данного микромицета связано как с трудностью и длительностью культуральных методов диагностики, так и строгого соблюдения СП 1.3.1285-03. Дрожжевая форма *H.capsulatum*, выделяемая из клинических образцов, при микроскопии трудноотличима от клеток других грибковых возбудителей [Kauffman С. А., 2007]. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет преодолеть эти трудности. Эффективность данного методического приема напрямую зависит от способа выделения ДНК из клеток. Клеточная стенка грибов состоит из нескольких слоев содержащих гликопротеины, глюканы и хитин, что определяет сложности экстракции ДНК.

Цель работы заключалась в оптимизации метода выделения ДНК из клеток *H.capsulatum*.

Объектами исследования являлись штаммы *H.capsulatum* var. *capsulatum* и *H.capsulatum* var. *duboisii*. Для получения мицелиальной фазы *H.capsulatum* высевали на агар Сабуро с последующей инкубацией при 28 °С в течение 30 суток. Конверсию мицелиальной формы в дрожжевую получали путем посева гриба на плотной питательной среде с добавлением цельной крови и L-цистеина с дальнейшей инкубацией при °С от 6 до 14 суток.

Для изучения эффективности различных методов выделения ДНК микроскопических грибов для проведения ПЦР проводили сравнительный анализ трех способов: кипячение грибных суспензий при 100⁰С в течение 30 мин, метод нуклеосорбции в присутствии гуанидинтиоцианата [Boom R. et al, 1990] и гуанидин-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом [Sandhu G.S. et al, 1995]. Эффективность методов выделения ДНК определяли по наличию специфической амплификации в пробах. Анализ продуктов ПЦР осуществляли методом гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

Из всех апробированных нами методов наиболее эффективным оказался метод гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом. Чувствительность реакции амплификации составила 1х⁴– 1х⁵ клеток/мл в зависимости от штамма.

Для оптимизации метода выделения мы использовали литические ферменты, разрушающие компоненты клеточной стенки грибов. Первоначально, использовался пищеварительный сок улитки (ПСУ) (ВолгоградНИПЧИ), как источник хитинолитических ферментов. Для определения оптимальных условий выделения ДНК к суспензии клеток *H.capsulatum* добавляли 5, 10, 20, 30 мкл ПСУ и инкубировали смесь при 37°С в течение 1, 6, 18 часов и далее выделяли ДНК методом гуанидин-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом. Использование ПСУ позволило повысить эффективность выделения ДНК из клеток *H.capsulatum* и обеспечило амплификацию специфичных фрагментов в ПЦР у большинства используемых в работе штаммов. ПСУ - фермент опытного образца, используемый для лизиса клеточной стенки грибов не стандартизирован и активность его может изменяться от серии к серии [Burik J.-A. V, 1998]. В дальнейшей работе для расщепления клеточной стенки микромицетов мы использовали коммерческий препарат «LysingEnzymesfromTrichoderma harzianum» (Sigma) обладающий целулазной, протеазной и хитиназной активностью. Фермент добавляли в концентрациях 1, 2, 3, 4 и 5 мг/мл.

Применение лизирующих ферментов из *T.harzianum* в оптимальной концентрации 2 мг/мл с инкубированием смеси 1 час при температуре 37°С позволило повысить эффективность

экстракции ДНК из клеток *H.capsulatum* и чувствительность ПЦР до 1×10^3 – 1×10^4 клеток/мл. Таким образом, для эффективного выделения ДНК из клеток *H.capsulatum* при проведении ПЦР на этапе пробоподготовки необходимо использовать литические ферменты.

ГЕНОСИСТЕМАТИКА И ПРОБЛЕМА ВИДА У ГРИБОВ

Шнырева А.В.

Кафедра микологии и альгологии МГУ имени М.В.Ломоносова

Москва

Систематика призвана изучать все многообразие живого, или биоразнообразие, во всех его проявлениях. В настоящее время при изучении биоразнообразия помимо традиционных подходов, основанных на сравнении фенотипов, объектом исследований служат *генотипы* организмов, т.е. весь комплекс генетической информации, передаваемый из поколения в поколение и реализуемый в ходе онтогенеза. Сравнение групп организмов на основе молекулярно-генетических данных дало начало развитию геносистематики. Филогения грибов долгое время основывалась на фенотипических признаках – морфологических, физиолого-биохимических, спектрах вторичных метаболитов. Геносистематика, основанная на применении молекулярных признаков, открыла новые перспективы для установления/подтверждения филогенетических связей между таксонами разных уровней. Таким образом, геносистематика (*molecular phylogenetics*) занимается изучением эволюционной истории организмов по отношению к их общим предкам на основе анализа молекулярных признаков.

Последовательности ДНК с полезной и значимой филогенетической информацией могут выступать участки генов, которые выполняют одну и ту же функцию во всех таксонах, эволюционируют приблизительно с одинаковой скоростью, и представлены в геноме единичными копиями, или ведут себя как однокопийные участки.

Большинство филогенетических анализов в царстве грибов сделано на основе кластера рибосомальных генов, обнаруженных в ядерных и митохондриальных геномах (Nilsson et al., 2008). Кластер ядерных генов рРНК представлен структурными генами большой и малой субъединиц рРНК (18S и 25S рРНК), внутренними транскрибируемыми спейсерными участками ITS и межгенными спейсерами IGS. В виду того, что накопление изменений в нуклеотидных последовательностях структурных генов и спейсерных участков происходит с различной скоростью, их можно использовать при разделении таксонов различного уровня. Структурные гены большой и малой субъединиц более консервативны, поэтому их последовательности используют для установления связей между удаленными таксономическими группами и для анализа таксонов более высокого ранга. Более переменные спейсерные области между генами субъединиц - ITS (внутренние транскрибируемые спейсеры) и межгенные спейсеры IGS используют для изучения связей между видами в пределах родов или внутривидового разнообразия (популяционный уровень). В качестве молекулярных признаков могут выступать и другие кодирующие и некодирующие последовательности в геномах, а в эру геномики - даже целые геномы. При этом всегда стоит помнить, что практически невозможно подобрать какую-нибудь определенную универсальную генную последовательность, которая позволила бы установить все таксономические и эволюционные связи организма.

Можно утверждать, что геносистематика на основе рДНК последовательностей стала стандартным методом грибной таксономии.

Однако даже анализ родства на молекулярном уровне не всегда позволяет получить однозначный ответ о видовом статусе изучаемых объектов. Это связано с тем, что помимо огромного разнообразия морфологических форм грибы демонстрируют разнообразие форм размножения/воспроизведения. Грибы из разных таксономических групп могут иметь 1/ разный ядерный статус - быть гаплоидами, диплоидами, дикарионами; 2/ разные системы размножения – от строгой агамности до панмиксиса, т.е. размножаться бесполом путем, иметь половое воспроизведение или демонстрировать смешанный тип размножения. В виду всего этого разнообразия форм и подходов к изучению биоразнообразия и возникли концепции морфологического, биологического и молекулярного вида.

Концепция *морфологического вида* основывается на традиционных фенетических подходах систематики, когда изучаются и сравниваются видимые морфологические, реже физиолого-биохимические признаки. Концепция *биологического вида* была внедрена еще Э. Майром, согласно которой *вид* – это группа свободно скрещивающихся организмов, дающих жизнеспособное потомство, и репродуктивно изолированных от других таких же групп. Если, согласно этой концепции, скрещивания между группами организмов (популяциями) затруднены или не происходят, то данные группы принадлежат различным видам. Таким образом, в основе концепции биологического вида лежит критерий скрещиваемости (или репродуктивной изоляции). Но многие грибы в ходе эволюции, сопровождаемой адаптациями к различным экологическим нишам и способу существования, утратили половой процесс или прибегают к половому воспроизведению крайне редко, например, митоспоровые (несовершенные) грибы. Это, так называемые, *агамные* виды, которые размножаются исключительно (или преимущественно) бесполом способом. Определить границы вида на основе критерия скрещиваемости для агамных видов довольно затруднительно или практически невозможно. И в этом случае деление на виды (разграничение видов) можно соотносить с уровнем накапливаемой в агамных популяциях генетической изменчивостью. Чем выше уровень изменчивости, тем в большей степени дивергировали изучаемые популяции, а, следовательно, с определенного уровня накопленной изменчивости можно говорить о существовании различных видов.

Как же происходит видообразование? Процессы видообразования сопряжены с накоплением генетической изменчивости в популяциях организмов, образующих данный вид, и последующей дифференциацией этих популяций. Собственно изучение структуры вида как совокупности популяций фактически сводится к оценке происходящих в природе процессов накопления генетической изменчивости, ее последующей дифференциации и связи с такими процессами как поток генов (миграции), генетический дрейф, рекомбинации и отбор. Естественный отбор является одним из основных факторов эволюции, который вызывает адаптивные изменения в генетической структуре вида (и популяций, образующих данный вид). Отбор – это процесс, когда различные генотипы, или правильней сказать, генетически обусловленные фенотипические варианты в пределах данного вида различаются по их вкладу в каждое последующее поколение (Endler, 1986). Наряду с отбором репродуктивная изоляция является мощным фактором дифференциации популяций при симпатрическом видообразовании. Видообразование у грибов может быть связано также с расхождением по различным экологическим нишам обитания или, как, например, у ряда фитопатогенов, со специализацией на различных растениях-хозяевах.

Молекулярные подходы геносистематики несколько облегчают задачу разделения видов. Согласно молекулярной концепции вида, группа особей, стоящая особняком на дендрограмме (филограмме), будет образовывать отдельный вид. Иными словами, группа организмов, объединившаяся в отдельный кластер на филограмме, построенной на основе молекулярных признаков, является представителем отдельного молекулярного вида. Очевидно, что молекулярные маркеры приобретают особое значение при разграничении видов грибов, размножающихся исключительно клонально (бесполом путем), то есть тогда, когда нужно определить границы видов, а установить репродуктивные барьеры невозможно. В этом случае относительно консервативные последовательности генов рДНК могут оказаться не совсем приемлемыми для установления видового статуса, и тогда на помощь могут прийти более переменные участки ДНК, например, разнообразные повторяющиеся последовательности, в том числе и минисателлитная ДНК.

Следует заметить, что биологический вид и молекулярный вид не всегда совпадают. Концепция биологического вида в некоторых случаях позволяет достоверно разграничить виды, и при этом она может поддерживаться молекулярными данными. Например, как это было продемонстрировано для видов рода *Pleurotus* в нашей лаборатории. Во многом сходные по морфологии виды *P. pulmonarius* и *P. sajor-caju* были полностью репродуктивно изолированными с высоким уровнем дифференциации по молекулярным признакам (ITS

последовательностям рДНК) (собственные данные). Гораздо сложнее удается продемонстрировать соответствие двух концепций (биологической и молекулярной) для грибов, размножающихся бесполом путем. Иногда даже использование молекулярных и мультилокусных данных оказывается проблематичным в определении видового статуса грибов. Например, при исследовании патогенных для человека дерматофитов эта проблема возникает постоянно, так как грибы-дерматофиты в основном являются агамными клональными видами и характеризуются низким уровнем генетической вариабельности при значительном фенотипическом разнообразии (например, *Trichophyton spp.*) (Jackson et al., 1999; Кас, 2000). Поэтому наряду с молекулярными признаками делить агамные виды можно по экологическим нишам, по сезонам появления, можно также разделить коротко- и долгоживущие виды.

Иными словами, задача по-прежнему состоит в поиске такой таксономической системы в концепции вида, которая позволила бы адекватно отразить эволюцию видов и основные биологические направления (тренды) этой эволюции.

В зоне внимания геносистематиков по-прежнему остаются актуальными вопросы: какие локусы (молекулярные маркеры) выбрать для филогенетических реконструкций, и в чем критерий истины? Интересным для дискуссии является также вопрос о том, послужит ли сравнение целых геномов в эпоху геномики ответом на основные вопросы геносистематики о происхождении видов и при реконструкции филогений.