

## Раздел 6

# ЦИТОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

### ГЕНЕТИКА ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В СИСТЕМЕ *HORDEUM VULGARE*/*PYRENOPHORA TERES*

Афанасенко О. С., Мироненко Н. В., Копаньке Д.  
Всероссийский НИИ защиты растений  
189600 Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3

Накопление фундаментальных знаний по генетике устойчивости растений к фитопатогенам создало предпосылку для молекулярно-генетического изучения взаимоотношений в системе хозяин-патоген. Имеются лишь единичные примеры успешного решения данной проблемы для гембиотрофных патогенов злаковых. Целью настоящего исследования было изучение генетики признака вирулентности у возбудителя сетчатой пятнистости ячменя гриба *P. teres* и генетики устойчивости 2-х образцов ячменя к этому патогену.

Анализ наследования признака устойчивости к серии штаммов гриба различного происхождения показал наличие 1 доминантного гена у сорта Харбин, эффективного против семи исследованных штаммов. Расщепление в гибридной популяции F<sub>2</sub> в от скрещивания сорта Харбин и восприимчивого сорта Пиркка соответствовало теоретически ожидаемому 3:1 (среднее по всем штаммам — 337У:102В). У образца СИ 4922 расщепление в гибридной популяции от скрещивания его с восприимчивым сортом Зазерский 85 соответствовало теоретически ожидаемому 15:1, то есть наличию двух доминантных генов устойчивости (среднее по всем штаммам 231У:11В).

Скрещивания изолятов гетероталлического гриба *P. teres* проводили по методике McDonald's (1967): смесь конидий и мицелия двух штаммов наносили на кусочки автоклавированных листьев лимона, помещенных в чашки Петри. Чашки помещали в термостат с 16 часовым фотопериодом и температурой +15°C. Зрелые перитеции между совместимыми изолятами по-

являлись через 2-4 месяца. Оценили вирулентность моноаскоспоровых изолятов высоко фертильного скрещивания (выживаемость аскоспор — 90%) изолята из Ленинградской обл. 181-6 (-) и Приморского края 8ах (+) к сортам ячменя Харбин и СИ 4922. Половина аскоспоровых изолятов имели аномальные конидии, удлиненной серповидной формы с неоткрепленным конидиеносцем. Поскольку родительские изоляты имели нормальную форму конидий, мы предположили, что один из родителей мутировал в гене, контролирующем форму конидий гриба, и для скрещивания был взят мутантный сектор колонии гриба. Признак формы конидий сегрегировал в потомстве как моногенный. Все изоляты, имеющие аномальную форму конидий, были авирулентны ко всем трем тестируемым сортам ячменя. Таким образом, очевидно, что ген, отвечающий за форму конидий и обозначенный нами как N/n, сцеплен, по крайней мере, с одним геном авирулентности гриба, что проявляется в неспособности патогена проникать в листья ячменя. На сорте Харбин наблюдали соотношение вирулентных и авирулентных изолятов как 1:1 (26:17), что свидетельствует о моногенном наследовании признака вирулентности *P. teres* к этому сорту. Расщепление по вирулентности к сорту СИ 4922 оказалось более сложным. Соотношение 37 авирулентных к 6 вирулентным изолятам идеально подходит для модели сегрегации 7:1, соответствующей наличию трех генов авирулентности. Таким образом, можно считать доказанным наличие Флоровских взаимодействий «ген на ген» в патосистеме *P. teres*/*H. vulgare*.

---

### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *TRICHODERMA HARZIANUM* В ПОЧВАХ, КОНТАМИНИРОВАННЫХ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Алимова Ф. К., Аскарлова А. Н., Киямова С. Н., Габидуллина Л. Р.  
Казанский государственный университет  
420008, Казань, Кремлевская 18, кафедра микробиологии

Биопрепарат триходермин, получаемый из пропагул гриба *Trichoderma harzianum* G-432, применяется для повышения супрессивности почв различного типа

Республики Татарстан. Разработана экологически безопасная биотехнология получения дешевого и жизнеспособного биопрепарата на отходах пищевой,

деревообрабатывающей промышленности и птицеводства.

Главной причиной, сдерживающей промышленное внедрение данного препарата, является недостаток знаний о популяционной изменчивости интродуцированного штамма в зависимости от типа экологической ниши. Показано, что в тепличной почве моноспоровый штамм *T. harzianum* G-432 расщепляется на 50-60 изолятов, обладающих различной фитотоксической и антагонистической активностью к фитопатогенам и конкурентноспособностью. В почве, загрязненной тяжелыми металлами, выявлено изменение морфологических, цитологических и физиологических свойств интродуцированного моноспорового штамма. Из почв с индексами контаминации (Ic) 13, 27 и 65 выделены изоляты триходермы, которые были разделены на три различающихся кластера. В первый отнесены изоляты с высокой стимулирующей активностью по отношению к растениям, но низкой антагонистической и конкурентной способностью. Во второй — изоляты с высокой конкурентноспособностью, антагонистической активностью и фитотоксичностью. В третий кластер помещены изоляты с промежуточными свойствами, которые представляют наибольший интерес для биотехнологии.

С целью установления генетической изменчивости моноспорового штамма в почве, загрязненной тяжелыми металлами, проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием специфических и неспецифических праймеров. Для анализа использовали ДНК, полученную из изолятов триходермы,

выделенных из почв с различными индексами контаминации тяжелыми металлами. Разработана методика эффективного выделения из пропагул *T. harzianum* нативной высокомолекулярной ДНК, пригодной для проведения ПЦР. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 6%-ном полиакриламидном геле и визуализировали окрашиванием раствором этидиум бромид или нитрата серебра.

Установлено, что интродукция моноспорового штамма в почвы, загрязненные тяжелыми металлами, приводит к изменению спектра распределения амплификатов при использовании специфических праймеров. В случае применения неспецифических праймеров к ДНК фага M13 во всех исследованных изолятах между спектрами амплификатов не было обнаружено различий.

Полученные результаты позволяют предположить генетическую изменчивость интродуцированного штамма в токсичной экологической нише. Ранее было показано, что почвы, использованные в опыте не обладали мутагенной активностью в тесте Эймса. Повидимому, высокая скорость (в течение 6 месяцев) генетического расщепления исходной однородной популяции определяется особенностями генетического аппарата гриба *T. harzianum*, а не мутагенным давлением среды. Таким образом, для повышения супрессивности почв с помощью биопрепарата в условиях перехода к биологическому земледелию необходим не только предварительный генетический анализ интродуцированного моноспорового штамма, но и постоянный контроль генетической изменчивости гриба в конкретной почве.

---

### **SINE — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ *PHYTOPHTHORA INFESTANS***

**Багирова С. Ф.**

Кафедра микологии и альгологии, МГУ  
119899, Москва, МГУ

Геномы эукариот, в том числе грибов, содержат большое число псевдогенов. Долгое время считалось, что псевдогены являются слепыми ветвями эволюции. Однако последние открытия в молекулярной биологии заставляют пересмотреть эту точку зрения. В настоящее время действие активных транспозонов и транспозонподобных элементов (TE) в геноме и, как следствие, образование псевдогенов могут считаться динамичными путями к эволюционному прогрессу, а сами TE могут рассматриваться в качестве перспективных маркеров для исследования популяционной структуры и эволюции видов.

Одними из наиболее интересных с эволюционной точки зрения TE являются *SINE* (*short interspersed elements*). Впервые в геноме представителя класса

Оомицеты, опасного фитопатогена — *Phytophthora infestans*, обнаружены TE из класса *SINE*. Эти последовательности выявлены методом ПЦР, клонированы и секвенированы. Сравнение последовательностей оомицета с данными генбанка позволило идентифицировать семейства *SINE*. Полученные результаты свидетельствуют о высокой вариабельности последовательностей у различных штаммов *P. infestans* и указывают на то, что *SINE* является хорошим кладистическим маркером. Кроме того, по всей видимости, *SINE* является источником мутаций, а следовательно перспективным инструментом изучения генома фитотрофы.

Автор благодарит проф. Ю. Т. Дьякова за внимательное отношение к теме исследования и фонд МНТЦ (грант N) за финансовую поддержку.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АЗОТНОГО ОБМЕНА У *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Багирова С. Ф.

Кафедра микологии и альгологии, МГУ

119899, Москва, МГУ

Широко распространенного и вредоносного жгутиконосца — *Phytophthora infestans*, принято считать биотрофным патогеном, мягко воздействующим на ткани хозяина. Именно с биотрофией исследователи связывали отличительные особенности азотного питания вида, а именно потерю способности усваивать неорганические формы азота (нитрат, нитрит, аммоний) и тесную связь азотного обмена хозяина и паразита. Старые популяции фитотрофы были представлены практически исключительно ауксотрофными мутантами, дефицитными по азоту. Такие штаммы получали органические формы азота прежде всего из растения, что обуславливало значительную зависимость патогена от растения.

Однако новые штаммы фитотрофы, появившиеся в Европе в 80-х годах, отличались от старых по ряду фенотипических признаков, особенностям жизненного цикла и патогенеза. Исследованные нами штаммы, как

оказалось, утилизируют те или иные формы неорганического азота, а изученные популяции различаются по частоте встречаемости определенных ауксотрофных мутантов. Наибольшее число штаммов, способных усваивать неорганический азот, были найдены в популяциях, паразитирующих на томате. Опыты по сращиванию колоний различных мутантов показали, что мутации могут компенсироваться, а штаммы обладают различным сродством мицелиев. Таким образом, ауксотрофные мутанты фитотрофы были впервые использованы для изучения вегетативной несоместимости, а также популяционной структуры вида. Результаты исследования различных аспектов азотного питания фитотрофы дополняют современные представления о биологии вида и его взаимосвязи с растением-хозяином.

Работа была выполнена при финансовой поддержке МНТЦ (грант N)

## ПРИОНЫ ДРОЖЖЕЙ

Инге-Вечтомов С. Г.

Кафедра генетики и селекции С.-Петербургского государственного университета, 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9

Прионы — инфекционные белки, ответственные за передачу ряда нейродегенеративных заболеваний млекопитающих. Предшественником прионов служит нормальный клеточный белок нервной системы, претерпевающий конформационное превращение, которое поддерживается далее автокаталитически. Неясными остаются как функция этого белка, так и механизм его превращения в прион.

Прионоподобные факторы описаны также у низших грибов, прежде всего у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Несмотря на то, что они не имеют ничего общего по первичной структуре и выполняемым функциям с прионами млекопитающих, их общие характеристики имеют большое сходство. Прионы дрожжей ведут себя как цитоплазматические наследственные детерминанты белковой природы. Этот факт приобретает особое значение на фоне всеобщего увлечения геномикой. Лучше всего охарактеризована система: фактор [PSI] — ген *SUP35*, кодирующий фактор терминации трансляции eRF3.

В настоящее время можно выделить несколько последовательных стадий в процессе образования и последующего «размножения» приона [PSI], которые могут быть маркированы генетически и биохимически:

Инициация → коприон (гетероприон) → гомоприон → рост → размножение (деление).

Этап инициации, т. е. первичного конформационного превращения клеточного белка в новую форму, способную к последующей олигомеризации, изучен хуже всего. Считается, что инициация происходит без

изменения первичной структуры белка.

Представление о существовании коприона основывается на том, что предсуществующий (или появившийся) в клетке прион превращает вновь синтезируемые гомологичные по первичной структуре полипептиды в свое конформационное подобие. Этот процесс требует физического взаимодействия двух типов молекул в составе коприона.

Гетероприон представляет собой олигомер, растущий за счет по меньшей мере двух типов прионизующихся молекул, которые могут иметь как одинаковые, так и различные по первичной структуре участки.

Коприон и гетероприон могут переходить (а могут и не переходить) в состояние гомоприона, когда олигомеры состоят только из одинаковых прионизованных молекул.

Рост гетероприона и гомоприона может сопровождаться отделением меньших по молекулярной массе фрагментов, или «семян», которые попадают в дочерние клетки. В этом заключается процесс размножения приона.

Можно предполагать, что прионизация представляет собой побочный результат выполнения нормальных функций клеточным белком. Потенциальная способность к прионизации отражена в первичной структуре некоторых белков. Кроме того, прионное превращение конкретного белка может быть частным проявлением более общего процесса — каскада, или цепной реакции прионизации, отражающего взаимодействие белков в составе протеома.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ КАРИОЛОГИЯ ШТАММОВ *AGARICUS BISPORUS* (LANGE) IMBACH С РАЗНЫМИ ТИПАМИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА

Камзолкина О. В., Волкова В. Н., Козлова М. В., Дьяков Ю. Т.

Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова  
119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ

Проведено сравнительное изучение процесса морфогенеза базидий и спорогенеза, а так же поведения ядер в вегетативном мицелии у трех штаммов шампиньона, имеющих разные типы жизненного цикла, с использованием методов световой микроскопии. В работе использовались следующие культурные и дикорастущие штаммы: псевдогомоталличный Bs26 (принадлежит к разновидности *Agaricus bisporus* var. *bisporus*), гетероталличный Bs94 (принадлежит к разновидности *Agaricus bisporus* var. *burnettii* Kerrigan et Callac) и первичногомоталличный Bs423 (принадлежит к разновидности *Agaricus bisporus* var. *eurotetrasporus* Callac & Guinbertau).

Количество ядер в вегетативном мицелии варьировало от 1 до 8 на клетку, хотя большинство клеток содержали по 3-4 ядра. Были отмечены амитотические деления ядер и миграция ядер через долипоровую септу.

Проведены морфометрические измерения базидий и ядерного аппарата в процессе мейоза (окрашивание по методу Фельген и ДАПИ, причем метод Фельгена был модифицирован специально для нашего объекта). У всех штаммов обнаружены все стадии мейоза и прослежен процесс морфогенеза базидий в отношении их роста, изменения положения ядер и вакуолей. Наблюдалось шесть типов ориентации веретена деле-

ния во втором делении мейоза, из них два обнаружены впервые. Показаны:

- несинхронность 1-го и 2-го делений мейоза;
- несинхронность прохождения постмейотических ядер в стеригмы;
- добавочный митоз ядер в базидиях.

Электронномикроскопическое изучение ядерного аппарата базидий (ТЕМ) позволило обнаружить у всех штаммов синаптонемные комплексы (СК), характерные для профазы первого деления мейоза. Причем для штаммов, имеющих гетероталличный и первичногомоталличный типы жизненного цикла, СК обнаружен впервые. Таким образом, у штамма с первичногомоталличным типом жизненного цикла впервые подтверждено наличие мейотического деления в базидиях. Возможно, мейоз сохранился у него как остаточное явление, т. к. гомомиксис (мейоз, проходящий после слияния генетически однородных ядер) не приводит к возникновению новых генотипов.

На основе полученных нами данных была предпринята попытка восстановить последовательность основных этапов в жизненных циклах трех исследованных штаммов шампиньона.

Работа финансировалась при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ); номер проекта 00-04-48080.

## ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ И БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ *BGL2* И *CHS3* *S. CEREVISIAE* И *PMT1* *H. POLYMORPHA*.

Карпова Е. В., Лауринавичюте Д. К., Соколов С. С.,

\*Агафонов М. О., Калебина Т. С.

МГУ имени М. В. Ломоносова, кафедра молекулярной биологии  
11989, Москва, Воробьевы Горы

1 Российский Кардиологический Научно-Производственный Комплекс МЗ РФ  
3-я Черепковская ул. 15А, Москва, 121552

*Saccharomyces cerevisiae* и *Hansenula polymorpha* являются аскомицетными дрожжами, клеточная стенка которых состоит из глюкана, хитина и маннопротеинов. Эти виды дрожжей, однако, являются довольно удаленными друг от друга филогенетически. Предварительные результаты позволяют предполагать, что *S. cerevisiae* и *H. polymorpha* по составу и строению клеточной стенки отличаются друг от друга. С другой стороны, эти организмы удобны для молекулярно-генетических манипуляций. Сказанное дает возможность использовать их в качестве удобной экспериментальной модели для изучения эволюционного консерватизма роли разных компонентов клеточной стенки. Данная работа посвящена электронно-микроскопическому и биохимическому изучению полученных нами

ранее штаммов *S. cerevisiae* с мутацией в гене *BGL2* (кодирует глюкантрансферазу) и с двойной мутацией в генах *BGL2* и *CHS3* (кодирует хитиназу), а также *H. polymorpha* с мутацией в гене *PMT1* (кодирует О-маннозилтрансферазу). Выявлены и частично проанализированы нарушения в структуре клеточной стенки штаммов, лишенных данных белков. Для штаммов с нарушенными генами *BGL2* и *CHS3* сделано предположение о существовании механизма, позволяющего клетке компенсировать указанные нарушения. Проведенная работа позволяет лучше понять связи между отдельными структурными элементами в молекулярном ансамбле клеточной стенки дрожжей.

Работа поддержана грантами РФФИ № 00-04-48356 и 00-15-97851.

## ВЫЯВЛЕНИЕ И СИКВЕНИРОВАНИЕ КОРОТКОГО ФРАГМЕНТА ВНУТРИ SINE В ГЕНОМЕ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Лаерова О. И.

Биологический факультет МГУ имени Ломоносова  
119899, Москва, МГУ, Воробьевы горы, д. 1, к. 12, Биологический факультет

Короткие диспергированные элементы (SINEs), или, как их иначе называют — короткие ретропозоны, представляют собой рассеянные по геному повторяющиеся последовательности длиной 80–400 п. н., амплификация которых происходит с участием обратной транскрипции. Число копий обычно варьирует от 1000 до 100000 штук на геном, причем один вид может иметь более одного семейства SINE в своем геноме. Копии SINEs, принадлежащих к одному семейству, отличаются друг от друга 5–15 % нуклеотидных пар. Большинство коротких ретропозонов транскрибируется РНК полимеразой III и их 5' концевая часть обладает гомологией с некоторыми видами тРНК. Такие ретропозоны называют тРНКродственными; предполагают, что они произошли из молекул тРНК или их генов.

Было установлено, что SINEs могут служить генетическими маркерами, позволяющими получать надежную информацию о филогенезе таксономических групп среднего уровня — семейств и отрядов (Shimamura et al. 1997; Serdobova, Kramerov 1998). Есть данные и о внутривидовой дифференциации по SINE различных популяций. Использование этого подхода, как и изучение природы самих ретропозонов, требует выделения новых семейств SINEs.

Известно, что SINEs, как и гены тРНК, содержат внутри своей последовательности промотор РНК полимеразы III, состоящей из двух частей — боксов А и В, расстояние между которыми составляет 33–40 пар нуклеотидов. Недавно разработанный метод детекции SINE в геноме различных организмов (О. Borodulina,

D. Kramerov 1999) основывается на полимеразной цепной реакции (ПЦР), где матрицей служит геномная ДНК, а праймерами — олигонуклеотиды, соответствующие консенсусам боксов А и В. В результате такой реакции, названной (А-В) ПЦР, происходит амплификация участка SINEs, расположенного между боксами А и В. Амплифицированный фрагмент ДНК (размером примерно 45–60 пар нуклеотидов) может быть клонирован и сиквенирован, а главное — может быть использован в качестве гибридационного зонда при скрининге соответствующей геномной библиотеки с целью выделения полноразмерных копий SINEs.

Праймеры А-В бокса являются универсальными для многих организмов (О. Borodulina, D. Kramerov 1999). Эти праймеры были также использованы нами для выявления SINEs в геноме *P. infestans*. Таким образом было выявлено, клонировано и сиквенировано восемь копий (консенсусов) различного размера (от 45 до 51 пар нуклеотидов) короткого фрагмента А-В бокса ретропозона SINE в геноме *P. infestans*. В данный момент ведется работа по выявлению полноразмерной копии SINE (до 400 пар нуклеотидов) в геноме *P. infestans* с помощью изученного короткого фрагмента А-В бокса SINE. Также у всех восьми консенсусов ПЦР-продукта А-В бокса отмечена консервативная последовательность, включающая В бокс, протяженностью 24 нуклеотида. На основе этой последовательности был сконструирован 24-нуклеотидный праймер, направленный от конца В бокса к А боксу. В данный момент ведется работа по дифференциации изолятов коллекции *P. infestans* с помощью данного праймера.

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЯДЕР В ВЕГЕТАТИВНЫХ И РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУРАХ *ALTERNARIA TENUISSIMA* И РОЗОВОГО МУТАНТНОГО ШТАММА ИЗ РОДА *ALTERNARIA*

Левкина Л. М., Логунова Т. В.

МГУ, Биологический факультет, кафедра Микологии и альгологии  
119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, Биологический факультет

Род *Alternaria* отличается большой изменчивостью. Наблюдается нестабильность в искусственной культуре и широкая амплитуда естественной изменчивости, что затрудняет определение вида у этих грибов.

Настоящая работа посвящена исследованию ядерного аппарата *A. tenuissima* (Fr.) Wiltsh. и мутантного штамма нежно-розового цвета морфологически близкого к *A. tenuissima*.

Оба гриба были выделены из почвы. Мутантный штамм имел блок в синтезе меланина и отличался непрочностью клеточных оболочек конидий, которые легко разваливались под тяжестью покровного стекла.

Окраску 3–7 дневного материала проводили по методу HCL-Гимза и Фельгина.

Вегетативный мицелий *A. tenuissima* состоял из одноядерных (50%), двуядерных (37%), трехядерных (10%), четырехядерных (3%) и пятиядерных (1%) клеток. Вегетативный мицелий мутантного штамма состоял в основном из одноядерных клеток (90%). Двух- и многоядерные клетки встречались крайне редко.

Установлена корреляция между размером клетки и количеством находящихся в ней ядер.

Наличие анастомозов в вегетативных гифах, по которым отмечен переход ядер, указывает на возможность гетерокариоза у *A. tenuissima* и розового мутантного штамма.

В молодой зачаток конидиеносца *A. tenuissima* и мутантного штамма переходит одно ядро.

Конидии этих грибов формируются из апикальных

клеток конидиеносца, которые, как правило, содержат одно ядро. Материнское ядро делится и одно из дочерних ядер переходит в молодую конидию. Следо-

вательно, все ядра многоклеточной конидии — гомокариотичны, что указывает на неустойчивое состояние гетерокариона в клетках этих грибов.

### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОФАЗЫ I МЕЙОЗА В РАСПЛАСТАННЫХ ПРОТОПЛАСТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ БАЗИДИЙ КУЛЬТИВИРУЕМОГО ШАМПИНЬОНА

**Мажейка И. С., Коломиец О. Л.**

Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова  
119899, Москва, Воробьевы горы, Биологический ф-т  
Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН  
119991, Москва, ул. Губкина д. 3

Метод распластывания мейотических ядер разработан Кунс и Мейер (Counse&Meyer, 1973). Суть метода заключается в распластывании хроматина на поверхности мениска гипотонического раствора. На полученных таким образом препаратах удается одновременно наблюдать все синаптомные комплексы (СК) мейотических хромосом. СК — это специфическая нуклеопротеидная структура, которая формируется в профазе I мейоза эукариот в процессе синапсиса гомологичных хромосом. СК состоит из двух линейных боковых элементов, каждый из которых объединяет две сестринские хроматиды, и центрального «скрепляющего» элемента. Показано, что целостность структуры СК сохраняется после процедур выделения и распластывания ядер. Метод нашел широкое применение в цитогенетике. Однако в микологии метод распластывания применен только для исследования мейоза нескольких видов дрожжей.

Нами предложена собственная модификация метода получения тотальных препаратов СК для *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. Мейоз у шампиньона протекает в базидиях, которые находятся в гимении плодовых тел и имеют клеточную стенку. Поэтому первым шагом получения препаратов СК является процедура выделения протопластов из базидий. Выявлены пики распределения стадий мейоза на разных этапах развития плодового тела. Пик выхода клеток на стадии пахитены наблюдается через несколько часов после вскрытия частного покрывала. Для выделения протопластов мы использовали известные методики, в основе которых лежит лизис клеточной стенки с помощью комбинации литических ферментов. Измельченные пластинки инкубировали 40 мин при 30° в р-ре

Na-малеатного буфера с осмотическим регулятором 0.35 М КСl, с добавлением литического фермента из *Trichoderma harzianum*, хитиназы и целлюлазы — 2 мг/мл, 1.1 мг/мл и 20 мг/мл, соответственно, и 10 мМ ЭДТА. Выход протопластов достигал 2x10<sup>6</sup> клеток на мл из 0.5–2 г свежих пластинок в 0.1 мл конечной суспензии. Суспензию протопластов фильтровали, отмывали и добавляли в конечную суспензию ФМСФ. Оптимальными условиями распластывания протопластов оказались условия, предложенные Лойдл (Loidl et al. 1991). Контрастирование осуществляли по собственной методике — готовили 70% раствор AgNO<sub>3</sub> в слабом растворе азотной кислоты (рН 3,5). 100 мкл AgNO<sub>3</sub> наносили на препарат, накрывали покровным стеклом, смазанным по краю резиновым клеем и выдерживали 4 ч при 60° во влажной камере. Распластаные клетки искали на препаратах под световым микроскопом, вырезали кружки пластика, с прикрепленными к нему клетками, алмазным метчиком и переносили их на сеточки. Электронно-микроскопические исследования проводили в просвечивающем микроскопе JEM 100B. Нам удалось получить препараты на стадиях лептотены — диплотены. Под электронным микроскопом на стадии лептотены — зиготены выявлены осевые элементы хромосом, на стадии пахитены — СК, в той или иной степени замаскированные хроматином, а также ядрышко, полярные тельца веретена и хромоцентры.

Разработанная нами методика может быть применена для изучения профазы I мейоза шампиньона, СК-кариотипирования, сравнения разных штаммов и форм этого гриба.

Работа поддержана грантом РФФИ N 00-04-48080

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА Puccinia graminis Pers.

**Малеева Ю. В., Лебедева Л. А., Инсарова И. Д., Лекомцева С. Н.**  
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова  
Биологический факультет  
119899, Москва, МГУ

Популяции ржавчинных грибов традиционно характеризуются полиморфностью признаков авирулентности/вирулентности по многим локусам. Во многих странах мира проводится поиск эффективных путей использования расоспецифичной устойчивости для ограничения развития гриба на культурных видах рас-

тений. В тоже время сведений о вирулентности и авирулентности явно недостаточно для того, чтобы судить о генетических процессах в природных популяциях патогенов. В этой ситуации молекулярные маркеры и биохимические признаки, наряду с физиологическими и морфологическими характеристиками, обеспечи-

вают комплексное изучение внутривидового полиморфизма организмов с относительно бедной морфологией. Целью нашей работы была разработка молекулярных подходов для анализа внутривидовой изменчивости возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы — *P. graminis Pers. f. sp. tritici* на коллекционном материале спор гриба из 10-ти регионов бывшего СССР.

Для характеристики исследуемых образцов по признакам вирулентности/авирулентности вы использовали международный набор из 16-ти изогенных линий пшеницы. Наибольшее число генов вирулентности (10) было выявлено в образцах из Московской области, Краснодарского и Алтайского краев. Наименьшее (3-5) — из Челябинской обл., Таджикистана и Кустанайской обл.

Изоферментный анализ показал, что все географические изоляты были мономорфны по глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназе. Полиморфизм был отмечен по малатдегидрогеназной активности. Причем, образцы из Краснодарского края, Московской, Челябинской, Кустанайской областей и Киргизии были гомозиготными, а из Владимирской обл., Алтайского края, Туркмении и Таджикистана — гетерозиготными. Фракция с ЭФП-0,22 по малатдегидрогеназе была выяв-

лена и ранее (Burdon et al., 1985, Лекомцева и др., 1996), что позволяет более строго утверждать о наличии этого аллеля у *P. graminis*. Метод определения ферментативной активности в экстрактах листьев пшеницы с пустулами гриба и незараженными растениями в качестве контроля оказался достаточно эффективным и надежным.

Результаты кластерного анализа по данным RAPD-PCR с использованием праймеров RP3 и Co9e и в основном совпадают с дендрограммой по генам вирулентности.

Можно говорить об определенном сходстве изолятов из предгорий Средней Азии и Кавказа и широтном переносе спор с Запада. Анализ отклонений от случайного объединения пар генотипов (по Tibayrenc et al., 1991) в выборках из Краснодарского края и Владимирской обл., полученных при размножении сборных споровых образцов на восприимчивом сорте, показал наличие рекомбинации в обоих выборках. В качестве контролей мы оценивали неравновесие по сцеплению для фрагментов из одного и того же RAPD-паттерна, где неслучайность статистически достоверна.

*Работа поддержана грантом РФФИ № 01-04-48126а.*

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *VERTICILLIUM LECANII*

*Митина Г. В., Юли-Маттила Т.*

*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений  
196602, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3*

Энтомопатогенный гриб *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas является перспективным микробиологическим агентом для контроля вредных насекомых; в России препарат вертициллин на основе спор гриба разрешен для применения в теплицах для защиты овощных культур. Микозы белокрылок, тлей и коцид (Homoptera) хорошо изучены (Евляхова 1939, Hall 1976, 1981). Согласно современным представлениям *V. lecanii* является комплексным видом, включающим отдельные таксоны, с различными молекулярными профилями (Steenberg & Nummer 1999). Классические морфологические методы часто являются недостаточными для идентификации вида и дифференциации штаммов, а также для контроля за штаммами, интродуцированными в природу.

В работе были изучены 17 изолятов *V. lecanii*, выделенных главным образом из сосущих вредителей (белокрылки, тли) и собранных в различных географических зонах бывшего Советского Союза. Изоляты проявляли большое разнообразие морфологических и биохимических признаков. Целью работы являлось изучение генетического разнообразия природных изолятов *V. lecanii* методами случайных праймеров (RAPD-PCR) (Williams et al. 1990) и универсальных праймеров (UP-PCR) (Bulat et al. 1992, 1998) и его сравнение с вирулентностью и с происхождением изолятов. В качестве случайных и универсальных праймеров были использованы праймеры, успешно применяемые ра-

нее для дифференциации штаммов фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum* и антагониста *Gliocladium* (Yli-Mattila et al 1996, 1997, Paavananen-Huhtala et al 1999, 2000).

RAPD-PCR и UP-PCR отдельно и комбинация результатов обоих методов позволили дифференцировать все изученные изоляты *V. lecanii*. Изучались только воспроизводимые штаммовые различия. Филогенетические деревья (NJ и NJ-cosensus tree) определили группы природных изолятов, таких как «южные» *V. lecanii* штаммы и изоляты из Центральной России (Московская область), что соответствовало их географическому происхождению. Деления штаммов на группы по хозяевам или по вирулентности не было получено. Амплификация рибосомальных регионов (ITS и IGS) была успешной только в случае IGS. Это может быть связано с отдельными точечными мутациями в 28S rDNA регионе. Анализ IGS-сиквенсов обнаружил штаммовые специфические различия. Эти результаты подтвердили результаты, полученные при анализе филогенетических деревьев. Таким образом, IGS-сиквенсы могут быть использованы для изучения генетического разнообразия *V. lecanii*. Найденные штаммоспецифические RAPD-PCR маркеры позволяют осуществлять контроль за штаммами, интродуцированными в природу.

*Работа поддержана грантом Академии наук Финляндии (N34375) и Университетом г. Турку.*

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДА *PICHIA/HANSENULA ANOMALA*, БИОКОНТРОЛИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ АНТАГОНИСТОВ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Наумов Г. И., Наумова Е. С., Шнюпер И.

ГосНИИгенетика

113545, Москва, 1-Дорожный проезд, д. 1

Шведский университет сельскохозяйственных наук  
Швеция, Упсала

В последние годы генофонд дрожжей, используемых в прикладных разработках, постоянно расширяется. Начинают использовать и нетрадиционные несакхаромицетные дрожжи, способные синтезировать разнообразные физиологически активные биопрепараты. Дрожжи *Pichia anomala* (синоним *Hansenula anomala*), обладающие биоконтролирующими свойствами, являются антагонистами грибов, вызывающих порчу пищевых и кормовых продуктов (Petersson et al., 1999). Эти дрожжи продуцируют киллерные токсины (микоцины) широкого спектра действия (Rosini, 1983, 1985; Вустин и др., 1989; Walker et al., 1995). Однако генетически эти дрожжи практически не исследованы.

Проведено молекулярно-генетическое изучение дрожжей *P. anomala*. Скрининг коллекционных штаммов показал, что эти дрожжи являются довольно трудным объектом для генетических исследований. Штаммы имели низкую фертильность, плохо спорулировали и проявляли слабую активность типов спаривания. Большинство проанализированных гибридов оказались полиплоидными, вероятно тетраплоидными, о чем свидетельствовало расщепление контрольных

ауксотрофных маркеров. Тем не менее, некоторые микоспорные культуры изученных штаммов образовывали диплоидные гибриды с нормальным мейотическим расщеплением контрольных ауксотрофных маркеров. Как правило, изоляты *P. anomala* были гомоталлическими с задержанной самодиплоидизацией. Выявлены редкие стабильные гетероталлические штаммы *P. anomala*. Молекулярный анализ генома дрожжей *P. anomala* выявил большую гетерогенность указанных дрожжей по числу хромосом (от 9 до 12) и их размерам. Обнаруженный полиморфизм кариотипов не связан с происхождением штаммов (источником и местом выделения). Подобраны неспецифичные праймеры, позволяющие дифференцировать изученные дрожжи на видовом и штаммовом уровнях. Рекомендовано использовать праймер M13 для идентификации штаммов вида *P. anomala*. Способность неспецифичных праймеров генотипировать отдельные изоляты перспективна в плане дальнейших исследований по обнаружению специфических молекулярных маркеров для проведения мониторинга биоконтролирующих дрожжей *P. anomala*.

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ШТАММОВ *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* ИЗ МЕРЗЛЫХ ГРУНТОВ СИБИРИ

Петровская Л. Е., Топорова В. А., \*Иванушкина Н. Е.,  
\*Кочкина Г. А., Гиличинский Д. А.

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова  
117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения  
Пушино, Московской области

Штаммы *Penicillium chrysogenum* 778 и 799 выделены из образцов мерзлых грунтов, имеющих возраст 5-10 тысяч и 1,8-3 миллионов лет соответственно. Для обнаружения наиболее вариабельных участков генома мы провели амплификацию методом ПЦР и секвенирование фрагментов рДНК и митохондриальной ДНК этих штаммов. Это исследование показало, что традиционно используемые для определения видовой принадлежности ITS2 и D2 участки кластера генов рДНК, а также последовательности спейсера, соединяющего

гены АТР6 и SSU митохондриальной ДНК, обоих штаммов не отличаются по нуклеотидной последовательности. В то же время, последовательности 5' концевых участков межгенных спейсеров рДНК сильно варьируют, что открывает возможность их применения для изучения внутривидовой генетической изменчивости *Penicillium chrysogenum*.

Работа проводится при частичной финансовой поддержке РФФИ, грант 01-05-65043-а.

## ТИПЫ ПОЛОВОЙ РЕКОМБИНАЦИИ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ВЕШЕНКИ УСТРИЧНОЙ, *PLEUROTUS OSTREATUS*

Шнырева А. В., Штаер О. В.

Кафедра микологии и альгологии, Московский госуниверситет имени М. В. Ломоносова.  
119899, г. Москва, Воробьевы горы, МГУ, биологический факультет.

Вешенка устричная, *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm., из класса базидиальных грибов в природе формирует панмиксные популяции вследствие гибридизации

гаплоидного потомства, гетероаллельного по двум локусам спаривания со множественными аллелями. Подобная тетраполярная система размножения обеспечи-



вает высокую степень панмиксиса в природных популяциях, хотя и предусматривает 25%-ный потенциал инбридинга. В лабораторных условиях показано, что формирование фертильных дикарионов может происходить как вследствие слияния монокариотических мицелиев (*мон-мон-кроссы*), так и вследствие дикариотизации монокариотического штамма дикариотическим мицелием (*ди-мон-кроссы*). В последнем случае необходимо, чтобы хотя бы одно ядро дикариона содержало факторы спаривания, гетероаллельные факторам спаривания монокариотического партнера. В связи со сложностью обнаружения почти нет сообщений о встречаемости ди-мон-скрещиваний в природе.

Анализируя распределение факторов типов спаривания в локальных популяциях вешенки, была обнаружена возможность слияния гиф между дикариотическим фертильным мицелием, способным формировать плодовые тела, и монокариотическим мицелием, берущим начало от проросшей базидиоспоры (т. е. ди-мон-кроссы). Чтобы продемонстрировать ди-мон-скрещивания в природе, провели анализ факторов спаривания (половой совместимости) у дикариотических штаммов, выделенных из плодовых тел в пределах одного сростка и на одном субстрате (бревне). Все они оказались вегетативно совместимыми, т. е.

принадлежали одному клону: сформировались на едином дикариотическом вегетативном мицелии. Анализ изозимных спектров (по 14 локусам) также продемонстрировал их полную генетическую идентичность. Вегетативно совместимые штаммы-клоны лишь незначительно отличались по RAPD-маркерам. Однако анализ аллелей локусов спаривания у этих штаммов обнаружил как полностью генетически идентичные особи в пределах сростка (демонстрирующие 25%-ную половую совместимость), так и отличающиеся одним из двух факторов спаривания (А или В) и дающие 75% совместимых реакций.

Таким образом, наряду с традиционной мейотической рекомбинацией, происходящей при созревании базидиоспор и приводящей к случайному распределению аллелей локусов спаривания, в природных популяциях вешенки происходит, хотя и редко, рекомбинация локусов спаривания в ди-мон-кроссах, приводящая к наличию в одном мицелии трех генетически различных типов ядер, случайно попарно комбинирующихся в клетках разных плодовых тел.

Будут представлены подробные данные генетического анализа распределения факторов типов спаривания в природных популяциях гриба.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 01-04-49447.*

## ТРАНСПОЗОНЫ КАК ФАКТОРЫ РАЗЛИЧНЫХ ПЕРЕСТРОЕК И МОДИФИКАЦИЙ В ГЕНОМАХ ГРИБОВ

*Шнырева А. В.*

*Кафедра микологии и альгологии МГУ имени М. В. Ломоносова  
119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, биологический факультет*

Мобильные генетические элементы, транспозоны, — это последовательности ДНК, способные вырезаться и автономно перемещаться в новые участки в геноме. За последние пятнадцать лет транспозоны обнаружены у большого числа исследованных видов грибов из разных таксономических групп, и этот список постоянно пополняется. Вероятно, можно утверждать, что подобные мобильные элементы являются непременным атрибутом любого грибного генома. Как и у других эукариот, транспозоны грибов принадлежат двум классам, принципиально различающихся между собой как структурой, так и механизмами их передачи (транскрипции). Передача транспозонов класса I осуществляется через РНК-посредника с участием ферментов интеграции — обратных транскриптаз:

ДНК → РНК → ДНК. Транспозоны класса II характеризуются совершенно противоположным механизмом передачи, а именно, непосредственной транспозицией с ДНК → ДНК, что обеспечивается ферментами транспозазами, кодируемыми самими транспозонами. Показано, что концевые (терминальные) повторы, фланкирующие транспозонную последовательность (длинные прямые LTRs — у транспозонов класса I, и короткие инвертированные ITRs — у транспозонов класса II), — функционально значимы и принимают непосредственное участие в передаче транспозонов в новые сайты, являясь своеобразными мише-

нями интеграции. Наличие у вновь перемещенных копий транспозонов дубликаций ДНК в участках интеграции, расположенных в концевых повторах, свидетельствует в пользу выше упомянутых механизмов интеграции в отличие от обычной рекомбинации.

Первоначальные представления о транспозонах были как о некоей «паразитической» ДНК; сейчас же исследователи склонны думать о них как о движущем факторе эволюции. В докладе будут представлены подробные характеристики некоторых транспозонов, обсуждены вопросы, связанные с возможной ролью транспозонов в процессах патогенеза, в регуляции процессов половой совместимости, высказаны предположения о факторах, индуцирующих транспозиции в геномах. На конкретных примерах будут рассмотрены возможные модификации и перестройки геномов грибов, связанные с транспозициями мобильных генетических элементов:

— хромосомные перестройки (делеции, дубликации, инверсии, транслокации) благодаря гомологичной рекомбинации между членами из одного семейства транспозонов;

— изменение экспрессии генов: интеграция транспозонов в структурные или промоторные области чаще блокирует экспрессию генов, но также может изменять механизм регуляции гена.

— амплификация ДНК-последовательностей с образованием псевдогенов.