

УДК 57.065,582.282.192.3

Филогенетический анализ и молекулярное типирование трихотеценпродуцирующих грибов рода *Fusarium* из российских коллекций

А. А. Стахеев^{1*}, Л. В. Самохвалова¹, О. Д. Микитюк², С. К. Завриев¹¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, 143050, Московская обл., Одинцовский р-н, р.п. Большие Вяземы, ул. Институт, влад. 5

*E-mail: Stakheev.aa@gmail.com

Поступила в редакцию 26.04.2017

Принята к печати 27.03.2018

РЕФЕРАТ Проведен трехлокусный филогенетический анализ штаммов грибов рода *Fusarium*, депонированных во всероссийских коллекциях и предположительно способных к синтезу микотоксинов трихотеценовой группы. Исследован меж- и внутривидовой полиморфизм фрагментов гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (*TEF1α*) и двух генов, входящих в трихотеценовый кластер – *TRI5* и *TRI14*. Анализ 60 штаммов различного происхождения позволил подтвердить и уточнить таксономическую характеристику некоторых штаммов с помощью ДНК-маркеров. Впервые на территории России идентифицирован штамм *F. commune* (F-900), а также выявлен штамм (F-846), филогенетически отличный от любого из охарактеризованных на данный момент видов *Fusarium*. Также показано, что штаммы *F. equiseti* из северо-западных регионов России относятся к североευропейской (I) группе, а северокавказский изолят – к южноевропейской (II). Частичные последовательности гена *TRI14* 9 из 12 исследованных видов охарактеризованы впервые. Сравнительный анализ выявил относительно высокий уровень внутривидового полиморфизма этих последовательностей, в частности у видов *F. graminearum* и *F. sporotrichioides*, однако не обнаружено какой-либо связи между различиями в структуре гена *TRI14* и географическим происхождением либо хемотипом штаммов. С помощью двух систем праймеров проведено молекулярное типирование штаммов-продуцентов трихотеценов типа В, позволившее охарактеризовать их специфические хемотипы. Принадлежность большинства исследованных штаммов к определенному хемотипу подтверждена методом ВЭЖХ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК-маркеры, идентификация, род *Fusarium*, трихотеценовые микотоксины, филогенетический анализ, хемотип.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТрМТ – трихотеценовые микотоксины; *TEF1α* – ген фактора элонгации трансляции 1 альфа; *TRI5* – ген триходииенсинтетазы.

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Fusarium*, относящегося к классу аскомицетов, занимают разнообразные экологические ниши и встречаются в различных климатических поясах. На территории России виды *Fusarium* распространены во всех регионах, в которых выращивают сельскохозяйственные культуры, в первую очередь злаки. Этот гриб причиняет существенный ущерб сельскохозяйственной и пищевой промышленности, исчисляемый сотнями миллионов долларов ежегодно. Кроме того, микотоксины, продуцируемые представителями рода *Fusarium*, представляют угрозу здоровью человека и животных, а также действуют

как факторы патогенности по отношению к растениям [1].

Наиболее обширной группой токсических метаболитов, продуцируемых грибами рода *Fusarium*, являются трихотеценовые микотоксины (ТрМТ). Трихотеценовые микотоксины продуцируются не только представителями рода *Fusarium*, но и родов *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys* [2]. На сегодняшний день выявлено около 200 трихотеценовых токсинов [3–6]. ТрМТ представляют собой сесквитерпеновые соединения, состоящие из трех колец, у которых при атомах С-12–С-13 находится эпоксидное кольцо,

а при С-9–С-10 – двойная связь, поэтому группа носит название 12,13-эпокситрихотец-9-ены. В зависимости от структуры боковых групп трихотеценовые токсины делятся на четыре типа (А–D), при этом лишь А и В продуцируются грибами рода *Fusarium*. К более токсичным представителям трихотеценов типа А относятся диацетоксисцирпенол (ДАС), а также токсины Т-2 и НТ-2, а основными продуцентами этих токсинов являются *F. sporotrichioides* и *F. langsethiae*. В 2015–2016 гг. была описана новая группа трихотеценовых токсинов типа А, получившая название NX [7, 8]. Интересно, что эти соединения идентифицированы в культурах *F. graminearum*, традиционного продуцента ТрМТ В-типа. Тип В представлен такими соединениями, как ниваленол (НИВ), дезоксиниваленол (ДОН), а также их ацетилированными производными (3- и 15-АДОН и 4,15-АНИВ), которые продуцируются *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, а также группой видов, известной под названием *F. graminearum* species complex (FGSC) [9, 10]. Кроме того, *F. poae*, *F. venenatum* и *F. equiseti* способны продуцировать токсины, относящиеся как к А-, так и к В-типам [11]. Тип токсинов, продуцируемых тем или иным штаммом, определяется структурой и функциями генов, входящих в состав трихотеценового кластера [12, 13]. У большинства трихотеценообразующих видов *Fusarium* в состав основного кластера входят 12 генов, кодирующих как ферменты, ответственные за различные этапы биосинтеза, так и регуляторные факторы, некоторые из которых контролируют экспрессию большого числа генов, связанных с различными аспектами метаболизма и жизнедеятельности грибов [14]. Трихотеценовые токсины ингибируют синтез белка у эукариот [15], а такие трихотецены, как ДОН, представляют собой важные факторы агрессивности, способствуя распространению гриба по тканям растения-хозяина. Показано, что искусственная инокуляция колоса злаков мутантными штаммами *F. graminearum*, у которых нарушен синтез ДОН, приводила к поражению меньшего количества зерновок, чем инокуляция штаммами дикого типа [16].

Опасность, которую представляют грибы рода *Fusarium* и продуцируемые ими микотоксины, делает необходимой разработку методов быстрого и надежного определения видовой принадлежности штаммов, что позволит определять спектр соединений, накапливающихся в культуре или партии зерна. На сегодняшний день важную роль в таксономических исследованиях рода *Fusarium* и идентификации его представителей играют методы, основанные на анализе полиморфизма ДНК. Применение молекулярно-генетического подхода позволило более

четко установить стандарты и границы видов, а также охарактеризовать целый ряд новых таксонов. В частности, мультилокусный филогенетический анализ с использованием ДНК-маркеров с охарактеризованной последовательностью нуклеотидов (SCAR-маркеры [17]) на основе 13 генов «домашнего хозяйства» позволил выявить 9 новых видов в составе FGSC [10], который ранее считался единым видом *F. graminearum*. Чуть позднее этот комплекс был дополнен также видами *F. vorosii* и *F. gerlachii* [18]. Всего в составе комплекса FGSC выделяют 16 филогенетических видов [19]. Применение филогенетического подхода дало возможность подтвердить статус *F. pseudograminearum* и *F. culmorum* как самостоятельных видов [20, 21]. На территории России с помощью анализа полиморфных ДНК-маркеров идентифицированы группы штаммов, впоследствии охарактеризованные как два новых вида – *F. ussuriicum*, морфологически и фенотипически сходный с *F. graminearum* [22], и *F. sibiricum*, близкородственный *F. sporotrichioides* [23]. Ряд недавних филогенетических исследований позволил установить сложную структуру комплекса видов *F. equiseti*–*F. incarnatum* (FIESC) и выделить в его составе несколько новых видов [24]. Кроме того, изучение меж- и внутривидового полиморфизма ДНК позволило разработать ряд высокоспецифичных систем диагностики и идентификации основных возбудителей фузариоза, прежде всего, основанных на ПЦР и ее модификациях [25–29]. Применение современных молекулярно-биологических и биоинформатических методов, в том числе полногеномного секвенирования [30, 31], существенно ускорило изучение генетического разнообразия рода *Fusarium* и функциональную характеристику элементов геномов, однако поиск эффективных методов молекулярного маркирования и информативных ДНК-баркодов остается по-прежнему актуальным [32, 33].

Род *Fusarium* отличается от большинства других таксонов царства Грибы (Fungi). «Золотым стандартом» молекулярной таксономии грибов считается область внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомной ДНК (*ITS*) [34]. Однако в геноме представителей рода *Fusarium* эти маркеры представлены двумя неортологичными копиями и не обладают достаточным уровнем межвидового полиморфизма [35]. На сегодняшний день в филогенетических и таксономических исследованиях в качестве маркера наиболее часто используется ген *TEF1α* [36, 37]. Интересным представляется использование в качестве филогенетических маркеров генов, вовлеченных в биосинтез микотоксинов. Так, ген, кодирующий триходиенсинтетазу (*TRI5*), ранее использовали для разработки систем видоспеци-

фичных праймеров [38] и изучения внутривидового полиморфизма представителей комплекса видов *F. equiseti* [39, 40]. Однако филогенетические характеристики гена *TRI5* не сравнивали с характеристиками «классических» маркеров, таких, как *TEF1α*. Среди других генов, входящих в состав трихотецевого кластера и применяемых в филогенетических исследованиях, необходимо отметить *TRI1*, кодирующий цитохром-Р450-монооксигеназу, и *TRI12*, кодирующий белок, участвующий в транспорте токсинов из клетки [41]. Филогенетический анализ гена *TRI1* позволил идентифицировать группу штаммов *F. graminearum*, обладающих способностью к синтезу токсина NX-2 [7]. Полиморфизм гена *TRI12* использовали для дизайна праймеров, выявляющих штаммы-продуценты ТрМТ типа В в соответствии с их хемотипом (3/15-АДОН, НИВ) [42]. В состав трихотецевого кластера входит также ряд генов, практически не охарактеризованных ни структурно, ни функционально, таких, как *TRI9* и *TRI14* [43].

Содержащиеся во всероссийских коллекциях штаммы *Fusarium*, потенциально способные к синтезу ТрМТ и представляющие различные климатогеографические зоны России, практически не охарактеризованы молекулярно-генетическими методами. Поэтому основными целями нашей работы были: (1) анализ корректности таксономической идентификации трихотеценпродуцирующих штаммов *Fusarium*, депонированных во всероссийских коллекциях, с помощью SCAR-маркеров; (2) изучение молекулярно-генетического разнообразия штаммов различного географического происхождения, выделенных в разные годы и из разных источников; (3) определение меж- и внутривидового полиморфизма гена *TRI14*, одного из наименее изученных генов трихотецевого кластера; (4) определение хемотипов штаммов-продуцентов ТрМТ типа В с помощью известных систем праймеров, с подтверждением полученных результатов методом ВЭЖХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы грибов

В работе анализировали 60 штаммов 12 видов грибов рода *Fusarium*, депонированных во всероссийских коллекциях и предположительно обладающих способностью к биосинтезу ТрМТ. При выборе штаммов исходили из максимального охвата различных природно-географических зон России. Кроме того, в исследование были включены штаммы из ряда сопредельных государств, а также из Молдовы и Германии. Кроме того, изучен штамм *F. graminearum* F-892 (ВКПМ), депонированный в базе данных StrainInfo (<http://www.straininfo.net>)

под номером АТСС 36015. Перечень штаммов с указанием их географического происхождения, видов растений-хозяев, годами сбора и принадлежности к той или иной коллекции приведен в табл. 1. Дополнительно с помощью лабораторного микроскопа МИКМЕД 6 («Ломо», Россия) определяли морфологические характеристики ряда штаммов, первоначальная идентификация которых не подтверждалась молекулярными методами. Для проведения микроскопического анализа штаммы грибов выращивали в течение 10–14 сут на гвоздично-листовом агаре (ГЛА) и синтетической среде Ниренберга (SNA).

Выделение ДНК

Перед выделением ДНК моноспоровые культуры грибов выращивали на картофельно-сахарозном агаре (КСА) в течение 10 сут при комнатной температуре до получения обильного мицелия. ДНК из моноспоровых культур грибов выделяли с помощью метода, основанного на использовании цетилтриметиламмоний бромида в качестве детергента, с учетом модификаций, описанных нами ранее [28]. Концентрацию образцов ДНК и их чистоту оценивали с помощью спектрофотометра NanoVue (GE HealthCare, США).

Дизайн универсальных праймеров, проведение ПЦР, секвенирование

Для амплификации частичных последовательностей генов *TEF1α*, *TRI5* и *TRI14* сконструированы пары праймеров TEF50F (5'-CGACTCTGGCAAGTCGACCAC-3') и TEF590R (5'-CTCGGCTTTGAGCTTGTCAAG-3'); TRI5F (5'-ACACTGGTTCTGGACGACAGCA-3') и TRI5R (5'-CCATCCAGTTCTCCATCTGAG-3'); TRI14F (5'-GAAGCTGCCTCGACATGGCTC-3') и TRI14R (5'-AATAATATTATGGGAACAATCAT-3').

Праймеры подбирали с использованием алгоритма ClustalW [44]. Физико-химические свойства праймеров оценивали с помощью программы Oligo 6.71.

ПЦР проводили с использованием следующих программ амплификации.

Праймеры TEF50F-590R: 93°C, 90 с; 93°C, 20 с; 64°C, 5 с; 67°C, 5 с (5 циклов); 93°C, 1 с; 64°C, 5 с; 67°C, 5 с (40 циклов).

Праймеры TRI5F-R и TRI14F-R: 93°C, 90 с; 93°C, 10 с; 55°C, 15 с; 72°C, 10 с (40 циклов).

ПЦР и электрофоретический анализ проводили согласно [27, 28].

Продукты ПЦР клонировали с использованием системы InstA Clone PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва) в соответствии с протоколом производителя. ДНК секвенировали в ЗАО «Евроген» с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye

Таблица 1. Штаммы грибов рода *Fusarium*, использованные в работе

№	№ коллекции	Вид	Происхождение	Источник	Год выделения
1	М-99-43*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	1999
2	09-1/7*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	2009
3	М-99-9*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	1999
4	М-10-1*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	2010
5	BR-03-19*	<i>F. culmorum</i>	Брянская обл.	Пшеница	2003
6	BR-0453*	<i>F. culmorum</i>	Брянская обл.	Пшеница	2004
7	OM-0233*	<i>F. culmorum</i>	Омская обл.	Пшеница	2002
8	OR-02-37*	<i>F. culmorum</i>	Орловская обл.	Пшеница	2002
9	CM-9864*	<i>F. culmorum</i>	Смоленская обл.	Пшеница	1998
10	KP-1136-66*	<i>F. culmorum</i>	Кировская обл.	Пшеница	1995
11	KP-1599-25/3*	<i>F. culmorum</i>	Кировская обл.	Пшеница	1996
12	KS-1384-1*	<i>F. culmorum</i>	Кировская обл.	Пшеница	2007
13	М-05-111*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	2005
14	КС-1716-8*	<i>F. culmorum</i>	Кировская обл.	Пшеница	1997
15	58801**	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	2004
16	Kz-27*	<i>F. culmorum</i>	Костанайская обл., Казахстан	Неизвестно	2014
17	74007**	<i>F. culmorum</i>	Архангельская обл.	Картофель	Неизвестно
18	58030**	<i>F. culmorum</i>	Ростовская обл.	Бодяк	2004
19	70505**	<i>F. culmorum</i>	Беларусь	Пшеница	2003
20	50106**	<i>F. culmorum</i>	Ленинградская обл.	Бодяк	2006
21	64722**	<i>F. cerealis</i>	Хабаровский край	Пшеница	2006
22	39295**	<i>F. cerealis</i>	Провинция Хэйлуцзян, Китай	Пшеница	2003
23	37032**	<i>F. cerealis</i>	Провинция Хэйлуцзян, Китай	Пшеница	2003
24	39142**	<i>F. cerealis</i>	Провинция Хэйлуцзян, Китай	Пшеница	2003
25	37031**	<i>F. cerealis</i>	Провинция Хэйлуцзян, Китай	Пшеница	2003
26	41727**	<i>F. cerealis</i>	Северная Осетия	Бодяк	2004
27	G.8-8**	<i>F. graminearum</i>	Германия	Пшеница	1998
28	41806**	<i>F. graminearum</i>	Северная Осетия	Пшеница	2004
29	48702**	<i>F. graminearum</i>	Тульская обл.	Пшеница	Неизвестно
30	58033**	<i>F. graminearum</i>	Ленинградская обл.	Пшеница	2002
31	70725**	<i>F. graminearum</i>	Орловская обл.	Пшеница	2006
32	58212**	<i>F. ussurianum</i> ¹	Приморский край	Пшеница	Неизвестно
33	29813**	<i>F. ussurianum</i>	Еврейская АО	Пшеница	2002
34	MM-7*	<i>F. sporotrichioides</i>	Московская обл.	Пшеница	2010
35	KG-9744*	<i>F. sporotrichioides</i>	Кировская обл.	Пшеница	Неизвестно
36	78105**	<i>F. sporotrichioides</i>	Орловская обл.	Пшеница	2006
37	SK-1506*	<i>F. sporotrichioides</i>	Северная Осетия	Пшеница	2010
38	64706**	<i>F. sporotrichioides</i>	Приморский край	Ячмень	2006
39	33100**	<i>F. sporotrichioides</i>	Приморский край	Пшеница	2003
40	74006**	<i>F. sporotrichioides</i>	Ленинградская обл.	Ячмень	2006
41	11007**	<i>F. sibiricum</i>	Красноярский край	Ячмень	2000
42	11014**	<i>F. sibiricum</i>	Амурская обл.	Овёс	2001
43	55201**	<i>F. langsethiae</i>	Калининградская обл.	Овёс	2005
44	82901**	<i>F. langsethiae</i>	Орловская обл.	Овёс	2003
45	47401**	<i>F. poae</i>	Московская обл.	Пшеница	2004
46	61701**	<i>F. poae</i>	Саратовская обл.	Пшеница	2005
47	58242**	<i>F. venenatum</i>	Германия	Неизвестно	Неизвестно
48	58514**	<i>F. venenatum</i>	Ленинградская обл.	Овёс	2013
49	58455**	<i>F. venenatum</i>	Новгородская обл.	Пшеница	2001
50	F-842***	<i>F. sambucinum</i>	Киевская обл., Украина	Картофель	1965
51	F-3966***	<i>F. sambucinum</i> ²	Тульская обл.	Почва	2006
52	F-4360***	<i>F. sambucinum</i> ²	Бурятия	Древесина	2005
53	64414**	<i>F. equiseti</i>	Калининградская обл.	Ячмень	2006
54	65901**	<i>F. equiseti</i>	Ленинградская обл.	Ячмень	2006
55	97001**	<i>F. equiseti</i>	Северная Осетия	Пшеница	2007
56	F-3549***	<i>F. equiseti</i> ²	Пустыня Негев, Израиль	Почва	1995
57	F-2681***	<i>F. incarnatum</i>	Московская обл.	Неизвестно	1966
58	F-846***	<i>F. sp.</i> ³	Молдова	Дыня	1958
59	F-892 (ATCC36015)****	<i>F. graminearum</i>	США	Неизвестно	1977
60	F-900****	<i>F. sambucinum</i> ²	Красноярский край	Лиственница сиб.	Неизвестно

* Штаммы из коллекции ВНИИФ; ** штаммы из коллекции ВИЗР; *** штаммы из коллекции ИБФМ; **** штаммы из коллекции ГосНИИГенетика.

¹ Первоначально идентифицирован как *F. graminearum*.

² В ходе работы видовая принадлежность не подтвердилась.

³ Первоначально идентифицирован как *F. poae*.

Terminator v. 3.1. с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Охарактеризованные в настоящей работе последовательности нуклеотидов депонированы в GenBank NCBI под номерами: MG989711-989751 (*TEF1α*), MN001611-001651 (*TRI5*), MN001652-001692 (*TRI14*).

Филогенетический анализ

ДНК-маркеры с охарактеризованной последовательностью нуклеотидов сравнивали с последовательностями, депонированными в базах данных GenBank NCBI и Fusarium MLST (<http://www.westerdijkinstituut.nl/fusarium/>) с помощью алгоритма BLAST. Построение филогенетических деревьев проводили с использованием метода максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и модели нуклеотидных замен GTR+G (General Time Reversible, с гамма-распределением) [45] в программе MEGA5.1 [46]. Помимо исследуемых штаммов в филогенетическом анализе использовали ряд последовательностей соответствующих генов типовых штаммов из международных коллекций, депонированных в базах данных. Достоверность топологий филогенетических деревьев подтверждали с помощью бутстреп-анализа с 1000 повторностей. Инсерции и делеции при проведении анализа не учитывали. Количество переменных, филогенетически информативных нуклеотидов и гаплотипов для каждого маркера вычисляли, используя выборку из 41 штамма в программе DnaSP v6 [47].

Молекулярное типирование продуцентов ТрМТ типа В

С целью определения хемотипов продуцентов ТрМТ типа В анализировали штаммы *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. ussuriarum*. Хемотип-специфичную ПЦР проводили с использованием трех наборов праймеров: два набора праймеров на полиморфные участки гена *TRI12* [42] (набор обозначен нами как 12-1), [48] (12-2), а также пара праймеров, амплифицирующая фрагменты последовательности гена *TRI13* разной длины в зависимости от хемотипа [49] (13-1). Структура праймеров и температура их плавления приведены в табл. 2. При этом в случае системы 12-2 анализ решено проводить с каждой парой праймеров отдельно, а не в формате мультиплексной ПЦР [48], что позволит повысить специфичность анализа, а также избежать образования неспецифических ампликонов.

Полученные результаты подтверждали с помощью количественной ПЦР (кПЦР) с парами праймеров из систем 12-1 и 12-2. В состав реакционной смеси, помимо стандартных компонентов, добавляли по 1.5 мкл 20× красителя EvaGreen (Biotium, США). Амплификацию и детекцию флуоресцентного сигнала проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Результаты ПЦР выражали в значении пороговых циклов (quantification cycle, C_q , [50]). Анализ каждого образца проводили в двух независимых повторностях.

Таблица 2. Праймеры, использованные для хемотипирования штаммов, продуцирующих ТрМТ типа В

Набор праймеров	Структура праймеров	Длина продукта, п.н.	$T_{пл}$, °C	Хемотип	Ссылка
12-1	12CON (унив.): 5'-CATGAGCATGGTGATGTC-3'				[48]
	12 NF: 5'-TCTCCTCGTTGTATCTGG-3'	840	60	НИВ	
	12-15F: 5'-TACAGCGGTCGCAACTTC-3'	670	60	15-АДОН	
	12-3F: 5'-CTTTGGCAAGCCCGTGCA-3'	410	60	3-АДОН	
12-2	3ADONf: 5'-AACATGATCGGTGAGGTATCGA-3' 3ADONr: 5'-CCATGGCGCTGGGAGTT-3'	60	60	3-АДОН	[42]
	15ADONf: 5'-GTTTCGATATTCATTGGAAAGCTAC-3' 15ADONr: 5'-CAAATAAGTATCGTCTGAAATTGGAAA-5'	57	60	15-АДОН	
	NIVf: 5'-GCCCATATTCGCGACAATGT-5' NIVr: 5'-GGCGAAGTATGAGTAACAAAACC-3'	77	60	НИВ	
	Tri13P1: 5'-CTCSACCGCATCGAAGASTCTC-3' Tri13P2: 5'-GAASGTCGCARGACCTTGTTTC-3'	859 644 583	62	15-АДОН 3-АДОН НИВ	
13-1				[49]	

Примечание: унив. – универсальный праймер.

Анализ токсинообразования штаммов-продуцентов ТрМТ типа В методом ВЭЖХ

Для определения типа ТрМТ, продуцируемых исследуемыми штаммами, культуры грибов выращивали на жидкой среде MYRO [51] при 25°C, 220 об/мин в течение 5 сут. Способность изолятов продуцировать ДОН и его моноацетилированные производные определяли, анализируя отделенный от мицелия центрифугированием супернатант культурального фильтрата, с помощью жидкостной хроматографии высокого давления с обращенной фазой [52, 53]. Аликвоту супернатанта культуральной жидкости объемом 8 мл разбавляли смесью ацетонитрил : вода (1 : 1) до 10 мл, пропускали через мембранный фильтр Millipore с диаметром пор 0.22 мкм и вводили 10 мкл образца в инжектор жидкостного хроматографа Waters 1525 Breeze, снабженного УФ-детектором Waters 2487 (Waters, США). Разделение проводили на колонке Symmetry C18 (150 × 4.6 мм), которую термостатировали при 27°C. Микотоксины элюировали смесью ацетонитрил : метанол : вода (1 : 1 : 8 об/об/об – подвижная фаза) со скоростью потока 0.5 мл/мин и детектировали при 254 нм. В качестве стандартов использовали коммерческие препараты ДОН, 3-АцДОН и 15-АцДОН (Sigma-Aldrich, США), а в качестве контроля – фильтрат неинокулированной среды MYRO, которую инкубировали одновременно с выращиванием погруженных культур грибов в указанных выше условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Филогенетические свойства генов, анализ их частичных последовательностей с помощью алгоритма BLAST, микроскопический анализ морфологии штаммов со спорной идентификацией

Основные филогенетические свойства анализируемых генов приведены в табл. 3. ДНК всех штаммов при амплификации с парой праймеров 50F-590R образовывала единственный продукт амплификации размером от 452 до 483 п.о., содержащего два интрона

длиной от 80 до 100 и от 236 до 254 п.н. За вычетом инсерций и делеций, не учитываемых при оценке филогенетических свойств, длина анализируемых последовательностей составила 392 п.н., включая 129 (32.9%) вариабельных нуклеотидов. Число филогенетически информативных позиций – 115 (29.3%), число гаплотипов – 17. Анализ последовательностей гена *TEF1α* с применением алгоритма BLAST подтвердил первоначальную видовую идентификацию 54 штаммов. Из шести штаммов, идентификация которых не была подтверждена, три были изначально охарактеризованы как *F. sambucinum*. Показано, что последовательности *TEF1α* штаммов F-3966 (№ 51, см. табл. 1), NRRL 52726, относящегося к комплексу *F. tricinctum* species, и NRRL 52727 (*F. avenaceum*), сходны на 99.3%. Сходство штамма F-4360 (№ 52) со штаммом *F. acuminatum* NRRL 52789 составляет 99.545%. Последовательность гена *TEF1α* штамма F-900 (№ 60) на 100% сходна с последовательностью фрагмента этого гена штамма NRRL 52764 *F. commune*. Не подтверждена первоначальная видовая принадлежность штамма F-3549 (№ 56), морфологически идентифицированного как *F. equiseti*: BLAST-анализ выявил 99% сходство с последовательностью штамма NRRL 34033 относительно редкого вида *F. brachygibbosum*. Штамм 58212 (№ 32), первоначально идентифицированный как *F. graminearum*, показал 100% сходство последовательности *TEF1α* со штаммами CBS 123751-123745, типовыми для *F. ussurianum*. Наиболее интересный результат получен при анализе результатов секвенирования маркерной последовательности штамма F-846, первоначально идентифицированного как *F. roae*. Сравнение с последовательностями *TEF1α* типовых штаммов, депонированными в базах данных, не выявило 100% сходства ни с одной из них. Наиболее близкой была последовательность штамма F-0016 вида *F. polyphialidicum* (DQ295144, сходство 97%).

Пара праймеров TRI5F-R обеспечивала амплификацию ДНК всех исследуемых штаммов, за исклю-

Таблица 3. Филогенетические характеристики анализируемых последовательностей нуклеотидов

Локус	ДП, п.н.	GC, %	ВП, %	ФИП, %	Число ГТ	H _d	P _i
<i>TEF1α</i>	392	53.2	32.9	29.3	17	0.933	0.08872
<i>TRI5</i>	379	48.5	37.2	36.1	13	0.907	0.13586
<i>TRI14</i>	650	49.1	36.8	34.5	23	0.96	0.13510
<i>TEF1α + TRI5 + TRI14</i>	1421	50	35.9	33.5	28	0.976	0.1233

Примечание. ДП – длины анализируемых последовательностей, GC – GC-состав, ВП – вариабельные позиции (variable sites), ФИП – филогенетически информативные позиции (parsimony informative sites), ГТ – гаплотипы, H_d – гаплотипическое разнообразие, P_i – нуклеотидное разнообразие.

чением № 51, 52, 56 и 60. Продукт амплификации гена *TRI5* длиной 431–440 п.н. содержал один интрон длиной 52–61 п.н. Длина анализируемых последовательностей составила 379 п.н., в том числе 141 (37.2%) вариабельная позиция и 137 (36.1%) филогенетически информативных, число гаплотипов – 13. Анализ последовательностей с помощью BLAST подтвердил корректность видовой идентификации 54 штаммов. Продукт амплификации ДНК штамма 58212 показал 99% сходство с последовательностью фрагмента гена *TRI5 F. asiaticum* (штаммы NRRL 26156, 28720). Необходимо отметить, что ни одна из баз данных не содержала записей о полных или частичных структурах этого гена у штаммов *F. ussurianum*, однако, принимая во внимание близкое родство *F. asiaticum* и *F. ussurianum* [7], этот результат представляется достоверным. Продукт амплификации ДНК штамма F-846 был на 98% сходным с частичной последовательностью гена *TRI5* штамма *F. langsethiae* KF2640 (JF966259).

При проведении ПЦР с парой праймеров TRI14F-R не были выявлены продукты амплификации ДНК образцов № 51, 52, 56, 60 (как и в случае пары TRI5F-R), а также № 58 (F-846). ДНК остальных штаммов амплифицировалась с образованием продуктов размером от 698 до 705 п.н., содержащих один интрон длиной от 50 до 59 п.н. Длина анализируемой последовательности (без учета вставок и делеций) составила 650 п.н., из которых 239 (36.8%) вариабельные, а 224 (34.5%) – филогенетически информативные, число гаплотипов – 23. Поиск сходных последовательностей в базах данных GenBank и Fusarium MLST показал, что исследованные штаммы *F. graminearum* составляют две группы: первая, в которую входят № 30 и 58, показала 100% сходство с последовательностью *TRI14* штамма CBS 138562 (KU572434.1), в то время как вторая (№ 27–29, 31) полностью идентична последовательности штамма CBS 138561 (KU572429.1), при этом сходство последовательностей в этих двух группах составляло 97%.

Проведен микроскопический анализ основных морфологических структур штаммов, первоначальная идентификация которых не была подтверждена при анализе маркерных последовательностей. У штаммов F-3966 и F-4360, растущих на ГЛЖ, выявлены удлинённые изогнутые макроконидии с тремя-четырьмя перегородками, характерными для *F. avenaceum*, *F. tricinctum* и *F. acuminatum* [54]. Штамм F-900 также формировал изогнутые макроконидии с четырьмя перегородками и микроконидии овальной формы размером порядка 10 мкм – признаки, соответствующие характеристикам вида *F. commune* [55]. У штамма F-846 обнаружены толстостенные микроконидии с четырьмя-пятью перегородками, а также

овальные и булавовидные микроконидии. Этот результат подтверждает предположение об ошибочности первоначальной идентификации штамма как *F. roae*, поскольку для этого вида характерны шаровидные или остроконечные микроконидии, а также редко формирующиеся макроконидии, как правило, с тремя перегородками [54].

Анализ топологии филогенетических деревьев

Филогенетические деревья, построенные на основе структур трех изучаемых генов, имели как сходство, так и ряд существенных топологических различий. На дендрограмме гена *TEF1α* (рис. 1) присутствуют четыре крупных кластера, поддержанных высокими значениями бутстрепа (98–99%). Каждый кластер включал штаммы видов, характеризующихся сходными спектрами продуцируемых микотоксинов. Кластер I (бутстреп-поддержка 98%) представлен видами, продуцирующими ТрМТ типа В (в том числе *F. pseudograminearum* CBS109954, номер КМ434220), кластер II (99%) сформирован продуцентами ТрМТ типа А, кластер III (98%) представлен видами, образующими оба типа ТрМТ, а кластер IV (99%) – видами *F. equiseti* и *F. incarnatum*, также способными продуцировать токсины как типа А, так и В, однако, в отличие от *F. roae* и близкородственных видов, они обладают также способностью к синтезу зеараленона и некоторых других микотоксинов. Необходимо отметить, что кластеры I–III и IV формировали отдельные группы, поддержанные высокими значениями бутстрепа (99%), а «*F. sp.*» (штамм F-846 *Fusarium sp.*) занимал промежуточное положение между этими двумя группами. Кластеры I и II включали в себя по две подгруппы: первую подгруппу кластера I (поддержка 99%) составили штаммы видов *F. culmorum* и *F. cerealis*, а вторую (98%) – *F. graminearum* и *F. ussurianum*. В кластере II подгруппы были представлены видами *F. langsethiae* и *F. sporotrichioides/F. sibiricum* (бутстреп-поддержка по 99% каждая). Наиболее неоднородным был кластер IV, представленный видами *F. equiseti* и *F. incarnatum*. Два типовых штамма *F. incarnatum* (NRRL 22244 и NRRL 34059) формировали отдельную группу, поддержанную значением бутстрепа 59%, в которую, однако, не вошел штамм F-2681, исследованный в настоящей работе. Штамм *F. equiseti* 97001 сформировал подгруппу (90%) вместе со штаммами H2-2-5B (JF496575) и 10393 (LN901566), а штаммы 65901 и 64414 вошли в состав другой подгруппы (99%), куда также входили штаммы VI01095 (AJ543560), VI01070 (AJ543562) и 10675 (LN901573).

Бутстреп-поддержка основных кластеров, соответствующих токсигенным профилям исследуемых видов, на дендрограмме гена *TRI5* (рис. 2) состав-

Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения частичных последовательностей нуклеотидов гена *TEF1α* видов-продуцентов ТрМТ с помощью метода максимального правдоподобия (74 последовательности). Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей. В анализ включена 21 последовательность типовых штаммов, депонированных в GenBank NCBI

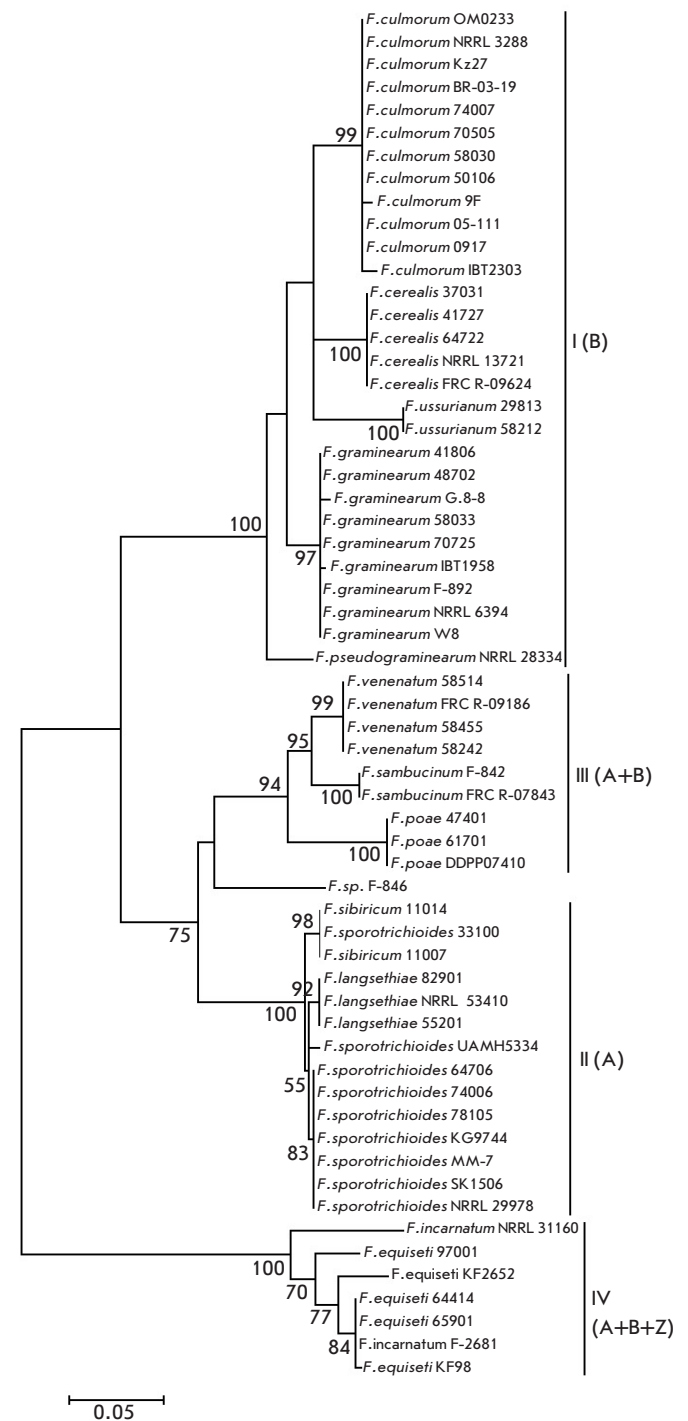
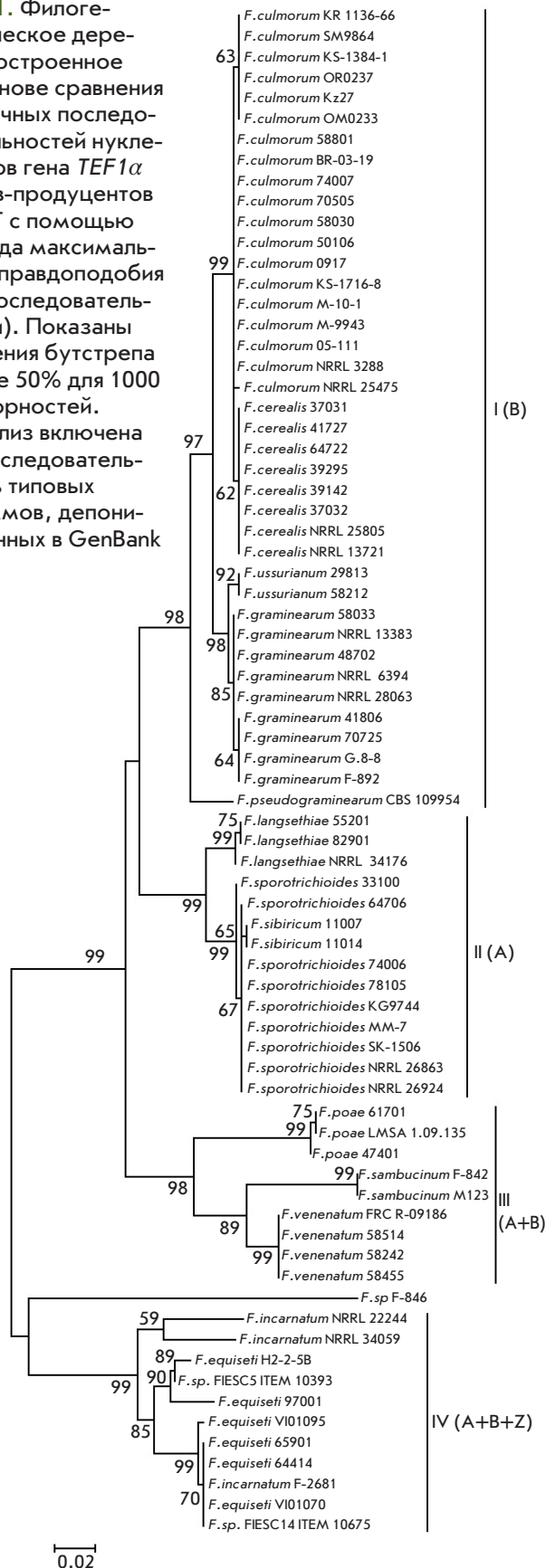


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения частичных последовательностей нуклеотидов гена *TR15* видов-продуцентов ТрМТ с помощью метода максимального правдоподобия (60 последовательностей). Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей. В анализ включены 18 последовательности типовых штаммов, депонированных в GenBank NCBI

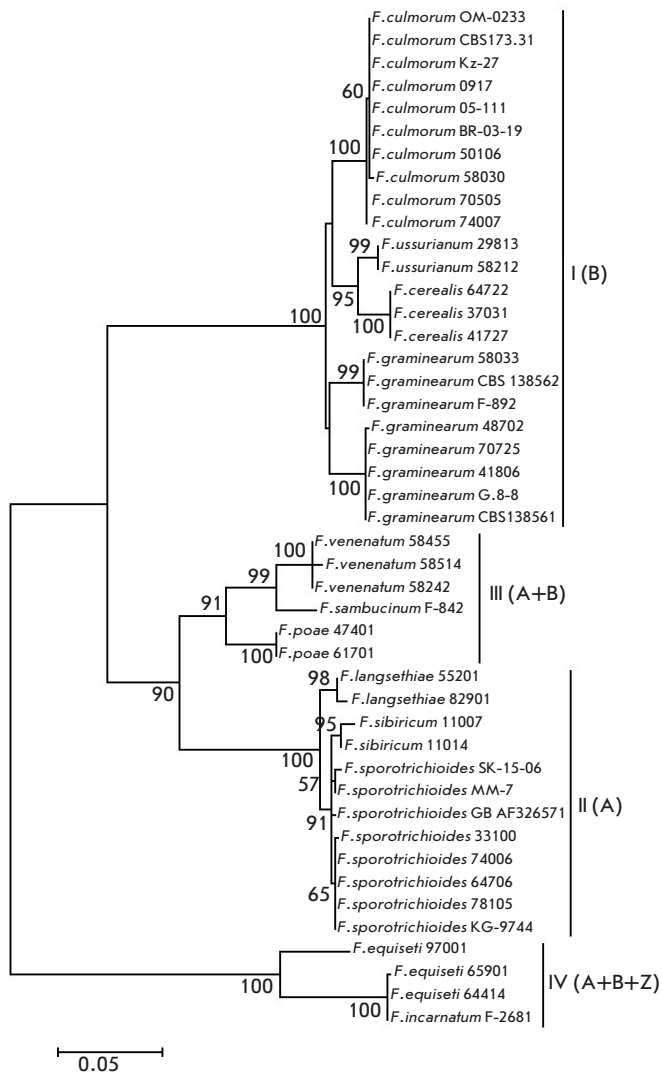


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения частичных последовательностей нуклеотидов гена *TR114* видов-продуцентов ТрМТ с помощью метода максимального правдоподобия (45 последовательностей). Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей. В анализ включены четыре последовательности типовых штаммов, депонированных в GenBank NCBI

ляла от 94 (кластер III) до 100% (кластеры I, II, IV). В отличие от дендрограммы гена *TEF1α*, «*F. sp.*» занимал промежуточное положение между кластерами II и III. Кроме того, штаммы *F. sporotrichioides* не формировали единой группы, а были распределены по кластеру II, в частности, штамм 33100 оказался в одной подгруппе со штаммами *F. sibiricum* (поддержка 98%). В составе кластера I отсутствовала подгруппа *F. graminearum-ussurianum*, характерная для дендрограммы *TEF1α*. На филогенетическом дереве гена *TR114* (рис. 3) штаммы *F. ussurianum* сфор-

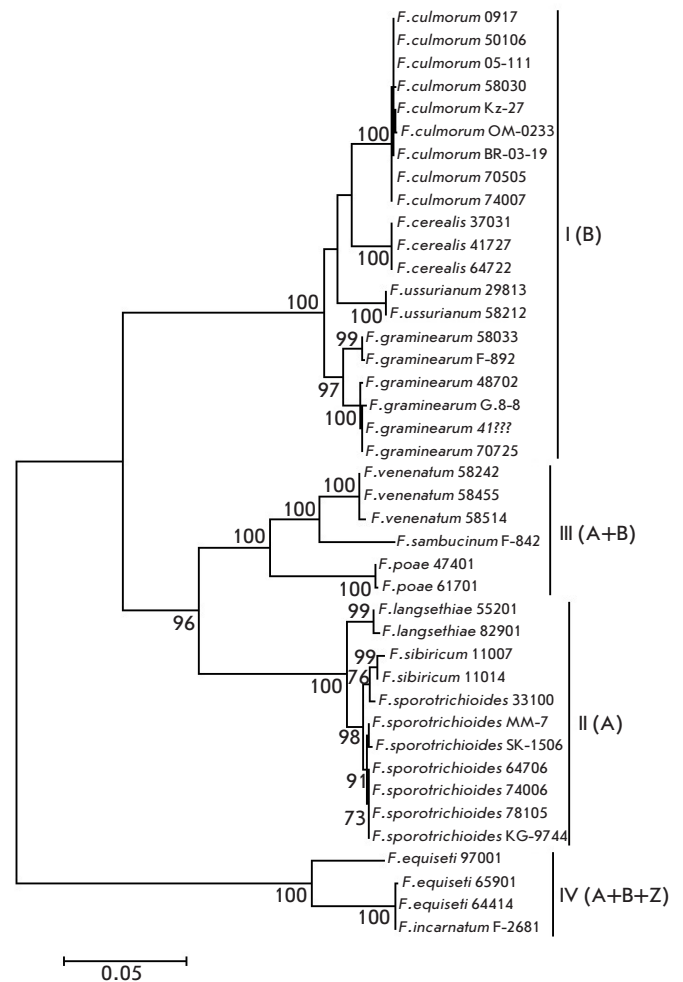


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения комбинированной последовательности нуклеотидов генов *TEF1α+TR15+TR114* видов-продуцентов ТрМТ с помощью метода максимального правдоподобия (41 последовательность). Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей

мировали подгруппу со штаммами *F. cerealis* (бутстреп-поддержка 95%), в то время как штаммы *F. graminearum* разделились на две подгруппы, поддержанные значениями бутстрепа 99 и 100%. В состав кластера II входят подгруппы *F. langsethiae* (98%) и *F. sporotrichioides/sibiricum* (91%); таким образом, топология этого кластера на дендрограмме *TR114* соответствовала скорее топологии дендрограммы *TEF1α*, чем *TR15*. Необходимо отметить, что в составе кластера IV штаммы *F. equiseti* 64414, 65901 и *F. incarnatum* F-2681, с одной стороны, и штамм *F. equiseti* 97001, с другой, формировали отдельные ветви на дендрограммах обоих *TRI*-генов.

В структуре филогенетического дерева, построенного на основе анализа комбинированной последовательности генов *TEF1α*, *TR15* и *TR114* (рис. 4), можно

выделить четыре крупных кластера, поддержанных значениями бутстрепа 100%. Обращает на себя внимание существование общей группы, включающей кластеры II и III (бутстреп-поддержка 96%).

Хемотипирование штаммов-продуцентов ТрМТ типа В, определение микотоксинов методом ВЭЖХ

В табл. 4 приведены результаты анализа 33 штаммов-продуцентов ТрМТ типа В методом кПЦР с наборами праймеров 12-1 и 12-2. От использования

набора 3-1 в ходе исследования было решено отказаться, поскольку при электрофоретическом анализе продуктов амплификации во всех образцах выявлены две специфические полосы (данные не приведены), т.е. не удавалось разделить хемотипы 3-АДОН и 15-АДОН *F. graminearum*. Согласно результатам хемотипирования, все проанализированные штаммы *F. culmorum* и *F. ussurianum* принадлежат к хемотипу 3-АДОН, к нему же относятся штаммы *F. graminearum* 58033 и 70725. ДНК штаммов *F.*

Таблица 4. Результаты кПЦР ДНК 33 штаммов рода *Fusarium*, относящихся к продуцентам ТрМТ типа В, с использованием наборов праймеров 12-1 и 12-2

Штамм	3-АДОН		15-АДОН		НИВ		ВЭЖХ
	12-1	12-2	12-1	12-2	12-1	12-2	
Набор праймеров							
<i>F. culmorum</i> М-99-43	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> 09-1/7	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> М-99-9	+	+	-	?	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> М-10-1	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> BR-03-19	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> BR-0453	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> ОМ-0233	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> ОР-02-37	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> СМ-9864	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> КР-1136-66	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> КР-1599-25/3	+	+	-	-	-	-	ДОН
<i>F. culmorum</i> КС-1384-1	+	+	-	-	-	-	ДОН
<i>F. culmorum</i> М-05-111	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> КС-1716-8	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> 58801	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> Кz-27	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> 74007	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> 58030	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> 70505	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> 50106	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. cerealis</i> 64722	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 39295	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 37032	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 39142	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 37031	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 41727	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. graminearum</i> G.8-8	-	-	+	+	-	-	ДОН
<i>F. graminearum</i> 41806	?	?	+	+	-	-	15-АДОН
<i>F. graminearum</i> 48702	-	?	+	+	-	-	15-АДОН
<i>F. graminearum</i> 58033	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. graminearum</i> 70725	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. ussurianum</i> 58212	+	+	-	-	-	-	ДОН
<i>F. ussurianum</i> 29813	+	+	-	-	-	-	3-АДОН

Примечание. ВЭЖХ – результаты анализа методом ВЭЖХ. «?» – минорные полосы детектированы при электрофоретическом анализе либо амплификация на последних циклах кПЦР; «н/а» – не анализировали.

graminearum G.8-8, 41806, 48702 амплифицировалась с парой праймеров 12CON-12-15F, что свидетельствует об их принадлежности к 15-АДОН-хемотипу (однако в образцах *F. graminearum* 14-17 выявлены также минорные полосы, что, вероятно, связано с условиями проведения ПЦР).

Анализ токсинообразующей способности штаммов методом ВЭЖХ подтвердил данные молекулярного типирования большей части образцов (табл. 4). В большинстве культур ДОН количественно преобладал над ацетилированными производными, в культурах штаммов *F. graminearum* G.8-8, *F. culmorum* КР-1599-25/3, KS-1384-1, *F. ussurianum* 58212 производные обнаружены не были. На рис. 5 в качестве примера изображена хроматограмма культуральной жидкости штамма *F. ussurianum* 29813, содержащая пики, соответствующие ДОН (время удерживания 4.453) и 3-АДОН (время удерживания 5.483).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей настоящей работы было изучение генетического разнообразия и токсигенных характеристик выделенных в разные годы в разных регионах России и депонированных во всероссийских коллекциях штаммов грибов рода *Fusarium*, потенциально способных к синтезу ТрМТ. Другой важный аспект исследования – расширение сведений о структурных особенностях генов, относящихся к основному трихотеценовому кластеру, связанных с синтезом токсинов и патогенными свойствами гриба.

Поскольку ген *TEF1α* на сегодняшний день считается наиболее изученным и наиболее филогенетически информативным SCAR-маркером представителей рода *Fusarium*, анализ его последовательностей стал основой для верификации таксономического статуса коллекционных штаммов. Первоначальная идентификация шести из 60 образцов не была подтверждена. Использование комбинации молекулярно-генетического и морфологического подходов позволило с высокой достоверностью определить видовую принадлежность «спорных» штаммов. Штамм 58212 (первоначально *F. graminearum*) был идентифицирован как *F. ussurianum*, что хорошо согласуется с его географическим происхождением (Приморский край) и с тем фактом, что виды *F. graminearum* и *F. ussurianum* практически невозможно отличить по морфологическим признакам. Штаммы F-3966 и F-4360, депонированные в коллекциях как *F. sambucinum*, идентифицированы как *F. avenaceum* и *F. acuminatum* соответственно. Виды *F. acuminatum* и *F. avenaceum* не продуцируют трихотеценовые микотоксины, однако по занимаемым экологическим нишам и характеру роста на картофельно-сахарозном агаре сходны с *F. sambucinum*.

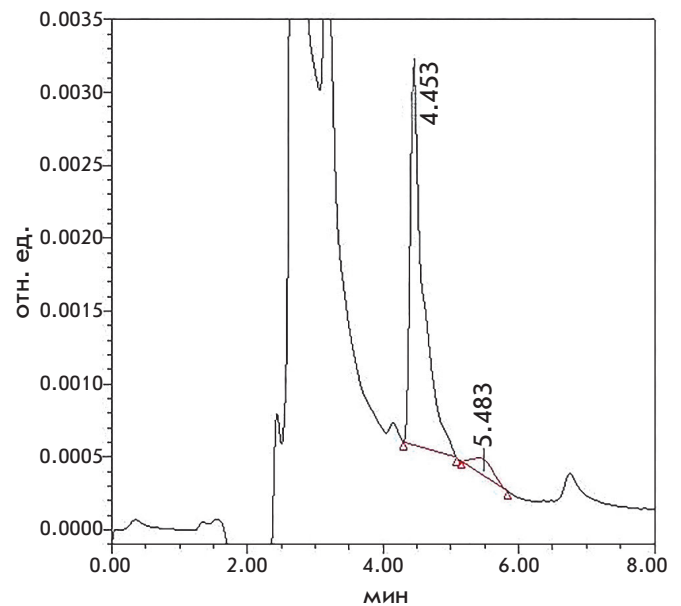


Рис. 5. Хроматограмма культуральной жидкости штамма *F. ussurianum* 29813. Пик, охарактеризованный временем удерживания 4.453 – ДОН; пик, охарактеризованный временем удерживания 5.483 (красный) – 3-АДОН

Данные о подобных ошибках отсутствуют, однако утверждается, что распространена неверная идентификация близкородственного к этим двум видам *F. torulosum* как *F. sambucinum* [54]. Штамм F-900, выделенный из почвы лесопитомника в Красноярском крае, по результатам комплексного исследования идентифицирован как *F. commune*. Вид *F. commune*, описанный в 2003 г. [55], до настоящего времени не выявлялся на территории России. Согласно имеющимся данным, *F. commune* может быть как почвенным сапрофитом, так и поражать различные растения, в том числе важные в хозяйственном отношении культуры. *F. commune* считается таксономически близким к комплексу видов *F. oxysporum*, он не способен к синтезу ТрМТ [56], что подтверждается отсутствием продуктов ПЦР-амплификации с парами праймеров к генам *TRI5* и *TRI14*. Штамм F-846, выделенный из дыни (Молдова, 1958), который по данным Всероссийской коллекции микроорганизмов представляет собой *F. roae*, при анализе последовательностей генов *TEF1α* и *TRI5* не показал 100% сходства ни с одной из последовательностей, депонированных в базах данных. По структуре маркерных генов наиболее близкими к нему оказались штаммы *F. polyphialidicum* F-0016 (*TEF1α*) и *F. langsethiae* F2640 (*TRI5*). Родство F-846 с *F. polyphialidicum* не подтверждено анализом морфологических структур. Что же касает-

ся штамма F2640, депонированного в GenBank, то существуют сомнения в правильности его отнесения к *F. langsethiae*, что подтверждается значительными различиями в структуре гена *TRI5* этого штамма и типовых штаммов *F. langsethiae*. На дендрограммах генов *TEF1α* и *TRI5* F-846 занимал промежуточное положение и не был отнесен ни к одному из крупных кластеров. Можно осторожно предположить, что штамм F-846 представляет собой отдельный филогенетический вид, однако для подтверждения этого предположения необходим дополнительный анализ с использованием большего спектра ДНК-маркеров, исследование токсинообразующей способности, а также дополнительных морфологических и физиологических данных.

В последние годы показано, что вид *F. equiseti* вместе с близкородственным *F. incarnatum* обладает сложной филогенетической структурой, формируя неоднородную группу, называемую «*F. incarnatum-equiseti* species complex» (FIESC). Штаммы *F. equiseti* из северной и южной Европы образуют две разные группы, названные типами I и II [57]. В настоящей работе маркерные последовательности гена *TEF1α* штаммов из различных регионов России сравнивали с последовательностями этого гена штаммов VI01070 и VI01095, относящихся к типу I, штамма H2-2-5B, относящегося к типу II, а также штаммов 10675 и 10393, проанализированных в [40]. Сравнение последовательностей и филогенетический анализ *TEF1α* показали, что штамм 97001, по всей видимости, принадлежит к типу II (южная Европа), что коррелирует с его географическим происхождением (Сев. Осетия), в то время как штаммы 64414 и 65901 (Калининградская и Ленинградская обл. соответственно) относятся к североевропейскому типу I. Исключением из этого правила стал штамм 10675 (LN901573), выделенный в 2009 г. из пшеницы в Испании, отнесенный, однако, согласно топологии сконструированного дерева, к типу I. К типу I также принадлежал штамм F-2681 *F. incarnatum*.

Использование в филогенетических исследованиях структур генов, ответственных за различные этапы биосинтеза микотоксинов, является дискуссионным, поскольку большая часть этих генов приобретена в результате горизонтального переноса. Сравнительный анализ таких маркеров, как правило, не вполне корректно отражает эволюционные отношения между таксонами, однако может быть полезен при выявлении особенностей токсинообразования либо патогенных свойств штаммов. В настоящей работе нами исследованы частичные структуры двух входящих в трихотеценовый кластер генов – *TRI5*, кодирующего триходиенсинтетазу, ответственную за первый этап биосинтеза ТрМТ, и *TRI14*, точ-

ная функция которого неизвестна, однако предположительно связана с регуляцией биосинтеза ДОН или его транспортом за пределы клетки в процессе развития гриба в тканях зараженного растения [16]. Представленная в базах данных информация о последовательностях генов трихотеценового кластера достаточно ограничена. Так, депонировано по одной последовательности гена *TRI5* *F. venenatum* и *F. incarnatum* и две – *F. sambucinum*. Найдены лишь три аннотации гена *TRI14* *F. sporotrichioides*, одна – *F. pseudograminearum*, а также семь и четыре – в составе полных последовательностей трихотеценового кластера *F. graminearum* и *F. culmorum* соответственно. Таким образом, впервые определены и депонированы в базу данных GenBank частичные последовательности гена *TRI14* 9 из 12 исследованных видов. Характерной особенностью генов *TRI5* и *TRI14* стал тот факт, что значительная часть переменных позиций у них сосредоточена в кодирующей части, что отражается и на различиях в аминокислотных последовательностях соответствующих белков между и внутри видов. Обратная картина наблюдается в случае гена *TEF1α*, у которого все переменные позиции находятся в интронах, а кодирующая часть отличается высокой консервативностью. Как мы полагаем, такой характер различий может быть следствием разной эволюционной истории этих генов, а также того, что фактор элонгации трансляции не относится к белкам, специфичным для рода *Fusarium*, в то время как полиморфизм аминокислотных последовательностей белков, кодируемых генами *TRI*, имеет важное адаптивное значение. Этим же можно объяснить различия в топологии филогенетических деревьев, построенных на основе *TEF1α*, *TRI5* и *TRI14*. Одно из таких различий – формирование кластерами II (продуценты ТрМТ типа А) и III (ТрМТ А+В) общих ветвей, поддержанных высокими значениями бутстрепа (90 и 75%), на дендрограммах генов *TRI5* и *TRI14* соответственно. В свою очередь, на дендрограмме гена *TEF1α* кластер II формирует общую ветвь с кластером I (продуценты ТрМТ типа В), хотя бутстреп-поддержка этой ветви была низкой (менее 50%). Также на дендрограммах генов *TRI5* и *TRI14* штаммы *F. ussuriatum* формировали единые кластеры со штаммами видов *F. culmorum* и *F. cerealis*, что противоречит эволюционным данным, согласно которым *F. ussuriatum* наиболее близок к виду *F. graminearum* [22], что подтверждено при филогенетическом анализе *TEF1α*. На дендрограмме гена *TRI14* исследованные штаммы *F. graminearum* были разделены на два кластера с высокой бутстреп-поддержкой, однако нам не удалось связать эту группировку ни с хемотипом штаммов, ни с их географическим происхождением.

Можно предположить существование связи между полиморфизмом гена *TRI14* и различиями в агрессивности разных штаммов по отношению к растению-хозяину. Однако в рамках настоящей работы таких исследований не проводилось. Для гена *TRI5* также не выявлено корреляции между хемотипами *F. graminearum* (3/15-АДОН) и филогенетической структурой вида. Кроме того, ни один из проанализированных штаммов *F. graminearum* и *F. culmorum* не содержал 8-нуклеотидной делеции (TGGAACA), маркерной для слаботоксигенных штаммов этих видов [58].

Несмотря на приблизительно одинаковое содержание переменных и филогенетически информативных позиций, а также гаплотипическое разнообразие трех генов, анализ *TEF1α* более точно отражал филогенетическую структуру и предполагаемое эволюционное развитие группы видов рода *Fusarium* – продуцентов ТрМТ. Этот результат согласуется с данными, полученными ранее при исследовании полиморфизма других генов, вовлеченных в биосинтез микотоксинов, например *TRI1* [7], или гена энниатинсинтазы (*Esyn1*) – ключевого фермента биосинтеза энниатинов у *F. avenaceum* и близкородственных видов [28, 59].

Принадлежность к тому или иному хемотипу является специфической характеристикой штамма, продуцирующего В-трихотецены. В последние годы опубликованы работы, посвященные встречаемости хемотипов продуцентов В-трихотеценов (прежде всего, *F. graminearum*) в различных регионах мира, например в Южной Америке [60], Африке [61] и Европе [62, 63]. В 2016 г. были опубликованы результаты обширного исследования, проведенного специалистами из 17 стран Европы, в том числе из России [64], практическим результатом которого стало создание европейской базы данных (www.catalogueeu.luxmss.lu). В этой базе данных содержится информация о 187 штаммах, выделенных на территории России, при этом нет упоминания о штаммах из целого ряда регионов, таких, как Западная Сибирь и Волго-Вятский район, а также сведений о хемотипах коллекционных образцов, выделенных в прошлые годы. В настоящем исследовании для анализа типа ТрМТ мы применили комбинированный подход, включающий хемотипирование с использованием хемотип-специфических праймеров, описанных ранее (см. раздел «Молекулярное типирование продуцентов ТрМТ типа В»), а также анализ культуральных жидкостей некоторых штаммов методом ВЭЖХ. С помощью наборов праймеров, специфичных к полиморфным участкам гена *TRI12* (12-1 и 12-2), удалось установить хемотипы штаммов четырех видов, продуцирующих ТрМТ типа В. Показано,

что штаммы *F. culmorum* и *F. ussuriense* относятся к 3-АДОН-хемотипу, штаммы *F. cerealis* – к НИВ-хемотипу, а среди штаммов *F. graminearum* присутствуют продуценты как 3-АДОН, так и 15-АДОН. Необходимо иметь в виду, что в некоторых случаях данные ПЦР-анализа могут не совпадать с реальным токсигенным профилем штамма, что подчеркивает необходимость подтверждения генетических данных с помощью химических методов [65]. Методом ВЭЖХ были подтверждены результаты хемотипирования 16 из 20 штаммов, выбранных для хроматографического анализа. В культуральных жидкостях четырех штаммов содержался только ДОН, а его ацетилированные производные отсутствовали. Опубликованные в последние годы результаты показывают, что среди штаммов *F. graminearum* различного географического происхождения доминируют продуценты 3-АДОН, что в значительной степени обусловлено их более высокой агрессивностью по сравнению с продуцентами 15-АДОН и НИВ [66, 67]. Анализ европейских штаммов *F. graminearum* показал, что 3-АДОН-хемотип распространен на севере Европы, в то время как хемотип 15-АДОН чаще встречается в центральной части и на юге континента [62–64]. Из трех исследованных нами штаммов *F. graminearum* 15-АДОН-хемотипа два можно отнести к центрально-европейской группе (G.8-8 – Германия, 48702 – Тульская обл.) и один – к южно-европейской (41806 – Сев. Осетия). Штаммы 3-АДОН-хемотипа можно отнести к северо-европейской (58033 – Ленинградская обл.) и центрально-европейской (70725 – Орловская обл.) группам. Все изученные культуры вида *F. culmorum* были отнесены к 3-АДОН-хемотипу. Считается, что для *F. culmorum* характерны лишь два из трех известных В-хемотипов – 3-АДОН и НИВ, при этом 3-АДОН существенно более распространен [61, 64], что подтверждено в настоящей работе. Штамм *F. ussuriense* 29813, представляющий 3-АДОН-хемотип, продуцировал наибольшие количества ДОН из всех проанализированных культур. Принадлежность штаммов *F. cerealis* к НИВ-хемотипу также соответствует данным [68]. Мы считаем, что результаты, полученные в настоящей работе, позволяют частично восполнить отсутствие в Европейской базе данных сведений о хемотипах штаммов из некоторых регионов России. Так, впервые охарактеризованы штаммы из Волго-Вятского региона (№ 10–12) и Западной Сибири, а также граничащей с ней Костанайской области Казахстана (№ 7, 16).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

Фундаментальное значение определяется существенным расширением сведений о молекулярно-генетическом разнообразии трихотеценпродуцирующих штаммов рода *Fusarium* различного происхождения, представляющих различные регионы России. Применение комплексного подхода, сочетающего классическое исследование морфологических структур с анализом высокоинформативных ДНК-маркеров, позволило подтвердить и уточнить видовую принадлежность ряда коллекционных образцов, в частности, впервые обнаружить на территории России штамм *F. commune*. Впервые для филогенетических исследований использован ген *TRI14*, анализ которого выявил, с одной стороны, высокий уровень меж- и внутривидового полиморфизма, а с другой, необходимость дальнейшего изучения его структуры и функций, которые позволили бы лучше понять его роль в процессах патогенеза и биосинтеза микотоксинов. Прикладная значимость работы обусловлена возможностью использования изученных маркеров для разработки систем мониторинга зара-

женности продуктов питания продуцентами ТрМТ. Комбинированное исследование принадлежности продуцентов ТрМТ типа В к основным хемотипам с помощью специфической ПЦР и ВЭЖХ позволило оценить их распространенность на территории России, в том числе в регионах, где ранее не находили продуцентов ТрМТ. ●

Коллектив авторов выражает благодарность Т.Ю. Гагкаевой (ФГБНУ ВИЗР) за ценные комментарии, касающиеся морфологической характеристики исследуемых штаммов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 15-29-02527 (Л.С., С.З.; подбор коллекционных образцов, филогенетический анализ генов *TEF1α* и *TRI5*, микроскопия) и 16-34-01369 (А.С.; структурный и филогенетический анализ гена *TRI14*, исследование токсинообразующей способности штаммов методом ВЭЖХ).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moretti A., Susca A., Mule G., Logrieco A.F., Proctor R.H. // *Int. J. Food Microbiol.* 2013. V. 167. P. 57–66.
- Ueno Y. // *Adv. Food Nutr. Res.* 1989. V. 3. P. 301–305.
- Desjardins A.E. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS Press, St. Paul, Minnesota, 2006.
- Grovey J.F. / The trichothecenes and their biosynthesis. // *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Eds Herz W., Falk H., Kirby G.W. Vienna: Springer-Verlag, 2007. P. 63–130.
- McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A., Alexander N.J. // *Toxins*. 2011. V. 3. P. 802–814.
- Nesic K., Ivanovic S., Nesic V. // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2014. V. 228. P. 101–120.
- Kelly A., Proctor R.H., Belzile F., Chulze S.N., Clear R.M., Cowger C., Elmer W., Lee T., Obanor F., Waalwijk C., Ward T.J. // *Fungal Genet. Biol.* 2016. V. 95. P. 39–48.
- Varga E., Wiesenberger G., Hametner C., Ward T.J., Dong Y., Schöfbeck D., McCormick S., Broz K., Stückler R., Schumacher R., et al. // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. № 8. P. 2588–2600.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K., Casper H.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 7905–7910.
- O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D.M., Kistler H.C., Aoki T. // *Fungal Genet. Biol.* 2004. V. 41. P. 600–623.
- Moss M.O., Thrane U. // *Toxicol. Lett.* 2004. V. 153. № 1. P. 23–28.
- Brown D.W., Dyer R.B., McCormick S.P., Kendra D.F., Plattner R.D. // *Fungal Genet. Biol.* 2004. V. 41. P. 454–462.
- Alexander N.J., McCormick S.P., Waalwijk C., van der Lee T., Proctor R.H. // *Fungal Genet. Biol.* 2011. V. 48. № 5. P. 485–495.
- Nasmith C.G., Walkowiak S., Wang L., Leung W.W.Y., Gong Y., Johnston A., Harris L.J., Guttman D.S., Subramaniam R. // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7. № 9. e1002266.
- Cundliffe E., Cannon M., Davies J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. № 1. P. 30–34.
- Dyer R.B., Plattner R.D., Kendra D.F., Brown D.R. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 9281–9287.
- Paran I., Michelmore R.W. // *Theor. Appl. Genet.* 1993. V. 85. № 8. P. 985–993.
- Starkey D.E., Ward T.J., Aoki T., Gale L.R., Kistler H.C., Geiser D.M., Suga H., Toth B., Varga J., O'Donnell K. // *Fungal Genet. Biol.* 2007. V. 44. P. 1191–1204.
- Aoki T., Ward T.J., Kistler H.C., O'Donnell K. // *JSM Mycotoxins*. 2012. V. 62. P. 91–102.
- Obanor F., Erginbas-Orakci G., Tunali B., Nicol J.M., Chakraborty S. // *Fungal Biol.* 2010. V. 114. P. 753–765.
- Scott J.B., Chakraborty S. // *Mycol. Res.* 2006. V. 110. P. 1413–1425.
- Yli-Mattila T., Gagkaeva T., Ward T.J., Aoki T., Kistler H.C., O'Donnell K. // *Mycologia*. 2009. V. 101. № 6. P. 841–852.
- Yli-Mattila T., Ward T.J., O'Donnell K., Proctor R.H., Burkin A.A., Kononenko G.P., Gavrilova O.P., Aoki T., McCormick S.P., Gagkaeva T.Yu. // *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 147. P. 58–68.
- O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Gueidan C., Crous P.W., Geiser D.M. // *J. Clin. Microbiol.* 2009. V. 47. P. 3851–3861.
- Fernandez-Ortuno D., Waalwijk C., van der Lee T., Fan J., Atkins S., West J.S., Fraaije B.A. // *Int. J. Food Microbiol.* 2013. V. 166. P. 148–154.
- Nicolaisen M., Surponiene S., Nielsen L.K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justensen A.F. // *J. Microbiol. Meth.* 2009. V. 76. P. 234–240.
- Stakheev A.A., Ryazantsev D.Yu., Gagkaeva T.Yu., Zavriev S.K. // *Food Control*. 2011. V. 22. P. 462–468.
- Stakheev A.A., Khairulina D.R., Zavriev S.K. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 225. P. 27–37.
- Yli-Mattila T., Nayaka S.C., Venkataramana M., Yörük E. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1542. P. 269–291.
- Walkowiak S., Rowland O., Rodrigue N., Subramaniam R. // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. P. 1014.
- Lysoe E., Frandsen R.J.N., Divon H.H., Terzi V., Orru L., Lamontanara A., Kolseth A.-K., Nielsen K.F., Thrane U. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 221. P. 29–36.

32. Al-Hatmi A.M.S., van den Ende A.H.G.G., Stielow J.B., van Diepeningen A.D., Seifert K.A., McCormick W., Assabgui R., Gräfenhan T., de Hoog G.S., Levesque C.A. // *Fungal Biol.* 2016. V. 120. P. 231–245.
33. Nirmaladevi D., Venkataramana M., Srivastava R.K., Up-palapati S.R., Gupta V.K., Yli-Mattila T., Clement Tsui K.M., Srinivas C., Niranjana S.R., Chandra N.S. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 21367.
34. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 6241–6246.
35. O'Donnell K., Cigelnik E. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1997. V. 7. № 1. P. 103–116.
36. Kristensen R., Torp M., Kosiak B., Holst-Jensen A. // *Mycol. Res.* 2005. V. 109. № 2. P. 173–186.
37. Geiser D.M., Jimenez-Case M., Kang S., Makalowska I., Veneraraghavan N., Ward T., Zhang N., Kuldau G.A., O'Donnell K. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2004. V. 110. P. 473–479.
38. Niessen L., Schmidt H., Vogel R.F. // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 95. P. 305–319.
39. Stepień L., Gromadzka K., Chelkowski J. // *J. Appl. Genet.* 2012. V. 53. P. 227–236.
40. Villani A., Moretti A., De Saeger S., Han Z., Di Mavungu J.D., Soares C.M.G., Proctor R.H., Venancio A., Lima N., Stea G., et al. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 234. P. 24–35.
41. Menke J., Dong Y., Kistler H.C. // *Mol. Plant Microbe In.* 2012. V. 25. № 11. P. 1408–1418.
42. Nielsen L.K., Jensen J.D., Rodriguez A., Jorgensen L.N., Justensen A.F. // *Int. J. Food Microbiol.* 2012. V. 157. P. 384–392.
43. Wachowska U., Packa D., Wiwart M. // *Toxins.* 2017. V. 9. № 12. P. 408.
44. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.
45. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York: Oxford University Press, 2000.
46. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. № 10. P. 2731–2739.
47. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. № 12. P. 3299–3302.
48. Ward T.J., Bielawski J.P., Kistler H.C., Sullivan E., O'Donnell K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 9278–9283.
49. Wang J.H., Li H.-P., Qu B., Zhang J.-B., Huang T., Chen F.-F., Liao Y.-C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2008. V. 9. P. 2495–2504.
50. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. // *Clin. Chem.* 2009. V. 55. P. 611–622.
51. Farber J.M., Sanders G.W. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1986. V. 51. № 2. P. 381–384.
52. Gupta V.K., Chattopadhyay P., Kalita M.C., Chaurasia A.K., Gogoi H.K., Singh L. // *Pharm. Methods.* 2011. V. 2. № 1. P. 25–29.
53. Han Z., Tangni E.K., Huybrechts B., Munaut F., Scaufilaire J., Wu A., Callebaut A. // *Mycotoxin Res.* 2014. V. 30. P. 231–240.
54. Leslie J.F., Summerell B.A. *The Fusarium laboratory manual.* Blackwell Publ., 2006. P. 266–267.
55. Skovgaard K., Rosendahl S., O'Donnell K., Hirenberh H.I. // *Mycologia.* 2003. V. 95. P. 630–636.
56. Zhu Z., Zheng L., Pan L. // *Plant Disease.* 2014. V. 98. № 7. P. 977–987.
57. Marin P., Moretti A., Ritieni A., Jurado M., Vazquez C., Teresa Gonzalez-Jaen M. // *Food Microbiol.* 2012. V. 31. P. 229–237.
58. Bakan B., Giraud-Delville C., Pinson L., Richard-Molard D., Fournier E., Brygoo Y. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 11. P. 5472–5479.
59. Kulik T., Pszczolkowska A., Lojko M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. P. 5626–5640.
60. Pan D., Mionetto A., Calero N., Reynoso M.M., Torres A., Bettucci L. // *Gen. Mol. Res.* 2016. V. 15. № 1. 15017270.
61. Laraba I., Boureghda H., Abdallah N., Bouaicha O., Obanor F., Moretti A., Geiser D.M., Kim H.-S., McCormick S.P., Proctor R.H., et al. // *Fungal Genet. Biol.* 2017. V. 103. P. 34–41.
62. Yli-Mattila T., Rämö S., Hietaniemi V., Hussien T., Carlobos-Lopez A.L., Cumagun C.J.R. // *Microorganisms.* 2013. V. 1. P. 162–174.
63. Surponiene S., Sakalauskas S., Mankeviciene A., Barcauskaitė K., Jonaviciene A. // *Zemdirbyste-Agriculture.* 2016. V. 103. № 3. P. 281–287.
64. Pasquali M., Beyer M., Logrieco A., Audenaert K., Balmas V., Basler R., Boutigny A.L., Chrpova J., Czembor E., Gagkaeva T., et al. // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 406.
65. Kulik T., Busko M., Bilska K., Ostrowska-Kolodziejczak A., van Diepeningen A.D., Perkowski J., Steinglein S. // *Toxins.* 2016. V. 8. № 11. 330.
66. Covarelli L., Beccari G., Prodi A., Generotti S., Etruschi F., Juan C., Ferrer E., Manes J. // *J. Sci. Food Agric.* 2014. V. 95. P. 540–551.
67. Pasquali M., Giraud F., Brochot C., Cocco E., Hoffmann L., Bohn T. // *Int. J. Food Microbiol.* 2010. V. 137. P. 246–253.
68. Amarasinghe C.C., Tittlemier S.A., Fernando W.G.D. // *Plant Pathol.* 2015. V. 64. № 4. P. 988–995.