

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 633.1 : 632.4

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГРИБОВ *FUSARIUM TEMPERATUM* И *F. SUBGLUTINANS* ИЗ КОМПЛЕКСА ВИДОВ *F. FUJIKUROI*

© 2024 г. Т. Ю. Гагкаева^{1,*}, О. П. Гаврилова^{1,**}, А. С. Орина^{1,***}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

**e-mail: olgavrilova1@yandex.ru

*** e-mail: orina-alex@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.05.2023 г.

После доработки 23.08.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Выявленный полиморфизм трех локусов (*TEF*, *tub* и *RPB2*) и проведенный филогенетический анализ привели к идентификации двух штаммов, выделенных из стебля пшеницы и корня рапса как *Fusarium temperatum*. Это первое обнаружение данного вида, относящегося к комплексу видов *F. fujikuroi*, на территории России и первое обнаружение в микобиоте пшеницы и рапса. Выполнен сравнительный анализ диагностической ценности морфологических признаков штаммов близкородственных близкородственных видов *F. temperatum* и *F. subglutinans* s.str. Отчетливых различий между *F. temperatum* и *F. subglutinans* по культуральным характеристикам и микроструктурам не выявлено, что указывает на невозможность точной идентификации этих видов по морфологическим признакам. Штаммы *F. subglutinans* имели одну МАТ-1 идиоморфу локуса типа спаривания, тогда как штаммы *F. temperatum* обладали альтернативными идиоморфами МАТ-1 и МАТ-2. Скрещивание в лабораторных условиях штаммов противоположных типов спаривания привело к образованию фертильных перитециев гриба *F. temperatum*. Показано, что при росте на автоклавированном рисе штаммы *F. temperatum* и *F. subglutinans* не продуцировали фумонизины. В отличие от штаммов *F. subglutinans*, штаммы *F. temperatum* образовывали высокие количества боверицина — 1665 и 6106 мкг/кг, а один из них дополнительно продуцировал 3407 мкг/кг монилиформина. Видовая идентификация *F. temperatum* и *F. subglutinans* возможна только при привлечении молекулярно-генетических и хемотаксономических методов.

Ключевые слова: грибы, ДНК, конидиогенез, микотоксины, морфология, половая стадия, типы спаривания.

DOI: 10.31857/S0026364824010067, **EDN:** makhka

ВВЕДЕНИЕ

Разнообразие и свойства представителей комплекса видов *Fusarium fujikuroi* (FFSC) широко изучается с использованием различных методов (Nirenberg, O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 2000; Qiu et al., 2020; Yilmaz et al., 2021; Crous et al., 2021). Виды FFSC характеризуют как относительно слабые патогены или эндофиты растений, которые обитают практически повсеместно, но преимущественно в сухом теплом климате. Большинство грибов *Fusarium* являются полифагами, но среди FFSC некоторые виды имеют трофическую ассоциацию — они способны заражать один род или вид растений (Leslie, Summerell, 2006; Britz et al., 2002; Lima et al., 2012; Costa et al., 2021; Dewing et al., 2022).

Процесс бесполого и полового размножения аскомицетов изучены не полностью (Glenn et al., 2004; Zheng et al., 2012). Морфология

конидиогенных клеток и разнообразие конидий относительно мало изучены, но считаются ценными диагностическими характеристиками при идентификации видов FFSC (Vermeulen et al., 2021). Между тем изменчивость этих грибов и зависимость анализируемых характеристик от условий культивирования особенно затрудняет разграничение близкородственных, морфологически сходных видов (O'Donnell et al., 1998, 2000; Vermeulen et al., 2021).

Анализ филогенетических связей грибов, принадлежащих к FFSC, привел к тому, что в последние годы наблюдается всплеск научных публикаций, в том числе с описанием новых видов (Qiu et al., 2020; Crous et al., 2021; Vermeulen et al., 2021; Yilmaz et al., 2021). Грибы этой группы продуцируют микотоксины из трех основных групп, а именно фумонизины (ФУМ), боверицин (БОВ)

и энниатины, монилиформин (МОН); однако образование этих токсичных метаболитов видоспецифично (Leslie, Summerell, 2006).

Входящий в комплекс FFSC вид *Fusarium subglutinans* (Wollenw. et Reinking) P.E. Nelson, Tousoun et Marasas описан в 1983 г. (Nelson et al., 1983). *Fusarium subglutinans* — глобально распространенный патоген, в основном вызывающий гниль стеблей и початков кукурузы (Fumero et al., 2015; Stępień et al., 2019). Помимо кукурузы, *F. subglutinans* также встречается на других растениях (Cosic et al., 2007; Okello, Mathew, 2019; Wang et al., 2022), вредителях (Demirözer, 2019) и человеке (Campos-Macías et al., 2013). Выявленная внутривидовая изменчивость *F. subglutinans* по молекулярно-генетическими признакам и способности продуцировать токсины позволила выделить две группы: *F. subglutinans* группа 1 и *F. subglutinans* группа 2 (Steenkamp et al., 2002; Moretti et al., 2008). Затем на основании данных филогенетического анализа *F. subglutinans* группу 1 описали как новый вид — *F. temperatum* Scaufl. et Munaut (Scauflaire et al., 2011). Обычно *F. temperatum* выделяют из кукурузы (Shin et al., 2014; Czembor et al., 2015; Fumero et al., 2015; Lanza et al., 2016; Zhang et al., 2016; Boutigny et al., 2017; Stępień et al., 2019; Fallahi et al., 2019; Pfordt et al., 2020; Xu et al., 2022), однако единичные находки этого вида отмечены на *Sorghum bicolor* L. Moench в Сербии (Levic et al., 2019) и на *Capsicum pubescens* Ruiz et Pav. в Мексике (Perez-Vazquez et al., 2022). Кроме того, сообщалось о микозах человека, вызванных грибом *F. temperatum* (Al-Hatmi et al., 2016; Yilmaz et al., 2021).

В коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР (MFG) при проведении молекулярно-генетических исследований различных грибов FFSC, предварительно идентифицированные по морфологическим признакам, были выявлены два штамма, относящиеся к виду *F. temperatum*, выделенные из рапса и пшеницы в 2011–2019 гг.

Цель нашего исследования заключалась в установлении различий между генетически охарактеризованными штаммами *F. temperatum* и *F. subglutinans* по морфологическим, физиологическим и биохимическим свойствам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы грибов. Для проведения сравнительного анализа признаков вида *F. temperatum* в исследование были взяты два штамма филогенетически наиболее близкого вида *F. subglutinans*, выделенные из образцов кукурузы в 1993–1997 гг.

Секвенирование ДНК и филогенетический анализ. Анализируемые штаммы *F. temperatum* и *F. subglutinans* выращивали на картофельно-сахарозной агаризованной среде (КА) при 24°C в течение семи сут. Выделение ДНК из 10–50 мг мицелия, собранного с поверхности колонии гриба, проводили с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) согласно инструкции производителя.

Аmplификацию фрагментов генов фактора элонгации трансляции 1-α (*TEF*), β-тубулина (*tub*) и гена, кодирующего вторую большую субъединицу РНК полимеразы II (*RPB2*), проводили с использованием праймеров и протоколов авторов (O'Donnell, Cigelnik, 1997; O'Donnell et al., 1998; Liu et al., 1999; Jewell, Hsiang, 2013). Нуклеотидную последовательность фрагментов определяли на секвенаторе ABIPrism 3500 (Applied Biosystems, Hitachi, Япония) с использованием набора реактивов BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Процедуры ручного редактирования хроматограмм и получение консенсусных нуклеотидных последовательностей проводили в программе Vector NTI Advance 10. Нуклеотидные последовательности с помощью инструмента BLAST были проверены на сходство с депонированными в международной информационной базе данных NCBI GenBank (табл. 1). Выравнивание нуклеотидных последовательностей анализируемых и репрезентативных штаммов, а также их филогенетический анализ производили методами максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и максимальной экономии (maximum parsimony; MP) с использованием программы MEGA X 10.1 (Kumar et al., 2018). Нуклеотидные последовательности анализируемых штаммов были размещены в базе данных NCBI GenBank. Лучшая модель замены нуклеотидов, используемая для построения деревьев ML (K2 + G), также была определена в MEGA X 10.1. Дополнительно рассчитывали байесовскую вероятность (Bayesian probability, BP) с помощью MrBayes v. 3.2.1 на платформе Armadillo 1.1 (Lord et al., 2012). Достоверность топологии филогенетических деревьев определяли посредством бутстреп-анализа (1000 повторностей).

Определение типа спаривания. Определение MAT1-1 или MAT1-2 идиоморфы локуса MAT, ответственного за тип спаривания, проводили с помощью ПЦР со специфичными праймерами, разработанными для определения типа спаривания грибов комплекса видов FFSC (Steenkamp et al., 2000).

Морфологическая характеристика штаммов. Для диагностики фенотипа колонии и оценки скорости

Таблица 1. Информация о штаммах *Fusarium*, включенных в исследование

Вид	Номер штамма*	Субстрат	Происхождение	Номер нуклеотидной последовательности в GenBank		
				<i>TEF</i>	<i>tub</i>	<i>RPB2</i>
<i>Fusarium fujikuroi</i>	NRRL 13566	<i>Oryza sativa</i>	Китай	AF160279	U34415	EF470116
<i>F. globosum</i>	NRRL 26131 T**	<i>Zea mays</i>	Южная Африка	AF160285	U61557	KF466406
<i>F. musae</i>	NRRL 28893	<i>Musa sp.</i>	Мексика	FN552092	FN545374	FN552114
<i>F. nygamai</i>	NRRL 13448 T	<i>Sorghum bicolor</i>	Австралия	AF160273	U34426	EF470114
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 22902	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	США	AF160312	U34424	LT575065
<i>F. phyllophilum</i>	NRRL 13617 T	<i>Dracaena deremensis</i>	Италия	KF466421	KF466443	KF466410
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22944	<i>Cymbidium sp.</i>	Германия	AF160280	U34416	JX171617
“ “	ITEM 2287	<i>Zea mays</i>	США	LT841245	LT841243	LT841252
<i>F. subglutinans</i>	CBS215.76	<i>Zea mays</i>	Германия	MN534061	MN534109	MN534241
“ “	CBS479.94	<i>Zea mays</i>	Южная Африка	MN534036	MN534105	MN534236
“ “	CBS747.97 T	<i>Zea mays</i>	США	MW402150	MW402351	MW402773
“ “	MFG 60369	<i>Zea mays</i> , стебель	Россия, Кабардино-Балкария	ON557397	ON557398	ON557399
“ “	MFG 60370	<i>Zea mays</i> , зерно	Россия, Ставропольский край	MW811128	OK000516	OK000543
“ “	RC1047	<i>Zea mays</i>	Аргентина	MT337661	MT337611	MT337636
<i>F. temperatum</i>	CBS135538	human	Мексика	MN534039	MN534111	MN534239
“ “	MUCL 52463 T	<i>Zea mays</i>	Бельгия	KM487197	MW402359	MW402776
“ “	NRRL 25622	<i>Zea mays</i>	Южная Африка	AF160301	AF160317	LR792618
“ “	MFG 60846	<i>Triticum aestivum</i> , стебель	Россия, Белгородская обл.	OK626395	OK626401	OK626403
“ “	MFG 70587	<i>Brassica napus</i> , корни	Россия, Краснодарский край	OK626400	OK626402	OK626404
“ “	RC2977	<i>Zea mays</i>	Аргентина	MT337671	MT337621	MT337646
“ “	RC1369	<i>Zea mays</i>	Аргентина	MT337677	MT337627	MT337652
<i>F. verticillioides</i>	NRRL 22172	<i>Zea mays</i>	Германия	AF160262	U34413	EF470122
<i>F. xylarioides</i>	NRRL 25486 T	<i>Coffea sp.</i>	Кот-д'Ивуар	AY707136	AY707118	JX171630

Примечание. *Акронимы коллекций: CBS — Коллекция культур Centraalbureau voor Schimmelcultures, Центр биоразнообразия грибов, Утрехт, Нидерланды; ITEM — Коллекция микроскопических грибов Agro-Food, Бари, Италия; MFG — коллекция культур лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского института защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург, Россия; MUCL — Коллекция агропродовольственных и экологических грибов, Лувен-ла-Нев, Бельгия; NRRL — коллекция культур Службы сельскохозяйственных исследований, Пеория, Иллинойс, США; RC — Коллекция культур кафедры микробиологии и иммунологии Национального университета Рио-Куарто, Рио-Куарто, Аргентина. Полу жирным выделены штаммы из коллекции MFG. **Т — типовой штамм.

роста штаммы *F. temperatum* и *F. subglutinans* выращивали при 25°C на картофельно-декстрозном агаре (КДА) и агаре Чапека (Cz) в течение 5–14 сут при трех режимах освещения: полная темнота, 12 ч ближний ультрафиолет (УФ)/12 ч темнота.

В центр чашки Петри на агаризованную среду помещали диск культуры гриба (4 мм), предварительно выращенной на КСА. Диаметр колонии, растущей на агаризованной среде, измеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях на пятые и седьмые сут роста. Скорость роста колонии рассчитывали, как радиус колонии (без учета диска исходного инокулюма), отнесенный к суткам роста в момент учета. Эксперименты проводили в двух повторностях.

Сравнение формы и размеров конидий, числа перегородок, расположения конидий проводили при выращивании культур *Fusarium* на агаризованной среде Ниренберг (SNA) в условиях УФ в течение 7 сут. По возможности выполняли 20–50 измерений каждой структуры. Морфологические признаки штаммов сравнивали с характеристиками *F. subglutinans* и *F. temperatum*, описанными ранее (Scaufflaire et al., 2011). В визуализацию способа образования конидий проводили с помощью кусочка прозрачной ленты шириной 2 см (Scotch), которую клейкой стороной сначала прижимали к поверхности культуры, а затем приклеивали к предметному стеклу и рассматривали под микроскопом.

Изучение микроструктур проводили с помощью микроскопов BX53 и SZX16 (Olympus Corporation, Япония), фотосъемку осуществляли подключенной к микроскопу камерой Jenoptik Gryphax PROKYON (Jenoptik AG, Германия). Редактирование изображений проводили в программе Adobe Photoshop CC2018 (Adobe System, США).

Скрещивание штаммов *Fusarium* противоположных типов спаривания проводили на морковной агаризованной среде, как описано Leslie и Summerell (2006). Кроме того, штаммы культивировали на КДА, куда помещали 1–3-сантиметровые свежие отрезки стеблей и колосков пырея (*Elytrigia* sp.) после их стерилизации 70%-м этиловым спиртом. После скрещивания культуры выдерживали при 20–25°C и режиме освещения 12 ч освещение/12 ч темнота в течение нескольких недель. Скрещивания проводили в трехкратной повторности и не менее чем в двух опытах. Для проверки репродуктивного барьера скрещивания проводили со штаммами *Fusarium* противоположного типа спаривания. Фертильность перитециев контролировали путем микроскопического наблюдения образования аскоспор в асках.

Определение токсинопродуцирующей способности штаммов. В колбах объемом 100 мл смешивали 20 г рисовых зерен и 12 мл воды, затем автоклавировали при 121°C в течение 40 мин. Автоклавированный рис инокулировали двумя дисками диаметром 5 мм, вырезанными из предварительно выращенных на КСА чистых культур штаммов *F. temperatum* и *F. subglutinans*. Неинокулированный рис использовали в качестве контроля. Колбы с инокулированным рисом инкубировали в течение двух недель при 22°C в темноте и ежедневно встряхивали. После этого образцы риса высушивали при 55°C в течение 24 ч, измельчали на лабораторной мельнице Tube Mill Control (IKA, Германия) и хранили при – 20°C.

Профиль вторичных токсичных метаболитов, продуцируемых анализируемыми грибами, определяли методом ВЭЖХ–МС/МС (Malachová et al., 2014). К 5 г рисовой муки образцов добавляли 20 мл экстракционного растворителя (ацетонитрил/вода/уксусная кислота, 79 : 20 : 1). Обнаружение и количественное определение ФУМ, БОВ и МОН выполняли на системе AB SCIEX Triple Quad™ 5500 MS/MS (Applied Biosystems, США), оснащенной источником ионизации электро-распылением TurboV (SCIEX, США) и системой микроволнового анализа Agilent Infinity серии 1290 (Agilent, США). Хроматографическое разделение проводили при 25°C на колонке Gemini® C18, 150 × 4.6 мм (Phenomenex, США).

Микотоксины количественно определяли путем сравнения площадей пиков с калибровочными кривыми, полученными для стандартных растворов (Romer Labs Diagnostic GmbH, Австрия). Проценты извлечения микотоксинов колебались от 80 до 132%.

Статистический анализ. Средние значения величин и стандартное отклонение рассчитывали в программе Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярно-генетическая идентификация штаммов

Молекулярно-филогенетический анализ, включавший последовательности трех полиморфных локусов: *TEF* — 420 п.н., *tub* — 210 п.н., и *RPB2* — 805 п.н., количество информативных сайтов в которых составило 69 п.н. (16.4%), 20 п.н. (9.5%) и 66 п.н. (8.2%) соответственно. Исследуемые штаммы MFG 60369 и MFG 60370 вошли в компактную кладу, включающую все референсные штаммы *F. subglutinans*, с бутстрэп-поддержкой ML/MP/BP 96/99/1.0 (рис. 1). Два штамма MFG 60846 и MFG 70587 формировали общую кладу с референсными штаммами *F. temperatum* с высокой бутстрэп-поддержкой ML/

MP/BP 100/100/1.0. Топология филогенетических деревьев, построенных разными методами, была сходной и соответствовала реконструированной ранее (Scaufaire et al., 2011; Yilmaz et al., 2021).

Амплификация ДНК штаммов с МАТІ-1 специфичными праймерами приводила к образованию специфического продукта весом 200 п.н. у обоих штаммов *F. subglutinans* и *F. temperatum* MFG 70587, тогда как амплификация ДНК с МАТІ-2 специфичными праймерами привела к формированию продукта весом 800 п.н. только у одного штамма — *F. temperatum* MFG 60846.

Морфологическая характеристика штаммов

Штаммы предварительно идентифицированные на основании морфологических признаков как *F. subglutinans* s.l. в результате филогенетического анализа были реидентифицированы как *F. temperatum* и *F. subglutinans* s.str. Для выявления морфологических особенностей двух видов штаммы были детально исследованы при выращивании на трех питательных средах при разных режимах освещения (рис. 2).

При культивировании на КДА с освещением и в темноте скорость роста колоний *F. temperatum* составляла в среднем 6.0–6.7 мм/сут, тогда как скорость роста колоний *F. subglutinans* в этих же условиях была ниже – в среднем 5.8 мм/сут. При культивировании на КДА с УФ освещением скорость роста анализируемых штаммов достоверно снижалась до 5.5 мм/сут для *F. temperatum* и 4.1 мм/сут для *F. subglutinans*.

Поверхность колоний штаммов обоих видов, выращенных на КДА с освещением и в темноте, была скудной до хлопьевидной, цвет воздушного мицелия варьировал от беловатого до бледно-серого. Реверс культур имел пурпурную или темно-фиолетовую окраску, более интенсивную в центре. При культивировании с освещением исследуемые штаммы *F. temperatum* образовывали более обильный воздушный мицелий и менее интенсивную пигментацию реверса, чем *F. subglutinans*. При УФ-освещении культуры обоих видов образовывали пигменты пурпурного или темно-фиолетового цвета, распределенные неравномерно — пятнами, секторами.

На среде Cz с освещением и в темноте средняя скорость роста штаммов *F. temperatum* составляла 5.6–5.8 мм/сут, что значительно превышало 4.8–5.0 мм/сут, выявленные для *F. subglutinans*. Все штаммы образовывали хлопьевидный мицелий серовато-оранжевого цвета. Окраска реверса культур варьировала от светло-желтой до бледно-оранжевой.

Формирование микроконидий начиналось быстро в воздушном мицелии на всех средах (рис. 3, 4). Штаммы *F. subglutinans* и *F. temperatum* обильно образовывали микроконидии в ложных головках на моно- и полифиалидных клетках.

Конидиеносцы *F. temperatum*, прямые, обычно симподиально разветвленные, пролиферирующие, длиной до 200 мкм. Конидиогенные клетки монофиалидные и полифиалидными, от шиловидных до цилиндрических, с периклинальным утолщением и воротничком, часто незаметным или отсутствующим, длиной до 30 мкм и шириной 2–4 мкм.

Помимо латеральных фиалид, для *F. temperatum* и реже для *F. subglutinans* характерно образование микроконидий на фиалидных отверстиях, формирующихся на поверхности гиф. Таким образом, ложные головки выглядят как расположенные непосредственно на гифах. Микроконидии у обоих видов гиалиновые, обратнойцевидные до эллипсоидных, слегка изогнутых, в основном без или с одной перегородкой.

Спородохии *F. temperatum* и *F. subglutinans* от кремового до бледно-оранжевого цвета, часто незаметные, обильно образуются на поверхности агара при освещении. Спородохимальные конидиеносцы плотно агрегированы, неправильно и мутовчато разветвлены. Конидиогенные клетки монофиалидные, от шиловидных до цилиндрических, 10–25 × 2.5–3.0 мкм, с периклинальным утолщением и воротничком, незаметным или отсутствующим.

У штаммов обоих видов макроконидии гиалиновые, преимущественно с тремя перегородками (от 2 до 5). Макроконидии серповидными, с тонкими стенками, почти прямыми или слегка изогнутыми; апикальные клетки — удлиненные с выступающим сосочком; базальные клетки — от заметной ножки до небольшой выемки.

Мезоконидии у штаммов обоих видов прямые, веретеновидные, относительно толстостенные, бесцветные, преимущественно 3(1–5)-септированные, наиболее широкие в средней части, сужающиеся к концам; апикальные и базальные клетки одинаковые, клиновидные, иногда с заметным утолщенным рубцом, обильно образующие на моно- и полибластических конидиогенных клетках. С возрастом поверхность воздушного мицелия культуры грибов приобретает порошистость. В среднем длина одноклеточных микроконидий, а также длина и ширина конидий с одной перегородкой, макроконидий и мезоконидий с тремя перегородками у штаммов *F. temperatum* оказались достоверно больше, чем у штаммов *F. subglutinans* (табл. 2). Хламидоспоры отсутствовали в культурах

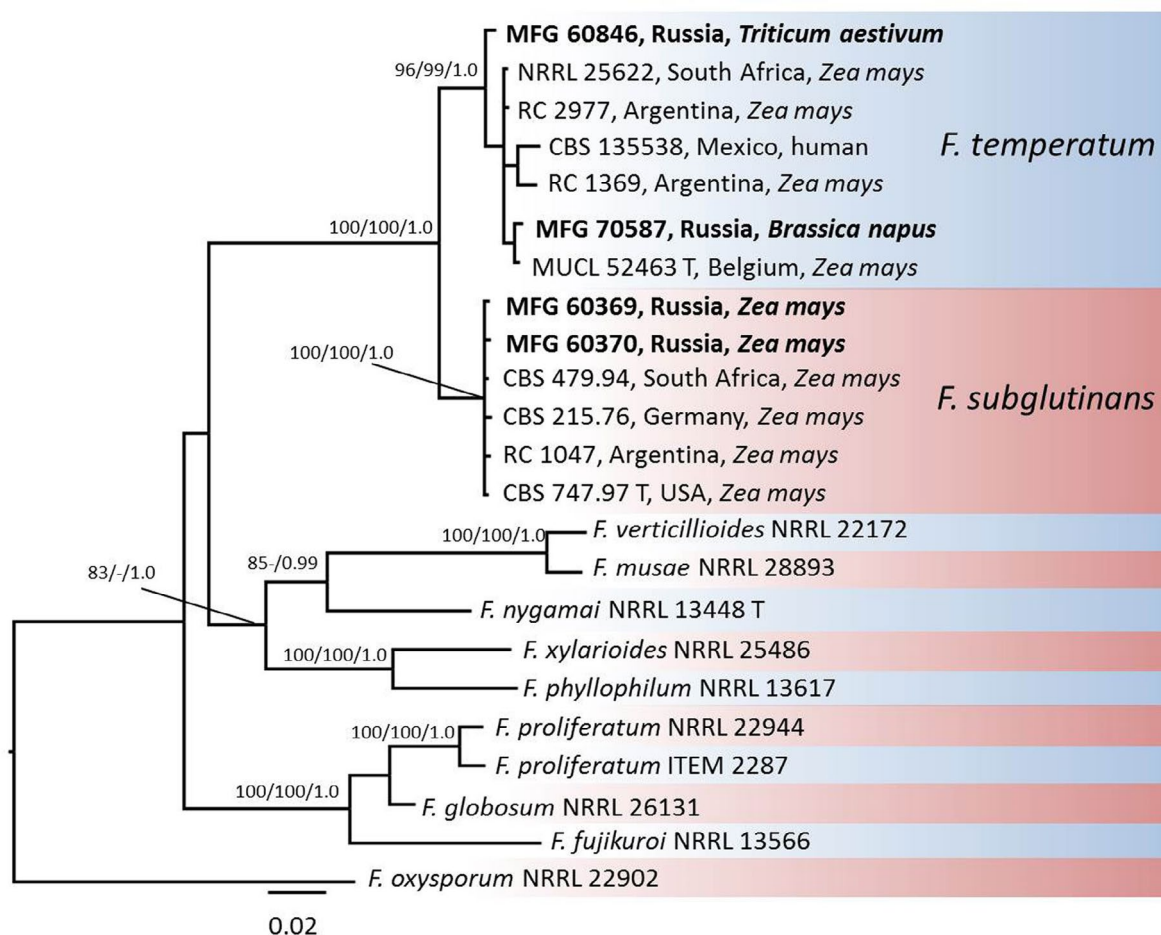


Рис. 1. Дендрограмма филогенетического сходства видов комплекса *Fusarium fujikuroi*, построенная на основе комбинированных нуклеотидных последовательностей *TEF*, *tub*, и *RPB2* фрагментов генома методом максимального правдоподобия. В узлах приведены значения бутстреп-поддержки (> 70%) при анализе методами максимального правдоподобия и максимальной экономии, а также значения Байесовской апостериорной вероятности (> 0.95). Штамм *F. oxysporum* NRRL 22902 был использован в качестве внешней группы.

штаммов обоих видов, что характерно для всех представителей FFSC.

Скрещивание штаммов *F. temperatum* приводило к образованию фертильных перитециев (рис. 5). На морковной агаризованной среде образование перитециев происходило менее обильно, чем на КДА с кусочками растений. Перитеции располагались как на поверхности агара, так и на плотном сплетении гиф, покрывающих растительную ткань. Перитеции *F. temperatum* при созревании становились грушевидной и колбовидной формы, размерами 250–350 × 150–330 мкм. Наружная оболочка перитециев ангулярной текстуры, темно-фиолетовой окраски, краснеющая в 90%-м р-ре молочной кислоты. Аски имеют вершину с заметным преломляющим кольцом и содержат восемь аскоспор размером 60–100 × 6–15 мкм. Аскоспоры гиалиновые, с одной перегородкой, от эллипсоидной до

овальной формы, в перегородке слегка сдавлены, иногда с клетками разной формы, длиной 11.9–16.8 мкм и шириной 3.5–6.0 мкм (в среднем 14.5 × 4.4 мкм). Скрещивание штаммов *F. temperatum* и *F. subglutinans*, относящихся к разным МАТ типам, не приводило к образованию перитециев.

Токсинопродуцирующая способность штаммов

Штамм *F. subglutinans* MFG 60370 не продуцировал анализируемые токсины при культивировании на автоклавированном рисе (табл. 3). В зерне, инокулированном штаммом *F. subglutinans* MFG 60369, среди пяти проанализированных микотоксинов выявлен только БОВ в количестве, близком к пределу обнаружения. В то же время оба штамма *F. temperatum* продуцировали БОВ в высоких количествах. Также штамм *F. temperatum* MFG 60846, выделенный из стебля пшеницы, синтезировал

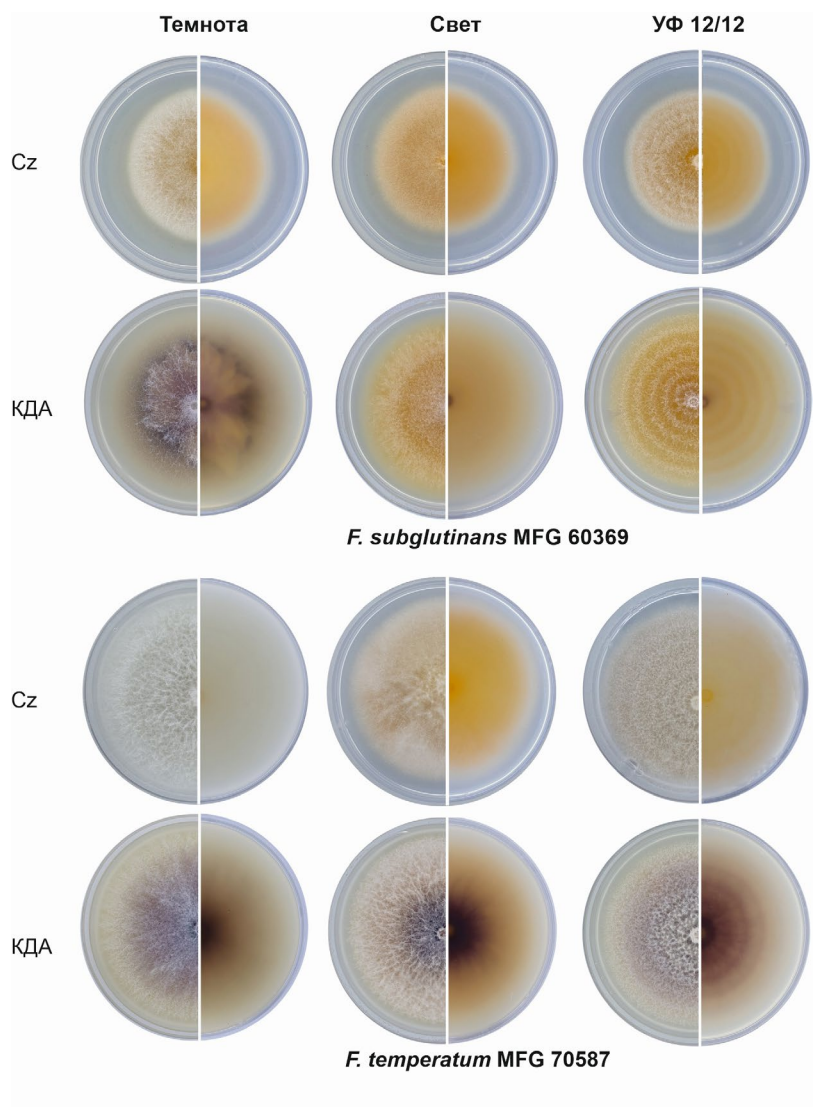


Рис. 2. Морфология культур штаммов *Fusarium temperatum* и *F. subglutinans* на седьмые сут на средах Cz и КДА при 25°С и разных режимах освещения. На каждой фотографии слева — поверхность культуры, справа — реверс.

Таблица 2. Размеры конидий штаммов *Fusarium*, культивируемых на SNA (25°С, УФ-освещение, 7 сут)

Вид	Средний размер конидий и диапазон варьирования, мкм			
	одноклеточные микроконидии	микроконидии с одной перегородкой	макроконидии с тремя перегородками	мезоконидии с тремя перегородками
<i>Fusarium temperatum</i>	12.13 × 3.17 (6.0–6.5) 11.8–12.2 (17.0–19.5) × (2.5) 3.0–3.2 (3.7–4.1)	20.3 × 3.64 (14.0–14.8) 19.6–20.9 (27.2–30.1) × (2.6–3.1) 3.5–3.6 (4.0–4.1)	38.3 × 3.8 (24.0–29.0) 38.2–38.6 (47.1–52.6) × (3.1–3.8) 3.7–4.3 (4.4–4.6)	31.0 × 3.9 (24.0–26.2) 30.5–31.2 (34.7–39.1) × (3.1–3.8) 3.7–4.3 (4.4–4.6)
<i>F. subglutinans</i>	9.85 × 3.17 (6.0–8.0) 8.7–11.56 (16.4–20.1) × (2.0–2.5) 3.1–3.2 (4.1–5.6)	17.0 × 3.49 (11.2–12.1) 16.2–17.5 (23.4–26.2) × (2.3–2.4) 3.5 (4.3–4.8)	36.2 × 3.8 (25.9–26.4) 35.8–36.6 (52.5–59.6) × (3.1–3.4) 4.1–4.2 (4.6–5.1)	29.1 × 4.1 (21.3–22.6) 27.3–30.5 (34.0–42.3) × (3.1–3.4) 4.1–4.2 (4.6–5.1)

Таблица 3. Микотоксины, продуцируемые штаммами *Fusarium temperatum* и *F. subglutinans* (автоклавируемый рис, 22°C, 14 сут в темноте)

Штамм	Количество микотоксина, мкг/кг				
	Фумонизин В ₁	Фумонизин В ₂	Фумонизин В ₃	Боверицин	Монилиформин
<i>Fusarium temperatum</i> MFG 60846	нв	нв	нв	6106	3407
<i>F. temperatum</i> MFG 70587	нв	нв	нв	1665	нв
<i>F. subglutinans</i> MFG 60369	нв	нв	нв	3.3	нв
<i>F. subglutinans</i> MFG 60370	нв	нв	нв	нв	нв
Параметры метода (±), %	5	6.8	7.9	7.7	7.7
LOD**, мкг/кг	9.76–361.4	5.85–216.4	5.95–220.2	3.55–131.6	6.50–240.2
LOQ***, мкг/кг	8.7	3.2	3.2	1.9	3.1

Примечание: *нв — не выявлен; **LOD — диапазон пределов количественного обнаружения; ***LOQ — предел детекции.

МОН. Изученные штаммы обоих видов не продуцировали фумонизины.

ОБСУЖДЕНИЕ

Грибы FFSC особенно часто представляют собой таксономические загадки, поскольку демонстрируют недостаточно четкие морфологические признаки, по которым можно было бы точно диагностировать виды. Внедрение филогенетических исследований привело к значительным изменениям в понимании видового разнообразия грибов и повысило точность идентификации (O'Donnell et al., 2000; Crous et al., 2021). Вследствие этого определение границ конкретных видов *Fusarium* и установление диапазона их свойств остаются открытыми и требуют актуализации и детализации.

В данном исследовании с помощью филогенетического анализа два штамма гриба, выделенные из стебля пшеницы и корня рапса, были ре-идентифицированы как *F. temperatum*. Это первое обнаружение *F. temperatum* на территории России и первое обнаружение этого вида в микобиоте пшеницы и рапса.

В нашем исследовании штаммы *F. temperatum* характеризовались более высокой скоростью роста и образовывали более обильный мицелий, чем штаммы *F. subglutinans*. В процессе роста они формировали три типа конидий: микроконидии, макроконидии и мезоконидии. При описании *F. temperatum* показано, что этот вид продуцирует в основном макроконидии с четырьмя перегородками, в то время как у *F. subglutinans* макроконидии обычно с тремя перегородками (Scauflaire et al., 2011; Shin et al., 2014). Позднее выявлено преобладание макроконидий с четырьмя перегородками у большинства штаммов *F. temperatum* и *F. subglutinans* при их культивировании на агаре

с листьями гвоздики при 20°C и 12 ч освещении холодным флуоресцентным светом или ближним ультрафиолетом (Levic и др., 2019). В то же время штаммы *F. temperatum*, выделенные из кукурузы в Китае, в основном образовывали макроконидии с тремя перегородками (Xu et al., 2022). В наших экспериментах при культивировании на SNA и освещении при 25°C и УФ-освещении как у штаммов *F. temperatum*, так и у штаммов *F. subglutinans* подавляющее большинство макроконидий были с тремя перегородками.

Размеры макроконидий с тремя перегородками у анализированных нами штаммов *F. temperatum* совпадали с указанными ранее для этого вида диапазонами (Scauflaire et al., 2011; Shin et al., 2014). Длина микроконидий *F. temperatum* оказалась больше, чем в предыдущих исследованиях (Scauflaire et al., 2011), и в среднем больше, чем длина микроконидий у двух изученных штаммов *F. subglutinans*. Однако эти показатели трудно использовать при идентификации, поскольку выявленные различия в размерах микроструктур могут быть связаны с варьированием состава питательных сред и условий культивирования.

Дополнительное образование веретенообразных мезоконидий у *F. temperatum* и *F. subglutinans* в результате голобластического конидиогенеза кажется характерным признаком как для *F. temperatum*, так и для *F. subglutinans* и отличает данные виды от других распространенных видов FFSC. Мезоконидии, быстро и обильно формирующиеся на бластических конидиогенных клетках, легко разлетаются по воздуху, что позволяет грибам быстро распространиться в окружающем пространстве. Следует отметить, что на всех средах макроконидии *F. temperatum* и *F. subglutinans* в спородохиях

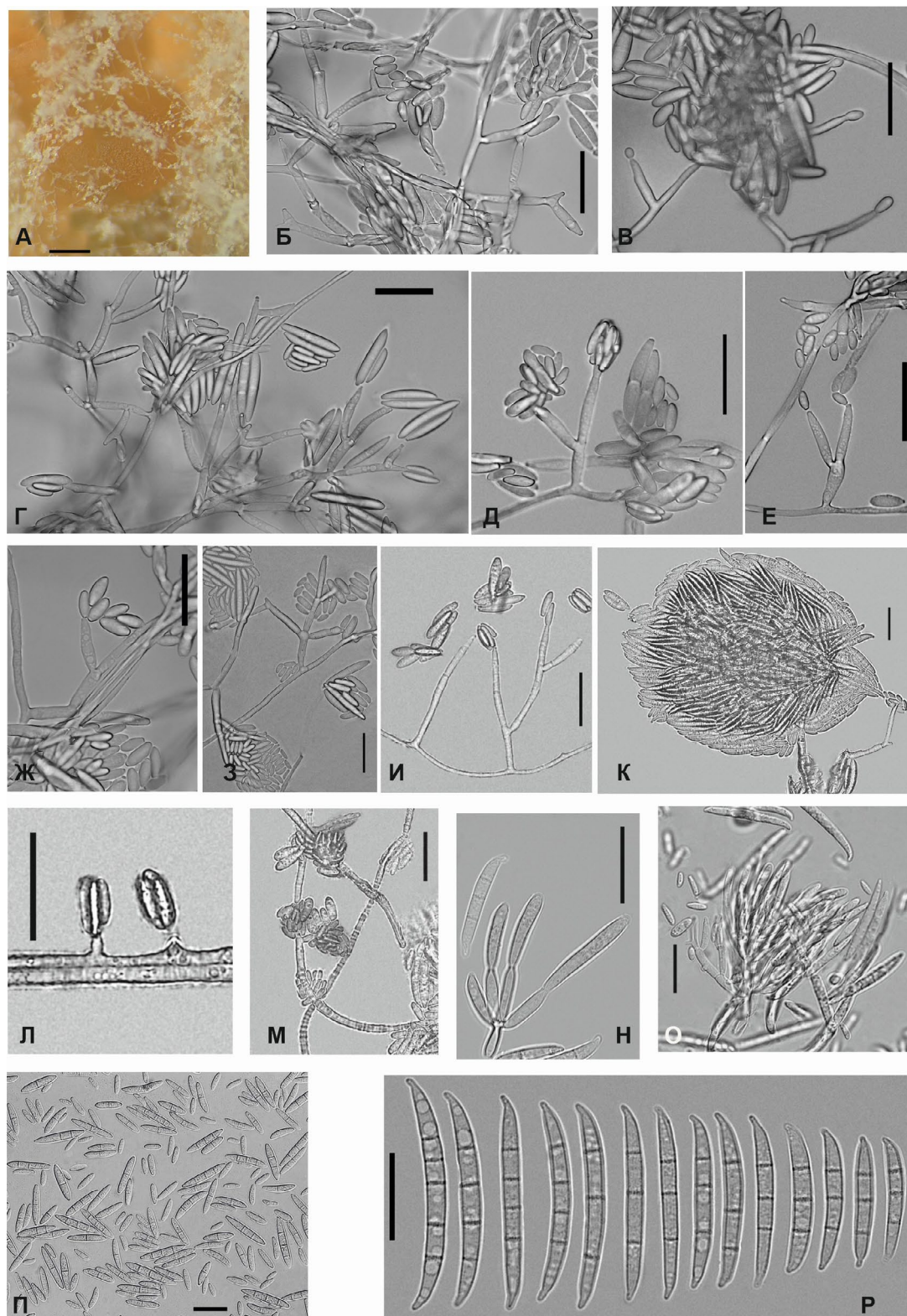


Рис. 3. Микроморфология *Fusarium temperatum*: А — фальшивые головки в воздушном мицелии над спороधिом, расположенном на поверхности агар; Б–И — конидиеносцы, фиалидные и бластические конидиогенные клетки; К — фальшивая головка; Л, М — микроконидии на фиалидных отверстиях на поверхности гифы; Н, О — разветвленные спорохиальные конидиеносцы; П — мезоконидии; Р — серповидные макроконидии. Фотографии И–М сделаны с использованием прозрачной липкой ленты (scotch). Масштаб: А — 200 мкм; В–Р — 20 мкм.

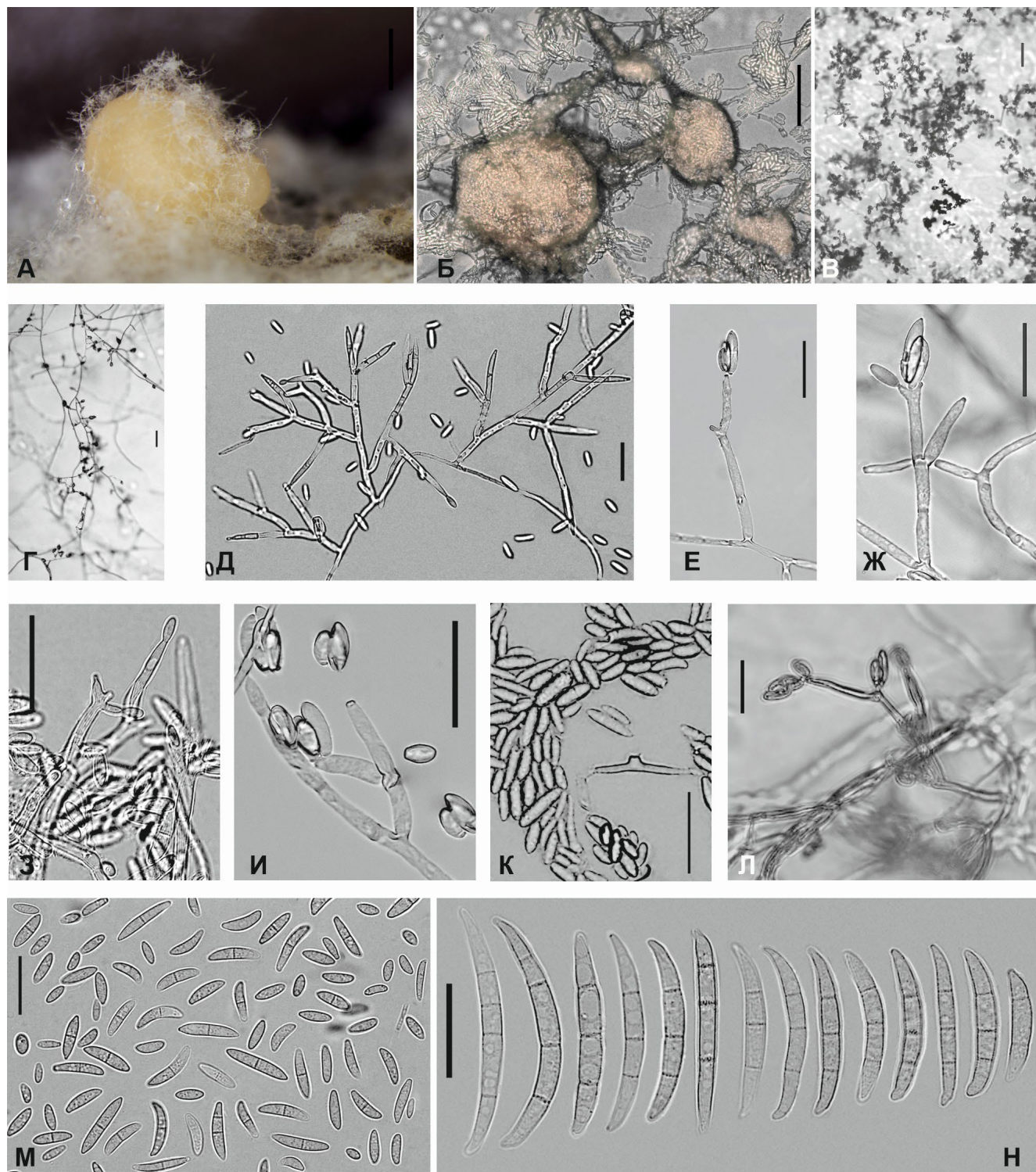


Рис. 4. Микроморфология *Fusarium subglutinans*: А — спородохий на поверхности стебля пырея; Б — спородохии на поверхности SNA; В, Г — воздушный мицелий, конидиеносцы и фальшивые головки; Д–К — конидиеносцы, фиалидные и бластические конидиогенные клетки; Л — воздушный мицелий и конидиеносцы; М — мезоконидии; Н — серповидные макроконидии. Фотографии Д–Л сделаны с использованием прозрачной липкой ленты (scotch). Масштаб: А — 500 мкм; Б — 50 мкм; В, Г — 100 мкм; Д–Н — 20 мкм.

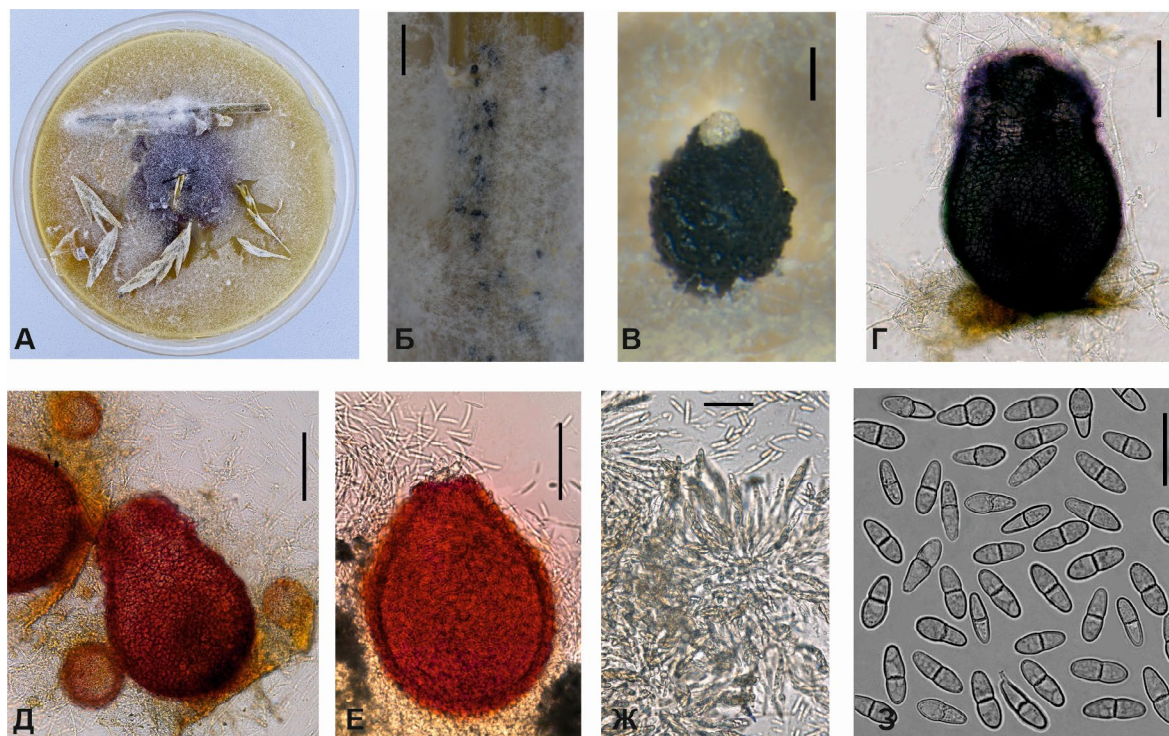


Рис. 5. Телеоморфа *Fusarium temperatum*: А, Б — формирование перитециев при скрещивании штаммов на КДА с фрагментами пырея; В, Г — фертильный перитеций; Д, Е — перитеций с измененной окраской под воздействием 90%-й молочной кислоты; Ж — высвобожденные из перитеция аски и аскоспоры; З — аскоспоры. Масштаб: Б — 1 мм; В–Е — 100 мкм; Ж, З — 20 мкм.

образуются особенно обильно при росте на свету, в то время как мезоконидии чаще формируются при культивировании штаммов в темноте.

Известно, что *F. temperatum* и *F. subglutinans* являются гетероталличными. Исследованные штаммы *F. temperatum* имели разные идиоморфы МАТ локуса. Ранее штаммы *F. temperatum* обоих типов спаривания были обнаружены в Бельгии и Аргентине, причем соотношение штаммов *F. temperatum* с разными идиоморфами МАТ-локуса оказалось примерно равным (Scauflaire et al., 2011; Fumero et al., 2015). В наших экспериментах при скрещивании двух штаммов *F. temperatum* образовывались зрелые перитеции с аскоспорами, что свидетельствует о наличии полового процесса у этого гриба в природе. При скрещивании *F. temperatum* и *F. subglutinans* мы не получили каких-либо фертильных перитециев, что предполагает наличие репродуктивного барьера между двумя филогенетически различными, но морфологически сходными видами. Однако способность нескольких видов *Fusarium* из комплекса FFSC к гибридизации позволяет предположить, что все они произошли от недавнего общего предка (Steenkamp et al., 2002).

Изученные штаммы *F. temperatum* и *F. subglutinans* не продуцировали фумонизины, но различались

по способности продуцировать БОВ и МОН. Долгое время не было единого мнения о способности *F. temperatum* и *F. subglutinans* продуцировать ФУМ (Scauflaire et al., 2012; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2016; Stępień et al., 2019). В настоящее время установлено, что штаммы этих близкородственных видов не обладают генами биосинтеза ФУМ и не способны продуцировать эти микотоксины (Fumero et al., 2020; Pfordt et al., 2020). Например, штаммы *F. temperatum*, выделенные из початков кукурузы в Германии, продуцировали только БОВ, МОН, фузариевую кислоту (ФК) и фузапролиферин (ФУЗА), тогда как все штаммы *F. subglutinans* образовывали ФК, МОН и ФУЗА, но не БОВ (Pfordt et al., 2020). Штаммы *F. subglutinans*, выделенные из кукурузы в Аргентине, не образовывали БОВ, хотя 75% проанализированных штаммов *F. temperatum* продуцировали этот микотоксин (Fumero et al., 2020). Авторы предположили, что ген *Bea1* нефункционален у *F. subglutinans* из-за инсерции и множественных мутаций в кодирующей области гена, в отличие от *F. temperatum* (Fumero et al., 2020). В недавнем исследовании все штаммы *F. temperatum*, выделенные из стеблей кукурузы, собранные в китайской провинции Юньнань, продуцировали БОВ (Xi et al., 2021). Выявлено, что

развитие фузариозной гнили кукурузы, выращенной в Польше, в значительной степени коррелирует с содержанием в инфицированной растительной ткани БОВ, продуцируемого *F. temperatum* (Wit et al., 2022). Все ранее полученные результаты подтверждают предположение о том, что *F. temperatum* представляет большую токсикологическую опасность, чем *F. subglutinans*, особенно в отношении БОВ, что еще раз подчеркивает важность точной идентификации этих близкородственных грибов *Fusarium*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам филогенетического исследования на основе частичных последовательностей трех полиморфных локусов (*TEF*, *tub* и *RPB2*), выделенные из кукурузы два штамма были идентифицированы как *F. subglutinans* s.str., а два других штамма, выделенные из стебля пшеницы и корня рапса, были идентифицированы как *F. temperatum*. Это первое обнаружение *F. temperatum* на территории России и первое обнаружение этого вида в микобиоте этих растений в мире. Детальный анализ морфологических характеристик штаммов *F. temperatum* и *F. subglutinans* не позволил выявить признаки, позволяющие достоверно дифференцировать эти два близкородственных вида. Однако *F. temperatum* и *F. subglutinans* различались по способности продуцировать микотоксины БОВ и МОН. Таким образом, однозначно идентифицировать морфологически сходные виды *F. temperatum* и *F. subglutinans* возможно только при привлечении молекулярно-генетических и хемотаксономических методов анализа.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19–76–30005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Al-Hatmi A., Sandoval-Denis M., Nabet C. et al. *Fusarium* volatile, a new potential pathogen from a human respiratory sample. *Fungal Syst. Evol.* 2019. V. 4. P. 171–181.
<https://doi.org/10.3114/fuse.2019.04.09>
- Bömke C., Tudzynski B. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*. 2009. V. 70. P. 1876–1893.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.020>
- Boutigny A.L., Scauflaire J., Ballois N. et al. *Fusarium temperatum* isolated from maize in France. *Eur. J. Plant Pathol.* 2017. V. 148. P. 997–1001.
<https://doi.org/10.1007/s10658-016-1137-x>
- Brankovics B., van Dam P., Rep M. et al. Mitochondrial genomes reveal recombination in the presumed asexual *Fusarium oxysporum* species complex. *BMC Genomics*. 2017. V. 18. P. 735.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4116-5>
- Britz H., Steenkamp E.T., Coutinho T.A. et al. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. *Mycologia*. 2002. V. 94. P. 722–730.
<https://doi.org/10.2307/3761722>
- Campos-Macías P., Arenas-Guzmán R., Hernández-Hernández F. *Fusarium subglutinans*: A new eumycetoma agent. *Med. Mycol. Case*. 2013. V. 2. P. 128–131.
<https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2013.06.004>
- Cosic J., Jurkovic D., Vrandecic K. et al. Pathogenicity of *Fusarium* species to wheat and barley ears. *Cereal Res. Commun.* 2007. V. 35. P. 529–532.
<https://doi.org/10.1556/crc.35.2007.2.91>
- Costa M.M., Melo M.P., Carmo F.S. et al. *Fusarium* species from tropical grasses in Brazil and description of two new taxa. *Mycol. Progress*. 2021. V. 20. P. 61–72.
<https://doi.org/10.1007/s11557-020-01658-5>
- Crous P.W., Lombard L., Sandoval-Denis M. et al. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Stud. Mycol.* 2021. V. 98. P. e100116.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>
- Czembor E., Stępień Ł., Waśkiewicz A. Effect of environmental factors on *Fusarium* species and associated mycotoxins in maize grain grown in Poland. *PLOS One*. 2015. V. 10. P. e0133644.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133644>
- Demirözer O. Target-oriented dissemination of the entomopathogenic fungus *Fusarium subglutinans* 12A by the Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Phytoparasitica*. 2019. V. 47. P. 393–403.
<https://doi.org/10.1007/s12600-019-00728-z>
- Dewing C., Van der Nest M.A., Santana Q.C. et al. Characterization of host-specific genes from pine- and grass-associated species of the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Pathogens*. 2022. V. 11. P. 858.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11080858>
- Fallahi M., Saremi H., Javan-Nikkhah M. et al. Isolation, molecular identification and mycotoxin profile of *Fusarium* species isolated from maize kernels in Iran. *Toxins*. 2019. V. 11. P. 297.
<https://doi.org/10.3390/toxins11050297>
- Fumero M.V., Reynoso M.M., Chulze S. *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* isolated from maize in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 2015. V. 199. P. 86–92.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.011>
- Fumero M.V., Villani A., Susca A. et al. Fumonisin and beauvericin chemotypes and genotypes of the sister species *Fusarium subglutinans* and *Fusarium temperatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86. P. e00133–20.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00133-20>
- Geiser D.M., Ivey M.L., Hakiza G. et al. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 2005. V. 97. P. 191–201.
<https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.191>
- Glenn A.E., Richardson E.A., Bacon C.W. Genetic and morphological characterization of a *Fusarium*

- verticillioides* conidiation mutant. *Mycologia*. 2004. V. 96. P. 968–980.
<https://doi.org/10.2307/3762081>
- Jewell L.E., Hsiang T. Multigene differences between *Microdochium nivale* and *Microdochium majus*. *Botany*. 2013. V. 91. P. 99–106.
<https://doi.org/10.1139/cjb-2012-0178>
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molec. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lanza F.E., Mayfield D.A., Munkvold G.P. First report of *Fusarium temperatum* causing maize seedling blight and seed rot in North America. *Plant Disease*. 2016. V. 100. P. 1019.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1301-PDN>
- Leslie J.F., Summerell B.A. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Professional, Ames, 2006.
- Levic J., Munaut F., Scauflaire J. et al. Polyphasic approach used for distinguishing *Fusarium temperatum* from *Fusarium subglutinans*. *J. Agric. Sci. Technol.* 2019. V. 21. P. 221–232. <http://r.istocar.bg.ac.rs/handle/123456789/614>
- Lima C.S., Pfenning L.H., Costa S.S. et al. *Fusarium tu-piense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia*. 2012. V. 104. P. 1408–1419.
<https://doi.org/10.3852/12-052>
- Liu Y.J., Wehlen S., Hall B.D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molec. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 1799–1808.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- Lord E., Leclercq M., Boc A. et al. Armadillo 1.1: An original workflow platform for designing and conducting phylogenetic analysis and simulations. *PLOS One*. 2012. V. 7. P. e29903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.002990>
- Malachová A., Sulyok M., Beltrán E. et al. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1362. P. 145–156.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.037>
- Moretti A., Mulé G., Ritieni A. et al. Cryptic subspecies and beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from Europe. *Int. J. Food Microbiol.* 2008. V. 127. P. 312–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.003>
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. 1983.
- Niehaus E.-M., Münsterkötter M., Proctor R.H. et al. Comparative “omics” of the *Fusarium fujikuroi* species complex highlights differences in genetic potential and metabolite synthesis. *Genome Biol. Evol.* 2016. V. 8. P. 3574–3599.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw259>
- Nirenberg H.I., O'Donnell K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 1998. V. 90. P. 434–458.
<https://doi.org/10.2307/3761403>
- O'Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1997. P. 103–116.
<https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- O'Donnell K., Cigelnik E., Nirenberg H.I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 1998. V. 90. P. 465–493.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026933>
- O'Donnell K., Nirenberg H.I., Aoki T. et al. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additionally phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 2000. V. 41. P. 61–78.
<https://doi.org/10.1007/BF02464387>
- O'Donnell K., Sarver B.A., Brandt M. et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* 2007. V. 45. P. 2235–2248.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00533-07>
- O'Donnell K., Rooney A.P., Proctor R.H. et al. Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Gen. Biol.* 2013. V. 52. P. 20–31.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
- Okello P.N., Mathew F.M. Cross pathogenicity studies show South Dakota isolates of *Fusarium acuminatum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, and *F. subglutinans* from either soybean or corn are pathogenic to both crops. *Plant Health Prog.* 2019. V. 20. P. 44–49.
<https://doi.org/10.1094/PHP-10-18-0056-RS>
- Pérez-Vázquez M.A.K., Morales-Mora L.A., Romero-Arenas O. et al. First report of *Fusarium temperatum* causing fruit blotch of *Capsicum pubescens* in Puebla, México. *Plant Dis.* 2022. V. 106. 1758.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1941-PDN>
- Pfordt A., Schiwek S., Rathgeb A. et al. Occurrence, pathogenicity, and mycotoxin production of *Fusarium temperatum* in relation to other *Fusarium* species on maize in Germany. *Pathogens*. 2020. V. 9. P. 864.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9110864>
- Proctor R.H., Van Hove F., Susca A. et al. Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Mol. Microbiol.* 2013. V. 90. P. 290–306.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12362>
- Qiu J., Lu Y., He D. et al. *Fusarium fujikuroi* species complex associated with rice, maize, and soybean from Jiangsu Province, China: phylogenetic, pathogenic, and toxicogenic analysis. *Plant Dis.* 2020. V. 104. P. 2193–2201.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1909-RE>
- Robles-Barrios F., Ramírez-Granillo A., Medina-Canales M.G. et al. *Fusarium temperatum* shows a

- hemibiotrophic infection process and differential pathogenicity over different maize breeds from Mexico. *J. Phytopathol.* 2022. V. 170. P. 21–33.
<https://doi.org/10.1111/jph.13052>
- Scauflaire J., Gourgue M., Callebaut A. et al. *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. *Eur. J. Plant Pathol.* 2012. V. 133. P. 911–922.
<https://doi.org/10.1007/s10658-012-9958-8>
- Scauflaire J., Gourgue M., Munaut F. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia.* 2011. V. 103. P. 586–597.
<https://doi.org/10.3852/10-135>
- Shin J.H., Han J.H., Lee J.K. et al. Characterization of the maize stalk rot pathogens *Fusarium subglutinans* and *F. temperatum* and the effect of fungicides on their mycelial growth and colony formation. *Plant Pathol. J.* 2014. V. 30. P. 397–406.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.08.2014.0078>
- Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Coutinho T.A. et al. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 4378–4382.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4378-4382.2000>
- Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Desjardins A.E. et al. Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. *Mycologia.* 2002. V. 94. P. 1032–1035.
<https://doi.org/10.2307/3761868>
- Stępień Ł., Gromadzka K., Chełkowski J. et al. Diversity and mycotoxin production by *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* as causal agents of pre-harvest Fusarium maize ear rot in Poland. *J. Appl. Genet.* 2019. V. 60. P. 113–121.
<https://doi.org/10.1007/s13353-018-0478-x>
- Tsavkelova E., Oeser B., Oren-Young L. et al. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 2012. V. 49. P. 48–57.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.10.005>
- Tudzynski B., Hölter K. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* 1998. V. 25. P. 157–170.
<https://doi.org/10.1006/fghi.1998.1095>
- Van Hove F., Waalwijk C., Logrieco A. et al. *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. *Mycologia.* 2011. V. 103. P. 570–585.
<https://doi.org/10.3852/10-038>
- Vermeulen M., Rothmann L.A., Swart W.J. et al. *Fusarium casha* sp. nov. and *F. curculicola* sp. nov. in the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from *Amaranthus cruentus* and threeweevil species in South Africa. *Diversity.* 2021. V. 13. 472.
<https://doi.org/10.3390/d13100472>
- Vrabka J., Niehaus E.-M., Münsterkötter M. et al. Production and role of hormones during interaction of *Fusarium* species with maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Front. Plant Sci.* 2019. V. 9. 1936.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01936>
- Wang J.-H., Zhang J.-B., Li H.-P. et al. Molecular identification, mycotoxin production and comparative pathogenicity of *Fusarium temperatum* isolated from maize in China. *J. Phytopathol.* 2014. V. 162. P. 147–157.
<https://doi.org/10.1111/jph.12164>
- Wang M.M., Crous P.W., Sandoval-Denis M. et al. *Fusarium* and allied genera from China: species diversity and distribution. *Persoonia.* 2022. V. 48. P. 1–53.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2022.48.01>
- Wit M., Ochodźki P., Warzecha R. et al. Influence of endosperm starch composition on maize response to *Fusarium temperatum* Scaufl. et Munaut. *Toxins.* 2022. V. 14. P. 200.
<https://doi.org/10.3390/toxins14030200>
- Xi K., Shan L., Yang Y. et al. Species diversity and chemotypes of *Fusarium* species associated with maize stalk rot in Yunnan province of Southwest China. *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 652062.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652062>
- Yang X., Xu X., Wang S. et al. Identification, pathogenicity, and genetic diversity of *Fusarium* spp. associated with maize sheath rot in Heilongjiang Province, China. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 10821.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810821>
- Yilmaz N., Sandoval-Denis M., Lombard L. et al. Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Persoonia.* 2021. V. 46. P. 129–162.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.05>
- Zhang H., Brankovics B., Luo W. et al. Crops are a main driver for species diversity and the toxigenic potential of *Fusarium* isolates in maize ears in China. *World Mycotoxin J.* 2016. V. 9. P. 701–715
<https://doi.org/10.3920/WMJ2015.2004>
- Zheng W., Zhao X., Xie Q. et al. A conserved homeobox transcription factor Htfl is required for phialide development and conidiogenesis in *Fusarium* species. *PLOS One.* 2012. V. 7. P. e45432.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045432>

Distinction of *Fusarium temperatum* and *F. subglutinans* in the *F. fujikuroi* species complex

T. Yu. Gagkaeva^{a,#}, O.P. Gavrilova^{a,##}, and A.S. Orina^{a,###}

^a All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

^{##}e-mail: olgavrilova1@yandex.ru

^{###}e-mail: orina-alex@yandex.ru

Fusarium strains isolated from the different plant hosts and formerly identified as *Fusarium subglutinans* s.l. according to morphological characteristics were analyzed in detail. Based on phylogenetic analysis of three loci (*TEF*, *tub*, and *RPB2*) two strains isolated from stem of wheat and root of rape were re-identified as *F. temperatum*. This is first report of rape and wheat as a novel plant host for *F. temperatum* that mainly associated with maize. This is also the first detection of *F. temperatum* in Russia. Other strains turned out to be *F. subglutinans* s.str. The examination of morphological characters has not revealed remarkable variation between the species: the features of *F. temperatum* and *F. subglutinans* are sufficiently similar to exclude confidence in identification based on visual assessment. Two *F. temperatum* strains possess alternate MAT idiomorphs, whereas the both *F. subglutinans* strains contain only MAT-1 idiomorph. Fertile crossings were observed between two *F. temperatum* strains in the laboratory conditions. Both *F. temperatum* strains produced beauvericin in high amounts of 1665 and 6106 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in contrast to *F. subglutinans* strains. Additionally, one *F. temperatum* strain produced 3407 $\mu\text{g kg}^{-1}$ moniliformin. No one from the analyzed strains produced the fumonisins. The differentiation of the *F. temperatum* and *F. subglutinans* species is possible only with the involvement of molecular genetics and chemotaxonomic methods.

Keywords: ascomata, conidiogenesis, DNA, fungi, mating type, morphology, mycotoxins, pathogenicity, rape, wheat.