

Том 58, Номер 1

ISSN 0026-3648

Январь 2024



МИКОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ



НАУКА
— 1727 —

МИКОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ

Том 58 № 1 2024 Январь—Февраль

Основан в 1967 г.
Выходит 6 раз в год
ISSN: 0026-3648

*Журнал издаётся под руководством
Отделения биологических наук РАН*

Главный редактор

А.Е. Коваленко

чл.-корр. РАН, проф., д.б.н., Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

Заместители главного редактора

академик РАН, проф., д.б.н. *О.С. Афанасенко*

проф., д.б.н. *Ю.К. Новожилов* (врио гл. редактора)

д.б.н. *И.В. Змитрович* (отв. секретарь, зав. редакцией)

Редакционная коллегия:

А.В. Александрова, Т.А. Белозерская, М.В. Бибикова, Е.В. Богомолова, М.А. Бондарцева,
С.П. Вассер, Д.Ю. Власов, С.В. Волобуев, Е.Ю. Воронина, Ф.Б. Ганнибал, Л.В. Гарибова,
Ц.М. Денчев, М.П. Журбенко, И.Ю. Кирцидели, А.В. Кураков, М.М. Левитин,
Е.Ф. Малышева, Минтер Дэвид Уильям, Н.В. Мироненко, О.В. Морозова, Л.Г. Переведенцева, Е.С.
Попов, Н.В. Псурцева, Ю.А. Ребриев, В.А. Соловьев, О.К. Струнникова, В.М. Терёшина,
А.Г. Ширяев, Шниттлер Мартин Герман

Ответственные редакторы выпуска:

А.В. Александрова и Н.В. Мироненко

© Российская академия наук, 2024

© Редакция журнала «Микология и
фитопатология» (составитель), 2024

MIKOLOGIYA I FITOPATOLOGIYA

FOUNDED BY

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
BRANCH OF BIOLOGICAL SCIENCES OF RAS

in January 1967

Published 6 issues a year

PUBLISHED UNDER DIRECTION
OF THE BRANCH OF BIOLOGICAL SCIENCES OF RAS

EDITOR-IN-CHIEF

Alexander E. Kovalenko,

Corresponding Member of RAS, Prof., Dr. Sci. (Biol.), Komarov Botanical Institute RAS,
St. Petersburg, Russia

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

Olga S. Afanasenko,

Academician of RAS, Prof., Dr. Sci. (Biol.), All-Russian Institute for Plant Protection RAS, St. Petersburg, Russia

Yuri K. Novozhilov,

Prof., Dr. Sci. (Biol.), Komarov Botanical Institute, St. Petersburg, Russia

Ivan V. Zmitrovich,

Dr. Sci (Biol.), Komarov Botanical Institute RAS, St. Petersburg, Russia

EDITORIAL BOARD

Alina V. Alexandrova, Tatyana A. Belozerskaya, Margarita V. Bibikova, Eugenie V. Bogomolova,
Margarita A. Bondartseva, Cvetomir M. Denchev, Ph. B. Gannibal, Lidiya V. Garibova, Irina Yu. Kirtsideli,
Alexander V. Kurakov, Mark M. Levitin, Ekaterina F. Malysheva, David W. Minter, Nina V. Mironenko, Olga V.
Morozova, Lydia G. Perevedentseva, Eugene S. Popov, Nadezhda V. Psurtseva,
Yury A. Rebriev, Anton G. Shiryaev, Martin H. Schnittler, Viktor A. Solovyov, Olga K. Strunnikova,
Vera M. Tereshina, Dmitry Yu. Vlasov, Sergey V. Volobuev, Elena Yu. Voronina, Solomon P. Wasser,
Mikhail P. Zhurbenko

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-66715 от 28 июля 2016 г.,
выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 13.05.2024 г.

Дата выхода в свет: 14.05.2024

Формат 60 × 90¹/₈.

Усл. печ. л.

Уч.-изд. л.

Тираж экз. Зак. Цена договорная

Учредители: Российская академия наук

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14

Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24 ФГБУ «Издательство «Наука» 121099, Москва, Шубинский пер., 6, стр. 1

Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука» 121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 1, 2024

ОБЗОРЫ И ДИСКУССИИ

- Современная таксономия и подходы к идентификации рода *Talaromyces* (*Trichocomaceae*, *Eurotiales*)
А. Е. Антонов, А. В. Александрова, И. И. Антонова 3

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

- Aspergillus tabacinus* – новый продуцент противотромботических протеаз
В. Н. Лавренова, А. А. Осмоловский 19
- Штамм *Aspergillus niger* AM1 как агент биодegradации нефти и нефтепродуктов
А. З. Миндубаев, Э. В. Бабынин, В. М. Бабаев, В. В. Тутучкина, С. Т. Минзанова, Л. Г. Миронова,
Ю. В. Караева 27

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

- Антагонистический потенциал выделенных в Узбекистане бактерий родов *Bacillus*
и *Pseudomonas* и грибов рода *Trichoderma* в отношении *Phytophthora infestans*
Н. Ш. Азимова, Х. М. Хамидова, И. М. Халилов, С. Н. Еланский, Е. М. Чудинова, Х. Х. Каримов,
К. С. Маманазарова, Ф. Б. Кобиров 36
- Сравнительное исследование эффективности индукторов устойчивости
хлопчатника к вертициллезному вилту
И. Г. Ахмеджанов, М. М. Хотамов, П. Г. Мерзляк 44
- Дифференциация грибов *Fusarium temperatum* и *F. subglutinans* из комплекса видов *F. fujikuroi*
Т. Ю. Гагкаева, О. П. Гаврилова, А. С. Орина 54

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Опыт культивирования чаги (*Inonotus obliquus*) на деревьях малого диаметра
в постагрогенных экосистемах
С. Г. Парамонов, В. В. Перелыгин, М. В. Жариков 69
- Систематика комплексного вида *Typhula ishkariensis* в России
О. Б. Ткаченко, Т. Хошино, Н. Мацумото 74

ХРОНИКА

- К юбилею академика РАН Ольги Сильвестровны Афанасенко 82
- К 90-летию Лидии Васильевны Гарибовой
М. Ю. Дьяков 87
-

Contents

Vol. 58, No. 1, 2024

REVIEWS AND DISCUSSIONS

- Modern taxonomy and approaches to the identification of the genus *Talaromyces* (*Trichocomaceae*, *Eurotiales*)
E. A. Antonov, A.V. Aleksandrova, I. I. Antonova 3
-

PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY, BIOTECHNOLOGY

- Aspergillus tabacinus* as a producer of antithrombotic proteases
V. N. Lavrenova, A. A. Osmolovskiy 19
- Aspergillus niger* AN1 strain as causative agent for oil and petroleum products biodegradation
A. Z. Mindubaev, E. V. Babynin, V. M. Babaev, V. V. Tutuchkina, S. T. Minzanova, L. G. Mironova, Yu. V. Karaeva 27
-

PHYTOPATHOGENIC FUNGI

- Antagonistic potential of bacterial strains of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* and fungi of the genus *Trichoderma* isolated in Uzbekistan against *Phytophthora infestans*
N. Sh. Azimova, H. M. Khamidova, I. M. Khalilov, S.N. Elansky, E. M. Chudinova, H. H. Karimov, K. S. Mamanazarova, F. B. Kobilov 36
- Comparative study of the efficiency of inducers of cotton resistance to Verticillium wilt
I. G. Akhmedzhanov, M. M. Khotamov, P. G. Merzlyak 44
- Distinction of *Fusarium temperatum* and *F. subglutinans* in the *F. fujikuroi* species complex
T. Yu. Gagkaeva, O. P. Gavrilova, A. S. Orina 54
-

SHORT COMMUNICATIONS

- Experimental infection of small-diameter trees with chaga (*Inonotus obliquus*) in a postagrogenous birch forest
S. G. Paramonov, V. V. Pereygin, M. V. Zharikov 69
- Taxonomy of the *Typhula ishkariensis* complex in Russia
O. B. Tkachenko, T. Hoshino, N. Matsumoto 74
-

CHRONICLE

- Towards the Jubilee of Olga Silvestrovna Afanasenko, Academician of the Russian Academy of Sciences 82
- To the 90th Anniversary of Lidiya Vasilyevna Garibova
M. Yu. Dyakov 87
-
-

ОБЗОРЫ И ДИСКУССИИ

УДК 579.8: 582.282

СОВРЕМЕННАЯ ТАКСОНОМИЯ И ПОДХОДЫ К ИДЕНТИФИКАЦИИ РОДА *TALAROMYCES* (*TRICHOSOMACEAE*, *EUROTIALES*)

© 2024 г. А. Е. Антонов^{1,2,3,*}, А. В. Александрова^{1,2,**}, И. И. Антонова¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

² Совместный Российско-Вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр, 100000 Ханой, Вьетнам

³ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*e-mail: AntonovEA@my.msu.ru

**e-mail: alina-alex2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.06.2023 г.

После доработки 25.10.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Talaromyces — монофилетический род микроскопических грибов, включающий в себя большое количество видов, в том числе клинически- и биотехнологически значимых. С 2011 г., после включения в него представителей *Penicillium subg. Biverticillium*, интерес к роду значительно вырос — было описано большое количество новых видов из различных регионов, особенно Азии и Северной Америки. На сегодняшний день, по обобщенным литературным данным, специалистами признается 198 видов *Talaromyces*. В работе приведен обзор истории и изменений в системе рода, обсуждены сложности идентификации видов при использовании как морфологических, так и молекулярных признаков, дано представление о генетических участках, наиболее удобных для процедуры ДНК-штрихкодирования. Отдельно приведены данные о географическом распространении и субстратной приуроченности его представителей.

Ключевые слова: генетические участки, идентификация видов, таксономические изменения, *Talaromyces*.

DOI: 10.31857/S0026364824010018, **EDN:** mdmcpv

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение доступности различных технологий секвенирования ДНК способствовало накоплению значительного количества молекулярных данных. Большинство этих данных доступны и хранятся в таких базах данных, как GenBank, UNITE, SILVA и др. Внедрение процедуры идентификации таксона с использованием только короткой последовательности ДНК (ДНК-штрихкодирование) и открытие универсальных генетических участков позволило сравнивать свои данные исследователям по всему миру. Для грибов таким претендентом на универсальность оказался участок внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), считающийся оптимальным для идентификации (Schoch et al., 2012; Lücking et al., 2020) и рекомендованный как первичный ДНК-штрихкод для различных групп грибов. Однако для значительной части

таксонов (~17%) было показано, что ITS является малоинформативным, поэтому они не могут быть надежно идентифицированы до видового уровня (Vu et al., 2019; Lücking et al., 2020). Недостаточная информативность при использовании ITS может быть связана с недавно показанной внутригеномной изменчивостью для мультисплайсных генов, которая в некоторых случаях может превышать межвидовую изменчивость (особенно это проблематично для видовых комплексов), что затрудняет идентификацию конкретных видов (Paloj et al., 2022). Вторичные ДНК-штрихкоды — в основном белок-кодирующие участки (например, *TEF1-α*, *RPB1*, *RPB2*, *β-tubulin*, *CaM*), все чаще внедряются для идентификации таксонов, где ITS не обеспечивает достаточной точности (Tekpinar, Kalmer, 2019). Несмотря на широкое распространение ДНК-штрихкодов, методы, основанные на

изучении фенотипических признаков, по-прежнему остаются важными для первичной каталогизации биоразнообразия грибов (Lücking et al., 2020).

Система грибов подвержена многочисленным изменениям, поскольку исследователи пытаются использовать различные подходы к их классификации. До августа 2011 г. в номенклатуре грибов на протяжении многих десятилетий была разрешена двойная номенклатура: из-за плеоморфизма различные формы спорообразования гриба (анаморфные и телеоморфные) могли иметь разные названия. Многие виды микроскопических грибов достаточно легко образуют анаморфное спороношение и редко или никогда — телеоморфное, поэтому существующие системы идентификации опирались преимущественно на морфологические признаки именно бесполого размножения. Однако эта система оказалась плохо совместима с данными, появившимися в настоящее время благодаря более надежным молекулярным методам (Gams, 2016).

Поэтому смещение акцента в системе грибов с морфологических на молекулярные признаки, отказ от двойной номенклатуры и принятие принципа “один гриб — одно название” (Hawksworth et al., 2011), привело к заметным изменениям как в понимании границ и объема рода *Talaromyces*, так и в его внутривидовой структуре.

История ключевых изменений рода *Talaromyces*

Род *Talaromyces* был введен С.Р. Benjamin (1955) как половая стадия для некоторых грибов из рода *Penicillium*, обладающих закрытыми плодовыми телами и рыхлым перидием из переплетенных гиф, с типовым видом *Talaromyces vermiculatus* (P.A. Dang.) С.Р. Benj., позднее, в 1972 г., сведенным в синонимы с *T. flavus* (Klöcker) Stolk et Samson (Stolk, 1972). Исходно представители рода *Talaromyces* морфологически характеризовались своей половой стадией (телеоморфой), имеющей плодовые тела типа гимнотеция или клейстотеция, унитарные прототуникатные сумки с восемью одноклеточными аскоспорами, имеющими экваториальные гребни или без них. Бесполое стадии (анаморфы) ассоциировались с родом *Penicillium* и другими родственными родами: *Geosmithia*, *Merimbla*, *Paecilomyces* и *Sagenomella* (Benjamin, 1955; Malloch, Cain, 1972; Stolk, 1972; Yaguchi et al., 1996b; Samson, Pitt, 2003).

Первый вид, который сейчас мы относим к роду *Talaromyces*, *T. flavovirens* (Durieu et Mont.) Visagie, Llimona et Seifert был изначально описан еще в 1845 г. как *Lasioderma flavovirens* Durieu et Mont., однако перенесен в род *Talaromyces* лишь в 2013 г.

(Visagie et al., 2013). Немного раньше, в 2012 г., было показано, что *Penicillium aureocephalum* Munt.-Cvetk., Hoyo et Gómez-Bolea является синонимом *Lasioderma flavovirens* и принадлежит к роду *Talaromyces* (Visagie et al., 2012), из-за чего возникли проблемы, так как *Lasioderma* была более старым названием, чем широко используемое *Talaromyces*. Это закономерно привело к предложению сохранить *Talaromyces*, и была проведена процедура консервации названия (Seifert et al., 2012).

Первая внутривидовая классификация *Talaromyces* была введена в 1972 г. Она была основана на особенностях строения конидиального аппарата и морфологии колоний, в результате чего для рода были предложены четыре секции: *Emersonii*, *Purpurea*, *Talaromyces*, *Thermophila* (Stolk, Samson, 1972). J. Pitt (1979) принял секции *Talaromyces*, *Thermophilus* и *Purpureus* и ввел для секции *Talaromyces* серии *Flavi*, *Lutei*, *Trachyspermi*. Также он ввел секцию *Coremigenum* для *Penicillium* subg. *Biverticillium*, добавив в нее серии *Dendritica* и *Duclauxii*. На основании изучения убихиноновых профилей большинства видов *Talaromyces* было показано, что почти все виды *Talaromyces*, связанные с анаморфой *Penicillium*, имели убихиноновую систему Q10(H₂), а остальные виды *Penicillium* — систему Q9. В отдельную секцию *Trachyspermus* были вынесены представители *Talaromyces* sect. *Talaromyces* ser. *Trachyspermi*, у которых была обнаружена смесь убихинонов Q10(H₂) и Q10(H₄), которые отличались белыми плодовыми телами и быстрым ростом при 37°C (Yaguchi et al., 1996).

Молекулярные данные по роду *Talaromyces* начали появляться с 1990-х гг., и они однозначно продемонстрировали тесную связь телеоморф *Talaromyces* с анаморфами рода *Penicillium* subg. *Biverticillium*, и показали, что *Penicillium* не является монофилетичным (LoBuglio et al., 1993; Berbee et al., 1995). В 1993 г. на основе анализа последовательностей малой субъединицы митохондриальной рДНК и ядерной рДНК для 10 видов *Talaromyces* и шести видов из *Penicillium* subg. *Biverticillium* было выдвинуто предположение о том, что введенные на основе морфологических данных секции и серии *Talaromyces* не полностью отражают их реальные филогенетические отношения; также были высказаны сомнения о принадлежности *Talaromyces thermophilus* Stolk к роду *Talaromyces* (LoBuglio et al., 1993). В дальнейшем полифилия *Penicillium* и близость *Talaromyces* к *Penicillium* subg. *Biverticillium* была продемонстрирована еще не раз на множестве молекулярных данных. Ключевые работы по анализу последовательностей различных генетических локусов приведены в табл. 1.

Основываясь на результатах филогенетических реконструкций по участкам *RPB1* и ITS, фенотипических признаках и профилях вторичных метаболитов, все виды из *Penicillium* subg. *Biverticillium* были включены в род *Talaromyces*, образовав монофилетическую кладу, удаленную от других подродов *Penicillium*. Диагноз рода при этом был значительно расширен, так как *Talaromyces* стал включать анаморфные виды с симметричными двухъярусными кисточками, гладкими или шероховатыми конидиеносцами, несущими остроколючные и ампуловидные фиалиды, продуцирующие конидии от шаровидных до эллипсоидных, а также телеоморфные виды с плодовыми телами типа клейстотетий с мягкой рыхлой стенкой, часто желтой окраски (иногда белой, кремовой, розовой, оранжевой, красноватой или зеленой), содержащими сумки с восемью, и, реже, двумя гладкими, но чаще шиповатыми и/или с гребнями аскоспорами, от эллипсоидных до шаровидных, от бесцветных до желтых, иногда красных (Samson et al., 2011; Yilmaz et al., 2014a).

Включение *Penicillium* subg. *Biverticillium* в *Talaromyces* выявило необходимость в новой внутриродовой системе, для чего было важно сначала уточнить таксономическое положение спорных видов. Так, *Talaromyces emersonii* Stolk и *T. byssochlamydoides* Stolk et Samson были перенесены в новый род *Rasamsonia* (Houbraken, Samson, 2011), а чуть позднее и *Talaromyces thermophilus* был перенесен в род *Thermomyces* (Houbraken et al., 2014). Таким образом, секции *Thermophila* и *Emersonii* были упразднены. В это же время было предложено разделить семейство *Trichocomaceae* на три: *Aspergillaceae*, *Thermoascaceae*, *Trichocomaceae* на основе мультилокусного филогенетического анализа по четырем генетическим участкам: *RPB1*, *RPB2*, *Tsr1* и *Cct8*. Род *Talaromyces*, вместе с пятью другими родами (*Dendrosphaera*, *Rasamsonia*, *Sagenomella*, *Thermomyces*, *Trichocoma*), остался в семействе *Trichocomaceae*, которое с этого

момента стали понимать *sensu stricto* (Houbraken, Samson, 2011).

После разграничения семейства *Trichocomaceae* и решения вопросов о переносе спорных видов на основе мультигенной филогении по локусам ITS, *BenA* и *RPB2* было предложено разделение, призванное наиболее точно отразить связи между видами рода *Talaromyces*. Были выделены следующие секции: *Bacillispori*, *Helici*, *Islandici*, *Purpurei*, *Talaromyces*, *Subinflati*, *Trachyspermi* (Yilmaz et al., 2014). Позже был описан новый вид *Talaromyces tenuis* B.D. Sun, A.J. Chen, Houbraken et Samson, который поместили в новую секцию *Tenuis* (Sun et al., 2020). В табл. 2 в хронологическом порядке собраны системы, предлагавшиеся для внутриродового разделения *Talaromyces*, а также указаны признаки, на основе которых они были выделены.

Таким образом, накопление молекулярных данных способствовало значительному расширению представления о составе рода *Talaromyces*. После включения в него *Penicillium* subg. *Biverticillium* число видов выросло до 71 (Samson et al., 2011). Позже на основе мультигенной филогении была предложена новая внутриродовая система, состоящая из семи секций, куда поместили 88 принятых на тот момент видов (Yilmaz et al., 2014). В 2020 г. в род была добавлена восьмая секция (Sun et al., 2020), а количество описанных видов увеличилось до 171 (Houbraken et al., 2020).

Виды рода *Talaromyces* и их субстратная приуроченность

Анализ литературных данных показал, что интерес к роду *Talaromyces* с 2011 г. значительно вырос: за период с 2011 по первое полугодие 2023 г. было описано более половины всех известных на сегодня видов *Talaromyces*, а их количество увеличилось с 71 вида (Samson et al., 2011) до 198 видов (обобщенные литературные данные на первое

Таблица 1. Работы, в которых была показана полифилия рода *Penicillium* и обособленность рода *Talaromyces*

Генетические локусы	Авторы
Малая субъединица ярдНК (<i>18S SSU</i>)	Berbee et al. (1995); Ogawa et al. (1997)
Большая субъединица ярдНК (<i>28S LSU</i>)	Ogawa et al. (1997)
Митохондриальный ген малой субъединицы рРНК (<i>mtSrDNA</i>) и внутренний транскрибируемый спейсер (ITS)	LoBuglio et al. (1993)
Кальмодулин (<i>CaM</i>)	Wang, Zhuang (2007)
Внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) ярдНК и наибольшая субъединица РНК-полимеразы II (<i>RPB1</i>)	Samson et al. (2011)

Таблица 2. Различные подходы к выделению секций в роде *Talaromyces*

Авторы	Stolk (1972)	Yaguchi et al. (1996)	Yilmaz et al. (2014)	Sun et al. (2020)
Признаки	морфологические	биохимические и морфологические	молекулярные и морфологические	молекулярные и морфологические
Секции	<i>Emersonii</i> ¹ <i>Purpurea</i> <i>Talaromyces</i> <i>Thermophila</i> ²	<i>Emersonii</i> ¹ <i>Purpurea</i> <i>Talaromyces</i> <i>Thermophila</i> ² <i>Trachyspermus</i>	<i>Bacillispori</i> <i>Purpurei</i> <i>Talaromyces</i> <i>Islandici</i> <i>Trachyspermi</i> <i>Subinflati</i> <i>Helici</i>	<i>Bacillispori</i> <i>Purpurei</i> <i>Talaromyces</i> <i>Islandici</i> <i>Trachyspermi</i> <i>Subinflati</i> <i>Helici</i> <i>Tenues</i>

Примечание.*Система, предложенная в работе Pitt (1979) (не приведена в данной таблице).¹ Секция перенесена в род *Rasamsonia* (Houbraken et al., 2012).² Секция перенесена в род *Thermomyces* (Houbraken et al., 2014).

полугодие 2023 г.). На рис. 1 приведена столбчатая диаграмма с хронологией количества описаний новых видов, входящих на данный момент в род *Talaromyces*.

Для построения диаграммы на рис. 1 была собрана база данных публикаций (190 публикаций) по всем видам, которые сегодня относят к роду *Talaromyces*. Начало датируется 1845 г., когда был описан вид *Lasioderma flavovirens*, получивший новую комбинацию *Talaromyces flavovirens* в 2013 г. (Visagie et al., 2013).

С увеличением количества работ по описанию новых видов *Talaromyces* исследователи стали проводить ревизии и оценку объема рода. Этот параметр менялся год от года. В табл. 3 приведены работы, опубликованные в период с 1955 по первое полугодие 2023 г., по которым можно оценить динамику расширения рода *Talaromyces* по количеству видов. До 2011 г. эти ревизии носили спорадический характер и стали регулярными лишь в последнее время.

Из данных табл. 3 хорошо заметно значительное нарастание в количестве видов, известных для *Talaromyces* с 1978 по 2011 г. В течение этого периода было описано или перенесено в род 31 вид, однако на 2023 г. из них в *Talaromyces* остались всего 10. Полный список этих видов и их текущее название приведены в табл. 4. Остальные виды, сейчас являющиеся частью рода *Talaromyces*, за это время были описаны в анаморфных родах *Penicillium*, *Sagenoma*, *Paecilomyces* и др. и перенесены в *Talaromyces* только в 2011 г. по результатам работы R.A. Samson (2011).

Распределение работ по описанию новых видов *Talaromyces* по странам и регионам их обнаружения за 11 лет (с 2012 по первое полугодие 2023 г.) представлено в табл. 5. Всего за этот период было описано 124 новых вида, 55 из которых описано из стран Азии, и, в частности, 49 новых видов (40% от общего количества) из стран Восточной Азии. Второй регион по числу новых описаний *Talaromyces* — Сев. Америка, откуда было описано 26 новых видов (21%).

Субстраты, на которых впервые были обнаружены виды *Talaromyces*, достаточно разнообразны и приведены в табл. 6. Для составления табл. 6 была собрана база данных публикаций по всем

Таблица 3. Динамика описания видов в роде *Talaromyces* с 1955 по 2023 г.

Год	Количество видов	Авторы
1955	10	Benjamin (1955)
1972	18	Stolk (1972); Malloch, Cain (1972)
1978	18	Kirilenko (1978)
1987	20	von Arx (1987)
2011	71	Samson et al. (2011)
2014	88	Yilmaz et al. (2014)
2018	120	Tsang et al. (2018)
2020	171	Houbraken et al. (2020)
2022	149	Wijayawardene et al. (2022)
2023	198	Обобщенные литературные данные

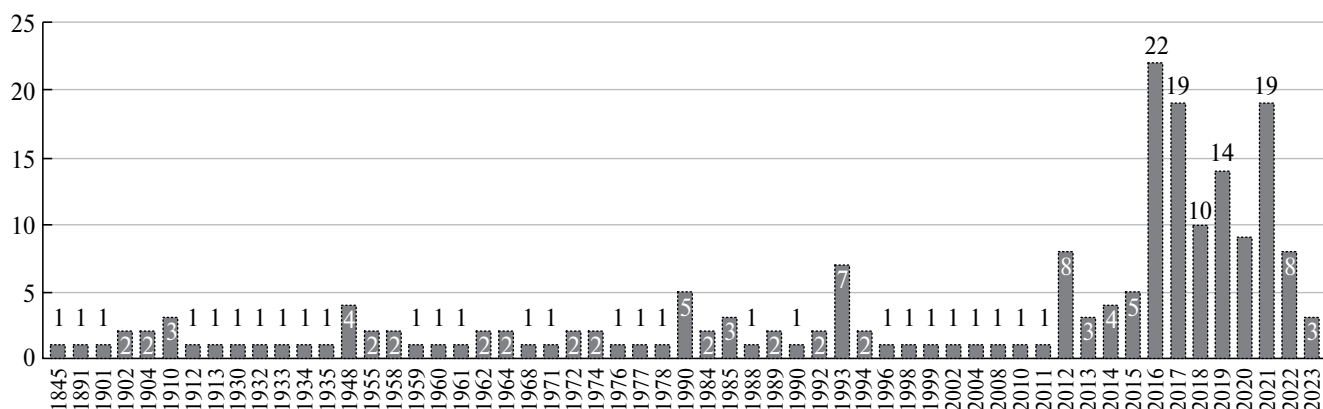


Рис. 1. Столбчатая диаграмма, демонстрирующая количество новых видов *Talaromyces* (или их базионимов), описанных в период с 1845 по 2023 г.

Таблица 4. Виды *Talaromyces*, описанные с 1978 по 2011 г.

Вид	Авторы	Текущее название (по: Index Fungorum, 2023)
<i>Talaromyces assiutensis</i> Samson et Abdel-Fattah	Samson, Abdel-Fattah (1978)	<i>Talaromyces assiutensis</i> Samson et Abdel-Fattah
<i>T. gossypii</i> Pitt	Pitt (1979)	<i>Penicillium gossypii</i> Pitt
<i>T. mimosinus</i> A.D. Hocking	Pitt (1979)	<i>Penicillium mimosinum</i> A.D. Hocking
<i>T. ohiensis</i> Pitt	Pitt (1979)	<i>Penicillium ohiense</i> L.H. Huang et J.A. Schmitt
<i>T. panasenkoi</i> Pitt	Pitt (1979)	<i>Penicillium panasenkoi</i> Pitt
<i>T. malagensis</i> (Thüm.) Stalpers et Samson	Stalpers (1984)	<i>Sporotrichum malagense</i> Thüm.
<i>T. thermocitrinus</i> Subrahman. et Gopalkr.	Subrahmanyam, Gopalkrishnan (1984)	<i>Talaromyces thermocitrinus</i> Subrahman. et Gopalkr. (Index Fungorum, 2023); <i>T. liani</i> (Kamyschko) Yilmaz, Frisvad et Samson (Yilmaz et al., 2014)
<i>T. ryukyuensis</i> (S. Ueda et Udagawa) Arx	Arx (1987)	<i>Penicillium unicum</i> Tzean, J.L. Chen et Shiu
<i>T. viridis</i> (Stolk et G.F. Orr) Arx (как <i>viride</i>)	Arx (1987)	<i>Talaromyces viridis</i> (Stolk et G.F. Orr) Arx
<i>T. derxii</i> Takada et Udagawa	Takada, Udagawa (1988)	<i>Penicillium derxii</i> Takada et Udagawa
<i>T. macrosporus</i> (Stolk et Samson) Frisvad, Samson et Stolk	Frisvad et al. (1990)	<i>Talaromyces macrosporus</i> (Stolk et Samson) Frisvad, Samson et Stolk
<i>T. helicus</i> var. <i>boninensis</i> Yaguchi et Udagawa	Yaguchi et al. (1992)	<i>Talaromyces boninensis</i> (Yaguchi et Udagawa) Samson, N. Yilmaz et Frisvad
<i>T. unicus</i> Tzean, J.L. Chen et Shiu	Tzean et al. (1992)	<i>Penicillium unicum</i> Tzean, J.L. Chen et Shiu
<i>T. convolutus</i> Udagawa	Udagawa (1993)	<i>Penicillium convolutum</i> Udagawa
<i>T. emodensis</i> Udagawa	Udagawa (1993)	<i>Penicillium emodense</i> Udagawa
<i>Talaromyces tardifaciens</i> Udagawa	Udagawa (1993)	<i>Penicillium tardifaciens</i> Udagawa
<i>T. indigoticus</i> Takada et Udagawa	Takada, Udagawa (1993)	<i>Penicillium indigoticum</i> Takada et Udagawa
<i>T. austrocalifornicus</i> Yaguchi et Udagawa	Yaguchi et al. (1993a)	<i>Penicillium austrocalifornicum</i> Yaguchi et Udagawa
<i>T. subinflatus</i> Yaguchi et Udagawa	Yaguchi et al. (1993a)	<i>Penicillium subinflatum</i> Yaguchi et Udagawa
<i>T. barcinensis</i> Yaguchi et Udagawa	Yaguchi et al. (1993b)	<i>Penicillium barcinense</i> Yaguchi et Udagawa
<i>T. lagunensis</i> Udagawa, Uchiy. et Kamiya	Udagawa et al. (1994)	<i>Penicillium lagunense</i> Udagawa, Uchiy. et Kamiya

Таблица 4. Окончание

<i>T. spectabilis</i> Udagawa et Shoji Suzuki	Udagawa, Suzuki (1994)	<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier
<i>T. muroii</i> Yaguchi, Someya et Udagawa	Yaguchi et al. (1994)	<i>Talaromyces muroii</i> Yaguchi, Someya et Udagawa
<i>T. eburneus</i> Yaguchi, Someya et Udagawa	Yaguchi et al. (1994)	<i>Rasamsonia eburnea</i> (Yaguchi, Someya et Udagawa) Houbraken et Frisvad
<i>T. trachyspermus</i> var. <i>assiutensis</i> (Samson et Abdel-Fattah) Yaguchi et Udagawa	Yaguchi et al. (1994)	<i>Talaromyces assiutensis</i> Samson et Abdel-Fattah
<i>T. wortmannii</i> var. <i>sublevisporus</i> Yaguchi et Udagawa	Yaguchi et al. (1994)	<i>Talaromyces sublevisporus</i> (Yaguchi et Udagawa) Samson, N. Yilmaz et Frisvad
<i>T. hachijoensis</i> Yaguchi, Someya et Udagawa	Yaguchi et al. (1996a)	<i>Talaromyces hachijoensis</i> Yaguchi, Someya et Udagawa
<i>T. euchlorocarpus</i> Yaguchi, Someya et Udagawa	Yaguchi et al. (1999)	<i>Penicillium euchlorocarpium</i> Yaguchi, Someya et Udagawa
<i>T. brevicompactus</i> H.Z. Kong	Kong (1999)	<i>Hamigera brevicompacta</i> (H.Z. Kong) Houbraken, Frisvad et Samson
<i>T. ocotl</i> Bills et Heredia	Heredia et al. (2001)	<i>Sagenomella ocotl</i> (Bills et Heredia) Samson, Houbraken et Frisvad
<i>T. apiculatus</i> Samson, N. Yilmaz et Frisvad	Samson et al. (2011)	<i>Talaromyces apiculatus</i> Samson, N. Yilmaz et Frisvad

Примечание. Данные по текущему названию вида приведены из Index Fungorum (2023). Подчеркиванием выделены виды, которые остались в *Talaromyces*.

Таблица 5. Страны, из которых были описаны новые виды *Talaromyces* с 2012 по первое полугодие 2023 г.

Страна	Число видов	Регион	Ссылка
Китай	42	Восточная Азия	Chen et al. (2016); Wang et al. (2016); Wang et al. (2016); Wang et al. (2017); Su, Niu (2018); Jiang et al. (2018); Sun et al. (2020); Han et al. (2021); Pyrrri et al. (2021); Tian, (2021); Wei et al. (2021); Zhang et al. (2021); Han et al. (2021); Sun et al. (2022); Wang, Zhuang, (2022); Zhang et al. (2023)
Республика Корея	6		Sang et al. (2013); You et al. (2020); Nguyen et al. (2021)
Япония	1		Fujii et al. (2014)
Таиланд	4	Юго-Восточная Азия	Manoch et al. (2013); Nuankaew et al. (2022)
Индия	1	Южная Азия	Rajeshkumar et al. (2019)
Иран	1	Западная Азия	Crous et al. (2016)
США	22	Северная Америка	Peterson, Jurjević, (2013); Guevara-Suarez et al. (2017); Peterson, Jurjević, (2017); Crous, Wingfield, et al. (2018); Crous, Luangsa-ard, et al. (2018); Peterson, Jurjević, (2019)
Канада	2		Visagie et al. (2015); Peterson, Jurjević, (2017)
Мексика	2		Visagie, Hirooka, et al. (2014); Peterson, Jurjević, (2017)
Колумбия	6	Южная Америка	Visagie et al. (2015); Yilmaz, López-Quintero, et al. (2016); Guerra Sierra et al. (2022)
Бразилия	4		Barbosa et al. (2018); Crous, Carnegie, et al. (2019); Rodríguez-Andrade et al. (2019)
Аргентина	2		Romero et al. (2016)

Таблица 5. Окончание

Гватемала	1	Центральная Америка	Crous, Wingfield, et al. (2019)
Испания	4	Европа	Rodríguez-Andrade et al. (2019); Pyrri et al. (2021)
Нидерланды	4		Yilmaz et al. (2012); Visagie et al. (2015); Crous et al. (2017); Pyrri et al. (2021)
Германия	2		Crous et al. (2017); Pyrri et al. (2021)
Италия	2		Varriale et al. (2018); Peterson, Jurjević, (2019)
Португалия	1		Trovão et al. (2021)
Франция	1		Crous et al. (2020)
Южная Африка	12		Yilmaz et al. (2012); Visagie, Jacobs, (2012); Frisvad et al. (2013); Visagie et al. (2014); Visagie et al. (2015); Yilmaz et al. (2016); Peterson, Jurjević, (2019); Pyrri et al. (2021)
Гана	1	Африка	Peterson, Jurjević, (2019)
Австралия	2		Visagie et al. (2015); Sun et al. (2020)
Микронезия	1		Visagie et al. (2014)
Итого:	124		

видам, которые сегодня относят к роду *Talaromyces*. Подсчитано процентное соотношение количества видов на определенном типе субстрата и общего количества видов для каждого типа субстрата. Эти данные также можно условно разделить на две части. До 2012 г. основная масса видов была описана из почвы и подстилки (57 видов, 77%), а с остальных субстратов значительно меньше. Нужно отметить, что в 1959 г. из внутренних органов китайской бамбуковой крысы (*Rhizomys sinensis*) в горной местности Центрального Вьетнама был выделен и описан патоген *Penicillium marneffe* Segretain, Capponi et Sureau (Segretain, 1959), являющийся эндемиком Юго-Восточной Азии и вызывающий глубокие микозы у людей с ослабленным иммунитетом (Pruksaphon et al., 2022). Позже этот вид перенесен в род *Talaromyces* (Samson et al., 2011).

Субстраты, на которых были описаны виды *Talaromyces* после 2011 г., гораздо разнообразнее. Почва, подстилка, ризосфера и корни растений являются субстратом для уже менее чем половины (48%) всех описанных за это время видов. Значительная часть видов (21%) была обнаружена в воздухе и пыли помещений. С растительными субстратами (остатками растений, древесины, семенами, фруктами) связано 16% описанных видов. Остальные находки (15%) сделаны на самых разнообразных субстратах, к которым относятся насекомые, ткани собаки, ткани человека, мед, вода. Прямая ассоциация с этими субстратами требует дополнительных подтверждений отсутствия поверхностной контаминации их спорами.

Таким образом, интерес к видам рода *Talaromyces* значительно вырос после 2011 г., что также отразилось и на количестве описаний новых видов: с 2000 по 2011 г. было описано только два новых вида рода *Talaromyces* и четыре вида рода *Penicillium* (в 2002 г. описан *Penicillium calidicanium* J.L. Chen, в 2004 г. — *P. cecidicola* Seifert, Hoekstra et Frisvad, в 2008 г. — *P. ramulosum* Visagie et K. Jacobs, в 2010 г. — *P. albobiverticillium* H.M. Hsieh, Y.M. Ju et S.Y. Hsieh), которые в 2011 г. были включены в *Talaromyces* (Houbraken, Samson, 2011). С 2012 по 2023 г. было описано 124 новых вида, значительная часть — из стран Азии. На первое полугодие 2023 г., по обобщенным литературным данным, известно 198 видов рода *Talaromyces*, которые в большинстве приурочены к почве и связанным с ней субстратам (подстилке, растениям, древесине, семенам, фруктам, корням) — 141 вид, или 71% от общего количества видов.

Дифференциация и идентификация видов рода *Talaromyces*

Классификация микроскопических грибов всегда вызывала трудности у исследователей. Основные причины — дефицит легко наблюдаемых стабильных морфологических признаков, отсутствие полового размножения у значительной части видов и связанные с этим технические трудности при изучении. Выходом из этой ситуации стало развитие молекулярной филогении и основанной на ней системы, что позволило свести к минимуму субъективность интерпретации полученных

Таблица 6. Субстраты, на которых были описаны виды рода *Talaromyces*

Субстрат	Число видов	%
1955–2011		
Почва	54	74
Искусственные материалы	5	6.8
Растения, древесина, семена	4	5.4
Подстилка	3	4.1
2012–2023		
Почва	50	40.3
Воздух	17	13.7
Растения и древесина	12	9.6
Помещения и пыль	9	7.2
Подстилка	5	4
Ризосфера и корни	5	4
Воздух	3	4.1
Неизвестный субстрат	3	4.1
Перо <i>Hylocichla fuscescens</i>	1	1.4
Внутренние органы <i>Rhizomys sinensis</i>	1	1.4
Ткани и органы человека	5	4
Насекомые, суставная жидкость животных	5	4
Фрукты	5	4
Вода	4	3.2
Мед	4	3.2
Семена	3	2.4

данных. Логичным продолжением молекулярной филогении стал полифазный таксономический подход для определения критериев вида, основанный на независимом анализе множества признаков и свойств у большого числа штаммов (Gannibal, 2021). Попытки построения таких систем на основе морфологических, физиологических, молекулярных признаков и вторичных метаболитов сейчас проводят и для рода *Talaromyces* (Yilmaz et al., 2014; Tsang et al., 2018; Houbroken et al., 2020b).

Наиболее полная система для достоверного разделения видов была предложена в 2014 г. для рода *Penicillium*, но она также хорошо работает и для *Talaromyces* (Visagie et al., 2014). В основе этой системы лежат строго стандартизованные условия культивирования штамма и последующая его характеристика по трем направлениям: морфологическому, молекулярному и физиологическому.

На первом этапе штамм инкубируют из споровой суспензии в течение семи сут в темноте на вентилируемых чашках Петри (диаметр 90 мм, 20 мл питательной среды в чашке). Рекомендуемые питательные среды: MEA при 25°C, CYA в трехкратной повторности при 30 и 37°C. Дополнительно можно использовать среды CZ, YES, OA, CREA, DG18, CYAS (Crous et al., 2009; Visagie, Houbroken et al., 2014). Второй этап — всесторонний анализ, характеристика и выявление признаков, описанных в табл. 7.

Идентификация грибов рода *Talaromyces* в настоящее время является сложной задачей, требующей изучения множества признаков (табл. 7), во-первых, микро- и макроморфологических, во-вторых, изучение физиологических особенностей, в-третьих, определение спектра вторичных метаболитов с использованием различных методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволяющей получить профили, специфичные для разных видов. Для большинства соединений *Talaromyces* уже доступны стандарты профилей различных экстрактов (Klitgaard et al., 2014).

Все это в совокупности с молекулярными данными необходимо для того, чтобы надежно установить границы видов или ввести новые таксоны (Yilmaz et al., 2014; Tsang et al., 2018). При этом даже незначительные вариации в составе питательной среды и окружающих условий могут изменить внешний вид организма и привести к неверной идентификации, поскольку морфологические изменения являются одним из способов адаптации к выживанию в окружающей среде. Именно поэтому необходимо использовать стандартизированные методы работы для проведения морфологических и физиологических исследований (Samson et al., 2014; Tsang et al., 2018; Houbroken et al., 2020).

Идентификация видов рода *Talaromyces* осложняется наличием близкородственных видов, образующих видоые комплексы и имеющих сходные морфологические признаки, и часто не имеющих телеоморфной стадии. Сегодня все больше микологов придерживаются концепции филогенетического распознавания видов с генеалогическим соответствием (GCPSR — genealogical concordance phylogenetic species recognition) для понимания и разделения криптических видов (Taylor et al., 2000). На основе этой концепции исследователи использовали последовательности различных маркерных генов (ITS, β -тубулина, *RPB1*, *RPB2*, кальмодулина и др.) для разграничения видов *Talaromyces*, входящих в ранее выявленные комплексы

Таблица 7. Данные, необходимые для дифференциации видов рода *Talaromyces* (по: Visagie, 2014)

Морфологическая характеристика	
Макроморфологические признаки	Микроморфологические признаки ²
— диаметр и текстура колонии; — цвет мицелия и спороношения; — наличие растворимого пигмента; — цвет экссудата и реверса; — верхний температурный предел роста; — выделение кислотных или щелочных метаболитов на индикаторной среде CREA¹	— количество уровней ветвления между ножкой и фиалидами; — размер, форма и текстура конидиогенного аппарата, конидий, клейстотециев, сумок и аскоспор (при наличии)
Молекулярная идентификация	
— получение последовательностей ДНК генов для идентификации видов: ITS, BenA; — получение последовательностей ДНК генов для филогении: CaM, RPB2; — поиск сходных нуклеотидных последовательностей через BLAST	
Выявление вторичных метаболитов (экстралитов) ³	
— экстракция метаболитов смесью: этилацетат/дихлорметан/метанол (3 : 2 : 1) (об./об./об.) с 1% (об./об.) муравьиной кислоты; — фильтрация и анализ при помощи ВЭЖХ (Klitgaard et al., 2014); — дополнительно — реакция Эрлиха⁴ с использованием фильтровальной бумаги	

Примечание.¹Состав питательных сред по: Crous et al. (2009).²Признаки выявляют на среде MEA¹; жидкость для приготовления препаратов — 60%-я молочная кислота; конидии отмывают в 70%-м этаноле.³Используют пять агаровых блоков из каждой среды (CYA¹ и MEA) на один образец.⁴Рекомендации по реакции Эрлиха для различения метаболитов по: Lund (1995).

видов. В табл. 8 приведены описанные в литературе комплексы внутри рода *Talaromyces*.

Однако сложности с идентификацией могут возникнуть даже с разными штаммами одного вида. Например, внутривидовая вариативность *Talaromyces albobiverticillius* (H.M. Hsieh, Y.M. Ju et S.Y. Hsieh) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert была хорошо продемонстрирована как на уровне макроморфологии колонии, так и на уровне последовательностей ДНК, где наблюдались вариации (Frisvad et al., 2013). Возможно, в скором времени этот вид признают комплексным и разделят на самостоятельные виды.

Выбор генов для идентификации и филогении *Talaromyces*

При текущем внедрении консолидированного распознавания видов, где молекулярные данные получили основную роль, маркерные последовательности ДНК и филогенетический анализ стали “золотым стандартом” для точной идентификации грибов (Tsang et al., 2018). Стоит учитывать, что некоторые из маркеров недостаточно информативны для разделения видов в пределах рода. Так, внутривидовой транскрибируемый спейсер (ITS — internal

transcribed spacer) — общепринятый генетический ДНК-штрихкод для грибов, возможно, слишком консервативен для рода *Talaromyces* и родственных родов (Schoch et al., 2012). В целом участок ITS можно использовать для идентификации видов *Talaromyces*, но в нескольких кладах он имеет низкую изменчивость, не позволяя различать некоторые виды (Samson et al., 2011; Yilmaz et al., 2014). Например, *T. ruber* (Stoll) N. Yilmaz, Houbraken, Frisvad et Samson и *T. amestolkiae* N. Yilmaz, Houbraken, Frisvad et Samson различаются всего одной парой оснований, поэтому для их идентификации необходимо использовать альтернативные гены (Yilmaz et al., 2012). Более поздние данные демонстрируют наличие внутригеномных вариаций ITS, что может вызвать проблемы при разграничении и идентификации видов, при этом в исследованных геномах *Talaromyces pinophilus* (Hedgc.) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert, *T. funiculosus* (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert, *T. rugulosus* (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert такие вариации обнаружены не были (Paloi et al., 2022).

Более вариативный по сравнению с ITS ген β-тубулина *BT2*, а в частности его фрагмент *BenA* длиной 400–450 п.о., прост для амплификации, как и участок ITS, но при этом позволяет точно

Таблица 8. Видовые комплексы в роде *Talaromyces*

Название	Виды	Авторы
<i>T. purpureogenus</i>	<i>T. purpureogenus</i> (Stoll) Samson, N. Yilmaz, Houbraken, Spierenb., Seifert, Peterson, Varga et Frisvad; <i>T. ruber</i> (Stoll) N. Yilmaz, Houbraken, Frisvad et Samson; <i>T. amestolkiae</i> N. Yilmaz, Houbraken, Frisvad et Samson; <i>T. stollii</i> N. Yilmaz, Houbraken, Frisvad et Samson	Yilmaz et al. (2012)
<i>T. wortmanii</i>	<i>T. wortmannii</i> (Klöcker) C.R. Benj.; <i>T. variabilis</i> (Sopp) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert; <i>T. sublevisporus</i> (Yaguchi et Udagawa) Samson, N. Yilmaz et Frisvad	Yilmaz et al. (2016)
<i>T. rugulosus</i>	<i>T. rugulosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert; <i>T. atricola</i> (Thom) S.W. Peterson et Jurjević; <i>T. echinosporus</i> (Nehira) Samson, N. Yilmaz et Frisvad; <i>T. infraolivaceus</i> Visagie, N. Yilmaz et K. Jacobs; <i>T. acaricola</i> Visagie, N. Yilmaz et K. Jacobs	Yilmaz et al. (2016)
<i>T. minioluteus</i>	<i>T. chongqingensis</i> X.C. Wang et W.Y. Zhuang; <i>T. minnesotensis</i> Guevara-Suarez, Cano et Dania García; <i>T. minioluteus</i> (Dierckx) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert; <i>T. calidominioluteus</i> Houbraken et Pyrri; <i>T. africanus</i> Houbraken, Pyrri et Visagie; <i>T. germanicus</i> Houbraken et Pyrri; <i>T. gaditanus</i> (C. Ramírez et A.T. Martínez) Houbraken et Soccio; <i>T. samsonii</i> (Quintan.) Houbraken et Pyrri	Pyrri et al. (2021)
<i>T. pinophilus</i>	<i>T. soli</i> Jurjević et S.W. Peterson; <i>T. tumuli</i> Jurjević et S.W. Peterson; <i>T. malicola</i> Jurjević et S.W. Peterson; <i>T. domesticus</i> Jurjević et S.W. Peterson; <i>T. pratensis</i> Jurjević et S.W. Peterson; <i>T. mae</i> X.Z. Jiang et L. Wang; <i>T. lentulus</i> X.Z. Jiang et L. Wang; <i>T. adpressus</i> A.J. Chen, Frisvad et Samson; <i>T. pinophilus sensu stricto</i>	Peterson, Jurjević (2019)

различить известные виды *Talaromyces*. Поэтому он был предложен в качестве альтернативного (вторичного) идентификационного маркера для этого рода (Yilmaz et al., 2014), и это предложение было поддержано в последующих работах (Visagie et al., 2015). Также была выявлена проблема с амплификацией паралогов гена β -тубулина в секции *Islandici* с использованием пар праймеров bt2a/bt2b или Bt2f/T22 (Peterson, Jurjević, 2013), что подтвердилось в отдельной работе по изучению *Talaromyces* из секции *Islandici* (Yilmaz, Visagie et al., 2016), где для этой секции авторы рекомендовали использовать пару праймеров T10 и Bt2b (Glass, Donaldson, 1995) при температуре отжига 50 или 52°C для амплификации.

Также имеются данные по анализу последовательностей гена митохондриальной цитохром С оксидазы 1 (*COI*) в качестве ДНК-штрихкода для *Penicillium* subgen. *Penicillium* и родственных видов, показавшего хорошее таксономическое разрешение на видовом уровне, при этом амплификация

и выравнивание *COI* были проще, при этом *BenA* обеспечивал большее разрешение, чем ITS или *COI* (Seifert et al., 2007).

Ген второй субъединицы РНК-полимеразы II (*RPB2*), показал хорошее филогенетическое разрешение для видов из отдела *Ascomycota* (Liu et al., 1999), но его амплификация, а также амплификация участка наибольшей субъединицы РНК-полимеразы II (*RPB1*) затруднена во всех секциях *Talaromyces* (Yilmaz et al., 2014a), что усложняет его использование в качестве вторичного идентификационного маркера в отличие от легко амплифицируемого участка *BenA* (Samson et al., 2014).

Анализ последовательностей гена кальмодулина (*CaM*) показал хорошую разрешающую способность для рода *Talaromyces* (Wang, Zhuang, 2007), однако отделить *T. amestolkiae* от *T. ruber* по этому участку не удалось (Yilmaz et al., 2012). Амплификация последовательностей кальмодулина часто затруднена в секции *Trachyspermi* при использовании

пар праймеров CMD5/CMD6 и CF1/CF4 (Yilmaz et al., 2014).

Стоит отметить, что при выборе того или иного генетического участка стоит учитывать наличие и количество последовательностей ДНК для сравнения в базах данных (в первую очередь в GenBank). Больше всего последовательностей для рода *Talaromyces* доступно для участка ITS, который все же недостаточно информативен сам по себе и его желательно использовать вместе с рекомендованным как вторичный маркер участком *BenA* (Yilmaz et al., 2014), для которого также имеется достаточное количество последовательностей. Участки *RPB1*, *RPB2* и *CaM*, рекомендованные для построения филогении на уровне рода (Visagie, Houbraken, et al., 2014) и выше, так же хорошо работают и для идентификации видов. Для *RPB2* и *CaM* доступно значительное количество референсных последовательностей, а для участка *RPB1* значительно меньше; при этом *RPB1* и *RPB2* достаточно трудны для амплификации, в отличие от ITS, *BenA* и *CaM*. При разделении семейства *Trichocomaceae* были использованы участки *Tsr1* и *Cct8* (Houbraken, Samson, 2011), по которым доступны последовательности и для некоторых видов *Talaromyces*, вероятно, их тоже можно использовать для идентификации видов, но количество последовательностей доступных для сравнения крайне мало.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количество видов рода *Talaromyces* за последнее десятилетие выросло более чем двукратно, достигнув в 2023 г. 198 видов, при этом значительная часть новых видов была описана из стран Азии. За это время произошла смена подходов в работе от морфологического через молекулярный к полифазному, который теперь является “золотым стандартом” для описания новых видов грибов, при этом для видовой идентификации ключевой стала процедура ДНК-штрихкодирования. Однако короткие последовательности ДНК не всегда информативны, и часто идентифицировать виды достаточно сложно. На это есть несколько причин: используемые генетические участки имеют недостаточную разрешающую способность, в общедоступных базах данных для сравнения отсутствуют нужные референсные последовательности, исследуемый вид является частью видового комплекса.

При обширном количестве макроморфологических признаков, очень варьирующих даже в пределах одного вида, наблюдается крайне скудное разнообразие микроморфологических признаков, что также не способствует простой идентификации

видов *Talaromyces*. Выходом из этой ситуации может стать использование полифазного подхода, но соблюдать полные рекомендации, одновременно исследуя морфологические признаки, проводя молекулярную идентификацию и выявляя профиль вторичных метаболитов, — крайне ресурсоемкая задача. Поэтому часто на первое место при идентификации и описании новых видов *Talaromyces* выходит процедура ДНК-штрихкодирования как наиболее простой и точный метод. Этому способствует и большое количество накопленных последовательностей ДНК в общедоступных базах данных. Для ключевых, достаточно информативных и простых в амплификации генетических участков — универсального ITS и рекомендованного в качестве вторичного маркера *BenA* — таких последовательностей достаточно много.

Большая часть данных о новых видах сегодня поступает из стран Азии и Северной Америки, при этом по-прежнему остаются “белые пятна” в наших знаниях о разнообразии и распространении представителей рода *Talaromyces* в других регионах — как умеренного, так и тропического климата. Значительная часть видов *Talaromyces* известна из почвы, а описание новых видов происходит в последнее время с других, иногда не связанных с ней субстратов, в связи с чем при планировании работы следует учитывать этот факт. Все вышесказанное предполагает наличие высокого потенциала для описания новых видов, особенно на слабоизученных территориях. Таким образом, в будущем можно ожидать дальнейшего увеличения числа видов *Talaromyces*.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300081-7. Составление базы данных поддержано программой Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1396).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arx J.A. von A re-evaluation of the *Eurotiales*. *Persoonia*. 1987. V. 13 (3). P. 273–300.
- Barbosa R.N., Bezerra J.D.P., Souza-Motta C.M. et al. New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2018. V. 111 (10). P. 1883–1912. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1081-1>
- Benjamin C.R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia*. 1955. V. 47 (5). P. 669. <https://doi.org/10.2307/3755578>
- Berbee M.L., Yoshimura A., Sugiyama J. et al. Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in

- the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia*. 1995. V. 87 (2). P. 210.
<https://doi.org/10.2307/3760907>
- Chen A.J., Sun B.D., Houbraken J. et al. New *Talaromyces* species from indoor environments in China. *Stud. Mycol.* 2016. V. 84 (1). P. 119–144.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.003>
- Crous P.W., Carnegie A.J., Wingfield M.J. et al. Fungal Planet description sheets: 868–950. *Persoonia*. 2019. V. 42. P. 291–473.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.42.11>
- Crous P.W., Cock A.W. de (eds). Centraalbureau voor Schimmelcultures. Fungal biodiversity. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, 2009.
- Crous P.W., Wingfield M.J., Burgess T.I. et al. Fungal Planet description sheets: 469–557. *Persoonia*. 2016. V. 37 (1). P. 218–403.
<https://doi.org/10.3767/003158516X694499>
- Crous P.W., Wingfield M.J., Burgess T.I. et al. Fungal Planet description sheets: 625–715. *Persoonia*. 2017. V. 40 (1).
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.11>
- Crous P.W., Wingfield M.J., Burgess T.I. et al. Fungal Planet description sheets: 716–784. *Persoonia*. 2018. V. 40 (1). P. 239–392. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.10>
- Crous P.W., Luangsa-ard J.J., Wingfield M.J. et al. Fungal Planet description sheets: 785–867. *Persoonia*. 2018. V. 41 (1). P. 238–417.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.12>
- Crous P.W., Wingfield M.J., Lombard L. et al. Fungal Planet description sheets: 951–1041. *Persoonia*. 2019. V. 43. P. 223–425.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.06>
- Crous P.W., Cowan D.A., Maggs-Kölling G. et al. Fungal Planet description sheets: 1112–1181. *Persoonia*. 2020. V. 45 (1). P. 251–409.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.45.10>
- Frisvad J.C., Filtenborg O., Samson R.A., et Stolk A.C. Chemotaxonomy of the genus *Talaromyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1990. V. 57 (3). P. 179–189. <https://doi.org/10.1007/BF00403953>
- Frisvad J.C., Yilmaz N., Thrane U. et al. *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. *PLOS One*. 2013. V. 8 (12). P. e84102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084102>
- Fujii T., Hoshino T., Inoue H. et al. Taxonomic revision of the cellulose-degrading fungus *Acremonium cellulolyticus* nomen nudum to *Talaromyces* based on phylogenetic analysis. *FEMS Microbiol. Letters*. 2014. V. 351 (1). P. 32–41. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12352>
- Gams W. Recent changes in fungal nomenclature and their impact on naming of microfungi. In: D.-W. Li (ed.). *Biology of Microfungi*. Springer International Publishing, N.Y. etc., pp. 7–23.
- Gannibal F.B. Polyphasic approach in fungal taxonomy. *Zhurnal obshchey biologii*. 2021. V. 82 (3). P. 175–187 (in Russ.).
<https://doi.org/10.31857/S0044459621020032>
- Glass N.L., Donaldson G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environm. Microbiol.* 1995. V. 61 (4). P. 1323–1330.
<https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Guerra Sierra B., Arteaga-Figueroa L., Sierra-Pelaéz S. et al. *Talaromyces santanderensis*: A new cadmium-tolerant fungus from cacao soils in Colombia. *J. Fungi*. 2022. V. 8 (10). P. 1042.
<https://doi.org/10.3390/jof8101042>
- Guevara-Suarez M., Sutton D.A., Gené J. et al. Four new species of *Talaromyces* from clinical sources. *Mycoses*. 2017. V. 60 (10). P. 651–662.
<https://doi.org/10.1111/myc.12640>
- Han P.-J., Sun J.-Q., Wang L. Two new sexual *Talaromyces* species discovered in estuary soil in China. *J. Fungi*. 2021. V. 8 (1). P. 36. <https://doi.org/10.3390/jof8010036>
- Hawksworth D.L., Crous P.W., Redhead S.A. et al. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus*. 2011. V. 2 (1). P. 105–112. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2011.02.01.14>
- Heredia G., Reyes M., Arias R. et al. *Talaromyces ocotl* sp. nov. and observations on *T. rotundus* from conifer forest soils of Veracruz State, Mexico. *Mycologia*. 2001. V. 93 (3). P. 528–540.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12063185>
- Houbraken J., de Vries R.P., Samson R.A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv. Appl. Microbiol.* 2014. V. 86. P. 199–249.
<https://doi.org/10.1016/978-0-12-800262-9.00004-4>
- Houbraken J., Kocsubé S., Visagie C.M. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud. Mycol.* 2020. V. 95. P. 5–169.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- Houbraken J., Samson R.A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud. Mycol.* 2011. V. 70. P. 1–51.
<https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>
- Houbraken J., Spierenburg H., Frisvad J.C. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012. V. 101 (2). P. 403–421.
<https://doi.org/10.1007/s10482-011-9647-1>
- Index Fungorum. CABI Bioscience, 2023. <http://www.indexfungorum.org/>. Accessed 10.06.2023.
- Jiang X.-Z., Yu Z.-D., Ruan Y.-M. et al. Three new species of *Talaromyces* sect. *Talaromyces* discovered from soil in China. *Scientific Reports*. 2018. V. 8 (1). P. 4932. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23370-x>

- Kirilenko T.S. Key to soil ascomycetes. Kiev, Naukova dumka, 1978 (in Russ.).
- Klitgaard A., Iversen A., Andersen M.R. et al. Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Analyt. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406 (7). P. 1933–1943. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7582-x>
- Kong H. A new species of *Talaromyces*. *Mycosystema*. 1999. V. 18 (1). P. 9–11.
- LoBuglio K.F., Pitt J.I., Taylor J.W. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia*. 1993. V. 85 (4). P. 592. <https://doi.org/10.2307/3760506>
- Lücking R., Aime M.C., Robbertse B. et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus*. 2020. V. 11 (1). P. 14. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>
- Lund F. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters Appl. Microbiol.* 1995. V. 20 (4). P. 228–231. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00434.x>
- Malloch D., Cain R. The *Trichocomataceae*: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium* imperfect states. *Can. J. Bot.* 1972. V. 50 (12). P. 2613–2628. <https://doi.org/10.1139/b72-335>
- Manoch L., Dethoup T., Yilmaz N. et al. Two new *Talaromyces* species from soil in Thailand. *Mycoscience*. 2013. V. 54 (5). P. 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2012.12.002>
- Nguyen T.T.T., Frisvad J.C., Kirk P.M. et al. Discovery and extrolite production of three new species of *Talaromyces* belonging to sections *Helici* and *Purpurei* from freshwater in Korea. *J. Fungi*. 2021. V. 7 (9). P. 722. <https://doi.org/10.3390/jof7090722>
- Nuankaew S., Chuaseeharonnachai C., Preedanon S. et al. Two novel species of *Talaromyces* discovered in a karst cave in the Satun UNESCO global geopark of Southern Thailand. *J. Fungi*. 2022. V. 8 (8). P. 825. <https://doi.org/10.3390/jof8080825>
- Ogawa H., Yoshimura A., Sugiyama J. Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: Evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia*. 1997. V. 89 (5). P. 756. <https://doi.org/10.2307/3761132>
- Paloi S., Luangsa-ard J.J., Mhuantong W. et al. Intragenomic variation in nuclear ribosomal markers and its implication in species delimitation, identification and barcoding in fungi. *Fungal Biol. Rev.* 2022. V. 42. P. 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.04.002>
- Peterson S.W., Jurjević Ž. *Talaromyces columbinus* sp. nov., and genealogical concordance analysis in *Talaromyces* clade 2a. *PLOS One*. 2013. V. 8 (10). P. e78084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078084>
- Peterson S.W., Jurjević Ž. New species of *Talaromyces* isolated from maize, indoor air, and other substrates. *Mycologia*. 2017. P. 1–20. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1369339>
- Peterson S.W., Jurjević Ž. The *Talaromyces pinophilus* species complex. *Fungal Biology*. 2019. V. 123 (10). P. 745–762. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.007>
- Pitt J. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, L., 1980.
- Pruksaphon K., Nosanchuk J.D., Ratanabanangkoon K. et al. *Talaromyces marneffei* infection: virulence, intracellular lifestyle and host defense mechanisms. *J. Fungi*. 2022. V. 8 (2). P. 200. <https://doi.org/10.3390/jof8020200>
- Pyrrri I., Visagie C.M., Soccio P. et al. Re-evaluation of the taxonomy of *Talaromyces minioluteus*. *J. Fungi*. 2021. V. 7 (11). P. 993. <https://doi.org/10.3390/jof7110993>
- Rajeshkumar K.C., Yilmaz N., Marathe S.D. et al. Morphology and multigene phylogeny of *Talaromyces amyrossmaniae*, a new synnematus species belonging to the section *Trachyspermi* from India. *MycKeys*. 2019. V. 45. P. 41–56. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.45.32549>
- Rodríguez-Andrade E., Stchigel A.M., Terrab A. et al. Diversity of xerotolerant and xerophilic fungi in honey. *IMA Fungus*. 2019. V. 10 (1). P. 20. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0021-7>
- Romero S.M., Romero A.I., Barrera V. et al. *Talaromyces systylus*, a new synnematus species from Argentinean semi-arid soil. *Nova Hedwigia*. 2016. V. 102 (1–2). P. 241–256. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2015/0306
- Samson R.A., Pitt J.I. (eds). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. N.Y., CRC Press, 2000. <https://doi.org/10.1201/9781482284188>
- Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 2014. V. 78 (1). P. 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Samson R.A., Yilmaz N., Houbraken J. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud. Mycol.* 2011. V. 70. P. 159–183. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.04>
- Samson R., Abdel-Fattah H. A new species of *Talaromyces* and a discussion of some recently described taxa. *Persoonia*. 1978. V. 9 (4). P. 501–504.
- Sang H., An T.-J., Kim C.S. et al. Two novel *Talaromyces* species isolated from medicinal crops in Korea. *J. Microbiol.* 2013. V. 51 (5). P. 704–708. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-3361-9>
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*.

2012. V. 109 (16). P. 6241–6246.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Segretain G. *Penicillium marneffei* n. sp., agent d'une mycose du système réticulo-endothélial. Mycopathologia et Mycologia Applicata. 1959. V. 11 (4). P. 327–353.
<https://doi.org/10.1007/BF02089507>
- Stalpers J.A. A revision of the genus *Sporotrichum*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 1984.
- Stolk A.C. The genus *Talaromyces*: studies on *Talaromyces* and related genera II. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 1972.
- Stolk A.C., Samson R. Studies on *Talaromyces* and related genera I. *Hamigera* gen. nov. and *Byssoschlamys*. Undefined. 1971.
- Su L., Niu Y.-C. Multilocus phylogenetic analysis of *Talaromyces* species isolated from cucurbit plants in China and description of two new species, *T. cucurbitiradicus* and *T. endophyticus*. Mycologia. 2018. V. 110 (2). P. 375–386.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1432221>
- Subrahmanyam A., Gopalkrishnan K.S. Notes on thermophilic fungi. Indian Botanical Reporter. 1984. P. 33–36.
- Sun B.-D., Chen A.J., Houbraken J. et al. New section and species in *Talaromyces*. MycoKeys. 2020. V. 68. P. 75–113.
<https://doi.org/10.3897/mycokeys.68.52092>
- Sun X.-R., Xu M.-Y., Kong W.-L. et al. Fine identification and classification of a novel beneficial *Talaromyces* fungal species from Masson Pine rhizosphere soil. J. Fungi. 2022. V. 8 (2). P. 155.
<https://doi.org/10.3390/jof8020155>
- Takada M., Udagawa S. A new species of heterothallic *Talaromyces*. A new species of heterothallic *Talaromyces*. 1988. V. 31 (2). P. 417–425.
- Takada M., Udagawa S. *Talaromyces indigoticus*, a new species from soil. Mycotaxon. 1993. V. 46. P. 129–134.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. Fungal Genetics Biol. 2000. V. 31 (1). P. 21–32.
<https://doi.org/10.1006/fgb.2000.1228>
- Tekpinar A.D., Kalmer A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. Nova Hedwigia. 2019. V. 109 (1–2). P. 187–224.
https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0528
- Tian J. *Talaromyces peaticola* (Aspergillaceae, Eurotiales), a new species from the Zoige wetlands, China. Stud. Fungi. 2021. V. 6 (1). P. 391–399.
<https://doi.org/10.5943/sif/6/1/29>
- Trovão J., Soares F., Tiago I. et al. *Talaromyces saxosalicus* sp. nov., isolated from the limestone walls of the Old Cathedral of Coimbra, Portugal. Int. J. Systematic Evolutionary Microbiol. 2021. V. 71 (12).
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005175>
- Tsang C.-C., Tang J.Y.M., Lau S.K. et al. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era — Past, present and future. Computational and Structural Biotechnology J. 2018. V. 16. P. 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.05.003>
- Tzean S.S., Chen J.L., Shiu S.H. *Talaromyces unicus* sp. nov. from Taiwan. Mycologia. 1992. V. 84 (5). P. 739–749.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1992.12026200>
- Udagawa S. Three new species of *Talaromyces* from Nepal. Mycotaxon. 1993. V. 48. P. 141–156.
- Udagawa S., Suzuki S. *Talaromyces spectabilis*, a new species of food-borne ascomycetes. Mycotaxon. 1994. V. 50. P. 81–88.
- Udagawa S., Uchiyama S., Kamiya S. *Talaromyces lagunensis*, a new species from Philippine soil. Mycoscience. 1994. V. 35 (4). P. 403–407.
<https://doi.org/10.1007/BF02268513>
- Varriale S., Houbraken J., Granchi Z. et al. *Talaromyces borbonicus*, sp. nov., a novel fungus from biodegraded *Arundo donax* with potential abilities in lignocellulose conversion. Mycologia. 2018. V. 110 (2). P. 316–324.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1456835>
- Visagie C.M., Hirooka Y., Tanney J.B. et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. Stud. Mycol. 2014. V. 78 (1). P. 63–139.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.002>
- Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Stud. Mycol. 2014. V. 78 (1). P. 343–371.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Visagie C.M., Jacobs K. Three new additions to the genus *Talaromyces* isolated from Atlantis sandveld fynbos soils. Persoonia. 2012. V. 28 (1). P. 14–24.
<https://doi.org/10.3767/003158512X632455>
- Visagie C.M., Llimona X., Vila J. et al. Phylogenetic relationships and the newly discovered sexual state of *Talaromyces flavovirens*, comb. nov. Mycotaxon. 2013. V. 122 (1). P. 399–411.
<https://doi.org/10.5248/122.399>
- Visagie C.M., Yilmaz N., Frisvad J.C. et al. Five new *Talaromyces* species with ampulliform-like phialides and globose rough walled conidia resembling *T. verruculosus*. Mycoscience. 2015. V. 56 (5). P. 486–502.
<https://doi.org/10.1016/j.myc.2015.02.005>
- Vu D., Groenewald M., De Vries M. et al. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. Stud. Mycol. 2019. V. 92 (1). P. 135–154.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
- Wang L., Zhuang W.-Y. Phylogenetic analyses of penicillia based on partial calmodulin gene sequences. BioSystems. 2007. V. 88 (1–2). P. 113–126.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2006.04.008>
- Wang Q.-M., Zhang Y.-H., Wang B. et al. *Talaromyces neofusisporus* and *T. qii*, two new species of section *Talaromyces* isolated from plant leaves in Tibet, China. Scientific Rep. 2016. V. 6 (1). P. 18622.
<https://doi.org/10.1038/srep18622>
- Wang X.-C., Chen K., Qin W.-T. et al. *Talaromyces heiheensis* and *T. mangshanicus*, two new species from

- China. Mycol. Progress. 2017. V. 16 (1). P. 73–81.
<https://doi.org/10.1007/s11557-016-1251-3>
- Wang X.-C., Chen K., Xia Y.-W. et al. A new species of *Talaromyces* (*Trichocomaceae*) from the Xisha Islands, Hainan, China. Phytotaxa. 2016. V. 267 (3). P. 187.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.267.3.2>
- Wang X.-C., Zhuang W.-Y. New species of *Talaromyces* (*Trichocomaceae*, *Eurotiales*) from Southwestern China. J. Fungi. 2022. V. 8 (7). P. 647.
<https://doi.org/10.3390/jof8070647>
- Wei S., Xu X., Wang L. Four new species of *Talaromyces* section *Talaromyces* discovered in China. Mycologia. 2021. V. 113 (2). P. 492–508.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1853457>
- Wijayawardene N., Hyde K., Dai D. et al. Outline of Fungi and fungus-like taxa — 2021. Mycosphere. 2022. V. 13 (1). P. 53–453.
<https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/2>
- Yaguchi T., Imai S., Udagawa S. *Talaromyces helicus* var. *boninensis*, a new variety from Japanese soil. Trans. Mycol. Soc. Japan. 1992. V. 33. P. 511–515.
- Yaguchi T., Miyadoh S., Udagawa S. Two new species of *Talaromyces* from soil. Trans. Mycol. Soc. Japan. 1993a. V. 34 (2). P. 245–254.
- Yaguchi T., Miyadoh S., Udagawa S. *Talaromyces barcinensis*, new species a new soil ascomycete. Trans. Mycol. Soc. Japan. 1993b. V. 34 (1). P. 15–19.
- Yaguchi T., Someya A., Miyadoh S. et al. A new variety of *Talaromyces wortmannii* and some observation on *Talaromyces assiutensis*. Mycoscience. 1994. V. 35 (1). P. 63–68.
<https://doi.org/10.1007/BF02268530>
- Yaguchi T., Someya A., Udagawa S. Two new species of *Talaromyces* from Taiwan and Japan. Mycoscience. 1994. V. 35 (3). P. 249–255. <https://doi.org/10.1007/BF02268446>
- Yaguchi T., Someya A., Udagawa S. New and rare microfungi from the island of Hachijo-jima. 1996a. V. 37 (2). P. 157–162.
- Yaguchi T., Someya A., Udagawa S. A reappraisal of intrageneric classification of *Talaromyces* based on the ubiquinone systems. Mycoscience. 1996b. V. 37 (1). P. 55–60.
<https://doi.org/10.1007/BF02461457>
- Yaguchi T., Someya A., Udagawa S. *Talaromyces euchlorocarpus*, a new species from soil. Mycoscience. 1999. V. 40 (2). P. 133–136.
<https://doi.org/10.1007/BF02464291>
- Yilmaz N., Houbraken J., Hoekstra E.S. et al. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. Persoonia. 2012. V. 29 (1). P. 39–54.
<https://doi.org/10.3767/003158512X659500>
- Yilmaz N., López-Quintero C.A., Vasco-Palacios A.M. et al. Four novel *Talaromyces* species isolated from leaf litter from Colombian Amazon rain forests. Mycol. Progress. 2016. V. 15 (10–11). P. 1041–1056. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1227-3>
- Yilmaz N., Visagie C.M., Frisvad J.C. et al. Taxonomic re-evaluation of species in *Talaromyces* section *Islandici*, using a polyphasic approach. Persoonia. 2016. V. 36 (1). P. 37–56.
<https://doi.org/10.3767/003158516X688270>
- Yilmaz N., Visagie C.M., Houbraken J. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. Stud. Mycol. 2014. V. 78. P. 175–341.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.08.001>
- You Y.-H., Aktaruzzaman M., Heo I. et al. *Talaromyces halophytorum* sp. nov. isolated from roots of *Limonium tetragonum* in Korea. Mycobiology. 2020. V. 48 (2). P. 133–138.
<https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1723389>
- Zhang Z., Li X., Chen W. et al. Culturable fungi from urban soils in China II, with the description of 18 novel species in *Ascomycota* (*Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes* and *Sordariomycetes*). MycoKeys. 2023. V. 98. P. 167–220.
<https://doi.org/10.3897/mycokeys.98.102816>
- Zhang Z.-K., Wang X.-C., Zhuang W.-Y. et al. New Species of *Talaromyces* (*Fungi*) isolated from soil in Southwestern China. Biology. 2021. V. 10 (8). P. 745.
<https://doi.org/10.3390/biology10080745>
- Ганнибал Ф.Б. (Gannibal) Полифазный подход в таксономии грибов // Журнал общей биологии. 2021. Т. 82. № 3. С. 175–187.
- Кириленко Т.С. (Kirilenko) Определитель почвенных сумчатых грибов. Киев: Наукова думка, 1978. 263 с.

Modern taxonomy and approaches to the identification of the genus *Talaromyces* (*Trichocomaceae*, *Eurotiales*)

E.A. Antonov^{a,b,c,#}, A.V. Aleksandrova^{a,b,##}, and I.I. Antonova^a

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^b Joint Vietnam-Russian Tropical Research and Technological Center, Hanoi, Vietnam

^c Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, Russia

[#]e-mail: AntonovEA@my.msu.ru

^{##}e-mail: alina-alex2011@yandex.ru

Talaromyces is a monophyletic genus of microscopic fungi which contain a large number of species, including clinically and biotechnologically significant ones. Since 2011 when species of *Penicillium* subg. *Biverticillium* were transferred to a *Talaromyces*, interest in the genus has grown significantly, a large number of new species have been described from various regions, especially Asia and North America. According to the generalized literature data on the 2023 year a genus *Talaromyces* have a 198 species. This paper provides an overview of the history and changes in the genus system, discusses the difficulties in identifying both using morphological and molecular characters, and gives information about genetic regions that are most convenient for the DNA barcoding procedure. Separately, provides a data about regions and substrates.

Keywords: genetic regions, species identification, *Talaromyces*, taxonomic changes

УДК 582.282.123.4 : 577.152.34

***ASPERGILLUS TABACINUS* – НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ ПРОТИВОТРОМБОТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ**

© 2024 г. В. Н. Лавренова^{1,*}, А. А. Осмоловский^{1,**}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

*e-mail: pkviktoria@mail.ru

**e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 28.09.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Микромицеты рода *Aspergillus* — известные продуценты фибринолитических и активаторных к плазминогену протеаз. Однако для разработки новых противотромботических препаратов стоит использовать штаммы, секретируемые протеазы которых соответствуют следующим критериям: 1) проявляют одновременно антикоагулянтную, фибринолитическую и активаторную к плазминогену активности; 2) имеют узкую субстратную специфичность; 3) способны расщеплять субстраты двух последовательно идущих белковых компонентов системы гемостаза. Максимальная активность отобранного по данным критериям продуцента *Aspergillus tabacinus* при оптимальных условиях культивирования составила $87 \text{ Е} \times 10^{-3}$ по субстрату активированного протеина С S-2366 и $73 \text{ Е} \times 10^{-3}$ по субстрату тромбина Chromozym TH. Фибринолитическая активность полученного после высевания и диализа препарата составила 779.1 Е/мг белка.

Ключевые слова: антикоагулянты, протеазы, фибринолитики, *Aspergillus*.

DOI: 10.31857/S0026364824010022, **EDN:** mdcene

ВВЕДЕНИЕ

Тромбообразование — это процесс формирования сгустка тромбоцитов и в меньшей степени других элементов крови, скрепленных белковыми, прежде всего фибриновыми, сшивками. В норме тромбообразование запускается только при физическом повреждении и нарушении целостности сосудистой стенки. Патологическое тромбообразование может являться как причиной, так и следствием множества заболеваний сердечно-сосудистой и иммунной систем. Ежегодная смертность от тромбозов разного генеза составляет почти 25 млн чел. по всему миру (Vokarev, Порова, 2014).

Лекарственными препаратами, предотвращающими формирование тромбов при различных заболеваниях, являются антикоагулянты, а вещества, которые помогают расщеплять уже существующие тромбы, называются фибринолитиками. Поскольку основной составляющей, поддерживающей структуру тромба, являются тяжи фибрина и фибриногена, фибринолитики по своей природе являются протеазами, способствующими расщеплению этих тяжей. Некоторые антикоагулянты также являются протеолитическими ферментами,

так как имитируют или активируют реакции, катализируемые белками собственной противосвертывающей системы организма, ряд компонентов которой является протеазами.

В настоящее время для терапии тромбозов используют несколько протеаз бактериального происхождения: стрептокиназу (Maksimenko, 2012), стафилокиназу (Vanrerschueren et al., 1997), септапептазу (Nair, 2022), наттокиназу (Kurosawa et al., 2015). Потенциал и разнообразие грибных протеаз вряд ли уступает бактериальным ферментам. В то время как бактерии специализируются на секретиции одного — трех специфических протеолитических ферментов, микроскопические грибы, как правило, выделяют целую смесь протеаз (до 12), действие которых дополняет друг друга (Wandersman, 1989; Pavlukova et al., 1998). Продуценты протеаз с антикоагулянтными и фибринолитическими свойствами известны среди представителей отделов *Mucoromycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*, однако наибольшая доля исследованных на данный момент продуцентов противотромботических протеаз приходится на представителей рода *Aspergillus* семейства *Aspergillaceae* отдела *Ascomycota* (Osмоловский et al., 2021a, Sharma et al., 2021). Широкая

экологическая иррадиация данного рода, который включает более 800 видов, позволяет штаммам секретировать огромное разнообразие протеолитических ферментов, необходимых для адаптации к среде обитания. Несмотря на наличие более десятка известных продуцентов противотромботических протеаз среди микромицетов рода *Aspergillus*, поиск новых продуцентов является актуальной задачей, поскольку многие существующие антикоагулянты и фибринолитики имеют побочные эффекты. Кроме того, нахождение новых протеаз со своими уникальными физико-химическими свойствами может быть необходимо для разработки диагностических наборов, работающих в различных условиях.

Целью данной работы является анализ противотромботической активности внеклеточных протеаз нескольких недавно изученных штаммов рода *Aspergillus* (Surkova et al., 2023), формулирование критериев отбора перспективного штамма-продуцента и подбор условий культивирования для максимального выхода ферментного препарата выбранного штамма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования продуцента. Микромицет *Aspergillus tabacinus* BEOFB3260m был получен из коллекции биологического факультета Белградского университета. Поверхностное культивирование продуцента проводили в чашках Петри на агаризованной среде Чапека. Для поддержания культуры пересевы производили раз в семь дней. Для последующего перевода культуры в глубинное культивирование производили пересев на скошенную агаризованную среду Чапека и через семь дней пересевали в посевную среду.

Пересев в посевную среду производили путем смыва споровой суспензии со скошенного агара. Культивирование на посевной среде (в %: сусло — 6.7, глюкоза — 1.0, пептон — 0.1, pH 5.5–6.0) производили в течение 48 ч при 28°C и постоянном перемешивании со скоростью 200 об/мин в качалочных колбах объемом 750 мл. Объем среды в одной колбе составлял 100 мл. Для индукции образования внеклеточных ферментов 3% объема посевной среды переносили в соответствующий объем ферментационной среды 1 (в %: глицерин — 7.0, глюкоза — 3.0, гидролизат рыбной муки — 3.0, $MgSO_4$ — 0.1, KH_2PO_4 — 0.1, pH 7.0) или ферментационной среды 2 (в %: глюкоза — 3.5, крахмал — 1.0, гидролизат рыбной муки — 0.5, пептон — 0.5, NaCl — 0.2, KH_2PO_4 — 0.05, $MgSO_4$ — 0.05, pH 7.0) (Osmolovskiy et al., 2018). Культивирование производили при

28°C и постоянном перемешивании со скоростью 200 об/мин в качалочных колбах объемом 750 мл. Объем среды в одной колбе составлял 100 мл.

Для выяснения влияния условий культивирования на продукцию протеаз культивировали штамм-продуцент на двух ферментационных средах и измеряли концентрацию белка, азоказеинолитическую и амидолитическую активности аликвот культуральной жидкости, отобранных каждые 24 ч, начиная с конца вторых суток культивирования. Культивирование проводили до заметного снижения протеолитической активности культуральной жидкости. По результатам эксперимента выбирали наиболее подходящую среду и оптимальное время культивирования продуцента.

После выбора оптимальной среды и времени культивирования продуцент выращивали в данных условиях, но на средах с разными значениями pH (4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 и 8.0). Значение pH в средах корректировали при помощи титрования 0.1-нормальными р-рами HCl и NaOH. После выбора оптимального pH культивировали микромицет на данной среде при разных температурах (26, 28, 30 и 32°C).

Определение азоказеинолитической активности. Протеолитическую активность культуральной жидкости по отношению к азоказеину определяли спектрофотометрически при 37°C, измеряя поглощение растворимых продуктов реакции при 340 нм. Использовали 0.2%-й р-р азоказеина в 0.05 М Трис-HCl буфере, pH 8.2. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл раствора белка к 100 мкл пробы фермента. Инкубацию ферментной пробы с субстратом проводили в течение 30 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-й трихлоруксусной кислоты. В контрольной пробе реакцию останавливали без 30-минутной инкубации. Все пробы центрифугировали в течение 5 мин при 14 000 g и измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости. За единицу ферментативной активности принимали то количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0.01 ед.

Определение амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами. Специфическую ферментативную активность в культуральной жидкости определяли спектрофотометрически при 37°C при длине волны 405 нм по накоплению пара-нитроанилина после гидролиза хромогенных пептидных субстратов тромбина Chromozym TH и активированного протеина C S-2236 (Zvonareva et al., 2018). Субстрат растворяли в 0.05-молярном Трис-HCl буфере, pH 8.2, до концентрации 0.5 мг/мл. Далее смешивали 100 мкл субстрата с 50

мкл такого же буфера. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл культуральной жидкости. Спустя 5 мин реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-й уксусной кислоты. В качестве контроля использовали пробу без пятиминутной инкубации. За единицу ферментативной активности принимали число мкмоль пара-нитроанилина, образовавшегося в 1 мл р-ра за 1 мин.

Измерение концентрации белка. Концентрацию белка в культуральной жидкости и в пробах ферментного препарата проводили по методу Брэдфорд (Bradford, 197). Оптическую плотность в образцах после добавления Кумасси G250 измеряли при 595 нм.

Получение препарата секретируемых белков. Препарат секретируемых белков получали методом высаливания. К 2 л культуральной жидкости, полученной после культивирования микромицета в течение оптимального времени в ферментационной среде при подобранных значениях pH и температуры, добавляли сульфат аммония постепенно до степени насыщения 80%. Спустя 48 ч инкубации при 4°C отделяли белковый осадок центрифугированием при 15 000 g в течение 40 мин. Осадок ресуспендировали в 10 мл 0.005-молярного Трис-НСl буфера, pH 8.2, и помещали в диализный мешок, после чего проводили диализ против того же буфера. После диализа нерастворимые белки были отделены центрифугированием при описанных выше параметрах, а супернатант был лиофильно высушен и далее хранился при –20°C.

Определение фибринолитической активности. Протеолитическую активность р-ра ферментного препарата по отношению к фибриногену определяли спектрофотометрически при 37°C модифицированным методом Ансона-Хагихары (Anson, 1935; Hagihara et al., 1958), измеряя поглощение тирозина в растворимой фракции реакционной смеси при 275 нм. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл 1%-го р-ра белка в 0.05-молярном Трис-НСl буфере, pH 8.2, к 100 мкл пробы фермента. Спустя 10 мин реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-й трихлоруксусной кислоты. В контрольной пробе реакцию останавливали без 10-минутной инкубации. После пятиминутного центрифугирования проб при 14 000 g измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости. За единицу ферментативной активности принимали число мкмоль тирозина, образовавшегося в 1 мл р-ра за 1 мин.

Эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных

использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Результаты представлены в виде среднего значения с ошибкой среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди представителей рода *Aspergillus* известно довольно много штаммов, продуцирующих фибринолитические (Shirasaka et al., 2012; Kotb et al., 2015; Chimbekujwo et al., 2020; Afini et al., 2016; Shilpa et al., 2019; Yadav, Siddalingeshwara, 2016; Galiakberova et al., 2016; Popova et al., 2021) и антикоагулянтные (Osmolovskiy et al., 2015) протеазы, однако, эти ферменты обладают только одной из упомянутых выше активностей. В то же время для разработки нового высокоэффективного противотромботического средства стоит использовать протеолитические препараты с несколькими активностями, поскольку в современной терапии, как правило, используют одновременно два или три лекарства со следующими свойствами: антикоагулянт, прямой фибринолитик, активатор плазминогена (собственного человеческого фермента, осуществляющего протеолитическое расщепление фибрина). Наличие всех трех описанных активностей было принято как основной критерий для анализа перспективности 15 недавно изученных штаммов рода *Aspergillus* в качестве продуцентов противотромботических протеаз (Surkova et al., 2023).

Свойства 15 анализируемых штаммов суммированы в табл. 1. Положительной антикоагулянтной активностью считалась обнаруженная после культивирования хотя бы на одной ферментационной среде высокая ($> 50 \text{ E} \times 10^{-3}$) амилолитическая активность в отношении хромогенного субстрата активированного протеина С (S-2366), так как система протеина С является одной из важнейших собственных антикоагулянтных систем человеческого организма. Положительной прямой фибринолитической активностью считалась детекция фибринолиза в результате воздействия на фибриновую пластину культуральной жидкости после роста штамма хотя бы на одной из двух ферментационных сред. Аналогичным образом по результатам метода фибриновых пластин определяли положительную активаторную к плазминогену активность.

Одновременно антикоагулянтную, фибринолитическую и активаторную к плазминогену активности проявляли секретируемые протеазы *Aspergillus aureolatus*, *A. creber*, *A. protuberus*, *A. tabacinus*, *A. tennesseensis*. Следующим критерием для отбора штамма-продуцента было предложено считать

субстратную специфичность секретируемых протеаз. Для культуральных жидкостей *A. aureolatus* и *A. tennesseensis* показана высокая протеолитическая активность в отношении нескольких хромогенных пептидных субстратов (Chromozym ТН, S-2251, S-2765, S-2444, S-2366), в то время как ферменты оставшихся трех штаммов более специфичны (*A. creber* и *A. protuberus* — в отношении S-2366, *A. tabacinus* — в отношении Chromozym ТН и S-2366) и более предпочтительны для дальнейшего анализа.

В качестве третьего критерия отбора штамма-продуцента было предложено использовать наличие активности по отношению к субстратам двух протеаз, следующих друг за другом в каскаде последовательно активирующихся белков гемостаза. Так, культуральная жидкость *A. tabacinus* активна в отношении субстратов тромбина и активированного протеина С, в то время как активация протеина С в кровотоке происходит именно под действием тромбина. Такая особенность может привести к гораздо большему уровню антикоагулянтной протеин С-подобной активности *in vivo*, чем в случае протеаз, не обладающих тромбиноподобной активностью, как протеазы *A. creber* и *A. protuberus*. По совокупности трех выдвинутых критериев для дальнейших экспериментов был выбран штамм *A. tabacinus* BEOFB3260m.

Для получения максимального выхода препарата протеолитических ферментов изучали динамику накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *A. tabacinus* на разных ферментационных

средах. Начиная со вторых суток культивирования на двух средах с начальным рН 7.0 при 28°C, каждые 24 ч отбирали аликвоты культуральной жидкости и измеряли в них концентрацию белка как показатель роста культуры, азоказеинолитическую активность в качестве показателя общей активности протеаз и специфические активности по хромогенным пептидным субстратам, по отношению к которым культуральная жидкость была наиболее активна в предыдущих экспериментах: Chromozym ТН, S-2366 (Surkova et al., 2023).

При росте на ферментационной среде 1 (рис. 1) максимальная активность по S-2366 была на пятые сутки культивирования ($39 \text{ E} \times 10^{-3}$), по Chromozym ТН — на четвертые сутки ($22 \text{ E} \times 10^{-3}$), а азоказеинолитическая активность постепенно снижалась, начиная со вторых суток. При росте на ферментационной среде 2 (рис. 2) были достигнуты более высокие значения активностей: максимальная активность по S-2366 и по Chromozym ТН была на седьмые сутки культивирования ($87 \text{ E} \times 10^{-3}$ и $73 \text{ E} \times 10^{-3}$ соответственно), по азоказеинолитической активности было два локальных максимума — на шестые и десятые сутки. Следует отметить, что активности культуральной жидкости по пептидным субстратам, обнаруженные при культивировании на ферментационной среде 2, превысили уровни аналогичных протеолитических активностей для семи изученных ранее представителей рода *Aspergillus* (Osmolovskiy et al., 2021b).

Таблица 1. Свойства анализируемых штаммов по критериям выбора перспективного продуцента противотромботических протеаз (по: Surkova et al., 2023)

Штамм	Активность		
	антикоагулянтная	фибринолитическая	активаторная к плазминогену
<i>Aspergillus aureolatus</i> BEOFB3320m	+	+	+
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	—	—	+
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	+	+	+
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	—	+	+
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	+	—	—
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	—	+	+
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	—	—	+
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	—	—	—
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	+	+	+
<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	—	—	—
<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	—	—	—
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	+	—	+
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	+	+	+
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	+	+	+
<i>A. tubingensis</i> BEOFB3300m	—	+	+

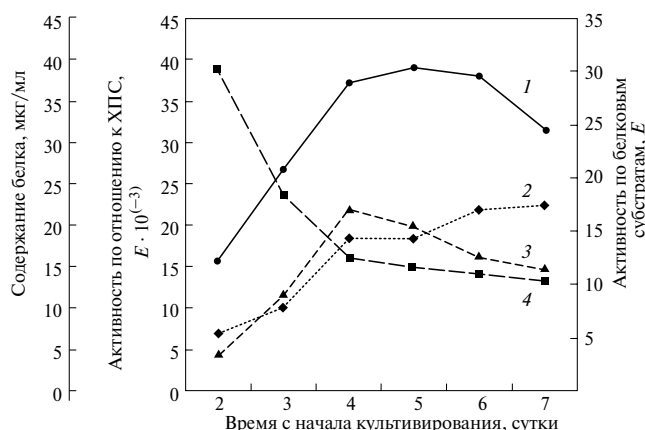


Рис. 1. Динамика накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *Aspergillus tabacinus* на ферментационной среде 1: 1 – активность по субстрату S-2366; 2 – концентрация белка; 3 – активность по субстрату Chromozym ТН; 4 – азоказеинолитическая активность.

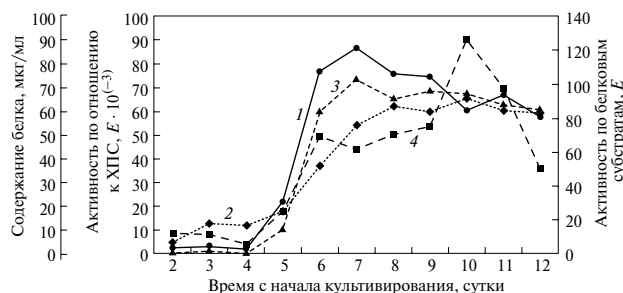


Рис. 2. Динамика накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *Aspergillus tabacinus* на ферментационной среде 2: 1 – активность по субстрату S-2366; 2 – концентрация.

Исследование влияния рН и температуры на продукцию протеаз *A. tabacinus* проводили при культивировании на ферментационной среде 2 в течение семи суток. Было обнаружено, что оптимальным начальным значением рН среды культивирования является 7–8 (рис. 3). При увеличении начального рН среды от 4 до 8 наблюдается возрастание всех измеренных показателей: концентрации белка в семидневной культуральной жидкости, азоказеинолитической активности и активностей по отношению к Chromozym ТН и S-2236. Однако между показателями для рН 7 и для рН 8 нет достоверной разницы.

Влияние температуры на продукцию протеаз *A. tabacinus* исследовали с использованием ферментационной среды 2, начальное значение рН которой составляло 7. Спустя семь суток культивирования измеряли концентрацию белка в среде и активность по S-2366, далее рассчитывали удельную активность протеаз культуральной жидкости

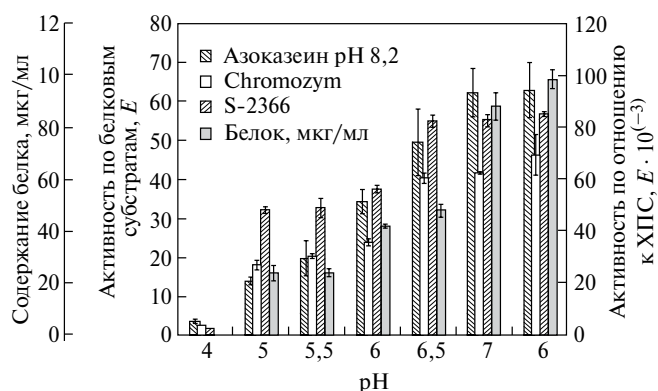


Рис. 3. Влияние рН ферментационной среды 2 на продукцию протеаз *Aspergillus tabacinus*.

по данному субстрату. Было обнаружено, что оптимальной температурой для продукции протеаз является 28°C (рис. 4).

После подбора оптимальных условий для культивирования методом высаливания с последующим диализом и лиофилизацией был получен частично очищенный препарат секретируемых протеаз *A. tabacinus*. Результаты измерения фибриногенолитической активности препарата, а также сравнение с известными фибриногенолитиками представлены в табл. 2, по которой можно сделать вывод, что фибриногенолитическая активность ферментного препарата *A. tabacinus* превышает подобную активность у других ранее изученных протеаз штаммов рода *Aspergillus* (Osmolovskiy et al., 2014; Osmolovskiy et al., 2021), а также известного продуцента фибрино- и фибриногенолитиков *Sarocladium strictum* (Korinenko et al., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было показано, что *Aspergillus tabacinus* является продуцентом протеаз с прямой фибринолитической, активаторной к плазминогену, а также протеин С-подобной и тромбиноподобной активностями, что делает данный микромицет привлекательным для разработки фармакологического препарата, оказывающего воздействие на разные стадии процесса тромбообразования. Максимальный уровень секреции протеазы *A. tabacinus* наблюдался на седьмые сутки на ферментационной среде 2. Условия культивирования — 28°C, начальное рН среды 7–8. Фибриногенолитическая активность лиофилизированного ферментного препарата *A. tabacinus* после высаливания и последующего диализа превысила показатели для других перспективных продуцентов, что свидетельствует о возможном применении ферментного препарата *A. tabacinus* в качестве тромболитика

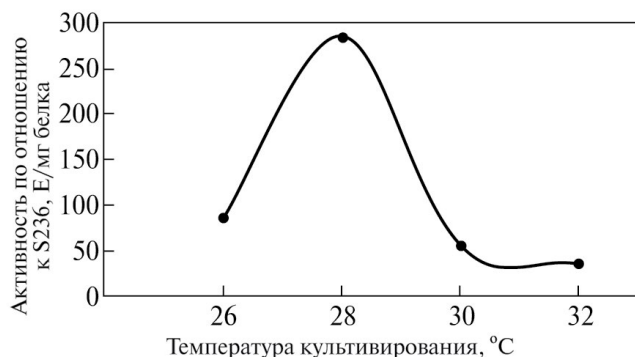


Рис. 4. Влияние температуры культивирования на ферментационной среде 2 на продукцию протеаз *Aspergillus tabacinus*.

и антиагреганта, так как расщепление фибриногена уничтожает одну из белковых платформ для агрегации тромбоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Afini A.V.M., Sooraj S.N., Smitha K.V. et al. Production and partial characterization of fibrinolytic enzyme from a soil isolate *Aspergillus carbonarius* S-CSR-0007. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2016. V. 8. P. 142–148. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i12.15069>
- Anson M. Crystalline carboxypolypeptidase. *Science*. 1935. V. 81 (2106). P. 467–468.
- Bokarev I.N., Popova L.V. Modern problems of thrombosis of arteries and veins. *Prakticheskaya meditsina*. 2014. V. 6 (82). P. 13–17 (in Russ.).
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Chimbekujwo K.I., Ja'afaru M.I., Adeyemo O.M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Sci. Afr.* 2020. V. 8. P. e00398. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00398>
- Galiakberova A.A., Bednenko D.M., Kreyer V.G. et al. Formation and properties of the extracellular proteinase of *Aspergillus flavus* O-1 micromycete active against fibrillar proteins. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57 (5). P. 586–593. <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683821050069>
- Hagihara B., Matsubara H., Nakai M. et al. Crystalline bacterial proteinase. *J. Biochem.* 1958. V. 45 (3). P. 185–194.
- Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G. et al. Characteristics and properties of the complex of proteolytic enzymes of the thrombolytic action of the micromycete *Sarocladium strictum*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2021. V. 57 (1). P. 57–64 (in Russ.). <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683821010129>
- Kotb E., Helal G.E.D.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC9735. *Biologia*. 2015. V. 70. P. 1565–1574. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0192>
- Kurosawa Y., Nirengi S., Homma T. et al. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profile. *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 11601–11607. <https://doi.org/10.1038/srep11601>
- Maksimenco A.V. Cardiac biopharmaceuticals in the concept of targeted drug transport: practical results and research prospects. *Acta Naturae*. 2012. T. 4 (3). P. 76–86 (in Russ.).
- Nair S.R., C S.D. Serratiopeptidase: an integrated view of multifaceted therapeutic enzyme. *Biomolecules*. 2022. V. 12 (10). P. 1468–1479. <https://doi.org/10.3390/biom12101468>
- Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G. et al. The effects of micromycete extracellular proteases of the *Aspergillus* genus on the proteins of the haemostatic system. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40 (6). P. 634–639. <http://dx.doi.org/10.1134/S1068162014060120>
- Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A. et al. Properties of extracellular proteinase — an activator of protein C in blood plasma formed by *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51 (1). P. 95–101. <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683815010123>
- Osmolovskiy A.A., Lukianova A.A., Zvonareva E.S. et al. Combined microbiological approach to screening of producers of proteases with hemostasis system proteins activity among micromycetes. *Biotech. Rep.* 2018. V. 19. P. e00265. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00265>
- Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V. et al. Effect of proteinase from *Aspergillus fumigatus* on blood plasma proteins. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Biol.* 2021. V. 76. P. 71–76 (in Russ.).
- Pavlyukova E.B., Belozersky M.A., Dunaevskiy Yu.E. Extracellular proteolytic enzymes of filamentous fungi. *Biokhimiya*. 1998. V. 63 (8). P. 899–928 (in Russ.).
- Popova E.A., Kreyer V.G., Komarevsev S.K. et al. Properties of extracellular proteinase of the micromycete *Aspergillus ustus* 1 and its high activity during fibrillary-proteins hydrolysis. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2021. V. 57 (2). P. 200–205 (in Russ.). <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683821020125>
- Sharma C., Osmolovskiy A., Singh R. Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: production, characterization and prodigious biopharmaceutical applications. *Pharmaceutics*. 2021. V. 13 (11). P. 1880–1911. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13111880>
- Shilpa H.K., Ambekar J.G., Dongre N.N. et al. Application of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus tamarii* — in vitro studies. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* 2019. V. 6. P. 560–562. <http://dx.doi.org/10.18231/2394-6377.2018.0092>
- Shirasaka N., Naitou M., Okamura K. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience*. 2012. V. 53. P. 354–364. <https://doi.org/10.1007/S10267-011-0179-3>
- Surkova D., Lavrenova V., Klyagin S. et al. Screening of proteases produced by *Aspergillus* micromycetes active against proteins of the hemostasis system. *Curr. Med. Mycol.* 2023. V. 9 (1). P. 8–13. <https://doi.org/10.22034/cmm.2023.150674>

- Vanderschueren S., Dens J., Kerdsinchai P. et al. Randomized coronary patency trial of double-bolus recombinant staphylokinase versus front-loaded alteplase in acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 1997. V. 134 (2, pt 1). P. 213–219.
[https://doi.org/10.1016/s0002-8703\(97\)70127-3](https://doi.org/10.1016/s0002-8703(97)70127-3)
- Wandersman C. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* 1989. V. 3 (12). P. 1825–1831.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00169.x>
- Yadav S., Siddalingeshwara K.G. Biosynthesis of clot busting fibrinolytic enzyme from *Aspergillus japonicum* by supplementing carbon sources. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2016. V. 5 (3). P. 860–864.
<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.503.099>
- Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G. et al. Production of proteinase with plasmin-like and prekallikrein activating activity by the micromycete *Aspergillus terreus*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2018. V. 54 (2). P. 206–210 (in Russ.).
<http://dx.doi.org/10.1134/S0003683818020151>
- Бокарев И.Н., Попова Л.В. (Bokarev, Popova) Современные проблемы тромбозов артерий и вен // *Практ. мед.* 2014. Т. 6. № 82. С. 13–17.
- Галиакберова А.А., Бедненко Д.М., Крейер В.Г. и др. (Galiakberova et al.) Образование и свойства внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus flavus* O-1, активной по отношению к фибриллярным белкам // *Прикл. биохим. микробиол.* 2021. Т. 57. № 5. С. 458–466.
- Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г. и др. (Zvonareva et al.) Продукция протеиназ с плазминоподобной и активирующей прекалликреин активностью микромицетом *Aspergillus terreus* // *Прикл. Биохим. микробиол.* 2018. Т. 54. № 2. С. 195–200.
- Корниенко Е.И., Осмоловский А.А., Крейер В.Г. и др. (Kornienko et al.) Характеристика и свойства комплекса протеолитических ферментов тромболитического действия микромицета *Sarocladium strictum* // *Прикл. биохим. микробиол.* 2021. Т. 57. № 1. С. 46–53.
- Максименко А.В. (Maksimenko) Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 3. С. 76–86.
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г. и др. (Osmolovskiy et al.) Воздействие внеклеточных протеаз микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза // *Биоорг. химия*. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А. и др. (Osmolovskiy et al.) Свойства внеклеточной протеиназы — активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* // *Прикл. биохим. микробиол.* 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г. и др. (Osmolovskiy et al.) Тромболитический потенциал внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus terreus* 2 // *Микология и фитопатология*. 2021. Т. 55. № 3. С. 225–228.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А. и др. (Osmolovskiy et al.) Протеолитические ферменты мицелиальных грибов с плазминоподобной и активаторной к плазминогену активностью // *Усп. совр. биол.* 2021. Т. 141. № 5. С. 467–482.
- Осмоловский А.А., Шмидт Л., Орехова А.В. и др. (Osmolovskiy et al.) Влияние протеиназы *Aspergillus fumigatus* на белки плазмы крови // *Вестник Московского университета. Биол.* 2021. Т. 76. С. 71–76.
- Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. (Pavlyukova et al.) Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов // *Биохимия*. 1998. Т. 63. № 8. С. 1059–1089.
- Попова Е.А., Крейер В.Г., Комаревцев С.К. и др. (Popova et al.) Свойства высокоактивной в отношении фибриллярных белков внеклеточной протеиназы, образуемой микромицетом *Aspergillus ustus* 1 // *Прикл. биохим. микробиол.* 2021. Т. 57. № 2. С. 138–144.

Aspergillus tabacinus* as a producer of antithrombotic proteases*V.N. Lavrenova^{a,#} and A.A. Osmolovskiy^{a,##}**^a*M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*[#]*e-mail: pkviktoria@mail.ru*^{##}*e-mail: aosmol@mail.ru*

Microfungi of the genus *Aspergillus* are well-known as producers of fibrinolytic and plasminogen activating proteases. But for development of new antithrombotics we should use strains which extracellular proteases correspond to these criteria: 1) demonstrate anticoagulant, fibrinolytic and plasminogen activating activities at the same time; 2) have narrow substrate specificity; 3) are able to hydrolase substrates of two following each other proteins of hemostasis system. According to these criteria *Aspergillus tabacinus* was chosen. Maximal activities of culture liquid of this strain grown in optimal conditions were $87 \text{ E} \times 10^{-3}$ with activated protein C substrate S-2366 and $73 \text{ E} \times 10^{-3}$ with thrombin substrate Chromozym TH. Fibrinogenolytic activity of lyophilized enzyme preparation after ammonium sulfate precipitation and dialysis was 779.1 E/mg of protein.

Keywords: *Aspergillus*, anticoagulants, fibrinolytics, proteases.

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.695 + 546.85 + 665.61

ШТАММ *ASPERGILLUS NIGER* AM1 КАК АГЕНТ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

© 2024 г. А. З. Миндубаев^{1,*}, Э. В. Бабынин^{2,**}, В. М. Бабаев^{3,***}, В. В. Тутучкина^{3,****}, С. Т. Минзанова^{3,*****}, Л. Г. Миронова^{3,*****}, Ю. В. Карасева^{1,*****}

¹ Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015 Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия

³ Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, 420088 Казань, Россия

*e-mail: mindubaev@iopc.ru

**e-mail: edward.b67@mail.ru

***e-mail: babaev-84@mail.ru

****e-mail: tutuchkinav@mail.ru

*****e-mail: minzanova@iopc.ru

*****e-mail: mironoval1963@gmail.com

*****e-mail: julieenergy@list.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 27.09.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Исследована биодegradация нефтей штаммом *Aspergillus niger* AM1 ВКМ F-4815D. Визуальное наблюдение и хроматомасс-спектрометрия показали, что нефть подвергается частичной деструкции, но не может служить единственным источником углерода — в культуральной среде должна содержаться глюкоза. Интересным фактом является изменение консистенции, отвердения нефти под влиянием *A. niger*. Это позволяет рассматривать возможность использования штамма для биоремедиации почв и вод, загрязненных нефтью. Не менее интересно то, что еще ранее для штамма была установлена способность метаболизировать ряд токсичных соединений фосфора, включая даже белый и красный фосфор. Однако органические растворители в большинстве оказывают заметное токсическое действие, замедляя рост в присутствии глюкозы и не становясь источниками углерода в отсутствие глюкозы.

Ключевые слова: биодegradация, масс-спектрометрия, нефтепродукты, нефть, *Aspergillus*.

DOI: 10.31857/S0026364824010037, **EDN:** mmbmhiy

В наших публикациях (Mindubaev et al., 2020, 2021) впервые описано биологическое окисление белого фосфора в полезный для жизнедеятельности фосфат. Дальнейший ход наших исследований был связан с расширением спектра соединений, подвергаемых биодegradации. Он включал разнообразные соединения фосфора, органические и неорганические, в различных степенях окисления. Интересно дальнейшее расширение спектра и включение в него загрязнителей, не содержащих фосфор. Наш выбор пал на нефти и нефтепродукты — основные загрязнители окружающей среды на сегодняшний день. Нефтепродукты в плане токсичности менее опасны для окружающей среды, чем соединения фосфора, но производятся

и потребляются в значительно больших объемах. Поэтому в целом опасность загрязнения этим классом поллютантов значительно выше. В случае положительных результатов работы существенно расширится сфера применения исследуемых нами штаммов аспергиллов, поскольку появится возможность обезвреживать более значительные масштабы загрязнений.

Штаммы *Aspergillus* относятся к включающему многие виды роду высших аэробных плесневых грибов, распространенных по всему миру (Perrone et al., 2007). *Aspergillus niger* уже сто с лишним лет находит широкое применение в биотехнологической промышленности (Cairns et al., 2018). Использование различных штаммов рода *Aspergillus*

для биodeградации токсичных соединений представлено в ряде исследований. Например, в исследовании Кхан с соавторами (Khan et al., 2017) *A. tubingensis* использовался для биodeградации полиэфирного полиуретана, широко применяемого в промышленности полимера. Оценка биodeградации полиэтилена, полистирола и полипропилена с использованием *A. flavus* проведена в работе (Santacoloma-Londoño, 2019). Результаты экспериментальных исследований биodeградации полиэтилена высокой плотности с использованием *A. versicolor* и *A. terreus* представлены в публикации (Singh et al., 2012). В обзоре (Pathak, 2017) указана возможность утилизации полиэтилена и поливинилхлорида *A. niger*, поли-3-полигидроксibuтирата с применением *A. fumigatus*, поликапролактона при помощи *A. flavus*.

Для биodeградации фенола применяли *A. niger* (Supriya, Neehar, 2014) а также антарктические штаммы *A. fumigatus* (Gerginova et al., 2013). *A. niger* использовали и для утилизации бензола и толуола (Perdana et al., 2019).

Возможности очистки почвы от загрязнения сырой нефтью с помощью *A. oryzae* рассмотрены в исследовании Asemoloye et al. (2020). Ал-Хаваш с соавторами (Al-Hawash et al., 2019) установлено, что *Aspergillus* sp. RFC-1 может адсорбировать, поглощать и деградировать сырую нефть и три типа полициклических ароматических углеводородов, которые являются высокотоксичными соединениями сложного строения. Более 80% полициклических ароматических углеводородов (нефтяных фракций) было удалено из воды произрастающими в ней местными видами грибов *A. fumigatus* после 120 дней воздействия (Okoro, Amund, 2010).

В работе (Singh, Walker, 2006) упоминается использование *A. niger* для биodeградации соединений со связями фосфор — углерод.

Таким образом, грибы рода *Aspergillus* можно рассматривать в качестве эффективного средства очистки окружающей среды от загрязнителей различной химической природы. Цель настоящей работы — исследование способности штамма *A. niger*, выделенного из навески белого фосфора к биodeградации нефти и нефтепродуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Происхождение штамма. Штамм *A. niger* AM1 BKM F-4815D был выделен 07.10.2014 из навески белого фосфора, приобретенного в ПАО “Химпром” (г. Новочебоксарск). Куски этого вещества технической чистоты хранились в банке из темного стекла, заполненной водой.

Культурально-морфологические и микроскопические особенности штамма. Определение культурально-морфологических характеристик штамма проведены с использованием сайта коллекции CBS (Голландия) и руководства по роду *Aspergillus* (Bilay, Koval, 1988).

Колонии на картофельно-глюкозном агаре (КГА) при 25°C через 9 сут имеют диаметр 58 мм, черные, поверхность зернистая, край ровный; мицелий белый, септированный, экссудат в чашке не обнаружен. Конидиальные головки шаровидные. Конидиеносцы несептированные, гладкостенные, со средним размером 960–1150 × 9–11 мкм. Везикулы сферические, диаметр около 58 мкм; конидиогенные структуры двухъярусные, метулы очень плотно покрывают всю поверхность везикулы. Конидии черные, шаровидные, около 4 мкм в диам., толстостенные, поверхность шероховатая (рис. 2). При росте на высоких (более 0.2%) концентрациях белого фосфора мицелий гриба приобретает желтый цвет. Споры аспергилла хранятся в пробирке с закручивающейся крышкой, заполненной 30%-м водным глицерином, при температуре –30°C. Культура относится к IV группе патогенности в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами, утвержденными Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2008 № 4 “Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителям паразитарных болезней” (СП 1.3.2322–08).

Культуры высевали в планшеты Corning, скорость роста оценивали микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия). Посев производили в среду состава (г/л): NaCl — 2.5, MgSO₄ — 0.5, KNO₃ — 2.0, глюкоза — 8.0.

Оценка способности штамма к биodeградации нефти и нефтепродуктов. Нефть и нефтепродукты значительно менее токсичны, чем ряд соединений фосфора, но гораздо шире используются и в больших количествах поступают в окружающую среду. Ниже показаны субстраты, использованные в исследовании штамма *A. niger* AM1 BKM F-4815D:

Исследованные нефти сильно различаются по вязкости: нефть с Ново-Шешминского месторождения Татарстана имеет примерно в 100 раз более высокую вязкость, чем месторождение Первомайское.

Химическая идентификация. Хроматомасс-спектрометрическое (ГХ–МС) исследование проводилось на газовом хроматографе “Agilent 6890N” с масс-спектрометрическим детектором 5973 N (Agilent Technologies, США). Метод ионизации — электронная ионизация (70 эВ). Температура источника ионов — 230°C. Диапазон масс 33–550

Месторождение	Обозначение	Градусы API	Вязкость (при 20 °C), мПа × с
Первомайское	Первомайск.	27.6	37.88
Ново-Шешминское	№ 13	13.74	3805.00

а.е.м. Идентификация компонентов проводилась с использованием библиотеки масс-спектров NIST-17. Использовалась неполярная капиллярная колонка HP-5 MS (5%-й дифенил-, 95%-й диметилполисилоксан), длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки фазы 0.25 мкм. Условия газохроматографического разделения: объем вводимой пробы — 1 мкл, температура узла ввода проб (инжектора) — 280°C, режим ввода пробы с делением потока (5 : 1), газ-носитель — гелий с расходом 0.7 мл/мин, начальная температура термостата колонки — 40°C, термостатирование — 2 мин, скорость увеличения температуры 10°C/мин до 100°C термостатирование — 2 мин, скорость увеличения температуры 20°C/мин, конечная температура термостата колонки — 280°C, термостатирование — 20 мин.

Образцы нефтей растворяли в хлористом метиле (добавляли 500 мкл хлористого метилена к образцу). В качестве внутреннего стандарта использовался гидроксипентилтолуол.

Пробоподготовка. Посев для ГХ–МС производился в фальконы. Всего шесть проб: две нефти, варианты с глюкозой, без глюкозы и стерильная нефть без посева гриба (негативный контроль, НК). Объем сред по 2 мл, количество добавляемых нефтей приблизительное — вследствие высокой вязкости невозможно внесение точных навесок. Кроме того, отдельно отдавали на анализ нефтяные и водные фракции каждой пробы: итого 12 образцов, которые отбирали в эппендорфы. На момент отбора проб возраст культуры составлял 21 сут. Нефтяные фракции разбавлялись растворителем до объема 2 мл. В качестве растворителя использовали метилхлорид, поскольку он отлично растворяет компоненты нефтей, но сам в их состав не входит. Следовательно, не станет помехой при анализе.

Скрининговый тест на использование углеводов. Изоляты были протестированы на их способность использовать в качестве источника углерода (Bidoia et al., 2010). Чистый штамм инокулировали в 3 мл культуральной среды, содержащего 50 мкл каждого испытуемого субстрата. Затем добавляли 40 мкл 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCPIP) и инкубировали при 28°C. DCPIP получали растворением 1 г порошка DCPIP в 1 л стерильной дистиллированной воды (Mariano et al., 2008).

Путем включения акцептора электронов, такого как DCPIP, в культуральную среду можно установить способность микроорганизма использовать субстрат, наблюдая изменение цвета DCPIP от синего (окисленного) до бесцветного (восстановленного) в технологии скрининга, о которой впервые сообщалось для применения в биодеградационной нефти (Hanson et al., 1993).

Рост на летучих органических веществах происходил в закрытых фальконах, аналогично посеву для ГХ–МС. Фальконы плотно закрывались во избежание испарения веществ. Однако время от времени фальконы открывали на короткое время, чтобы обеспечивать поступление кислорода воздуха, необходимого для жизнедеятельности культуры *A. niger*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обращает на себя внимание то, что в присутствии микроорганизмов нефти претерпевают изменения. На 18-е сут после посева стало заметно, что в среде, содержащей глюкозу в качестве основного источника углерода, нефть изменила консистенцию: утратила текучесть и собралась в комки (Minbubaev et al., 2023). Эти изменения коснулись нефтей из обоих месторождений. В среде без глюкозы нефти остались без изменений — по всей видимости, рост *A. niger* в ней не начался. На 31-е сут подобные изменения стали происходить с нефтями в отсутствие глюкозы. Но поскольку нефти не были автоклавированы, а в среде без глюкозы не отмечался рост мицелия, возникло предположение, что нефти подвергаются деструкции бактериями, которые присутствовали в них изначально.

Повторили посев, предварительно автоклавировав нефти при 120°C. В этом случае в среде без глюкозы биодеструкция не наблюдается даже спустя 51-е сут после посева. Однако в среде с глюкозой мицелий растет, а нефть комкуется. Причем менее вязкая нефть с месторождения Первомайское визуально трансформируется быстрее, чем более вязкая с Ново-Шешминского месторождения (рис. 1).

Безусловно, эти первые результаты интересны и могут указывать на способность *A. niger* AM1 осуществлять биодегградацию нефти. Однако визуальной оценки для такого заключения недостаточно. Комкование нефти не обязательно связано

с ее метаболизмом. Микроорганизмы могут вырабатывать поверхностно-активные вещества, биосурфактанты, способные менять консистенцию гидрофобных субстратов (Kubicki et al., 2019). Поэтому мы провели углубленное исследование методом газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ГХ–МС).

Надо отметить, что в посеве в фальконы, сделанном специально для ГХ–МС исследования, наблюдается схожая картина: *A. niger* AM1 растет только в присутствии сахара, т.е. компоненты нефти заведомо не могут служить ему полноценным источником углерода. Однако свойства нефти в присутствии аспергилла претерпевают изменения. В пробирках с посевом нефтяная фракция распределяется по поверхности водной фазы среды равномерно, образуя черную пленку, а в стерильных условиях нефти собираются у стенок фальконов и в середине образуется пятно водной фазы, свободное от нефти.

Методом ГХ–МС в водных фракциях сред никаких сигналов обнаружено не было. Поэтому в работе представлены спектры исключительно нефтяных фракций.

Усредненное из трех анализов ГХ–МС количество сигналов в стерильной нефти месторождения Первомайское (негативный контроль), нефти с посевом AM1 без глюкозы и с глюкозой, составило 22, 21 и 9 соответственно, т.е. в присутствии глюкозы в качестве основного источника углерода нефть подвергается глубокой деструкции микромицетом *A. niger*. Без глюкозы деструкция тоже происходит, но медленная и неглубокая. Эти результаты анализа совпадают с визуальной оценкой, согласно которой в положительном контроле без глюкозы видимый рост мицелия не наблюдается. Можно предположить, что *A. niger* в отсутствие глюкозы потребляет содержащиеся в нефти вещества биологического, главным образом, бактериального, происхождения.

Для нефти с месторождения Первомайское получены следующие результаты химического состава. Наименьшее количество компонентов, выявленных ГХ–МС, в варианте с глюкозой — 18 (рис. 2). В этом варианте появляются сигналы соединений, окисленных кислородом (кетонов, лактонов). Это означает, что разросшаяся на глюкозе биомасса гриба осуществляет биodeградацию компонентов нефти. Гриб в первую очередь метаболизирует алканы как нормального, так и разветвленного строения. Ароматические соединения разлагаются хуже. Кроме того, хорошо разложились компоненты нефти явно биологического происхождения — триацилглицерины (триглицериды) и амид гексадеценовой кислоты. Вероятно, эти соединения

образованы обитавшими в нефти бактериями, погибшими в результате автоклавирования.

Наиболее сложный состав (39 компонентов) в негативном контроле в стерильной нефти. В посеве *A. niger* AM1 без глюкозы количество компонентов составляет промежуточную величину, равную 30. Из этого можно сделать заключение, что аспергилл способен существовать в присутствии нефти в качестве единственного источника углерода и осуществлять ее биodeградацию, однако процесс этот очень медленный, а биodeструкция менее глубокая, чем в присутствии глюкозы. Данный результат тоже хорошо соотносится с представленными выше.

Обращает внимание отсутствие сигналов легких компонентов (например, низших алканов) во всех трех вариантах. Мы предполагаем, что они испарились из нефти во время автоклавирования. Съемка спектров проводилась трижды, и во всех трех повторях наблюдалась хорошая сходимости результатов — значит, они достоверны.

Хроматограмма нефти с Ново-Шешминского месторождения оказалась “бедной”. Ее компоненты плохо разделились методом ГХ–МС, что затрудняет интерпретацию результатов. Вероятно, все дело в высокой вязкости этой нефти и предполагаемой высокой молекулярной массе ее компонентов. Они могли неподвижно закрепиться в сорбенте колонки. Обе нефти содержат необычный компонент три(–2,4-бис-*трет*-бутилфенил) фосфит. Предполагаем, что это — искусственный антиокислитель, специально добавляемый в нефти, либо попавший в них при контакте с пробками из резины.

Таким образом, нет сомнений в том, что нефти подвергаются биodeградации *A. niger* AM1, по крайней мере, частичной. Однако нефть — сложная многокомпонентная система. Это создает трудности в изучении ряда ее свойств. Конечно, необходимо исследовать биodeградацию не только сырых нефтей, но и химически чистых нефтепродуктов. Мы выбрали два алкана — *n*-гексан и изооктан (2,2,4-триметилпентан) и два арена — бензол и толуол (метилбензол). Кроме того, проверили биodeградацию ацетонитрила — это вещество не входит в состав нефтей, но, в отличие от других исследуемых веществ, смешивается с водой и должно равномерно распределяться в толще среды.

Рост на нефтепродуктах описывается теми же закономерностями, что рост на нефтях. Гриб развивается только в присутствии глюкозы. Наименьшую токсичность в среде с глюкозой продемонстрировал изооктан: в его присутствии *A. niger* развился до стадии спороношения. В среде

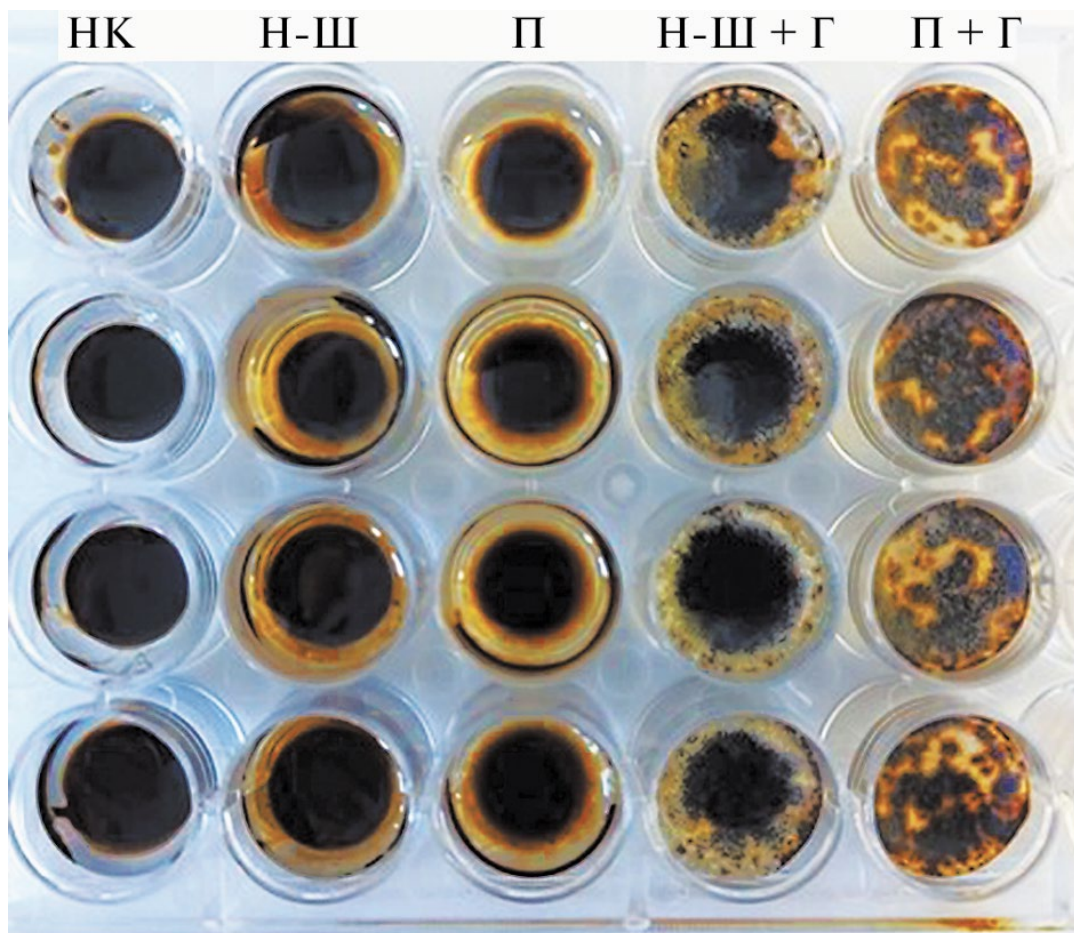


Рис. 1. Пробы нефти, инокулированные штаммом *Aspergillus niger* AM1: Г – глюкоза; НК – негативный контроль; Н-Ш – нефть Ново-Шешминского месторождения; П – нефть Первомайского месторождения. Рост мицелия заметен только в присутствии глюкозы. Снимок сделан на 36-е сут после посева.

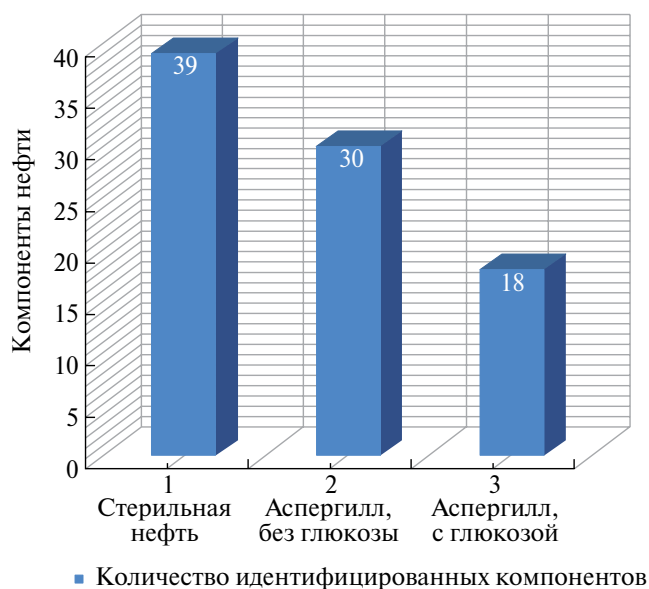


Рис. 2. Снижение количества компонентов нефти с Первомайского месторождения в результате биодеструкции грибом *Aspergillus niger* AM1.

с гексаном гриб тоже дал споры, но размер колонии был значительно меньше. В присутствии бензола и ацетонитрила образовался аспорогенный воздушный мицелий белого цвета. Наибольшую токсичность показал толуол: в среде с ним рост остановился на стадии субстратного мицелия. Эти результаты соотносятся с литературными данными, согласно которым грибы рода *Aspergillus* способны подвергать биodeградации парафиновый воск, состоящий преимущественно из высших *n*-алканов (Zhang et al., 2015). Следует, однако, иметь в виду, что свойства высших алканов с длиной цепи до C₅₀ и низших (гексан и изооктан) заметно различаются, как и их токсичность для микроорганизмов. В литературных источниках есть сведения о биodeградации ароматического вещества фенола культурами *A. niger* (Tebbouche et al., 2015). Фенол, в свою очередь, является метаболитом бензола (Morgan, Greenberg, 2010). Тем не менее следует иметь в виду, что различные штаммы даже одного вида могут иметь выраженные отличия.

Итак, во всех случаях визуально заметный рост отсутствовал в среде без глюкозы. Интерес представляло выяснение вопроса, протекают ли минимальные метаболические процессы в средах с нефтепродуктами в качестве единственных источников углерода. В опытах с сырой нефтью, по всей видимости, протекают, однако для чистых соединений этот результат следовало уточнить. Для этого в негативный и позитивный контроли — стерильную среду с ацетонитрилом и посев в среду с ацетонитрилом без глюкозы — добавили краситель 2,6-дихлорфенолиндофенол, имеющий голубой цвет, но восстанавливаемый в процессе микробного метаболизма до бесцветного производного. Сравнение окраски среды в обоих случаях продемонстрировало ее практически полную тождественность (рис. 3), т.е. даже если метаболические процессы в отсутствие глюкозы можно зафиксировать, они были на уровне статистической погрешности.

Таким образом, ароматические соединения и нитрилы оказывают на *A. niger* AM1 более выраженное токсическое действие в сравнении с алифатическими углеводородами.

В дальнейшем мы произвели посев AM1 на другой ряд растворителей — галогенорганическое соединение 1,2-дихлорэтан, двухатомный спирт этиленгликоль (этандиол) и сложный эфир этилацетат (уксусноэтиловый эфир). Следует сразу отметить, что и в данном случае рост наблюдался только в присутствии глюкозы как основного источника углерода. Этилацетат практически не угнетает рост, наибольшую токсичность проявил

дихлорэтан. Результат вполне объяснимый, если иметь в виду сведения о токсичности перечисленных соединений. Тем не менее в присутствии глюкозы все посевы *A. niger* AM1 достигли стадии спороношения. Это указывает на сравнительно низкую токсичность для грибов данных соединений.

Изначально предполагалось, что этилацетат, будучи сложным эфиром уксусной кислоты, может поддерживать рост гриба в отсутствие глюкозы. Но это предположение не подтвердилось — соединение оказалось трудноусваиваемым источником углерода.

Также мы предполагали, что метаболизм дихлорэтана должен сопровождаться отщеплением хлора в виде сильной соляной (хлористоводородной) кислоты. Было замерено pH среды при помощи индикаторной бумаги главным образом для того, чтобы установить метаболизм хлорорганического соединения. Выяснилось, что в процессе роста гриб закисляет культуральные среды до слабокислой реакции (минимальное значение pH = 4 в контроле с глюкозой). Вероятно, в процессе роста гриб сбрасывает глюкозу до слабых органических кислот, незначительно снижающих pH среды.

Однако предполагаемое особенно резкое закисление среды с дихлорэтаном не наблюдалось, даже при росте гриба в среде с глюкозой. Из этого следует либо отсутствие метаболизма данного соединения, либо метаболизм без отщепления неорганических хлорид-ионов. Возможно, сыграла роль низкая растворимость дихлорэтана в воде (0.87 г/100 мл) и высокая плотность (1.25 г/мл), из-за чего жидкость скапливается на дне пробирки и мало контактирует с мицелием *A. niger*. Этим же можно объяснить слабое токсическое действие дихлорэтана, который известен как один из самых токсичных растворителей.

В дальнейшем произвели посев еще на два летучих органических вещества — одноатомный спирт изопропанол (2-пропанол) и паральдегид (2,4,6-триметил-1,3,5-триоксан). В качестве позитивного контроля, помимо глюкозы, использовали оливковое масло в качестве источника углерода. Главным компонентом растительных масел являются триацилглицерины — сложные эфиры глицерина и ненасыщенных жирных кислот. Кроме того, повторили посев на одну из нефтей.

Результат посева подтвердил предыдущие результаты. Рост на изопропанол и паральдегиде оказался возможен только в присутствии глюкозы. Оба летучих соединения угнетали рост *A. niger*, при этом паральдегид неожиданно проявил особенно высокую токсичность, сильно превышающую таковую дихлорэтана. На нефти в отсутствие глюкозы

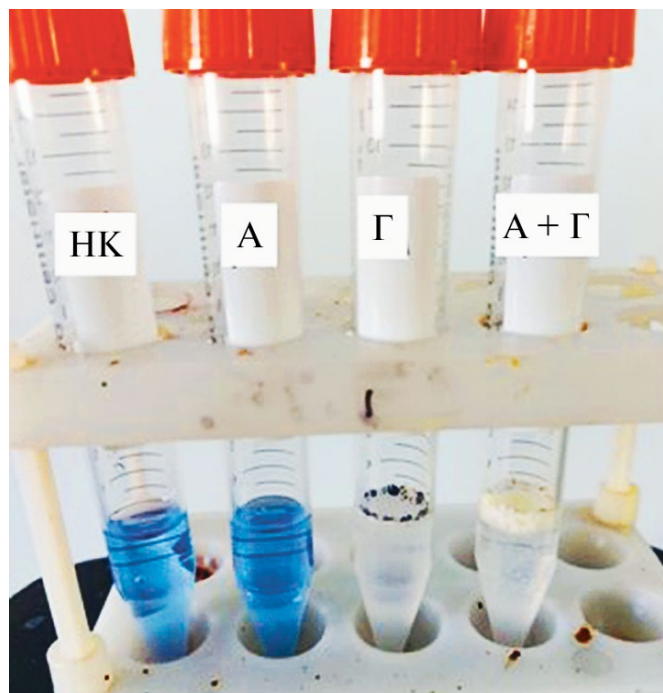


Рис. 3. Рост *Aspergillus niger* AM1 на ацетонитриле: А — ацетонитрил; Г — глюкоза; НК — негативный контроль. Голубая окраска окисленного 2,6-дихлорфенолиндофенола свидетельствует об отсутствии метаболических процессов. Отсутствие окраски у восстановленного красителя свидетельствует о жизнедеятельности *A. niger*. Снимок сделан на 26-е сут после посева.

видимый рост не наблюдается, а оливковое масло служит грибу источником углерода, хотя рост сильно отстает от контроля с глюкозой. На 12-е сут после посева в положительных контролях *A. niger* уже вступил в фазу спорообразования, на изопропанол с глюкозой вступил в фазу воздушного мицелия без спор, на паральдегиде с глюкозой остался в фазе субстратного мицелия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно сделать вывод о том, что нефти подвергаются частичной биодegradации нашим штаммом *A. niger* AM1, но только при наличии дополнительных легкоусваиваемых источников углерода. В принципе, дорогостоящую глюкозу можно заменить сельскохозяйственными отходами. С ростом вязкости нефти биодegradация замедляется. При этом нефти меняют консистенцию и становятся комковатыми. В перспективе это открывает возможности для создания методов сбора нефти, поскольку комки собираются легче, чем жидкая пленка. Не только сырые нефти, но и чистые органические вещества, близкие к нефтепродуктам, поддерживают рост *A. niger* AM1 только в присутствии глюкозы.

Следует отметить широкую применимость штамма, который способен еще и обезвреживать

соединения фосфора и даже белый фосфор — его биодegradацию мы наблюдали впервые в мире. Предполагается, что за окисление поллютантов разной природы отвечают одни и те же ферментные системы, но это предположение — тема будущего, более углубленного исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Al-Hawash A.B., Zhang X., Ma F.* Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. *Microbiology Open*. 2019. V.8 (1). P. e00619. <https://doi.org/10.1002/mbo3.619>
- Asemoloye M.D., Tosi S., Daccò C. et al.* Hydrocarbon degradation and enzyme activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* isolated from Nigerian crude oil-polluted sites. *Microorganisms*. 2020. V. 8 (12). P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121912>
- Bidoia E.D., Montagnolli R.N., Lopes P.R.M.* Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. In: A. Mendez-Vilas (ed.). *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Badajoz, 2010, pp. 1277–1288.
- Bilay V.I., Koval E.Z.* *Aspergilli*. Key-book. Naukova Dumka, Kiev, 1988 (in Russ.).
- Cairns T.C., Nai C., Meyer V.* How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research.

- Fungal Biol. Biotechnol. 2018. V. 5 (13). P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>
- Gerginova M., Manasiev J., Yemendzhiev H. et al. Biodegradation of phenol by Antarctic strains of *Aspergillus fumigatus*. Zeitschr. Naturforschung C. 2013. V. 68 (9–10). P. 384–393.
<https://doi.org/10.1515/znc-2013-9-1006>
- Hanson K.G., Desai J.D., Desai A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. Biotechnol. Tech. 1993. V. 7 (10). P. 745–748.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000028>
- Herrera-Gallardo B.E., Guzmán-Gil R., Colín-Luna J.A. et al. Atrazine biodegradation in soil by *Aspergillus niger*. Can J. Chemical Engineering. 2021. V. 99 (4). P. 932–946.
<https://doi.org/10.1002/cjce.23924>
- Khan S., Nadir S., Shah Z. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. Environm. Pollut. 2017. V. 225. P. 469–480.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>
- Kubicki S., Bollinger A., Katzke N. et al. Marine biosurfactants: biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. Mar. Drugs. 2019. V. 17 (408). P. 1–30.
<https://doi.org/10.3390/md17070408>
- Mariano A.P., Bonotto D.M., Angelis D.F. et al. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. Brazilian J. Microbiol. 2008. V. 39. P. 33–142.
- Mindubaev A.Z., Kuznetsova S.V., Evtyugin V.G. et al. Effect of white phosphorus on the survival, cellular morphology, and proteome of *Aspergillus niger*. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2020. V. 56 (2). P. 194–201 (in Russ.).
<https://doi.org/10.1134/S0003683820020118>
- Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Bedeeva E.K. et al. Biological degradation of yellow (white) phosphorus, a compound of first class hazard. Russian J. Inorganic Chem. 2021. V. 66 (8). P. 1239–1244.
<https://doi.org/10.1134/S0036023621080155>
- Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Minzanova S.T. et al. A method for oil detoxification using the *Aspergillus niger* strain AM1VKM F-4815D. RF patent. 2023. № 2791735.
- Morgan J., Greenberg A. Insights into the formation and isomerization of the benzene metabolite muconaldehyde and related molecules: comparison of computational and experimental studies of simple, benzo-anneled, and bridged 2,3-epoxyoxepins. J. Org. Chem. 2010. V. 75 (14). P. 4761–4768.
<https://doi.org/10.1021/jo100610g>
- Okoro C.C., Amund O.O. Biodegradation of produced water hydrocarbons by *Aspergillus fumigatus*. J. American Sci. 2010. V. 6 (3). P. 143–149.
<https://doi.org/10.12691/jaem-2-2-3>
- Pathak V.M. Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. Biores. Bioprocessing. 2017. V. 4 (15). P. 1–31.
<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>
- Perdana A.T., Arianata M., Larasati T.R.D. Optimization of benzene and toluene biodegradation by *Aspergillus niger* and *Phanerochaete chrysosporium*. J. Al-Azhar Indonesia Ser. Sains Dan Teknol. 2019. V. 5 (2). P. 87–91.
<https://doi.org/10.36722/sst.v5i2.355>
- Perrone G., Susca A., Cozzi G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. Stud. Mycol. 2007. Vol. 59. P. 53–66.
<https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
- Santacoloma-Londoño S.P. Evaluation of the biodegradation of polyethylene, polystyrene and polypropylene, through controlled tests in solid suspension with the fungus *Aspergillus flavus*. Scientia et Technica. 2019. V. 24 (3). P. 532–540.
<https://doi.org/10.22517/23447214.20731>
- Singh B.K., Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. № 3. P. 428–471.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>
- Singh V., Dubey M., Bhadauria S. Biodeterioration of polyethylene high density by *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus terreus*. J. Advanced Laboratory Res. Biol. 2012. V. 3 (1). P. 47–49.
- Supriya C., Neehar D. Biodegradation of phenol by *Aspergillus niger*. IOSR J. Pharmacy. 2014. V. 4 (7). P. 11–17.
<https://doi.org/10.9790/3013-0407011017>
- Tebbouche L., Hank D., Zeboudj S. et al. Evaluation of the phenol biodegradation by *Aspergillus niger*: application of full factorial design methodology. Desalination and Water Treatment. 2015. V. 7 (13). P. 1–7.
<https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1053991>
- Zhang J., Xue Q., Gao H. et al. Biodegradation of paraffin wax by crude *Aspergillus* enzyme preparations for potential use in removing paraffin deposits. J. Basic Microbiol. 2015. V. 55 (11). P. 1326–1335.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201500290>
- Билай В.И., Коваль Э.З. (Bilay, Koval) Аспергиллы. Определитель. Киев: Наук. думка, 1988. 204 с.
- Миндубаев А.З., Кузнецова С.В., Евтюгин В.Г. и др. (Mindubaev et al.) Влияние белого фосфора на выживаемость, клеточную морфологию и протеом *Aspergillus niger* // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 2. С. 194–201.
- Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Минзанова С.Т. и др. Способ детоксикации нефти с применением штамма *Aspergillus niger* AM1VKM F-4815D. Патент РФ. 2023. № 2791735.

***Aspergillus niger* AN1 strain as causative agent for oil and petroleum products biodegradation**

A.Z. Mindubaev^{a,#}, E.V. Babynin^{b,##}, V.M. Babaev^{c,###}, V.V. Tutuchkina^{c,####}, S.T. Minzanova^{c,#####}, L.G. Mironova^{c,#####}, and Yu.V. Karaeva^{a,#####}

^a Kazan National Research Technological University, 420015 Kazan, Russia

^b Kazan (Volga Region) Federal University, 420008 Kazan, Russia

^c Institute of Organic and Physical Chemistry named after. A.E. Arbuzov Kazan Scientific Center RAS, 420088 Kazan, Russia

[#] e-mail: mindubaev@iopc.ru

^{##} e-mail: edward.b67@mail.ru

^{###} e-mail: babaev-84@mail.ru

^{####} e-mail: tutuchkinav@mail.ru

^{#####} e-mail: minzanova@iopc.ru

^{#####} e-mail: mironoval1963@gmail.com

^{#####} e-mail: julieenergy@list.ru

The biodegradation of oils by the strain *Aspergillus niger* AM1 VKM F-4815D was studied. Visual observation and gas chromatography-mass spectrometry showed that oil is subject to partial destruction, but cannot serve as the only source of carbon — the culture medium must contain glucose. An interesting fact is the change in consistency and hardening of oil under the influence of *A. niger*. This allows us to consider the possibility of using the strain for the bioremediation of soils and waters contaminated with oil. No less interesting is that, even earlier, the ability of the strain to metabolize a number of toxic phosphorus compounds, including even white and red phosphorus, was established. However, most organic solvents have a noticeable toxic effect, inhibiting growth in the presence of glucose and not becoming carbon sources in the absence of glucose.

Keywords: *Aspergillus*, biodegradation, mass spectrometry, oil, petroleum products.

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 632.952 : 579.64

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ВЫДЕЛЕННЫХ В УЗБЕКИСТАНЕ БАКТЕРИЙ РОДОВ *BACILLUS* И *PSEUDOMONAS* И ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA* В ОТНОШЕНИИ *PHYTOPHTHORA* *INFESTANS*

© 2024 г. Н. Ш. Азимова^{1,*}, Х. М. Хамидова^{1,**}, И. М. Халилов^{1,***}, С. Н. Еланский^{2,3,****},
Е. М. Чудинова^{3,*****}, Х. Х. Каримов^{1,*****}, К. С. Маманазарова^{4,*****},
Ф. Б. Кобиллов^{1,*****}

¹ Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, 100128 Ташкент, Узбекистан

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

⁴ Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан, 100125 Ташкент, Узбекистан

*e-mail: azimovanodira@mail.ru

**e-mail: khamidovakh@mail.ru

***e-mail: ilkhom2002@yahoo.com

****e-mail: snelansky@mail.ru

*****e-mail: chudiel@mail.ru

*****e-mail: karimov_h_kh@mail.ru

*****e-mail: karomat.3005@mail.ru

*****e-mail: bozorovich02@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 27.08.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Проведены исследования выделенных в Узбекистане штаммов бактерий и грибов, перспективных для использования в биологической борьбе с фитофторозом картофеля. Тестирование проводили на двух штаммах *Phytophthora infestans* – TVKT-1 и 4MSLK 26, – выделенных из пораженного картофеля в Ташкентской обл. Узбекистана и в Московской обл. России соответственно. В отношении этих штаммов была изучена антагонистическая активность выделенных в Узбекистане грибов рода *Trichoderma* и бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Максимальную антагонистическую активность показал штамм *Bacillus safensis* 3/11, который ингибировал рост мицелия штаммов *Phytophthora infestans* TVKT-1 на 61.9% и 4MSLK 26 на 50%. Также достаточно эффективными были штаммы *Bacillus licheniformis* 6/25 и *Pseudomonas alcaliphila* 2/18. Все исследованные штаммы грибов рода *Trichoderma* показали высокую антагонистическую активность; наиболее активным был штамм *Trichoderma asperellum* Uz-A4, который ингибировал рост колоний штаммов *Phytophthora infestans* TVKT-1 и 4MSLK 26 на 77.1 и 73.1% соответственно.

Ключевые слова: биологический контроль, ингибирование роста, микопаразитизм, фитофтороз, *Bacillus safensis*, *Phytophthora*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Trichoderma*

DOI: 10.31857/S0026364824010049, EDN: matrdp

ВВЕДЕНИЕ

Оомицеты *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary вызывают опасное заболевание картофеля, томата и других культурных и дикорастущих пасленовых — фитофтороз (late blight). Распространен фитофтороз практически во всех регионах, где растут его растения-хозяева. *Ph. infestans* находится на первом месте в списке 10 самых опасных фитопатогенных оомицетов (Kamoun et al., 2015).

Борьба с фитофторозом основана на применении химических средств защиты растений. Применение

химических фунгицидов эффективно, но вызывает много сопутствующих проблем. Одной из основных является их высокая стоимость, особенно при многократном применении (Cooke et al., 2011; Momanyi et al., 2019; Lamichhane et al., 2020). Другая проблема — появление устойчивых мутантных штаммов к некоторым эффективным химическим препаратам, например к металаксилу (Elansky et al., 2015). Высокая доля устойчивых штаммов на поле делает применение препарата неэффективным. Немаловажно и то, что химические пестициды

негативно влияют на выживание полезных микроорганизмов, вызывают загрязнение окружающей среды и сельскохозяйственной продукции.

Одним из возможных вариантов снижения негативного эффекта от применения химических средств защиты растений является использование биологических препаратов. Биопрепараты могут применяться в схемах защиты как альтернатива химическим препаратам (что особенно важно в технологиях органического земледелия) либо в дополнение к ним. В связи с этим поиск безопасных для окружающей среды штаммов микроорганизмов с высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенов имеет большое значение.

Из литературы известна способность представителей бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces* и нек. др. подавлять рост *Ph. infestans* за счет широкого разнообразия образуемых ими метаболитов, токсичных для оомицета (Chen et al., 2017; Hashemi et al., 2022; Trang Le Vu Khanh et al., 2020; Caulier et al., 2018). *Bacillus* и *Pseudomonas* в дополнение к защитным функциям способны стимулировать рост растений (Chen et al., 2017). Грибы рода *Trichoderma* также используются в качестве агентов биоконтроля; их действие на патогенный организм включает множество механизмов, таких как конкуренция за питательный субстрат, синтез антибиотиков, микопаразитизм и индукция защитных сил растений (Shores et al., 2010; Yao et al., 2016; Kariuki et al., 2020).

Целью данного исследования было изучение антагонистического потенциала выделенных авторами на территории Узбекистана штаммов грибов рода *Trichoderma* и бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* в отношении *Ph. infestans* для отбора наиболее активных штаммов-антагонистов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Происхождение и идентификация штаммов. В работе исследован антагонистический эффект штаммов грибов и бактерий, выделенных в чистые культуры из растений и почв на территории Узбекистана. Использованные в качестве тест-объектов штаммы *Ph. infestans* выделены из пораженных органов картофеля в Узбекистане и в России (табл. 1).

Идентификацию объектов проводили культурально-морфологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими методами. Бактериальные штаммы идентифицировали с помощью оборудования Maldi "Bruker" (Bruker Daltonik GmbH, Germany). Идентификацию оомицета *Ph. infestans* проводили по культурально-морфологическим

признакам. Морфологические особенности грибов изучали при выращивании на агаризованной картофельно-декстрозной среде. Микроморфологические признаки грибов оценивали под световым микроскопом NLCD-307B-2 (HINOTEK, Китай) при увеличении $\times 400$. Идентификацию грибов рода *Trichoderma* классическими методами осуществляли с использованием определителя Самюэлис (Samuels, 2006; Azimova, Khalilov, 2021; Karimov et al., 2021). Видовая принадлежность штаммов *Trichoderma asperellum* Uz-A21 и Uz-A4 была подтверждена секвенированием участка ядерных рибосомных генов (ITS1–5.8S–ITS2).

Выделение и очистка грибной ДНК. ДНК выделяли из мицелия (брали 0.4 см³ подсушенного мицелия), выращенного в жидкой картофельно-декстрозной среде (PDA). Мицелий лизировали в 200 мкл буфера, содержащего 200 мМ LiOAc и 1% SDS. Выделенную ДНК очищали хлороформом, осаждали с помощью 5-молярного ацетата калия, промывали 70%-м этиловым спиртом (Looke et al., 2011; Elansky et al., 2022). Полученные образцы ДНК дополнительно очищали с использованием фермента РНКазы.

ПЦР-амплификация и секвенирование фрагмента ITS. Для ПЦР-амплификации использовали праймеры ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). ПЦР-амплификацию образцов ДНК проводили в объеме 20 мкл (10 мкл набора GenPak® PCR MasterMix, 8.2 мкл деионизированной воды (MilliQ), по 0.4 мкл праймеров (ITS1 и ITS4) и 1 мкл образца ДНК. Программа ПЦР включала начальную денатурацию при 94 °C в течение 3 мин и 35 циклов (94°C — 40 с, 55°C — 40 с, 70°C — 60 с), окончательная элонгация при 70°C в течение 7 мин. Ампликоны выявляли электрофорезом в 2%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия (рис. 1).

Продукты ПЦР выделяли из 2%-го агарозного геля с использованием набора QIAquick® Gel Extraction Kit; концентрацию ДНК измеряли прибором Nanodrop. Очищенные продукты ПЦР разделяли на аликвоты таким образом, чтобы в каждой микропробирке было по 20 нг ДНК. Секвенирование проводила компания Синтол (Москва, Россия).

Определение антагонистической активности выделенных микроорганизмов методом блоков. Штаммы *Ph. infestans* выращивали на агаризованной овсяной среде при 18°C в течение 14 сут, после чего из газона выросшей культуры вырезали блоки диаметром 8.0 мм. Каждый блок помещали в отдельную чашку Петри с агаризованной овсяной средой на расстоянии 2 см от края. Инкубировали в течение 5 сут в термостате при температуре 18°C. После того как колония

Таблица 1. Происхождение штаммов грибов и бактерий, использованных в работе

Вид, штамм	Субстрат, из которого проводили выделение	Место выделения
<i>Bacillus pumilus</i> 3/7	лист картофеля	Ферганская обл., Узбекистан
<i>Bacillus safensis</i> 3/11	стебель томата	Ферганская обл., Узбекистан
<i>Pseudomonas alcaliphila</i> 2/18	стебель томата	Ташкентская обл., Узбекистан
<i>Bacillus licheniformis</i> 6/25	лист перца сладкого	Кашкадарьинская обл., Узбекистан
<i>Pseudomonas putida</i> 4/23	лист картофеля	Кашкадарьинская обл., Узбекистан
<i>Trichoderma asperellum</i> Uz-A21	образец хлопка	Ташкентская обл., Узбекистан
<i>T. asperellum</i> Uz-A4	почва хлопкового поля	Бухарская обл., Узбекистан
<i>T. viride</i>	почва хлопкового поля	Ташкентская обл., Узбекистан
<i>Trichoderma</i> sp. 4/1	лист картофеля	Кашкадарьинская обл., Узбекистан
<i>Phytophthora infestans</i> 4MSLK 26	лист картофеля	Московская обл., Россия
<i>Ph. infestans</i> TVKT-1	клубень картофеля (сорт Пикассо) (Azimova et al., 2021)	Ташкентская обл., Узбекистан

Ph. infestans достигала диаметра 50–55 мм, с противоположной стороны чашки также на расстоянии 20 мм от края помещали блоки, вырезанные из культур тестируемых грибов или бактерий. Мицелий *Trichoderma spp.* предварительно выращивали на агаризованной картофельно-декстрозной среде при температуре 28°C в течение 5 сут, бактерии — на среде МПА в течение 24 ч при температуре 30°C. В контрольных чашках выращивали только штаммы *P. infestans*. Каждый вариант повторяли в трех повторностях. Все экспериментальные образцы инкубировали при 18°C. На шестые и 10-е сут измеряли радиус колоний штаммов *Ph. infestans* в направлении тестируемого штамма и рассчитывали степень ингибирования *Ph. infestans* тестируемыми микроорганизмами. Ингибирование скорости роста (ИСП, %) рассчитывали по следующей формуле (Мао et al., 2020): ИСП = (R контр. — R исслед.)/R контр., где R исслед. — радиус исследуемой колонии, R контр. — радиус колонии в контроле.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярная идентификация штаммов *Trichoderma*

Нуклеотидные последовательности ДНК участка ITS штаммов *Trichoderma* sp. Uz-A21 и *Trichoderma* sp. Uz-A4 включали 606 и 600 п.н. соответственно. Полученные результаты сравнивали с последовательностями из базы данных Genbank NCBI. Согласно результатам NCBI BLAST, секвенированные последовательности *Trichoderma* sp. Uz-A21 (MZ284959) и *Trichoderma* sp. Uz-A4 (ON534075) показали 99.66 и 100%-е сходство с последовательностями примерно 40 различных

штаммов, идентифицированными в GenBank как *Trichoderma asperellum*.

Антагонистическая активность бактериальных штаммов

Антагонистические свойства выделенных бактерий в отношении *Phytophthora infestans* определяли по результатам роста штаммов *Ph. infestans* в присутствии тестируемых бактерий (табл. 2). Наибольшую активность в подавлении *Ph. infestans* проявил штамм *Bacillus safensis* 3/11 (рис. 2, 3). Несколько меньшую активность проявили штаммы *Pseudomonas alcaliphila* 2/18 и *Bacillus licheniformis* 6/25. Штамм *Pseudomonas putida* 4/23 показал слабое ингибирование роста *Phytophthora infestans*. Штамм *Bacillus pumilus* 3/7 практически не влиял на рост колоний *Phytophthora infestans*. Также было отмечено, что штаммы *Ph. infestans* различались по восприимчивости к действию бактерий: 4МСЛК 26 был более устойчив, чем TVKT-1 (табл. 2).

Антагонистическая активность грибов рода *Trichoderma*. Антагонистическая активность грибов рода *Trichoderma* по отношению к *Ph. infestans* начала проявляться через трое — шестеро сут совместного культивирования, что было заметно по замедлению роста колоний фитопатогена. К 10-м сут штамм *Trichoderma asperellum* Uz-A4 нарастал на культуры штаммов *Phytophthora infestans* TVKT-1 и 4MSLK 26, что приводило к остановке роста фитопатогенов. Штаммы *Trichoderma asperellum* Uz-A21 и *T. viride* показали аналогичную способность. *Trichoderma* sp. ингибировал рост

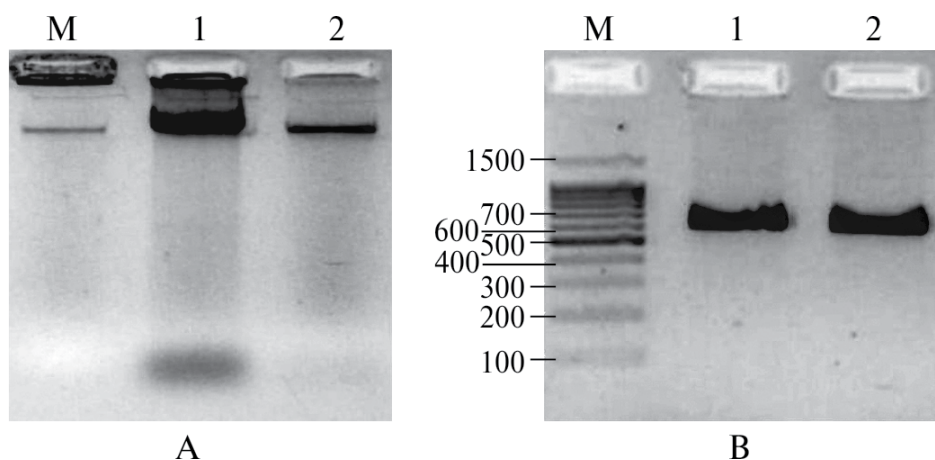


Рис. 1. Геномная ДНК штаммов *Trichoderma*: 1 — *Trichoderma* sp. Uz-A21; 2 — *Trichoderma* sp. Uz-A4; А — геномная ДНК; М — маркер геномной ДНК; В — продукт ПЦР ITS-области штаммов *Trichoderma*; М — ДНК-маркер длиной 100 п.н.

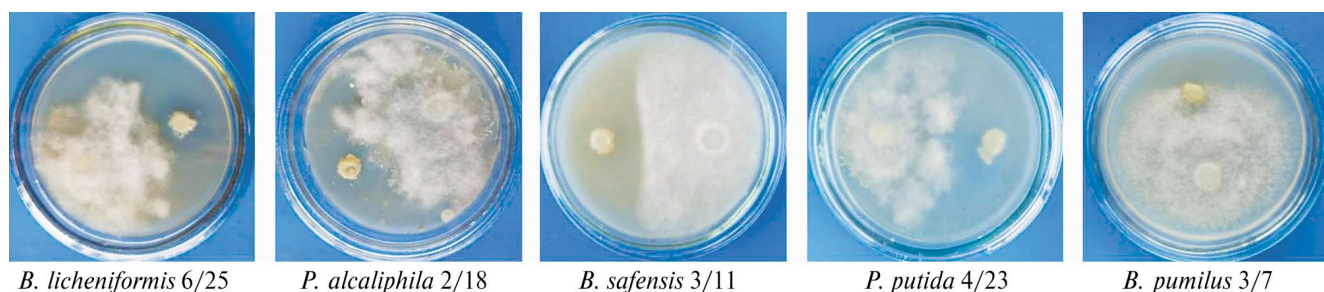


Рис. 2. Антагонистическая активность бактерий по отношению к *Phytophthora infestans* TVKT-1.

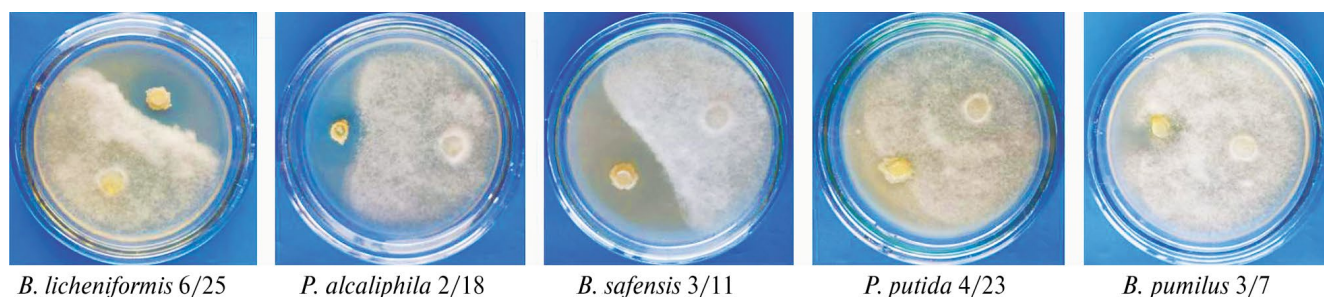


Рис. 3. Антагонистическая активность бактерий по отношению к *Phytophthora infestans* 4MSLK 26.

Phytophthora infestans слабее других исследованных штаммов этого вида (рис. 4, 5).

Все исследованные штаммы *Trichoderma* обладали хорошим антагонистическим эффектом в отношении *Ph. infestans*. В то же время картина их взаимодействия при одновременном выращивании с *Ph. infestans* на чашке Петри резко отличалась от наблюдавшейся в экспериментах с бактериями. Штаммы *Trichoderma* не только ограничивали рост колонии *Phytophthora*, но и нарастали поверх нее. Наиболее активным оказался штамм *Trichoderma asperellum* Uz-A4, ингибирующее действие которого в отношении штамма TVKT-1 составило 77,1%, а в отношении 4MSLK 26

— 73,1%. Несколько ниже была активность грибов *Trichoderma* sp. и *T. asperellum* Uz-A21 по отношению к TVKT-1 и 4MSLK 26, степень их ингибирования составила 73,3 и 71,4% соответственно (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus* и грибы рода *Trichoderma* широко используются в качестве агентов биоконтроля. Их высокая антагонистическая активность подтверждена многими исследованиями (Bell et al., 1982; Benhamou, Chet, 1996; Ezziyyani et al., 2007; Osorio-Hernandez et al., 2011; Trang Le Vu Khanh et al., 2020; Caulier et al., 2018).

Таблица 2. Влияние бактерий на рост *Phytophthora infestans*

Штаммы бактерий	Радиус колоний <i>Ph. infestans</i> в направлении тестируемого бактериального штамма, мм		Ингибирование скорости роста (ИСП) <i>Ph. infestans</i> тестируемыми штаммами, %	
	штамм TVKT-1	штамм 4МСЛК 26	штамм TVKT-1	штамм 4МСЛК 26
<i>Bacillus pumilus</i> 3/7	38 ± 1.2	50 ± 2.8	27.6 ± 1.8	3.8 ± 0.4
<i>B. safensis</i> 3/11	20 ± 1.3	26 ± 1.4	61.9 ± 3.2	50 ± 3.1
<i>B. licheniformis</i> 6/25	28 ± 1.8	29 ± 1.2	46.6 ± 3.8	44.2 ± 2.4
<i>Pseudomonas alcaliphila</i> 2/18	22 ± 3.2	30 ± 2.7	58.1 ± 3.5	42.3 ± 2.1
<i>P. putida</i> 4/23	29 ± 1.6	42 ± 3.1	44.7 ± 2.8	19.2 ± 1.5
Контроль	52.5 ± 3.0	52.0 ± 2.5	—	—

Примечание. Результаты представлены как средние значения при уровне значимости 95%.

Таблица 3. Влияние грибов рода *Trichoderma* на рост штаммов *Phytophthora infestans*

Грибы	Радиус колоний <i>Ph. infestans</i> TVKT-1, мм	Радиус колоний <i>P. infestans</i> 4МСЛК 26, мм	Степень ингибирования <i>Ph. infestans</i> TVKT-1, %	Степень ингибирования <i>Ph. infestans</i> 4МСЛК 26, %
<i>Trichoderma asperellum</i> Uz-A21	15 ± 1.4	17 ± 2.1	71.4 ± 3.5	67.3 ± 3.1
<i>T. asperellum</i> Uz-A4	12 ± 0.8	14 ± 1.5	77.1 ± 2.6	73.1 ± 4.7
<i>T. viride</i>	22 ± 1.6	16 ± 2.0	58.0 ± 1.8	69.2 ± 3.7
<i>Trichoderma</i> sp.	14 ± 2.2	18 ± 1.7	73.3 ± 4.9	65.4 ± 2.6
Контроль	52.5 ± 3.0	52.0 ± 2.5	—	—

Примечание. Результаты представлены как средние значения при уровне значимости 95%.

В работе Yao et al. (2016) наблюдения под сканирующим электронным микроскопом показали рост гиф *Trichoderma* на гифах *Phytophthora infestans*, что, по мнению автора, свидетельствует о паразитизме *Trichoderma* на *Ph. infestans*.
На основе бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* и грибов рода *Trichoderma* созданы препараты. В России для защиты томата и картофеля от фитофторы зарегистрировано девять препаратов на основе *Bacillus subtilis* (Алирин-Б, Баксис, Бактера, Бактофит, Бисолбис Сан, Бисолбицид, Витаплан, Гамаир, Споробактерин), в состав последнего препарата входит также *Trichoderma harzianum*. *T. harzianum* является активным ингредиентом для препаратов Глиокладин и Трихоцин, используется для защиты от фитофтороза и другой вид триходермы *T. viride* (Триходерма вериде 471). На основе бактерий рода *Pseudomonas* также существуют препараты, рекомендованные для защиты от фитофтороза: Псевдобактерин (*Pseudomonas*

aureofaciens) и Ризоплан (*P. fluorescens*). В связи с тем, что *Phytophthora infestans* отличается высокой приспособляемостью к средствам защиты, со временем широко известные и используемые в качестве агентов биоконтроля штаммы могут потерять свою эффективность. Поэтому в мире продолжают поиски новых эффективных штаммов грибов и бактерий (El-Hasan et al., 2022; Volynchikova, Kim, 2022).
Для биологической борьбы с фитофторозом в Средней Азии, особенно в открытом грунте, необходим поиск местных, хорошо адаптированных к локальным условиям штаммов. В нашем исследовании выделенные в Узбекистане бактериальные штаммы *Bacillus safensis* 3/11, *B. licheniformis* 6/25, *Pseudomonas alcaliphila* 2/18, а также все исследованные штаммы грибов рода *Trichoderma* показали высокую антагонистическую активность в отношении *Phytophthora infestans*. Мы считаем их

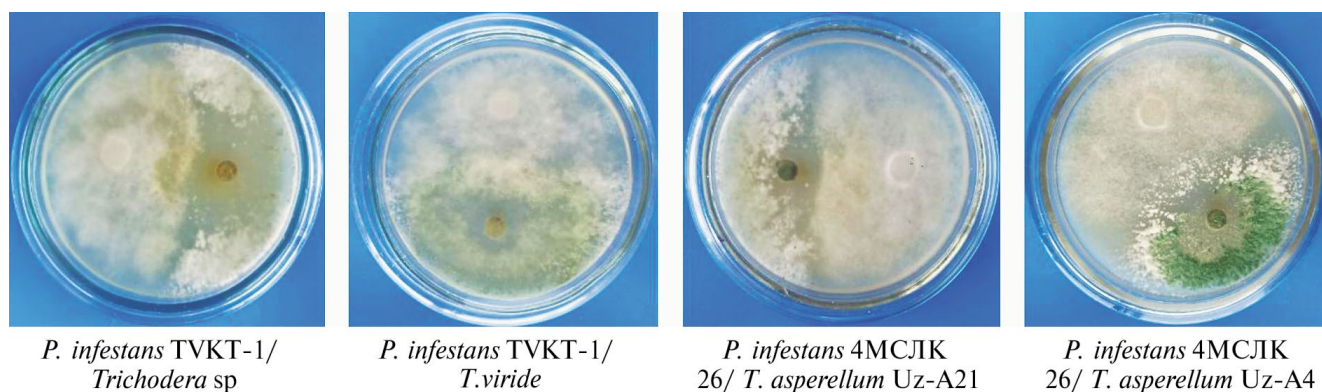


Рис. 4. Антагонистические свойства грибов рода *Trichoderma* по отношению к *Phytophthora infestans* TVKT-1 и *Ph. infestans* 4МСЛК 26 (6-е сут).

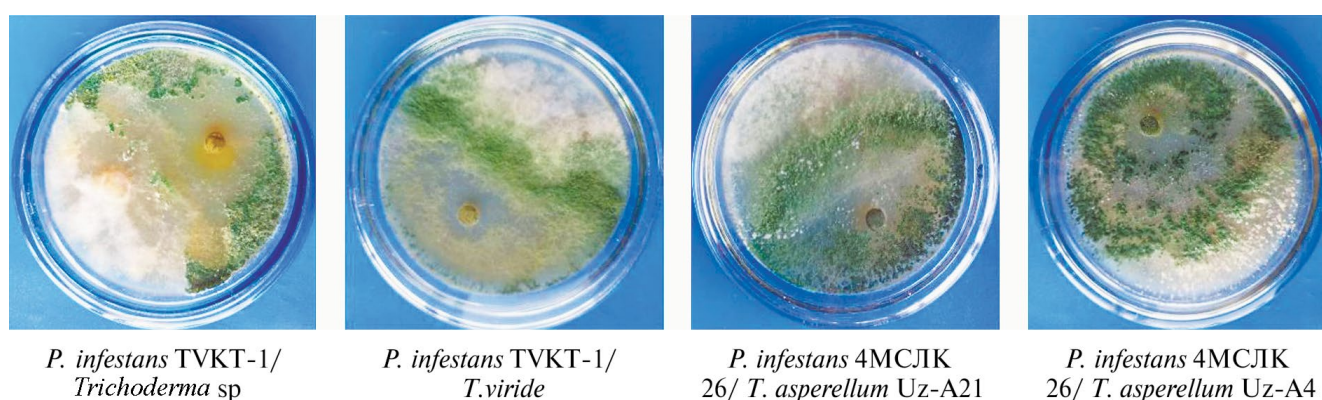


Рис. 5. Антагонистическая активность грибов рода *Trichoderma* по отношению к *Phytophthora infestans* TVKT-1 и *Ph. infestans* 4МСЛК 26 (10-е сут).

перспективными для использования в качестве агентов биоконтроля.

Полученные результаты также показывают, что антагонистическая активность исследуемых штаммов грибов и бактерий различалась по отношению к двум штаммам *Ph. infestans*. Это свидетельствует о необходимости постоянного мониторинга видового разнообразия *Ph. infestans* в посевах восприимчивых к фитофторозу культур и последующего подбора антагонистических микроорганизмов к агрессивным расам фитопатогенного гриба.

Работа проведена при поддержке проекта Министерства инновационного развития Узбекистана № ИЛ-402104392, реализуемого в Институте микробиологии АН РУз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Azimova N. Sh., Esenova D.B., Hamidova H.M. et al. Isolation and determination of virulence of a local strain of the fungus *Phytophthora infestans* from potato tubers. *Universum: chemistry and biology*. 2021. V. 10. P. 88 (in Russ.). <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/12324>
- Azimova N. Sh., Khalilov I.M. Phylogenetic identification of *Trichoderma* sp_uzb strain by morphological and molecular genetic methods. *Chin. J. Ind. Hyg. Occup. Dis.* 2021. V. 39 (13). P. 634–642. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5713519>
- Bell D.K., Wells H.D., Markham C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 1982. V. 72 (4). P. 379–382. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Benhamou N., Chet I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*. 1996. V. 86. P. 405–415.
- Caulier S., Gillis A., Colau G. et al. Versatile antagonistic activities of soil-Borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens. *Front Microbiol.* 2018. V. 9. P. 143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00143>
- Chen Sh., Zhang M., Wang J. et al. Biocontrol effects of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on potato common scab and its impact on rhizosphere bacterial communities. *Biol. Control*. 2017. V. 106. P. 89–98.
- Cooke L.R., Schepers H.T.A.M., Hermansen A. et al. Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe. *Potato Res.* 2011. V. 54. P. 183–222. <https://doi.org/10.1007/s11540-011-9187-0>

- Elansky S.N., Chudinova E.M., Elansky A.S. et al. Microorganisms in spent water-miscible metalworking fluids as a resource of strains for their disposal. J. Cleaner Production. 2022. V. 350. P. 131438. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131438>
- Elansky S.N., Pobedinskaya, M.A., Kokaeva L. Yu. et al. *Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: Genotypic structure and metalaxyl resistance. J. Plant Pathol. 2015. V. 97 (3). P. 449–456. <https://doi.org/10.4454/JPP.V97I3.020>
- El-Hasan A., Ngatia G., Link T.I. et al. Isolation, identification, and biocontrol potential of root fungal endophytes associated with solanaceous plants against potato late blight (*Phytophthora infestans*). Plants. 2022. V. 11. P. 1605. <https://doi.org/10.3390/plants11121605>
- Ezziyyani M., Requena M.E., Egea-Gilbert C. et al. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepperchili using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. J. Phytopathol. 2007. V. 155 (6). P. 342–349. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01237.x>
- Hashemi M., Tabet D., Sandroni M. et al. The hunt for sustainable biocontrol of oomycete plant pathogens, a case study of *Phytophthora infestans*. Fungal Biology Rev. 2022. V. 40. P. 53–69. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.003>
- Kamoun S., Furzer O., Jones J.D.G. et al. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. Molecular plant pathology. 2015. V. 16 (4). P. 413–434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>
- Karimov H., Turaeva B., Azimova N. et al. Properties of *Trichoderma* sp. 4 micromycete. Norw. J. Developm. International Sci. 2021. V. 75. P. 15–21.
- Kariuki W.G., Mungai N.W., Otake D.O. et al. Antagonistic effects of biocontrol agents against *Phytophthora infestans* and growth stimulation in tomatoes. African Crop Sci. J. V. 28. Suppl. issue. 2020. P. 55–70. <https://dx.doi.org/10.4314/acsj.v28i1.5S>
- Lamichhane J.R., You M.P., Laudinot V. et al. Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. Plant Diseases. 2020. V. 104. P. 610–623.
- Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. BioTechniques. 2011. V. 50. P. 325–328. <https://doi.org/10.2144/000113672>
- Mao T., Chen X., Ding H. et al. Pepper growth promotion and *Fusarium wilt* biocontrol by *Trichoderma hamatum* MHT1134. Biocontrol Sci. Technol. 2020. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1803212>
- Momanyi N.V., Keraka N.M., Abong'o A.D. et al. Types and classification of pesticides used on tomatoes grown in Mwea irrigation scheme, Kirinyaga County, Kenya. Eur. J. Nutr. Food Safety. 2019. V. 11 (2). P. 83–97.
- Osorio-Hernandez E., Hernandez-Castillo F.D., Gallegos-Morales G. et al. In vitro behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. Afr. J. Agric. Res. 2011. V. 6 (19). P. 4594–4600. <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR11.1094>
- Samuels G.J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology. 2006. V. 96. P. 195–206.
- Shoresh M., Mastouri F., Harman G.E. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Ann. Rev. Phytopathol. 2010. V. 48. P. 21–43.
- Trang Le Vu Khanh, Le Nguyen Tan, Mai Le Thi et al. Selecting *Bacillus* spp., antagonist of fungal phytopathogen *Phytophthora infestans* causing tomato late blight. Annual Res. Rev. Biol. 2020. V. 35 (12). P. 32–40.
- Vleeschauwer D. de, Höfte M. *Rhizobacteria*-induced systemic resistance. Adv. Bot. Res. 2009. V. 51. P. 223–281.
- Volynchikova E., Kim K.D. Biological control of oomycete soilborne diseases caused by *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, and *Phytophthora nicotianae* in solanaceous crops. Mycobiology. 2022. V. 50 (5). P. 269–293. <https://doi.org/10.1080/12298093.2022.2136333>
- Wang Y., Zhang C., Liang J. et al. Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 7467–7481. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10773-y>
- White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis etc. (eds). PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 1990, pp. 315–322.
- Yao Y., Li Y., Chen Z. et al. Biological control of potato late blight using isolates of *Trichoderma*. Am.J. Potato Res. 2016. V. 93. P. 33–42. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9475-3>
- Азимова Н.Ш., Есенова Д.Б., Хамидова Х.М. и др. (Azimova et al.) Выделение и определение вирулентности местного штамма гриба *Phytophthora infestans* из клубней картофеля. Universum: химия и биология: электрон. научн. журн. 2021. Т. 10. С. 88.

Antagonistic potential of bacterial strains of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* and fungi of the genus *Trichoderma* isolated in Uzbekistan against *Phytophthora infestans*

N. Sh. Azimova^{a, #}, H.M. Khamidova^{a, ##}, I.M. Khalilov^{a, ###}, S.N. Elansky^{b, c, ####}, E.M. Chudinova^{c, #####}, H.H. Karimov^{a, #####}, K.S. Mamanazarova^{a, d, #####} and F.B. Kobilov^{a, #####}

^aInstitute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, 100128 Tashkent, Uzbekistan

^bM.V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

^cPeoples' Friendship University of Russia, 117198 Moscow, Russia

^dInstitute of Botany of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, 100125 Tashkent, Uzbekistan

[#]e-mail: azimovanodira@mail.ru

^{##}e-mail: khamidovakh@mail.ru

^{###}e-mail: ilkhom2002@yahoo.com

^{####}e-mail: snelansky@mail.ru

^{#####}e-mail: chudiel@mail.ru

^{#####}e-mail: karimov_h_kh@mail.ru

^{#####}e-mail: karomat.3005@mail.ru

^{#####}e-mail: bozorovich02@mail.ru

Studies have been carried out on strains of bacteria and fungi isolated in Uzbekistan, which can be used in the biological control of potato late blight. Testing was carried out on two strains of *Phytophthora infestans* — TVKT-1 and 4MSLK 26 — isolated from affected potato in the Tashkent region of Uzbekistan and in the Moscow region of Russia, respectively. In relation to these strains, the antagonistic activity of strains of fungi belonging to the genus *Trichoderma* and bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated in Uzbekistan was studied. The maximum antagonistic activity was shown by the *Bacillus safensis* 3/11 strain, which inhibited the growth of the mycelium of the TVKT-1 strain by 61.9% and 4MSLK 26 by 50%. The strains *B. licheniformis* 6/25 and *Pseudomonas alcaliphila* 2/18 were also quite effective. All studied strains of fungi of the genus *Trichoderma* showed high antagonistic activity; the most active strain was *T. asperellum* Uz-A4, which inhibited the growth of mycelium of strains TVKT-1 and 4MSLK 26 by 77.1 and 73.1%, respectively.

Keywords: antagonistic activity, *Bacillus safensis*, growth inhibition, late blight, *Phytophthora*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Trichoderma*.

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFICIENCY OF INDUCERS OF COTTON RESISTANCE TO VERTICILLIUM WILT

© 2024 г. I. G. Akhmedzhanov^{1,*}, M. M. Khotamov^{2,**}, and P. G. Merzlyak^{1,***}

¹ Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan, 100047 Tashkent, Uzbekistan

² Institute of Genetics and Plant Experimental Biology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, 111208 Yukori-Yuz, Uzbekistan

*e-mail: iskakhm@mail.ru

**e-mail: mansurhatamov@mail.ru

***e-mail: galores@list.ru

Received 28 June, 2023;

Revised 21 July, 2023;

Accepted 28 December, 2023

The effect of pre-sowing seed treatment with immunostimulant Bisol-2, red light and low frequency electromagnetic field on the content of fungitoxic substances of phenolic nature – phytoalexins (isohemigossypol and gossypol-equivalent) in infected etiolated cotton seedlings of S-4727 cultivar infected with *Verticillium* wilt pathogen was studied. It was found that photostimulation of seeds by red light induces phytoalexin formation in cotton tissues infected by the pathogen 1.5–2 times more effectively in comparison with Bisol-2 preparation or inducer of electromagnetic nature. The correlation between the content of phytoalexins in the tissues of seedlings, parameters of induction curves of chlorophyll fluorescence and the number of plants with signs of wilt lesions grown from treated and untreated seeds with inducers was revealed. This indicates the possibility of using red light and weak low-frequency electromagnetic fields as factors contributing to the intensification of phytoalexin formation in response to *Verticillium* wilt infection of cotton.

Ключевые слова: chlorophyll fluorescence, cotton, *Gossypium hirsutum*, low frequency electromagnetic fields, phytoalexins, phytochrome, red light, *Verticillium* wilt

DOI: 10.31857/S0026364824010054, **EDN:** mapzuw

INTRODUCTION

An important link in the technology of cultivation of agricultural crops is plant protection from pests, which is carried out using various methods: breeding and seed production, agrotechnical, physical and mechanical, chemical, biological, etc. (Daguzhieva, 2015). Among them, a certain place is occupied by protective measures, which are based on the induction of plant disease resistance by immunomodulators of physical and chemical nature (Stossel, Magnolato, 1983; Akhmedzhanov et al., 1992; Shakirova, 2001; Ben-Izhak et al., 2003; Tonkikh, 2010; Pershakova et al., 2016).

It is known that the increase of cotton resistance to damage by causative agent of *Verticillium* wilt — fungus *Verticillium dahliae* Kleb in many cases consists in inducing biosynthesis in plant tissues of phytoalexins, such as isohemigossypol and gossypol equivalent, toxic to the pathogen (Avazkhodzhaev, Zeltser, 1980, 1995; Stossel, Magnolato, 1983; Akhmedzhanov et al., 1993; Kuc, 1995; Dyakov et al., 2001; Konan et al., 2014; Khotamov, Redzhapova, 2019; Khotamov, Akhmedzhanov, 2021).

To intensify immune reactions of cotton to increase wilt resistance is applied by stimulating phytoalexin formation in plant tissues with the help of various chemicals of biogenic and abiogenic nature by soaking seeds, spraying plants in different phases of development, etc. (Stossel, Magnolato, 1983; Dyakov et al., 2001; Belan, 2001; Kodirov, 2009; Akhiyarov et al., 2017). However, the widespread use of chemical pesticides has a number of negative consequences: environmental pollution, possible adaptation of the fungus *V. dahliae*, the emergence of new virulent races of the pathogen and toxic effects on beneficial microflora.

The phytoalexin-forming ability of plants in response to pathogen infection is significantly influenced by environmental factors and the physiological state of the plant organism itself. Light is also an inducer of phytoalexin formation in plant tissue. For example, ultraviolet irradiation (wavelengths less than 0.4 μm) of seeds and plants excites plant defence reactions (Haard, 1983; Kodama et al., 1988; Nelyubina, Kasatkina, 2021). At the same time, stress creation by means of ultraviolet irradiation has a number of disadvantages associated

with the possibility of its destructive action not only on pathogen macromolecules but also on host plant elements. In addition, the process of ultraviolet irradiation is labour-intensive and harmful to the human body (Nenakhova, Nikolaeva, 2020; Sayapina et al., 2022).

An alternative to ultraviolet irradiation is red light, which, by inducing the cis-trans isomerisation reaction of the phytochrome chromophore, the bilitriene-loosened tetrapyrrole cycle, activates the phytochrome system of plants and thus regulates many metabolic processes of the cell (Kuznetsov et al., 1986; Volotovskiy, 1992; Dechaine et al., 2009; Vayda et al., 2018; Voytsekhovskaya, 2019; Legris et al., 2019; Akhmedzhanov et al., 2023), including phytoalexin formation (Akhmedzhanov et al., 1992; Mavlanova, 2012). In addition, the possibility of increasing plant resistance to various harmful factors, including pathogens, by means of short-term stressing by inducers of different nature, i.e. plant hardening, has been shown (Shakirova, 2001). Studies by a number of authors (Ben-Izhak et al., 2003; Aksenov et al., 2007; Tonkikh, 2010; Bilalis et al., 2013; Pershakova et al., 2016) have shown that low-frequency electromagnetic fields can also be attributed to such inducers. Taking into account the efficiency and simplicity of using weak low-frequency electromagnetic fields for plant treatment, as well as their neutrality in terms of environmental impact, it was interesting to compare the effect of red light and low-frequency electromagnetic fields as inducers of phytoalexin formation in cotton tissues infected with the *Verticillium* wilt pathogen with the known immunostimulant — chemical preparation Bisol-2 (Shakirova, 2001; Akhiyarov, 2017; Belan, 2001). At the same time, the efficiency of inducers of cotton defence reactions studied in the experiments was also controlled by induction of chlorophyll fluorescence, the parameters of which adequately reflect the physiological state of plants (Veselovskiy, Veselova, 1990; Lichtenthaler, 1992; Korneev, 2002; Belasque et al., 2008; Posudin et al., 2010; Belov et al., 2015; Matorin et al., 2018; Wu et al., 2019), including their resistance to phytopathogens (Kshirsagar et al., 2001; Mandal et al., 2009; Pascual et al., 2010; Babar et al., 2018; Aleynikov, Mineev, 2019; Khotamov et al., 2020).

The aim of this work was a comparative study of the effect of the Bisol-2 immunostimulant, low-frequency electromagnetic fields, and biologically active red light on the resistance of cotton variety S-4727 to the causative agent of *Verticillium* wilt by assessing the intensity of the hypersensitivity reaction of pathogen-infected tissues and the characteristics of fluorescence induction of plant leaves.

MATERIALS AND METHODS

In the experiments, of the susceptible cotton cultivar S-4727 (*Gossypium hirsutum*) was used, which was grown in vegetation vessels on sterilized vermiculite enriched with Belousov's nutritious mixture (Zhurbitsky, 1968). In a phase of 6–7 true leaves, cotton plants were infected with a dosed inoculum of race-2 of the fungus *V. dahliae* from the collection of plant pathogens of the Institute of Genetics and Experimental Plant Biology of the Academy of Sciences of Uzbekistan at a rate of 2.5 million spores/ml. Plants were used as control, into the stems of which distilled water was introduced using a capillary (Avazkhodzhaev et al., 1995).

A monospore culture of *V. dahliae* fungus was grown for 8 days in test tubes on a solid Chapek medium of the following composition: NaNO_3 —3 g; KH_2PO_4 —1 g; MgSO_4 —0.5 g; KCl —0.5 g; FeSO_4 —0.01 g, sucrose—30 g, agar-agar—20 g per 1 liter of distilled water. Sowing was carried out by the “injection” method on the surface of an agar medium. As seed material, conidia or microsclerotia of micromycetes were used separately, as well as a mixture of these fungal structures. Then, using a microbiological loop under sterile conditions, part of the conidia was transferred to Petri dishes with Chapek's medium, where they were germinated in an incubator at a temperature of 27 °C in complete darkness. A fungal spore suspension was prepared by shaking 2 ml of sterile distilled water in a test tube with a fungal culture of 10–15 days of age (Avazkhodzhaev, Zeltser, 1980). The density of fungal spores in suspension was calculated according to the method described in (Israel et al., 1968). The suspension of conidia of the fungus obtained in vitro, after calculating its density, was diluted in the required concentration.

Plants were infected by injection of inoculum using a triple injection with a syringe into the stem. The inoculum was released from the syringe as a drop of suspension at the end of the needle. The needle was inserted into the stem at an angle of 45°. A drop was absorbed into the stem, and this gave visible confirmation of inoculation. The appearance of chlorosis on the lower leaves of cotton, yellowing of tissues, and necrotization of leaf blade sections indicated damage to infected plants by the wilt (Avazkhodzhaev, Zeltzer, 1980).

When studying the parameters of the hypersensitivity reaction, etiolated hypocotyls of cotton were used. Seedlings were grown in a thermostat at 24°C. 18–20 day old etiolated seedlings were placed in tubs and treated by spraying with a wilt inducer at the rate of 0.05 mg/100 ml of water. The qualitative composition of phytoalexins (FA) was determined by thin layer chromatography on Silufol-UV-254 plates from Kavalier (Czech Republic). For the quantitative determination

of isohemigossypol (IHG) and phytoalexin-equivalent (GE), cotton seedlings were finely chopped with scissors, filled with chloroform at 1:3 ratio, and placed in a refrigerator for 24 hours. Then obtained chloroform extract containing FA was filtered from solid residues and dried with a water jet pump. The dried residue was dissolved in 1 ml of chloroform. The resulting chloroform eluate was used for coating Silufol UV-254 plates. The plates were placed in chromatographic chambers and a single separation was performed in a benzol — methanol (9:1) solvent system. Benzol and methanol must be anhydrous because with an admixture of water, the system turns out to be cloudy and unsuitable for analysis. The heat-dried chromatograms were viewed under UV light and developed with fluoroglicin (2% in 96% ethanol). For this, the plate was covered with a developing reagent using a spray gun, then left for several minutes in air to evaporate the solvent, after which the chromatograms were heated for 1 min in a thermostat at 100 °C. Phytoalexins IHG and GE are stained in a stable dark crimson color. The quantitative determination of FA was carried out by elution of spots from chromatograms with a benzol-methanol mixture (9: 1) and measurement of the color intensity on a photoelectrocolorimeter with a blue light filter. The eluate from the clean zone of the chromatogram was used as a standard. The quantitative content of IHG was calculated using a pre-drawn calibration graph using pure IHG preparation as a standard. The results obtained were expressed in μg per g of wet tissue of etiolated seedlings (Avazkhodzhaev, Zeltzer, 1980).

Seeds before germination in the dark to obtain etiolated seedlings and before sowing into growing vessels were treated with immunostimulant Bisol-2 by soaking in the drug solution (the rate of drug consumption is 1 litre/t), electromagnetic field of electromagnetic pulse generator with a frequency of 4 Hz and magnetic induction of 200–500 nTl for 30 minutes (Tonkikh, 2010). Seed irradiation was carried out for 5 minutes with red light of LEDs (maximum radiation 660 nm) according to the method described in the patent (Akhmedzhanov et al., 2017).

Induced fluorescence of chlorophyll of the control (uninfected) leaves and infected with the pathogen of *Verticillium* wilt plants was measured on the 7th day after infection. The functional activity of the photosynthetic apparatus (PSA) of assimilating cotton tissues was evaluated by indicators of chlorophyll fluorescence induction (CFI) using a portable fluorimeter (Akhmedzhanov et al., 2013): light source — LED, 450–470 nm; receiver — P-I-N photodiode; fluorescence kinetics recording time up to 10 min with a resolution of 0.01 s. In this case the following ratio of parameters of the leaf fluorescence induction curve was

used: $(F_M - F_T)/F_M$ — degree of decrease in chlorophyll fluorescence intensity characterizing the integral activity of the photosynthetic apparatus, where F_M — maximum value of fluorescence induction, F_T — stationary value of fluorescence after light adaptation of a leaf (Posudin et al., 2010; Romanov et al., 2010; Akhmedzhanov et al., 2013; Khotamov et al., 2020).

The experiments were carried out 3–4 times. The results were processed by methods of mathematical statistics according to Dospheov (1985).

RESULTS

The physiological and biochemical study of various aspects of plant activity provides an opportunity to exploit the immune properties of the organism itself, by which it defends itself against attack by pathogens in nature. The results of studies have shown that both red light (RL) and low frequency electromagnetic fields (LF EMF) act on cotton seedlings similarly to physiologically active drugs (inducers), which activate the immune properties of plants manifested in the production of phytoalexin-like substances upon contact with the pathogen.

Analysis of chromatograms (Fig. 1) revealed that treatment of seeds with RL and LF EMF induces a hypersensitivity reaction in pathogen-infected tissues of hypocotyls of etiolated cotton seedlings. The areas of the chromatograms in which the phytoalexins (FA), isohemigossypol (IHG) and gossypol equivalent (GE) are detected are stained with fluoroglucin significantly more intensely when seedlings grown from inducer-irradiated seeds were used compared to when seedlings were obtained from non-irradiated seeds. Thus, the chromatographic characterisation of chloroform extracts of experimental and control cotton seedlings qualitatively indicates the FA-inducing activity of RL and LF EMF.

The data presented in the Table 1 reflect the effect of irradiation of cotton seeds with RL and EMF LF on the quantitative content of FA formed in the tissues of seedlings 48 hours after infection with the *Verticillium* wilt pathogen. Spraying of etiolated seedlings with the fungus preparation causes induction of FA-formation, but treatment of seeds with immunostimulant Bisol-2, as well as photostimulation and stressing of seeds by exposure to EMF LF lead to a noticeable increase in FA-inducing ability of infected tissues of etiolated seedlings. At the same time, it should be noted that under the influence of RL the increase in IGH content was 1.5–2 times greater compared to that induced by EMF LF or Bisol-2 preparation. There is also a small difference in the content of GE in variants

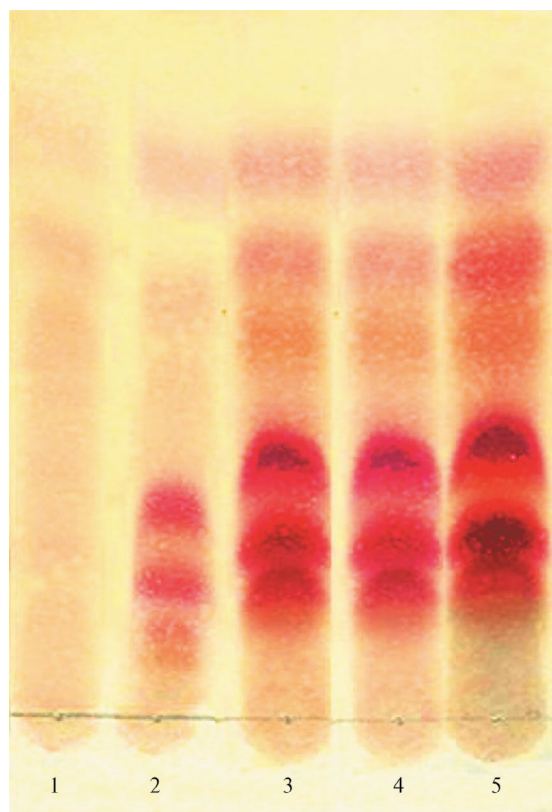


Fig. 1. Chromatograms of quantitative content of iso-hemigossypol and gossypol equivalent in hypocotyls of etiolated seedlings of cotton cultivar S-4727 48 h after infection with *Verticillium dahliae* fungus (infection load 2.5 million spores/ml): 1 – control (seeds before sowing were not treated, seedlings were not infected with the inducer of wilt lesion); 2 – seeds before sowing were not treated, seedlings were infected; 3 – seeds before sowing were treated with Bisol-2, seedlings were infected; 4 – seeds before sowing were treated in electromagnetic field, seedlings were infected; 5 – seeds before sowing were treated with red light, seedlings were infected.

with pretreatment of seeds with RL, EMF HF or immunostimulant.

The effectiveness of the effect of Bisol-2, RL and EMF LF on cotton resistance to infection by phytopathogenic fungus was also controlled by the method of induction of chlorophyll fluorescence (CFI) of plant leaves.

The data presented in Fig. 2 showed that infection of cotton with the *Verticillium* wilt pathogen resulted in an almost 2-fold decrease in the parameter $(FM - FT)/FM$ of the CFI measured at both 690 nm and 730 nm wavelengths. Pre-sowing treatment of seeds with immunostimulant Bisol-2 and inducer of electromagnetic nature have a significant protective effect against the negative effect of phytopathogen: the values of CFI parameter measured at 690 nm were

fixed at a higher level compared to the variant of plant infection without pre-treatment with inducers. At the same time, the difference in the value of the parameter compared to the control (healthy plants) was 17 and 26% in the case of inducer of chemical and physical nature, respectively. The greatest effect was observed for the variant of seed pre-sowing phototreatment: the values of the measured parameter CFI did not differ from the control. At the same time, the CFI measurement at 730 nm wavelength showed the following results: while the seed pretreatment with red light also completely prevents the reduction of the $(FM - FT)/FM$ parameter value, in the case of the Bisol-2 preparation application variant the protective effect was only 77.9%, and in the EMF variant – 76.4%.

DISCUSSION

A large number of works have been devoted to the study of the role of the phytochrome system in the regulation of physiological processes, from seed germination to the end of ontogenesis. The results of these studies have shown that the phytochrome system controls the germination of seeds, the restructuring of growth processes associated with the release of the seedling from the soil into the light, provides the plant with optimal adaptation to lighting conditions necessary for its photosynthetic activity, participates in the regulation of flowering and many other processes in plant life (Kulaeva, 2001; Dechaine, 2009), including plant resistance to phytopathogens (Mavlanova, 2012; Akhmedzhanov et al., 1992, 2023). Improving the sowing qualities of seeds under the influence of incoherent red light activates the initial growth processes in seeds, which further affects the acceleration of plant growth and development and, ultimately, leads to an increase in yield (Savina et al., 2015).

Phytochrome is the main photoreceptor of plants, which is located in the cells of the seed embryo. When soaking seeds, enzymatic reactions are activated in them, which cause hydrolysis of organic substances necessary for the nutrition of the embryo and the start of initial growth processes, which are stimulated by irradiation of seeds with red light (Savina, Ilyichev, 2021). At the same time, the main link in the mechanism of triggering the initial growth processes in seeds is an increase in the amount of gibberellin, which initiates the activation of hydrolytic enzymes (amylases, proteases, lipases) that cleave endosperm spare substances that contribute to the germination process (Bitarashvili et al., 2019). Another representative of the hormonal regulation of physiological processes of plants is auxin indolyl-3-acetic acid (IAA), which stimulates cell division and stretching, promotes the formation of conductive bundles and roots, and activation of the proton pump in the plasmalemma under the action of IAA leads

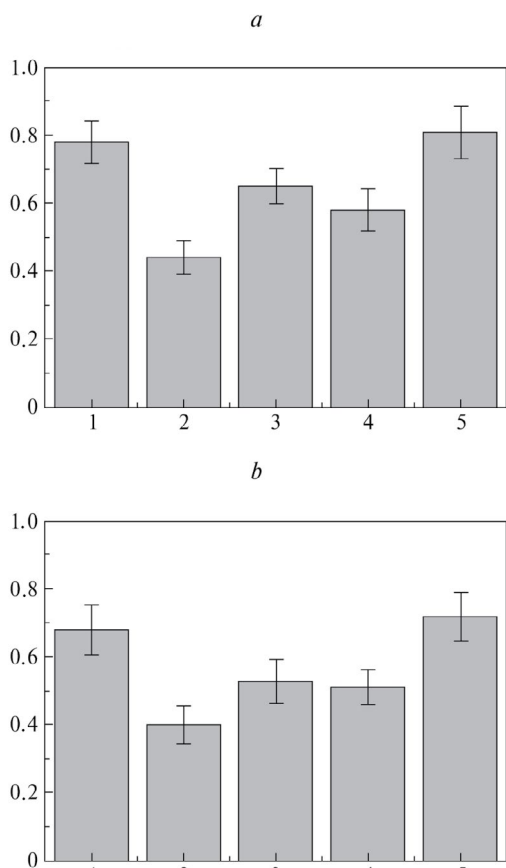


Fig. 2. Effect of seed treatment with Bisol-2 immunostimulant, low frequency electromagnetic field or red light on the value of the parameter (FM – FT)/FM of induction curves of chlorophyll fluorescence of leaves of Verticillium wilt-infected cotton cultivar S-4727. Measured at wavelengths of 690 nm (A) and 730 nm (B): 1 – control (seeds before sowing were not treated, seedlings were not infected with wilt inducer); 2 – seeds before sowing were not treated, seedlings were infected; 3 – seeds before sowing were treated with Bisol-2 preparation, seedlings were infected; 4 – seeds before sowing were treated in electromagnetic field, seedlings were infected; 5 – seeds before sowing were treated with red light, seedlings were infected. The confidence interval of the mean values was at least 95% ($P \leq 0.05$).

to acidification and loosening of the cell wall and thereby promotes cell growth by stretching. The IAA complex with the receptor is transported to the nucleus and activates RNA synthesis, which in turn leads to increased protein synthesis (Quail, 2002). As the results of our studies have shown (Nazhimova, 2007), phytochrome plays an active role in this process, which can bind to various auxin receptors, both membrane and cytoplasmic, at the very first stages of RL signal transduction, and this binding leads to an increase in the affinity of auxin to its receptors, which, as a result, enhances some rapid reactions in plants mediated by auxin under the action of RL.

The differences revealed in this study in the efficiency of the regulatory effect of inducers on the intensity of cotton defence reactions against Verticillium wilt pathogen are apparently related to the specificity of the action of RL mediated by the phytochrome system on this process. According to current ideas (Kuznetsov et al., 1986; Volotovskiy, 1992; Kulaeva, 2001; Dechaine et al., 2009; Vayda et al., 2018; Legris et al., 2019; Akhmedzhanov et al., 2023), a distinctive feature of phytochrome participation in the regulation of physiological processes of a plant organism is antagonism in the action of red and far red light (FRL) on the initiation and intensity of their course. In this regard, the opposite effect of RL and far-red light (FRL) on FA synthesis is evidence of the specificity of RL effects: in contrast to pretreatment of seeds with RL, which activates the phytochrome system and thus stimulates FA formation, treatment of seeds with FRL, which leads to the reverse photoconversion of phytochrome from the active P_{dk} to the inactive P_k form, does not affect the efficiency of defence reactions of infected cotton plants compared to the control (Akhmedzhanov et al., 1993). This fact may indicate in favour of the fact that RL seed irradiation through a cascade of phytochrome-dependent reactions contributes to the removal of the mechanism of suppression of genes responsible for the hypersensitivity reaction when plants are infected with the Verticillium wilt pathogen. There is an opinion (Avazkhodzhaev et al., 1995) that the suppression mechanism functions more effectively in cotton genotypes susceptible to wilt; therefore, under normal conditions they are characterised by low FA content in tissues. However, after the removal of this mechanism under the action of the active form of phytochrome, these genotypes acquire the ability to significantly increase the level of FA-formation, as noted for the cotton variety S-4727 studied in our experiments.

Under the action of non-specific stressing factors, which includes electromagnetic stressing of seeds, the mechanism of FA formation is different. In response to a nonspecific stressor, a large and complex chain of nonspecific plant responses develops, including expression of protective genes followed by synthesis of protective enzymes, etc. (Ben-Izhak et al., 2003; Malinovsky, 2004; Tonkikh, 2010; Bilalis et al., 2013). It is quite probable that the differences in the mechanisms of influence of RL and EMF LF on the system of defence reactions of cotton against wilt lesions cause, in the end, the difference in the efficiency of FA-inducing ability of infected tissues of seedlings grown from photostimulated and stressed seeds in the electromagnetic field. Differences in FA content, especially IHG, in experimental and control (without

Table 1. Effect of seed treatment with immunostimulant Bisol-2, low frequency electromagnetic field or red light on the quantitative content of phytoalexins in etiolated seedlings of cotton S-4727 cultivar 48 hours after infection with *Verticillium dahliae* fungus (infection load 2.5 million spores/ml) and the number of plants (in % of the total number) with Verticillium wilt symptoms

Seed treatment option	IGH	GE	Percentage of affected plants
	µg/g crude tissue		
Control	—	—	—
V.d.	19.4 ± 2.28	24.9 ± 2.66	23.1
Bisol-2 + V.d.	24.3 ± 2.29	27.7 ± 3.17	12.0
EMF LF + V.d.	23.9 ± 2.55	28.6 ± 3.04	12.5
RL + V.d.	30.0 ± 3.11	32.8 ± 4.05	4.9

Примечание. V.d. — infection with *Verticillium dahliae* fungus. The confidence interval of the mean values was at least 95% ($P \leq 0.05$).

application of inducers of defence reactions) variants correlate well with the number of plants with signs of wilt lesions. This fact is another strong evidence of the possibility of using RL and EMF LF as inducers to increase the efficiency of the FA-formation mechanism in response to infection of cotton with Verticillium wilt.

Comparative analysis of the effect of the studied inducers on the intensity of the hypersensitivity reaction and the parameters of CFI of cotton tissues infected with the pathogen showed almost equal effectiveness of the protective effect of Bisol-2 and EMF LF. At the same time, the level of plant defence reactions was significantly higher in the case of pre-sowing treatment of RL seeds. The calculation of Pearson correlation coefficient (r_p) between the content of IGH in etiolated tissues and the values of the parameter (FM – FT)/FM of CFI measured at wavelengths of 690 nm and 730 nm in the experimental and control variants allowed us to establish the value of $r_p = 0.93$ with the average error of the correlation coefficient $m_r = 0.052$ and $r_p = 0.89$ and $m_r = 0.056$, respectively. Thus, a high positive correlation was revealed between the compared indicators of resistance of cotton cultivar S-4727 to the Verticillium wilt pathogen: the greater values of the parameter (FM – FT)/FM of tissue fluorescence, the more effective is the system of plant defence reactions determined by the level of FA content in infected tissues. Conversely, a low level of IGH synthesis favours unimpeded spread of the pathogen through tissues of susceptible cultivars, which is reflected in a decrease in the value of the CFI parameter.

At present, chemical substances — inducers of hypersensitivity reaction of infected tissues — are widely used to increase cotton wilt resistance (Kodirov, 2009). The results of our research showed the effectiveness of alternative inducers of cotton resistance to the causative agent of Verticillium wilt — low frequency electromagnetic fields and biologically active red light. The significant advantage of inducers of physical nature,

compared to chemical immunostimulants, is high efficiency, environmental safety, the absence of the emergence of new virulent races of the pathogen and negative impact on the useful microflora, as well as low cost and simplicity of the procedure of pre-sowing treatment of seeds with red light (Akhmedzhanov et al., 2017) and electromagnetic fields of low frequency (Aksenov et al., 2007; Tonkikh, 2010; Bilalis et al., 2013).

REFERENCES

- Akhiyarov B., Rakhimov R., Kutluev A. The use of Bisol 2 on cucumbers. *Ovoshchevodstvo i teplichnoe khozyaystvo*. 2017. N2 (150). P. 40–45 (in Russ.).
- Akhmedzhanov I.G., Gussakovskiy E.E., Tashmukhamedov B.A. et al. A method for increasing the resistance of cotton to damage by the causative agent of Verticillium wilt. Authors' certificate N1782387 of the State Committee for inventions of the USSR, 1992 (in Russ.).
- Akhmedzhanov I.G., Gussakovskiy E.E., Avazkhodzhaev M.H. et al. Regulation of phytoalexin formation in cotton tissues when seeds are irradiated with red light. *Uzbekskiy biologicheskii zhurnal*. 1993. N 1. P. 3–5 (in Russ.).
- Akhmedzhanov I.G., Agishev V.S., Dzholdasova K.B. et al. The use of a portable fluorimeter to study the effect of water deficit on the characteristics of delayed fluorescence of cotton leaves. *Doklady Akademii nauk Uzbekistana*. 2013. N3. P. 58–60 (in Russ.).
- Akhmedzhanov I.G., Tonkikh A.K., Khotamov M.M. et al. Method of pre-sowing treatment of cotton seeds. Patent for invention N IAP 05970 of the Agency for intellectual property of the Republic of Uzbekistan (priority of 24.05.2017, N IAP 20170197).
- Akhmedzhanov I.G., Khotamov M.M. Investigation of cotton wilt resistance by fluorescence spectroscopy. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2022. V. 56 (2). P. 105–113.
- Akhmedzhanov I.G., Khotamov M.M., Ganiev F.K. et al. Phytochrome-dependent regulation of melon resistance to Fusarium wilt. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2023. V. 57 (2). P. 113–122.

- Aksenov S.I., Grunina T. Yu., Goryachev S.N. On the mechanisms of stimulation and inhibition during germination of wheat seeds in an ultra-low frequency electromagnetic field. *Biophysics*. 2007. V. 52 (2). P. 332–338.
- Aleynikov A.F., Mineev V.V. Effect of the fungus of *Ramularia tulasnei* Sacc. on chlorophyll fluorescence in garden strawberry. *Sibirskiy vestnik selskokhozyaystvennoy nauki*. 2019. V. 49 (2). P. 94–102 (in Russ.).
- Avazkhodzhaev M. Kh., Zeltzer S.S. Physiological factors of cotton wilt resistance. Fan, Tashkent, 1980 (in Russ.).
- Avazkhodzhaev M. Kh., Zeltzer S.S., Nuritdinova H. et al. Phytoalexins as a factor in wilt resistance of cotton. In: *Handbook of phytoalexin metabolism and action*. Marcel Dekker Inc., N.Y. etc., 1995, pp. 129–160.
- Babar M.A., Saleem M., Hina A. et al. Chlorophyll as biomarker for early disease diagnosis. *Laser Physics*. 2018. V. 28 (6). P. 58–63.
- Belan S.R. New pesticides: Handbook. Grail Publishing House, Moscow, 2001 (in Russ.).
- Belasque J., Gasparoto M.C.G., Marcassa L.G. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy. *Appl. Opt.* 2008. V. 47 (11). P. 1922–1926.
- Belov M.L., Bullo O.A., Fedotov Yu.V. et al. Laser method for vegetation monitoring. *Vestnik MGTU. Ser. Priborostroeniye*. 2015. N 2. P. 71–82 (in Russ.).
- Ben-Izhak M.E., Parola A.H., Kost D. Low-frequency electromagnetic fields induce a stress effect upon higher plants, as evident by the universal stress signal, alanine. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 302 (2). P. 427–434.
- Bilalis D.J., Katsenios N., Efthimiadou A. et al. Magnetic field pre-sowing treatment as an organic friendly techniqueto promote plant growth and chemical elements accumulation in early stages of cotton. *Australian J. Crop Sci.* 2013. V. 7 (1). P. 46–50.
- Bitarishvili S.V., Bondarenko V.S., Geraskin S.A. Expression of gibberellin biosynthesis and catabolism genes in the embryos of γ -irradiated Barley seeds. *Radiation biology. Radioecology*. 2019. N 3. P. 286–292 (in Russ.).
- Dechaine J.M., Gardner G., Weinig C. Phytochromes differentially regulate seed germination responses to light quality and temperature cues during seed maturation. *Plant Cell Environ.* 2009. V. 32 (10). P. 1297–1309.
- Dospekhov B.A. Field experiment technique (with the basics of statistical processing of research results). Agropromizdat, Moscow, 1985 (in Russ.).
- Dyakov Yu.T., Ozeretskoyevskaya O.L., Javakhia V.G. et al. General and molecular phytopathology. Moscow, 2001 (in Russ.).
- Haard N.F. Stress metabolites. Post. Harvest Phisiol. and Crop Preserv. Proc. NATO Adv. Study. Inst. Sounion. 1983. P. 299–314.
- Khotamov M.M., Redzhapova M.M. Resistance of the variety diversity *Gossypium hirsutum* L. species to Verticillium wilt. *Int. J. Innovative Research in Multidisciplinary Field*. 2019. V. 5 (5). P. 78–80.
- Khotamov M.M., Agishev V.S., Akhmedzhanov I.G. Influence of Verticillium wilt infection on the functional activity of the cotton photosynthetic apparatus. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2020. V. 54 (5). P. 340–346.
- Khotamov M.M., Akhmedzhanov I.G. Study of Verticillium wilt pathogenesis in different cotton genotypes. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2021. V.55 (2). P. 148–154.
- Kodama O., Suzuki T., Miyokawa J. et al. Ultraviolet induced accumulation of phytoalexins in rice leaves. *Agr. Biol. Chem.* 1988. V. 52. P. 2469–2473.
- Kodirov A.K. Study and development of technology for the use of the immuno- and growth stimulator Rostbisol on cotton in the conditions of the Bukhara region. Cand. Biol. Thesis. Tashkent, 2009 (in Russ.).
- Konan Y.K.F., Kouassi K.M., Kouakou K.L. et al. Effect of methyl jasmonate on phytoalexins biosynthesis and induced disease Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Int. J. Agron.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/806439>
- Korneev D. Yu. Information possibilities of the method of inducing fluorescence of chlorophyll. Alterpress, Kiev, 2002 (in Russ.).
- Kshirsagar A., Reid A.J., McColl S.M. et al. The effect of fungal metabolites on leaves as detected by chlorophyll fluorescence. *New Phytol.* 2001. V. 151 (2). P. 451–457.
- Kuc J. Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1995. N 33. P. 275–297.
- Kulaeva O.N. How light regulates life of plants. *Sorosovskiy obrazovatelniy zhurnal*. 2001. V. 7 (4). P. 6–12 (in Russ.).
- Kuznetsov E.D., Sechnyak L.K., Kindruk N.A. et al. The role of phytochrome in plants. Agropromizdat, Moscow, 1986 (in Russ.).
- Legris M., Caka Yu., Fankhauser C. Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nature Communications*. 2019. V. 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13045-0>
- Lichtenthaler H.K. The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica*. 1992. V. 27 (1–2). P. 45–55.
- Malinovskiy V.I. Plant physiology. Textbook, university manual. Vladivostok, 2004 (in Russ.).
- Mandal K., Saravanan R., Maiti S. et al. Effect of downy mildew disease on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Plantago ovata* Forsk. *J. Plant Dis. Protect.* 2009. V. 116 (4). P. 164–168.
- Matorin D.N., Timofeev N.P., Glinushkin A.P. et al. Application of the fluorescence method for investigating the influence of root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana* on photosynthetic light reactions in wheat plants. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Ser. 16. Biologiya*. 2018. V. 73 (4). P. 247–253 (in Russ.).
- Mavlanova S.A. Physiological and biochemical peculiarities of the induced resistance of cotton to sucking

- pests-insects and Verticillium wilt exitant. Cand. Biol. Thesis. Tashkent, 2012 (in Russ.).
- Nadzhimova H.K.* The influence of red light on auxin-dependent processes in plants. Cand. Biol. Thesis. Tashkent, 2007 (in Russ.).
- Nelyubina Z.S., Kasatkina N.I.* Influence of ultraviolet irradiation of perennial grasses seeds on their sowing quality. *Agrarnaya nauka*. 2021. N9. P. 97–100 (in Russ.). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-352-9-97-100>
- Nenakhova E.V., Nikolaeva L.A.* Ultraviolet radiation. The effect of ultraviolet radiation on the human body. IGMU, Irkutsk, 2020 (in Russ.).
- Pascual I., Azcona I., Morales F. et al.* Photosynthetic response of pepper plants to wilt induced by *Verticillium dahliae* and soil water deficit. *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167 (9). P. 701–708.
- Pershakova T.V., Kupin G.A., Mikhaylyuta L.V. et al.* Investigation of the influence of the electromagnetic field on the change of microbial contamination of plant raw materials during storage. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2016. N 5. P. 74–78 (in Russ.).
- Posudin Yu.I., Godlevska O.O., Zaloilo I.A. et al.* Application of portable fluorometer for estimation of plant tolerance to abiotic factors. *Int. Agrophysics*. 2010. V. 24 (4). P. 363–368.
- Quail P.H.* Phytochrome photosensory signaling networks. *Nature*. 2002. V. 3. P. 85–93.
- Romanov V.A., Galeluka I.B., Sakharan E.V.* Portable fluorimeter and features of its application. *Sensornaya elektronika i mikroskopicheskiye tekhnologii*. 2010. V. 1 (7). P. 146–152 (in Russ.).
- Savina O.V., Ilyichev L.F.* The use of red light to activate the germination of tomato seeds with expired shelf life. *Vestnik Ryazanskogo agrotekhnicheskogo universiteta*. 2021. V. 13 (4). P. 104–111 (in Russ.).
- Savina O.V., Rudelev S.A., Rodionova A.E.* Stimulation of germination of grain seeds by incoherent red light: theory and practice. *Vestnik FGBOU VPO RGATU*. 2015. N 1 (25). P. 60–65 (in Russ.).
- Sayapina D.G., Sivokon V.E., Limarenko N.V.* Investigation of the effect of ultraviolet radiation on the condition of human skin. *Molodoy issledovatel Dona*. 2022. N 3 (36). P. 144–148 (in Russ.).
- Shakirova F.M.* Non-specific resistance of plants to stress factors and its regulation. Gilem, Ufa, 2001 (in Russ.).
- Stossel P., Magnolato D.* Phytoalexins in *Phaseolus vulgaris* and glycine max induced by chemical treatment, microbial contamination and fungal infection. *Experimentia*. 1983. V. 39 (2). P. 153–154.
- Tonkikh A.K.* Mechanisms of action of weak low-frequency electromagnetic fields on living organisms. *Uzbekskiy biologicheskiy zhurnal*. 2010. Special Issue. P. 93–99 (in Russ.).
- Vayda K., Donohue K., Auge G.A.* Within- and trans-generational plasticity: seed germination responses to light quantity and quality. *AoB Plants*. 2018. V. 10 (3). P. ply023. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply023>
- Veselovsky V.A., Veselova T.V.* Luminescence of plants. Theoretical and practical aspects. Nauka, Moscow, 1990 (in Russ.).
- Voytsekhovskaya O.V.* Phytochromes and other (photo) receptors of information in plants. *Fiziologiya rasteniy*. 2019. V. 66 (3). P. 163–177 (in Russ.).
- Volotovskiy I.D.* Phytochrome is a regulatory photoreceptor of plants. Nauka, Moscow, 1992 (in Russ.).
- Wu G., Zhao I., Sen R. et al.* Characterization of maize phytochrome-interacting factors in light signaling and photomorphogenesis. *Plant Physiol.* 2019. V. 181. P. 789–803. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00239>
- Zhurbitsky Z.I.* Theory and practice of the vegetative method. Nauka, Moscow, 1968 (in Russ.).
- Авазходжаев М.Х., Зельцер С.Ш.* (Avazkhodzhaev, Zelster) Физиологические факторы вилтоустойчивости хлопчатника. Ташкент: Фан, 1980. 22 с.
- Аксенов С.И., Грунина Т.Ю., Горячев С.Н.* (Aksenov et al.) О механизмах стимуляции и торможения при прорастании семян пшеницы в электромагнитном поле сверхнизкой частоты // Биофизика. 2007. Т. 52. № 2. С. 332–338.
- Алейников А.Ф., Минеев В.В.* (Aleynikov, Mineev) Влияние гриба *Ramularia tulasnei* Sacc. на флуоресценцию хлорофилла садовой клубники // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2019. Т. 49. № 2. Р. 94–102.
- Ахияров Б., Рахимов Р., Кутлуев А.* (Akhiyarov et al.) Применение препарата Бисол 2 на огурцах // Овощеводство и тепличное хозяйство. 2017. № 2 (150). С. 40–45.
- Ахмеджанов И.Г., Гуссаковский Е.Е., Авазходжаев М.Х. и др.* (Akhmedzhanov et al.) Способ повышения устойчивости хлопчатника к поражению возбудителем вертициллезного вилта. Авт. свид. СССР. № 1782387, 1992.
- Ахмеджанов И.Г., Гуссаковский Е.Е., Авазходжаев М.Х. и др.* (Akhmedzhanov et al.) Регуляция фитоалексинаобразования в тканях хлопчатника при облучении семян красным светом // Узб. биол. журн. 1993. № 1. С. 3–5.
- Ахмеджанов И.Г., Агишев В.С., Джолдасова К.Б. и др.* (Akhmedzhanov et al.) Применение портативного флуориметра для исследования влияния водного дефицита на характеристики замедленной флуоресценции листьев хлопчатника // Докл. АН РУз. 2013 № 3. С. 58–60.
- Ахмеджанов И.Г., Тонких А.К., Хотамов М.М. и др.* (Akhmedzhanov et al.) Способ предпосевной обработки семян хлопчатника. Патент на изобретение № IAP 05970 Агентство по интеллектуальной собственности РУз (приоритет от 24.05.2017 г., рег. № IAP 20170197).
- Белан С.Р.* (Belan) Новые пестициды: Справочник. Москва: ИД Грааль, 2001. 196 с.
- Белов М.Л., Булю О.А., Федотов Ю.В. и др.* (Belov et al.) Лазерный метод контроля состояния растений // Вестник

- МГТУ им. Н.Э. Баумана. Сер. Приборостроение. 2015. № 2. С. 71–82.
- Битарашвили С.В., Бондаренко В.С., Гераськин С.А.* (Bitarashvili et al.) Экспрессия генов биосинтеза и катаболизма гиббереллинов в зародышах семян ячменя, подвергшихся воздействию γ -излучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. № 3. С. 286–292.
- Веселовский В.А., Веселова Т.В.* (Veselovskiy, Veselova) Люминесценция растений. Теоретические и практические аспекты. М.: Наука, 1990. 176 с.
- Войцеховская О.В.* (Voytsekhovskaya) Фитохромы и другие (фото)рецепторы информации у растений // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 3. С. 163–177.
- Волотовский И.Д.* (Volotovskiy) Фитохром — регуляторный фоторецептор растений. Москва: Наука, 1992. 168 с.
- Дагужиева З.Ш.* (Daguzhieva) Лекции по фитопатологии. Учебное пособие для аспирантов сельскохозяйственного направления. Майкоп: изд-во МГТУ, 2015. 76 с.
- Доспехов Б.А.* (Dospikhov) Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
- Дьяков Ю.Т., Озерцовская О.Л., Джавахия В.Г. и др.* (Dyakov et al.) Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общество фитопатологов, 2001. 302 с.
- Журбицкий З.И.* (Zhurbitskiy) Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука, 1968. 268 с.
- Кодиров А.К.* (Kodirov) Изучение и разработка технологии применения иммуно- и ростстимулятора Ростбисол на хлопчатнике в условиях Бухарской области. Дисс. ... канд. биол. наук. Ташкент, 2009. 133 с.
- Корнеев Д.Ю.* (Korneev) Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев: Альтерпрес, 2002. 188 с.
- Кузнецов Е.Д., Сечняк Л.К., Киндрук Н.А. и др.* (Kuznetsov et al.) Роль фитохрома в растениях. Москва: Агропромиздат, 1986. 285 с.
- Кулаева О.Н.* (Kulaeva) Как свет регулирует жизнь растений // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. № 4. С. 6–12.
- Мавланова С.А.* (Mavlanova) Физиолого-биохимические особенности индуцированной устойчивости хлопчатника к сосущим насекомым-вредителям и возбудителю вертициллезного вилта. Дисс. ... канд. биол. наук. Ташкент, 2012. 132 с.
- Малиновский В.И.* (Malinovskiy) Физиология растений. Учеб. пособие. Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2004. 94 с.
- Маторин Д.Н., Тимофеев Н.П., Глинушкин А.П. и др.* (Matorin et al.) Исследование влияния грибковой инфекции *Bipolaris sorokopiana* на световые реакции фотосинтеза пшеницы с использованием флуоресцентного метода // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2018. Т. 73 (4). С. 247–253.
- Наджимова Х.К.* (Nadzhimova) Влияние красного света на ауксинзависимые процессы в растениях. Дисс. ... канд. биол. наук. Ташкент, 2007. 119 с.
- Нелюбина Ж.С., Касаткина Н.И.* (Nelyubina, Kasatkina) Влияние ультрафиолетового облучения семян многолетних трав на их посевные качества // Аграрная наука. 2021. № 9. С. 97–100.
- Ненахова Е.В., Николаева Л.А.* (Nenakhova, Nikolaeva) Ультрафиолетовое излучение. Влияние ультрафиолетового излучения на организм человека. Иркутск: ИГМУ, 2020. 58 с.
- Першакова Т.В., Купин Г.А., Михайлюта Л.В. и др.* (Perzhakova et al.) Исследование влияния электромагнитного поля на изменение микробиальной обсемененности растительного сырья в процессе хранения // Успехи современного естествознания. 2016. № 5. С. 74–78.
- Романов В.А., Галелюка И.Б., Сахаран Е.В.* (Romanov et al.) Портативный флуориметр и особенности его применения // Сенсорная электроника и микроскопические технологии. 2010. Т. 1 (7). С. 146–152.
- Савина О.В., Ильичев Л.Ф.* (Savina, Ilyichev) Использование красного света для активации прорастания семян томата с истекшим сроком годности // Вестник Рязанского государственного агротехнического университета. 2021. Т. 13. № 4. С. 104–111.
- Савина О.В., Руделев С.А., Родионова А.Е.* (Savina et al.) Стимулирование прорастания семян зерновых некогерентным красным светом: теория и практика // Вестник ФГБОУ ВПО РГАТУ. 2015. № 1 (25). С. 60–65.
- Саяпина Д.Г., Сивоконь В.Е., Лимаренко Н.В.* (Sayapina et al.) Исследование влияния ультрафиолетового диапазона излучения на состояние кожных покровов человека // Молодой исследователь Дона. 2022. № 3 (36). С. 144–148.
- Тонких А.К.* (Tonkikh) Механизмы действия слабых низкочастотных электромагнитных полей на живые организмы // Узб. биол. журнал. Ташкент, 2010. Спецвыпуск. С. 93–99.
- Шакирова Ф.М.* (Shakirova) Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.

Сравнительное исследование эффективности индукторов устойчивости хлопчатника к вертициллезному вилту

И. Г. Ахмеджанов^{a, #}, М. М. Хотамов^{b, ##}, П. Г. Мерзляк^{a, ###}

^a Институт биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

^b Институт генетики и экспериментальной биологии растений АН РУз, 111208 Верхний Юз, Узбекистан

[#] e-mail: iskakhm@mail.ru

^{##} e-mail: mansurhatamov@mail.ru

^{###} e-mail: galores@list.ru

Исследовано влияние предпосевной обработки семян иммуностимулятором Бисол-2, красным светом и электромагнитным полем низкой частоты на содержание фунгитоксичных веществ фенольной природы — фитоалексинов (изогемигоссиопола и госсипол-эквивалента) в инфицированных возбудителем вертициллезного вилта этиолированных проростках хлопчатника сорта С-4727. Установлено, что фотостимуляция семян красным светом индуцирует фитоалексинообразование в инфицированных патогеном тканях хлопчатника в 1.5–2 раза эффективнее по сравнению с препаратом Бисол-2 или индуктором электромагнитной природы. Выявлена корреляция между содержанием фитоалексинов в тканях проростков, параметрами индукционных кривых флуоресценции хлорофилла и количеством растений с признаками вилтового поражения, выращенных из обработанных и необработанных индукторами семян. Это указывает на возможность использования красного света и слабых низкочастотных электромагнитных полей в качестве факторов, способствующих интенсификации процесса фитоалексинообразования в ответ на заражение хлопчатника вертициллезным вилтом.

Keywords: вертициллезный вилт, красный свет, фитоалексины, фитохром, флуоресценция хлорофилла, хлопчатник, электромагнитные поля низкой частоты, *Gossypium hirsutum*.

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 MAT1-1 идиоформу локуса типа спаривания, тогда как штаммы *F. temperatum* обладали альтернативными идиоформами MAT1-1 и MAT1-2. 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 (КСА) 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.

Аmplification 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

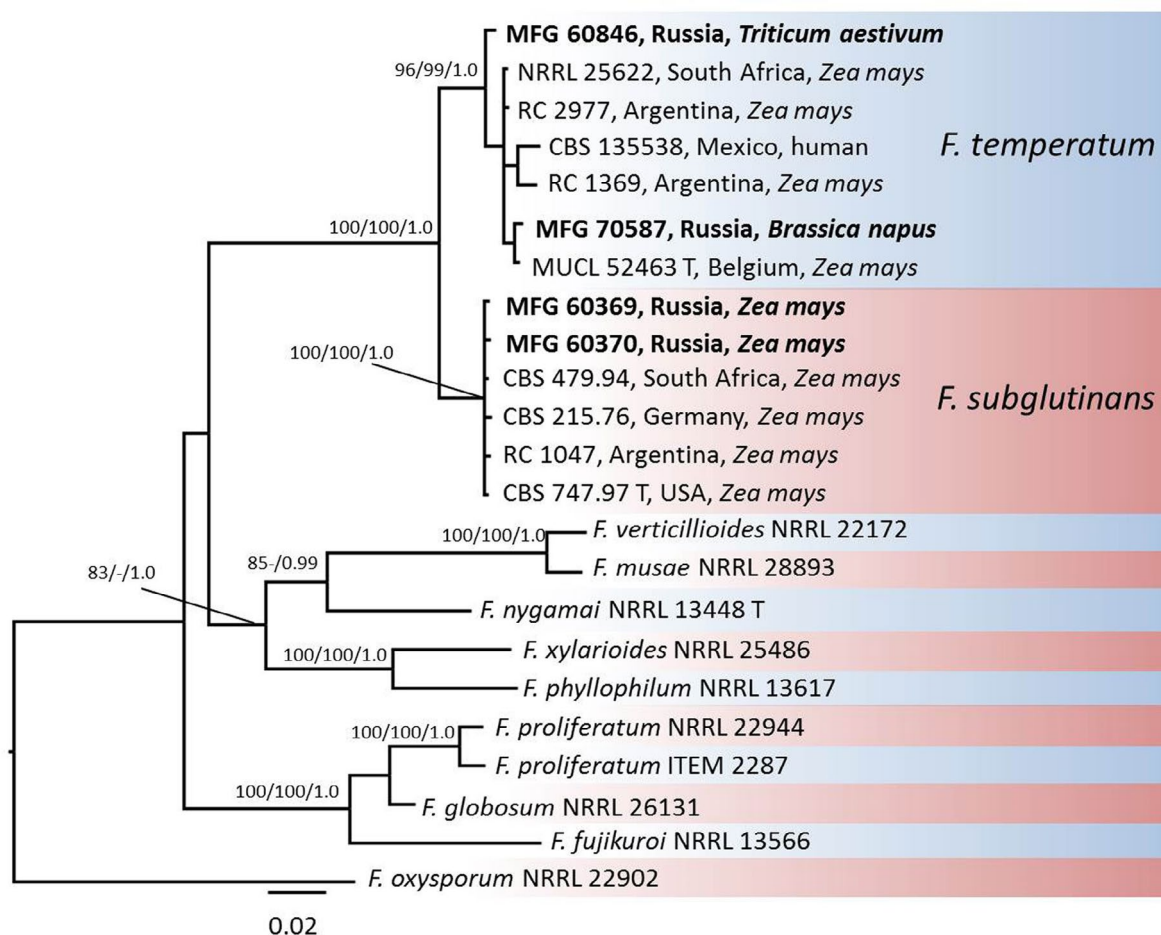


Рис. 1. Дендрограмма филогенетического сходства видов комплекса *Fusarium fujikuroi*, построенная на основе комбинированных нуклеотидных последовательностей *TEF*, *tub*, и *RPB2* фрагментов генома методом максимального правдоподобия. В узлах приведены значения бутстреп-поддержки (> 70%) при анализе 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 размерами 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

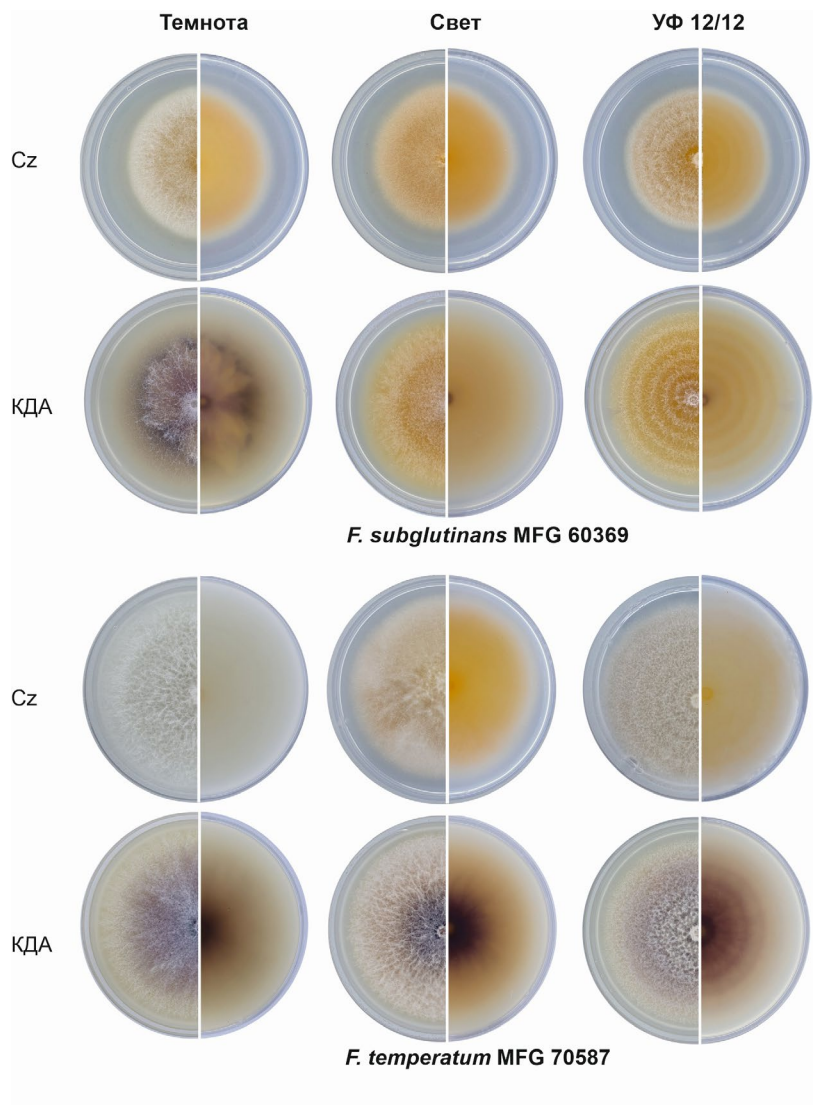


Рис. 2. Морфология культур штаммов *Fusarium temperatum* и *F. subglutinans* на седьмые сут на средах Cz и КДА при 25°C и разных режимах освещения. На каждой фотографии слева — поверхность культуры, справа — реверс.

Таблица 2. Размеры конидий штаммов *Fusarium*, культивируемых на SNA (25°C, 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

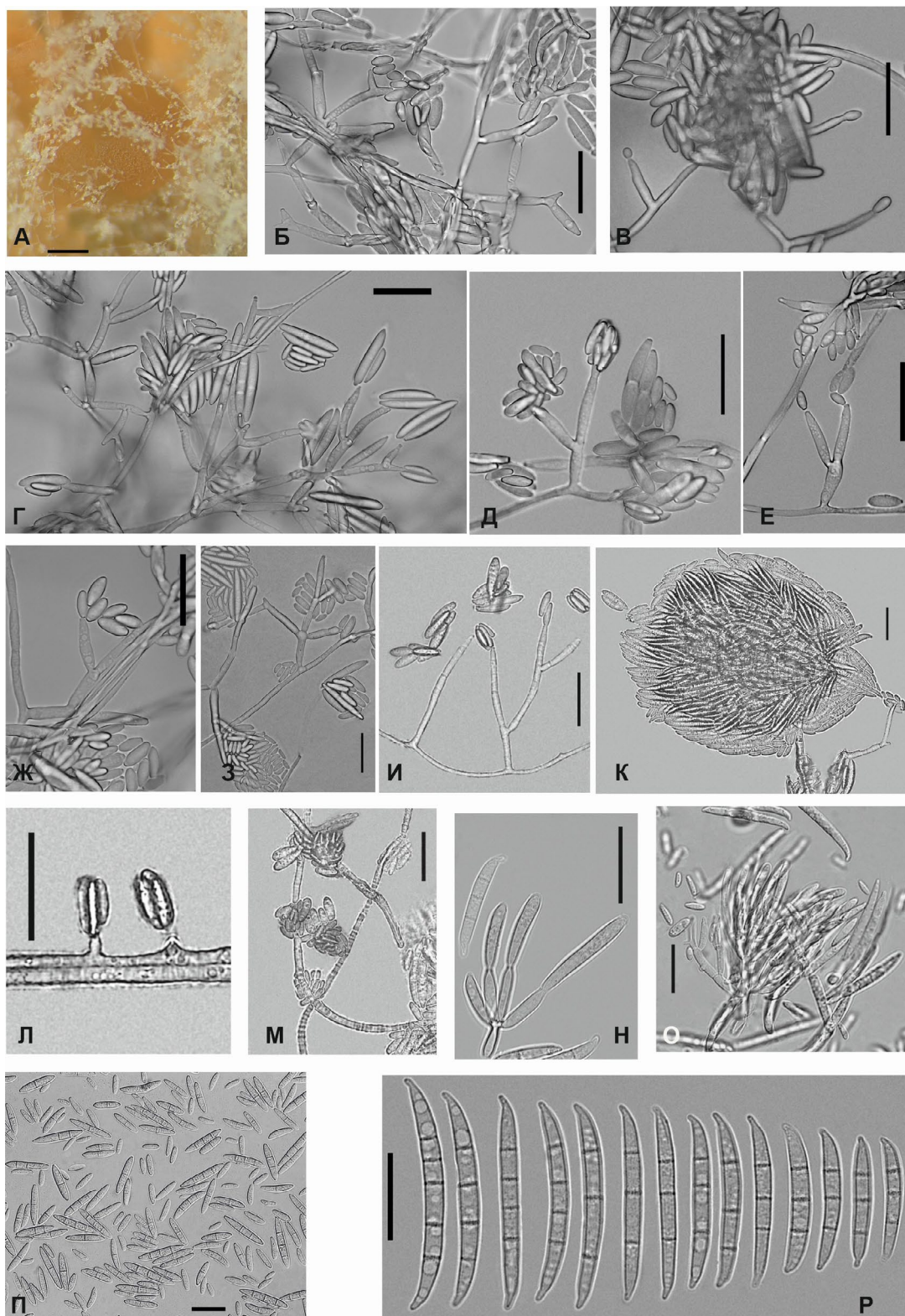


Рис. 3. Микроморфология *Fusarium temperatum*: А — фальшивые головки в воздушном мицелии над спороधिом, расположенном на поверхности агар; Б–И — конидиеносцы, фиалидные и бластические конидиогенные клетки; К — фальшивая головка; Л, М — микроконидии на фиалидных отверстиях на поверхности гифы; Н, О — 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.

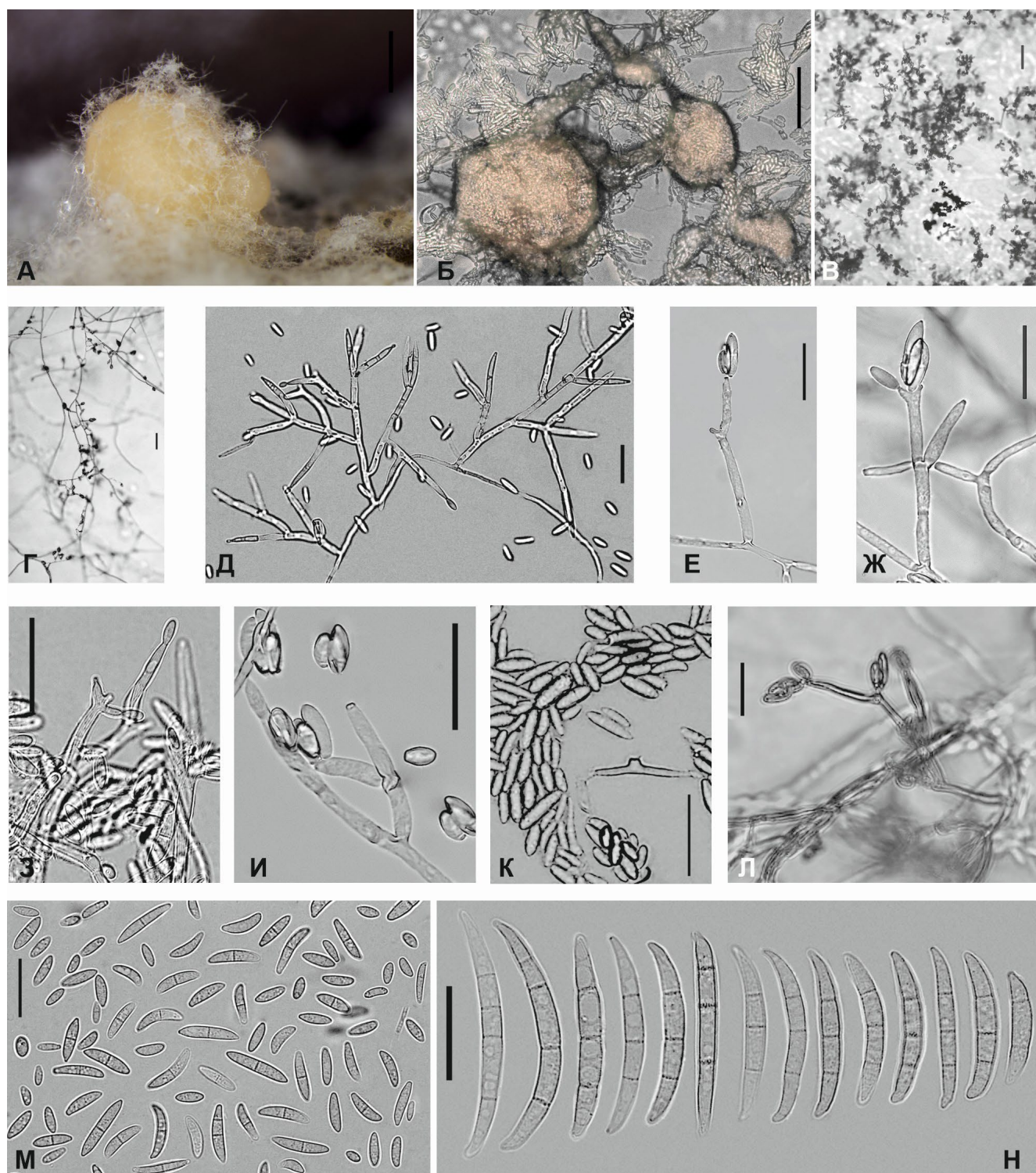


Рис. 4. Микроморфология *Fusarium subglutinans*: А — спородохий на поверхности стебля пихты; Б — спородохии на поверхности SNA; В, Г — воздушный мицелий, конидиеносцы и фальшивые головки; Д–К — конидиеносцы, фиалидные и бластические конидиогенные клетки; Л — воздушный мицелий и конидиеносцы; М — мезоконидии; 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.

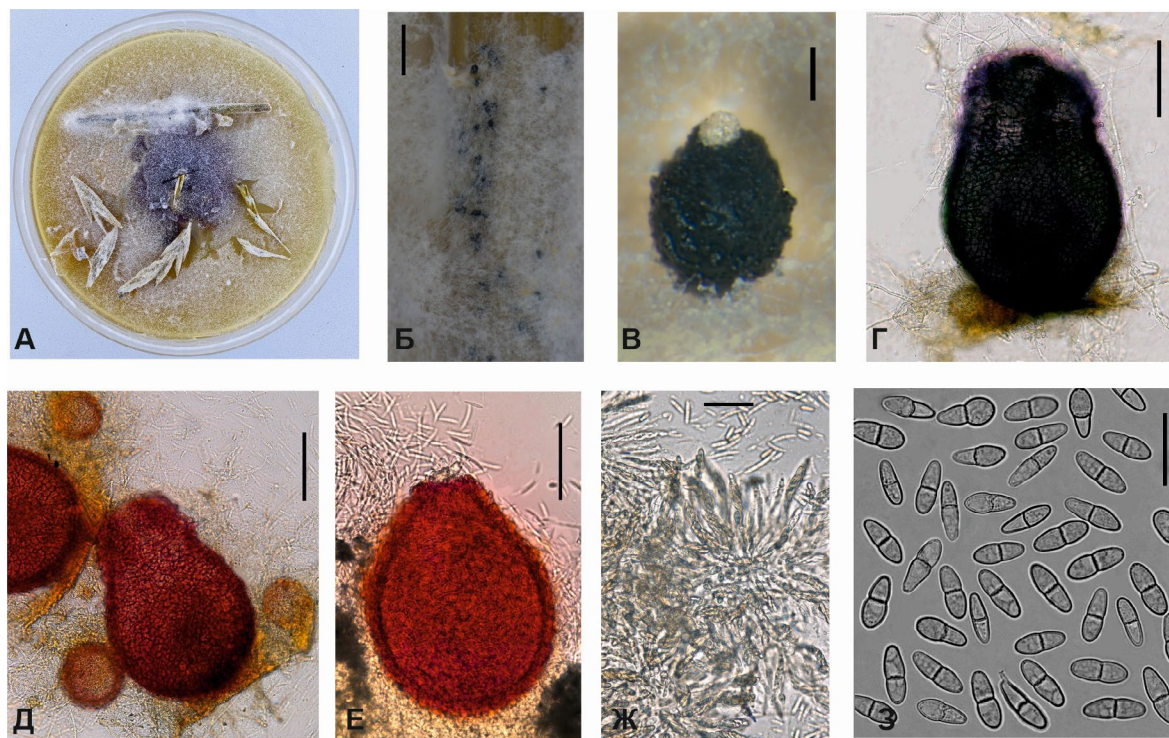


Рис. 5. Телеоморфа *Fusarium temperatum*: А, Б — формирование перитециев при скрещивании штаммов на КДА с фрагментами пырея; В, Г — фертильный перитеций; Д, Е — перитеций с измененной окраской под воздействием 90%-й молочной кислоты; Ж — высвобожденные из перитеция аски и аскоспоры; З — аскоспоры. Масштаб: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

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.084.2

ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЧАГИ (*INONOTUS OBLIQUUS*) НА ДЕРЕВЬЯХ МАЛОГО ДИАМЕТРА В ПОСТАГРОГЕННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

© 2024 г. С. Г. Парамонов^{1,*}, В. В. Перелыгин^{1,**}, М. В. Жариков^{1,***}

¹ Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет Минздрава России, 197376 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: sergei.paramonov@pharminnotech.com

**e-mail: vladimir.pereligin@pharminnotech.com

***e-mail: zharikov.mihail@pharminnotech.com

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 15.07.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

В Плюсском р-не Псковской обл. был проведен эксперимент по заражению берез возбудителем чаги *Inonotus obliquus* в постагроденном березняке 18-летнего возраста. Через 10 лет эксперимента на шести деревьях из десяти были обнаружены стерильные наросты чаги, у одного дерева обнаружено вздутие коры, а одно дерево погибло от *Phellinus nigricans*. Инфицированные деревья продолжали расти со скоростью, не отличающейся от роста остальной части леса. Стерильные наросты в основном располагались выше места инокуляции. Исследование показало, что получение сырья чаги может быть рассмотрено в качестве дополнительной формы лесопользования в условиях Нечерноземья.

Ключевые слова: береза, инокуляция, культивирование, лекарственное грибное сырье, чага.

DOI: 10.31857/S0026364824010073, **EDN:** lyqffr

Inonotus obliquus (Fr.) Pilát (*Basidiomycota*, *Hymenochaetales*) — вид, имеющий широкую известность как возбудитель чаги. В народной медицине стерильные наросты на стволах живых деревьев лиственных пород, вызванные деятельностью *I. obliquus* и именуемые чагой, используются в качестве биоактивного ингредиента (Shikov et al., 2014) и являются перспективным лекарственным сырьем (Zmitrovich et al., 2020a, 2020b). Чага была включена в Государственную фармакопею СССР в начале 1960-х гг. как общеукрепляющее и профилактическое средство, рекомендованное к применению при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (State, 2018). Интерес потребителей к использованию недревесных лесных продуктов в качестве пищевых добавок продолжает расти (Vidale et al., 2015), что в некоторых странах Северной Европы, в частности в Финляндии, нашло отражение в практике т.н. многоцелевого лесопользования (концепция управления лесами с целью производства как древесных, так и недревесных продуктов) (Vanhanen et al., 2014; Verkasalo et al., 2017).

Промышленное культивирование грибов имеет давнюю историю, и в настоящее время

грибоводство представляет собой масштабную глобальную отрасль. Такие роды, как *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* и *Flammulina* составляют около 85% мирового производства грибной биомассы (Royse, 2014). Инокуляция грибным мицелием живых деревьев используется реже (Bednarz, 2013; Abrego et al., 2016), но для *I. obliquus* это единственный способ получения сырья, поскольку чага образуется только на живых деревьях (Blanchette, 1982; Piętko, Grzywacz, 2006; Park et al., 2010; Vanhanen et al., 2014; Silvan, Sarjala, 2017).

Ранее в исследованиях по культивированию *I. obliquus* сообщалось о неудачном опыте искусственного заражения дерева, связанном с конкуренцией мицелиев (Piętko, Grzywacz, 2006), а также удавшихся опытов по инокуляции древесины мицелием гриба (Silvan, Sarjala, 2017).

Согласно данным Сельскохозяйственной переписи 2016 г., в Российской Федерации насчитывается 12% заброшенных сельскохозяйственных земель, а в Северо-Западном Федеральном округе эта проблема особенно актуальна, поскольку 33% сельскохозяйственных земель региона являются заброшенными. В этой связи опыт финских

коллег в области “многоцелевого лесопользования” и, в частности, получения сырья чаги с древостоев, развивающихся в постагрогенных сообществах, может быть востребован в отечественном лесоводстве.

Цель данного исследования заключалась в изучении возможности заражения грибом *I. obliquus* молодых березовых древостоев на 10 модельных деревьях 18-летнего возраста. Аналогичные эксперименты, проведенные в Финляндии на более широком объеме деревьев различных возрастов и диаметров, показали положительные результаты уже через 4–5 лет (Miina et al., 2021). Наши наблюдения продолжались 10 лет.

Исследование было проведено на участке с кадастровым номером 60: 16: 061401: 21, расположенном в Плюсском р-не Псковской обл. В северной части участка выделен лесной фрагмент с формулой древостоя 10Б + С + Ив, полнота 0.7. Почва в этом месте характеризуется песчаной и рыхлой структурой, а пахотный горизонт имеет толщину около 20 см. До 1995 г. данный участок использовался для выращивания картофеля. На момент начала эксперимента возраст древостоя составлял 18 лет. Высота древостоя ~20 м. Материал для инокуляции (кубические кусочки древесины, инфицированной *I. obliquus*) собран на территории, прилегающей к объекту лесного фонда в 203 кв. Житковицкого л-ва. В июле 2013 г. была произведена инокуляция 10 деревьев березы (*Betula pubescens*) диаметром 12 см путем надрубания топором на высоте 160–170 см и помещения около 10 г светлой части мицелия в расщеп. Процесс искусственного инфицирования проводили вдоль границы выделенного

участка, начиная с опушки и продвигаясь в глубь древостоя с востока на запад.

В 2023 г. живые и инокулированные березы были подвергнуты перебору. Для сортировки использовали два признака: наличие вздутия ствола и видимые наросты. Березы с вздутием ствола (рис. 1) или видимыми наростами (рис. 2) рассматривали в качестве успешно инокулированных.

Большинство (семь из десяти) зараженных деревьев проявляли признаки прогрессирующего поражения *I. obliquus* (желваки на коре, растрескивание коры с выделением бурого экссудата, появление наростов чаги) (табл. 1). Наросты чаги появились преимущественно над местом инокуляции (на дереве № 7 часть стерильных наростов появилась ниже места инокуляции), с восточной (а также северо-восточной или юго-восточной) сторон. Одно из деревьев отмерло, а на сломанном стволе было обнаружено плодовое тело *Phellinus nigricans*. Остальные деревья продолжали расти со скоростью, не отличающейся от скорости роста насаждения.

Некоторые деревья, помимо видимого поражения *Inonotus obliquus*, как оказалось, были естественным образом инфицированы ложным трутовиком (*Phellinus nigricans*) (рис. 3). Интересно отметить, что береза, ствол которой несет наибольшее количество наростов чаги, также поражена *Ph. nigricans*.

Помимо симптомов, наблюдавшихся на экспериментальной площадке, отек и экссудация также отмечены на не заражавшихся специально деревьях в непосредственной близости от площадки.

Таблица 1. Результаты эксперимента по заражению *Inonotus obliquus* 10 модельных деревьев березы

№ дерева	Диаметр дерева на высоте груди, см (2013/2023 гг.)	Размеры стерильных наростов, см	Высота расположения стерильных наростов, см	Дополнительно
1	12/14	6 × 4	180	вздутие коры
2	12/16	6 × 8	170	
3	12/14	6 × 6	350	
4	12/14	—	—	
5	12/17	20 × 8	180	<i>Phellinus nigricans</i>
6	12/17	8 × 10	240	
7	12/17	8 × 10; 8 × 10; 4 × 4; 4 × 4; 5 × 4	170	
8	12/12	—	—	
9	12/14	—	—	сухостой, <i>Ph. nigricans</i>
10	12/14	—	—	



Рис. 1. Вздутие ствола березы с вскрывающейся корой и истекающим экссудатом чаги.



Рис. 3. Дерево, пораженное *Inonotus obliquus* и *Phellinus nigricans*.



Рис. 2. Видимые стерильные наросты чаги.

Возможно, речь идет о вторичном естественном заражении *Inonotus obliquus* от ранее искусственно зараженных деревьев.

Инокуляция *I. obliquus* берез небольшого диаметра (12 см) на ранней стадии формирования древостоя привела к инфицированию грибом 70% растений, что вполне проявилось в течение 10 лет наблюдений. Отметим, что в естественных условиях поражение древостоев этим патогеном происходит на более поздних стадиях — преимущественно начиная с 40-летнего возраста (Chertov et al., 2011; Kuzmichev, 2013). Согласно таблицам хода роста нормальных березовых насаждений (по Н.Я. Саликову) исследуемый период роста березового насаждения соответствует с 20 до 30 лет с изреживанием с 2065 до 1120 стволов на гектар, при 1а классе бонитета (Goroshev, 1980). Наш эксперимент закончился по достижении деревьями 28-летнего возраста, но по достижении 40-летнего возраста многие из привитых деревьев могут погибнуть, что является решающим фактором при расчете продуктивности *I. obliquus*. Однако в целом можно констатировать, что искусственное заражение поствагеновых березняков Нечерноземья возбудителем чаги может быть успешным и рентабельным с ресурсоэкономической точки зрения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abrego N., Oivanen P., Viner I. et al. Reintroduction of threatened fungal species via inoculation. *Biol. Conserv.* 2016. V. 203. P. 120–124.
- Bednarz J.C., Huss M.J., Benson T.J. et al. The efficacy of fungal inoculation of live trees to create wood decay and wildlife-use trees in managed forests of western Washington, USA. *Forest Ecol. Manag.* 2013. V. 307. P. 186–195.
- Blanchette R.A. Progressive stages of discoloration and decay associated with the canker-rot fungus, *Inonotus obliquus*, in birch. *Phytopathology.* 1982. V. 72 (10). P. 1272–1277.
- Chertov O.G., Gryazkin A.V., Komarov A.S. et al. Dynamic modeling in forestry. SPb., 2011 (in Russ.).
- Goroshev B.I., Sinitsyn S.G., Moroz P.I. et al. Forest taxation guidebook. 2nd ed. Moscow, 1980 (in Russ.).
- Kantemirova D. Ch., Bazaev A.B., Gryazkin A.V. et al. Strategy for the use of abandoned agricultural lands. In: Current problems of ecology and conservation of biodiversity. Vladikavkaz, 2008, pp. 219–222 (in Russ.).
- Kuzmichev V.V. Patterns of forest stand dynamics: principles and models. Nauka, Novosibirsk, 2013 (in Russ.).
- Miina J., Peltola R., Veteli P. et al. Inoculation success of *Inonotus obliquus* in living birch (*Betula* spp.). *Forest Ecol. Manag.* 2021. V. 492. e119244. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119244>
- Park H., Ka K.-H., Lee B.-H. et al. Fruit-body production in *Inonotus obliquus* on living *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Korean J. Mycol.* 2010. V. 38. P. 83–84.
- Piętka J., Grzywacz A. Attempts at active protection of *Inonotus obliquus* by inoculating birches with its mycelium. *Acta Mycologica.* 2006. V. 41. P. 305–312.
- Pilz D. Chaga and other fungal resources: Assessment of sustainable commercial harvesting in Khabarovsk and Primorsky Krai, Russia. In: Report prepared for Winrock International, Morrilton, Arkansas and the Forest Project. Khabarovsk, 2004, pp. 1–54.
- Royse D.J. A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* and *Flammulina*. In: Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. New Deli, 2014, pp. 1–6.
- Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G. et al. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia, their history and applications. *J. Ethnopharmacol.* 2014. V. 154 (3). P. 481–536. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.007>
- Silvan N., Sarjala T. Cultivation and antioxidative properties of pakuri (*Inonotus obliquus*) on low-productive peatland forests. In: R. Peltola (ed.). Conference on non-timber forest products and bioeconomy. Rovaniemi, 2017, pp. 1–63.
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation of the XIV edition was approved by order of the Ministry of Health of Russia dated October 31, 2018 N749 “On the approval of general pharmacopoeial monographs and pharmacopoeial monographs and the recognition as invalid of some orders of the Ministry of Health and Medical Industry of Russia, the Ministry of Health and Social Development of Russia and the Ministry of Health of Russia”. Moscow, 2018 (in Russ.).
- Vanhanen H., Peltola R., Ahtikoski A. et al. Cultivation of Pakuri (*Inonotus obliquus*) — potential for new income source for forest owners. In: 10th International Mycological Congress. Bangkok, 2014, p. 418.
- Verkasalo E., Heräjärvi H., Möttönen V. et al. Current and future products as the basis for value chains of birch in Finland. In: V. Möttönen, E. Heinonen (eds). Proceedings of the 6th International Scientific Conference on Hardwood Processing. Helsinki, 2017, pp. 81–96.
- Vidale E., Da Re R., Lovric M. et al. International trade of the NWFP: Any opportunity for the Italian forest sector? In: O. Ciancio, (ed.). Proceedings of the Second International Congress of Silviculture, Designing the Future of the Forestry Sector, Florence, 2015, pp. 734–753.
- Zmitrovich I.V., Denisova N.P., Balandaykin M.E. et al. Chaga and its bioactive complexes: history and prospects. *Pharmacy Formulas.* 2020a. V. 2 (2). P. 84–93 (in Russ.). <https://doi.org/10.17816/phf34803>
- Zmitrovich I.V., Vlasenko V.A., Perelygin V.V. et al. Prevention and treatment of cancer using raw materials of “medicinal mushrooms”: criticism, facts, promising problems. *Pharmacy Formulas.* 2020b. V. 2 (4). P. 118–127 (in Russ.). <https://doi.org/10.17816/phf55224>
- Горошев Б.И., Синицын С.Г., Мороз П.И. и др. (Goroshev et al.) Лесотаксационный справочник. 2-е изд. М.: 1980. 288 с.
- Государственная фармакопея Российской Федерации (The State) XIV изд-е, утв. приказом Минздрава России от 31 октября 2018 г. № 749 “Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и признании утратившими силу некоторых приказов Минздравмедпрома России, Минздравсоцразвития России и Минздрава России”, действует с 01.12.2018. М., 2018.
- Змитрович И.В., Власенко В.А., Перельгин В.В. и др. (Zmitrovich et al.) Профилактика и лечение рака с использованием сырья “лекарственных грибов”: критика, факты, перспективные проблемы // *Формулы Фармации.* 2020. Т. 2. № 4. С. 118–127.
- Змитрович И.В., Денисова Н.П., Баландайкин М.Э. и др. (Zmitrovich et al.) Чага и ее биоактивные комплексы: история и перспективы // *Формулы Фармации.* 2020. Т. 2. № 2. С. 84–93.
- Кантемирова Д.Ч., Базеев А.Б., Грязькин А.В. и др. (Kantemirova et al.) Стратегия использования заброшенных земель сельскохозяйственного назначения // *Актуальные проблемы экологии: сб.*

- статей Всероссийской научной конференции. Владикавказ: СОИГСИ, 2008. С. 219–222.
- Кузьмичев В.В. (Kuzmichev) Закономерности динамики древостоев: принципы и модели. Новосибирск: Наука, 2013. 208 с.
- Чертов О.Г., Грязькин А.В., Комаров А.С. и др. (Chertov et al.) Динамическое моделирование в лесном хозяйстве. СПб.: Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова, 2011. 64 с.

Experimental infection of small-diameter trees with chaga (*Inonotus obliquus*) in a postagrogenous birch forest

S.G. Paramonov^{a,#}, V.V. Perelygin^{a,##}, and M.V. Zharikov^{a,###}

^a St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Russia,
St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: sergei.paramonov@pharminnotech.com

^{##}e-mail: vladimir.pereligin@pharminnotech.com

^{###}e-mail: zharikov.mihail@pharminnotech.com

In Plyussky district of the Pskov region, an experiment was carried out to infect birch trees with the Chaga pathogen *Inonotus obliquus* in an 18-year-old postagrogenic birch forest. After 10 years of the experiment, sterile bodies of Chaga were found on six out of ten trees, swelling of the bark was found in one tree, and one tree died from *Phellinus nigricans*. Infected trees continued to grow at a rate no different from the rest of the forest. Sterile growths were mainly located above the inoculation site. The study showed that the production of Chaga raw materials can be considered as an additional form of forest management in the Non-Black Earth Region of Russia.

Keywords: birch, Chaga, cultivation, inoculation, medicinal mushroom raw materials.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 582.284 (470 + 571)

СИСТЕМАТИКА КОМПЛЕКСНОГО ВИДА *TYPHULA ISHIKARIENSIS* В РОССИИ

© 2024 г. О. Б. Ткаченко^{1,*}, Т. Хошино^{2,3,**}, Н. Мацумото^{4,***}

¹ Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, Россия

² НИИ биопродукции, Национальный институт достижений промышленности и технологий, Каннопо, Япония

³ Технологический институт Хачинохе, Аомори, Япония

⁴ Национальной организации сельскохозяйственных и пищевых исследований, Цукуба, Япония

*e-mail: ol-bor-tkach@yandex.ru

**e-mail: t-hoshino@hi-tech.ac.jp

***e-mail: nowmat@a011.broada.jp

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 15.11.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г..

Цель настоящей публикации — показать историю таксономии комплекса *Typhula ishikariensis* и дать более подробные описания распространения этих грибов в России. Отмечены три подхода для выделения видов этого комплекса: морфологический, репродуктивный (скрещивание изолятов) и молекулярно-генетический. Часто виды, описанные на разных растениях-хозяевах, признавались синонимами других ранее описанных видов, например, *Typhula humulina*, выделенный из корневищ хмеля, и *T. graminearum* из однолетних проростков *Pinus sylvestris* и злаковых сорняков были синонимами *T. idahoensis*. По последним данным комплекс включает четыре таксона (три вида и один вариант), на основании молекулярной филогении, результатов скрещивания, морфологических и физиологических признаков: *Typhula ishikariensis* var. *ishikariensis*, *T. ishikariensis* var. *idahoensis*, *T. hyperborea* и *T. canadensis*. *T. ishikariensis* var. *idahoensis* был обнаружен только в Сев. Америке, а последние два вида (*T. hyperborea* и *T. canadensis*) преимущественно в р-нах с экстремальными зимними условиями. В России *T. ishikariensis* var. *ishikariensis* отмечен в европейской части России за Полярным кругом: Апатиты (Кольский п-ов), в местах с умеренным климатом: Москва, Санкт-Петербург, республики Чувашия и Марий Эл, а также в Азии в р-нах с более суровым климатом: Свердловская обл., Новосибирск, Иркутская обл. (Хамар-Дабан) и Сахалин. *T. canadensis* и, предположительно, анцестральный таксон *T. hyperborea* обитают преимущественно в р-нах с неустойчивым и суровым зимним климатом. *T. canadensis* в России отмечен нами в Азии в Прибайкалье в рефугиуме ледникового периода на Хамар-Дабане, Камчатке и Сахалине, а *T. hyperborea* в Азии в Свердловской обл., Новосибирске, на Камчатке и Чукотке (Анадырь), в европейских р-нах России с умеренным климатом в поволжских республиках Марий Эл и Татарстане. Для этих территорий характерны частые осенние заморозки, что способствовало конкуренции с другим возбудителем снежной плесени — некротрофом *Sclerotinia borealis*. Подземное повреждение тканей растений, таких как донце и корни луковиц тюльпанов и корневищ хмеля, грибом *Typhula ishikariensis* var. *ishikariensis* встречается только в России. Возможно, разнообразие в зимнем климате сформировало и сохранило разнообразные таксоны, в том числе и предковые формы. Очевидно, в результате таких климатических колебаний эволюционировали организмы, способные к выживанию в нестабильных стрессовых условиях.

Ключевые слова: грибы-психрофилы, комплексный вид, систематика, снежная плесень, стресс.

DOI: 10.31857/S0026364824010087, **EDN:** lxxnvd

Цель данной публикации — показать историю комплексного вида *Typhula ishikariensis* и более подробные данные о распространении в России грибов этого комплекса.

Таксономия грибов снежной плесени *Typhula ishikariensis* и родственных таксонов вызывала споры до тех пор, пока Хошино с соавторами (Hoshino et al., 2022) не выделили в комплексе таксонов три биологических вида, т.е. *T. ishikariensis*, *T. canadensis*

и *T. hyperborea*. Первым описал гриб, найденный на поле в провинции Ишикари (о. Хокайдо, Япония) на мертвых злаковых растениях Имаи, назвав его *T. ishikariensis* Imai (Imai, 1930). В штате Айдахо, США, Ремсберг описала на многолетних злаках *T. idahoensis* Remsberg (Remsberg, 1940), а Экстранд на севере Швеции на многолетних травах отметил два вида: *T. borealis* Ekstr. (Ekstrand, 1934) и *T. hyperborea* (Ekstrand, 1955). Бриэль и Канфер

(Bruehl, Cunfer, 1975) на Тихоокеанском северо-западе США выявили *T. ishkariensis* и *T. idahoensis* на основании морфологических признаков (таких как фертильные головки плодовых тел, форма клеток оболочки склероциев и ряд других).

В СССР В.В. Гуляевым был описан гриб *T. graminearum* Gulyaev nom. inval., обнаруженный в питомнике Татарской лесной опытной станции на саженцах сосны первого года и сорняках: мятлике луговом (*Poa pratensis* L.), незабудке средней (*Myosotis intermedia* Link.) и звездчатке злаковой (*Stellaria graminea* L.) (Gulyaev, 1950), а А.П. Кузнецова описала вид *T. humulina* A. Kuzn. (Kuznetzova, 1953), обнаруженный на подземных стеблях хмеля (*Humuli lupuli* L.) в Чувашской и Марийской АССР, а также в Кировской, Московской и Брянской областях (рис. 1). Однако Е.Г. Потатосова при написании диссертации на соискание степени кандидата наук по грибам рода *Typhula* в СССР определила, что виды *T. graminearum* и *T. humulina* являются синонимами *T. idahoensis* (Potatosova, 1960a, 1960b). В Москве в Главном ботаническом саду АН СССР был описан *T. borealis*, поражающий корни и донце луковиц тюльпанов (Procenko, 1967).

Методы скрещивания mon × mon (между монокарионами) и di × mon (между дикарионом и монокарионным тестером) были разработаны Реедом (Røed, 1969), их применяют для определения генетических отношений между таксонами. Используя эти методы, американские ученые посчитали *T. ishkariensis* и *T. idahoensis* различными видами, хотя иногда между ними происходило скрещивание (Bruehl et al., 1975; Bruehl, Machtmes, 1980). С другой стороны, генетические данные о том, что

эти два гриба были интерфертильными, побудили Оршволла и Смита (Årsvoll, Smith, 1978) рассматривать их как конспецифические и установить три разновидности, включая третий гриб из Канады: *T. ishkariensis* var. *ishkariensis*, *T. ishkariensis* var. *idahoensis* и *T. ishkariensis* var. *canadensis*. В Японии *T. ishkariensis* был разделен на три биотипа А, В и С (Matsumoto, Tajimi, 1983); биотип А был интерстерилен с биотипами В и С (Matsumoto, Tajimi, 1990), а последние два биотипа были интерфертильны; однако они рассматривали эти три биотипа как единый биологический вид, поскольку биотип А потенциально интерфертилен с биотипами В и С через посредство чужеродных таксонов. В Норвегии Мацумото и др. (Matsumoto et al., 1996), используя монокарионные тестеры биотипов, разделили норвежские изоляты на три группы: I, II и III.

Один из авторов этой статьи сделал первую попытку объединить все изоляты *T. ishkariensis*, разделив этот комплексный вид на два вида: species I и species II, впервые опубликовав статью сначала на японском (Matsumoto, 1997) и позднее на английском языке (Matsumoto et al., 2001) (табл. 1).

В России в прошлом веке были изоляты только из Европейской части России и по одному изоляту из Украины и Латвии. Все они принадлежали *T. ishkariensis* species I (по: Matsumoto, 1997) (Tkachenko et al., 1997).

Хошино с соавт. (Hoshino et al., 2022) окончательно устраняют путаницу, используя молекулярные методы; их изоляты, собранные из разных мест, образовали единую кладу, которая была разделена на три субклады, каждый из которых представляет

Таблица 1. Первая попытка выделения групп внутри комплексного вида *Typhula ishkariensis* (по: Matsumoto, 1997)

Страна	Биологический вид I			Биологический вид II		
	Таксон	Условия	Существующий экотип	Таксон	Условия	Существующий экотип
Япония	биотип А	снежно и много осадков	группа III	биотип В	мало осадков	мелкие склероции (почвообит.)
Норвегия	группа I	много снега		группа II	ветрено и/или катящиеся осадки	пушистые склероции с обильным воздушным мицелием
Россия	var. <i>ishkariensis</i>	промерзание почвы	почвенный	var. <i>canadensis</i>	низкие температуры	
Сев. Америка	var. <i>ishkariensis</i>	плажное лето				
	var. <i>idahoensis</i>	сухое лето				

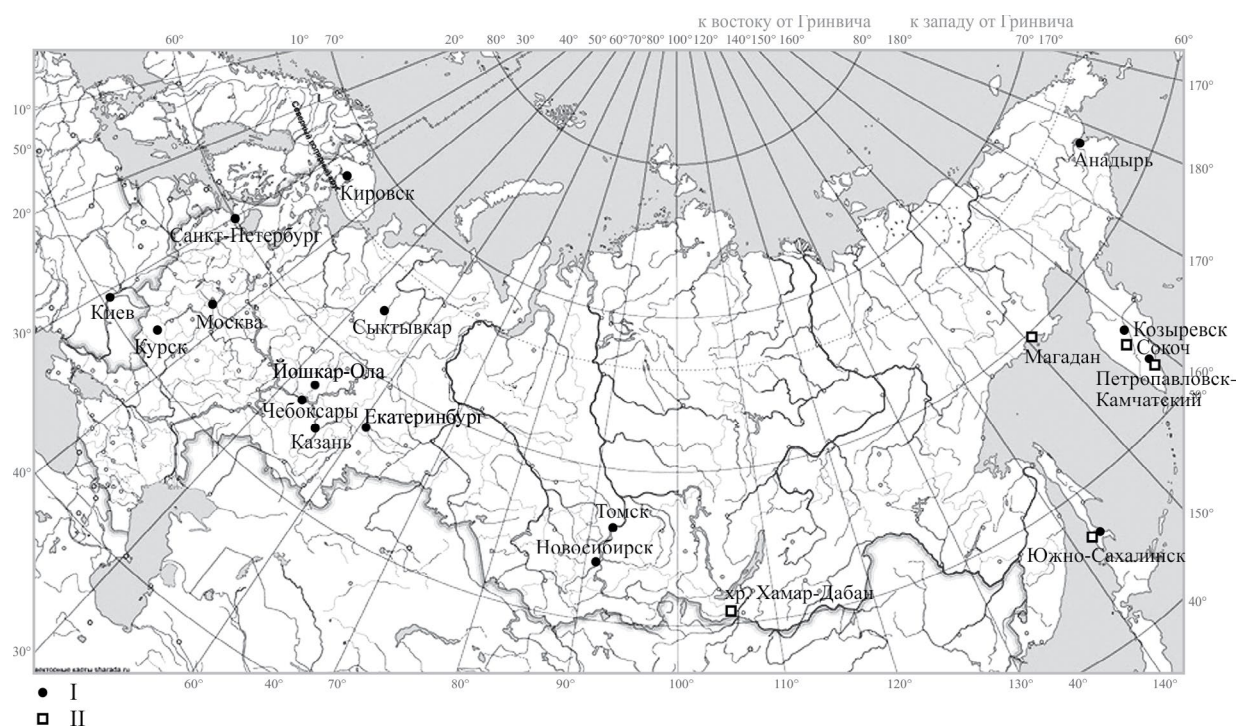


Рис. 1. Отмеченные по результатам экспедиций по России изоляты “*Typhula ishkariensis* species 1” (I) и “*T. ishkariensis* species 2” (II) (по: Matsumoto, 1997).

отдельный вид, т.е. *T. ishkariensis* var. *ishkariensis* и var. *idahoensis*, *T. canadensis* и *T. hyperborea* (табл. 2). В России отмечены *T. ishkariensis* var. *ishkariensis*, *T. canadensis*, *T. hyperborea*.

T. ishkariensis var. *ishkariensis* паразитирует на различных растениях-хозяевах и наиболее широко распространен в европейской части России, Урале, Зап. и Вост. Сибири и на Сахалине. Гриб отмечен на многолетних травах на северо-западе европейской части России (Апатиты, Кольский п-ов), Свердловской обл., Чувашии, Новосибирской, Иркутской областях, на многолетних травах на Сахалине, на озимой пшенице в Санкт-Петербурге и Москве, на подземных корневищах хмеля (*Humulus lupulus* L.) и звездчатке средней [*Stellaria media* (L.) Vill.] в Республике Чувашия, на пырее и очитке (*Sedum* sp.) в Республике Марий Эл, на многолетних злаковых травах и на сеянцах сосны (*Pinus sylvestris* L.) первого года в Свердловской обл. *T. ishkariensis* var. *ishkariensis* распространен не только в местах с относительно мягким зимним климатом, но и в местностях с экстремально холодной зимой, где преимущественно преобладают *T. canadensis* и *T. hyperborea*. *T. canadensis* отмечен как на Сахалине и Камчатке с суровыми зимними условиями, так и в рефугиуме ледникового периода Хамар-Дабан Иркутской обл. у оз. Байкал.

T. hyperborea встречается в Республике Коми, Свердловской обл., Ямало-Ненецком автономном округе¹, Новосибирске, на Камчатке и Чукотке, а также в европейской части России, наряду с широко распространенным *T. ishkariensis* var. *ishkariensis*, в Среднем Поволжье: Татарстан и Марий Эл (табл. 3).

T. canadensis отмечен как на Сахалине и Камчатке с суровыми зимними условиями, так и у подножия Хамар-Дабана в Иркутской обл. у оз. Байкал.

Считается, что разнообразие в р-нах с экстремальными зимними условиями способствует эволюции таксонов и сохранению предковой формы. Очевидно, такой механизм необходим организмам для выживания в нестабильных, стрессовых условиях, особенно при изменении климата. В качестве приспособления к низким температурам в России гриб стал поражать подземные части растений, например, донце луковиц и корни тюльпанов (Protsenko, 1967) и корневища хмеля (Kuznetzova, 1953), не отмеченные в других странах. Причем поражение тюльпанов отмечено еще в начале прошлого века (Elenkin, 1911), и, хотя возбудитель был ошибочно идентифицирован как *Sclerotium tuliparum* Kleb., иллюстрации и описание

¹ Изолят *T. hyperborea* был впервые обнаружен в Ямало-Ненецкой АО и не включен в публикацию Hoshino et al. (2022).

Таблица 2. Краткое описание особенностей видов комплекса *Typhula ishikariensis* (по: Hoshino et al., 2022)

Таксономические виды	Кросс-тесты	Рост мицелия на PDA		Склеротии			Базидиомы		Растения-хозяева	Распространение
		при 0°С	при 10°С	на хозяевах	цвет	размер (мм)	каулоцистиды (мкм)	размер спор (мкм)		
<i>Typhula ishikariensis</i> var. <i>ishikariensis</i>	A+, B–	скудный воздушный мицелий	нормальный	легко отделяется	от светлого до темно-коричневого	0.5–2	короткие (>50)	2.5–5.0 × 7.5–12.3	одно- и двухдольные, хвойные	Сев. полушарие
<i>T. ishikariensis</i> var. <i>idahoensis</i>	A–, B+	скудный воздушный мицелий	нормальный	часто субэпидермальные	от светлого-коричневого до почти черного	0.5–2	смесь коротких (>50) и длинных (50–120 редко)	2.5–8.0 × 6.5–13.0	почти все только одностолбчатые	Сев. Америка
<i>T. canadensis</i>	A–, B+	у некоторых обильный воздушный мицелий	нормальный	часто субэпидермальные	от светлого-коричневого до почти черного	0.2–2	длинные (50–120)	2.7–4.5 × 7.8–12.6	почти все только одностолбчатые	В Сев. полушарии от отсутствия до центральной Азии до средней Европы
<i>T. hyperborea</i>	A–, B–	обильный воздушный мицелий	Несимметричный (пероподобный)	легко отделяются	от светлого до темно-коричневого	0.5–2	короткие (>50)	3.7–7.1 × 7.6–14.8	почти все только одностолбчатые	Арктическая и боковая реальная зона Сев. Европы и России, Альпы и Сев. Америки

Таблица 3. Просеквенированные штаммы комплекса *Typhula ishkariensis* (по: Hoshino et al., 2022)

Название гриба	№ штамма	Местность	Регистрационные номера	
			ITS ¹	ML ²
<i>Typhula ishkariensis</i> var. <i>ishkariensis</i>	KP-10	Апатиты, Кольский п-в	LC192569	LC192628
	KP-13	там же	LC192851	LC192629
	KP-16	“ “	LC192570	LC192630
	SPb-2	Санкт-Петербург	LC192571	LC192625
	SPb-4	там же		LC192626
	SPb-6	“ “	LC192571	LC192625
	92-Tr-13	Москва	LC192567	LC192631
	MSC-1	там же	LC192568	LC192632
	C-2	Чувашия	LC192565	
	C-4	Чувашия	LC192566	LC192633
	C-6	там же	LC192852	LC192634
	<i>T. humulina</i>	Марий Эл	LC192564	LC192638
	Y-2	там же	LC192562	LC192638
	Y-6	“ “		LC192637
	E-2	Свердловская обл.	LC192558	LC192641
	E-5	там же	LC192854	LC192643
	<i>T. graminearum</i>	“ “	LC192560	LC192644
	N3A3	Новосибирск	LC1928554	LC192645
	N4A1	там же	LC192555	LC192646
	N4-1	“ “	LC192855	LC192647
	N4B2	“ “	LC192856	LC192648
	N5-1	“ “		LC192649
	IK1-1	Иркутская обл.		LC192651
	IK2-1	там же		LC192652
	IK3-1	“ “		LC192653
	YS1-1	Сахалин	AB194769	
	YS3-3	там же	AB127951	AB187583
	YS5-3	“ “	AB194770	
	YS8-2	“ “	AB194771	
	Y10-1	“ “	AB194772	
<i>T. canadensis</i>	IK4-3	Иркутская обл.		LC192654
	KPK2-1	там же		LC192661
	KPK3-1	“ “		LC192662
	KPK4-1	Камчатка		LC192663
	KPK5-1	там же		LC192664
	KPK11-2	“ “		LC192666
	KS1-1	“ “		LC192659
	KS1-2	“ “	LC192574	LC192660
	SD-1	Сахалин	LC192553	LC192658
	YS2-1	там же		LC192655
<i>T. hyperborea</i>	YS3-1	“ “		LC192656
	Y4-2	Марий Эл	LC192563	LC192563
	K-3	Татарстан	LC192561	LC192539
	E-1	Свердловская обл.	LC192557	LC192640
	E-3	там же	LC192853	LC192642
	E-4	“ “	LC192559	
	N6A-1	Новосибирск	LC192556	LC192650
	RPK8-2	Камчатка	LC192573	LC192665
	KK2-1	там же		LC192668
	KK8-1	“ “	LC192575	LC192669
	KE1-1	“ “		LC192667
	ANDI-1	Чукотка		LC192703

Примечание.¹ 18S рНК, ITS1, 5.8S рНК, ITS2, LSU рНК, частичная и полная последовательность;²митохондриальный ген большой субъединицы рибосомной РНК, частичная последовательность.

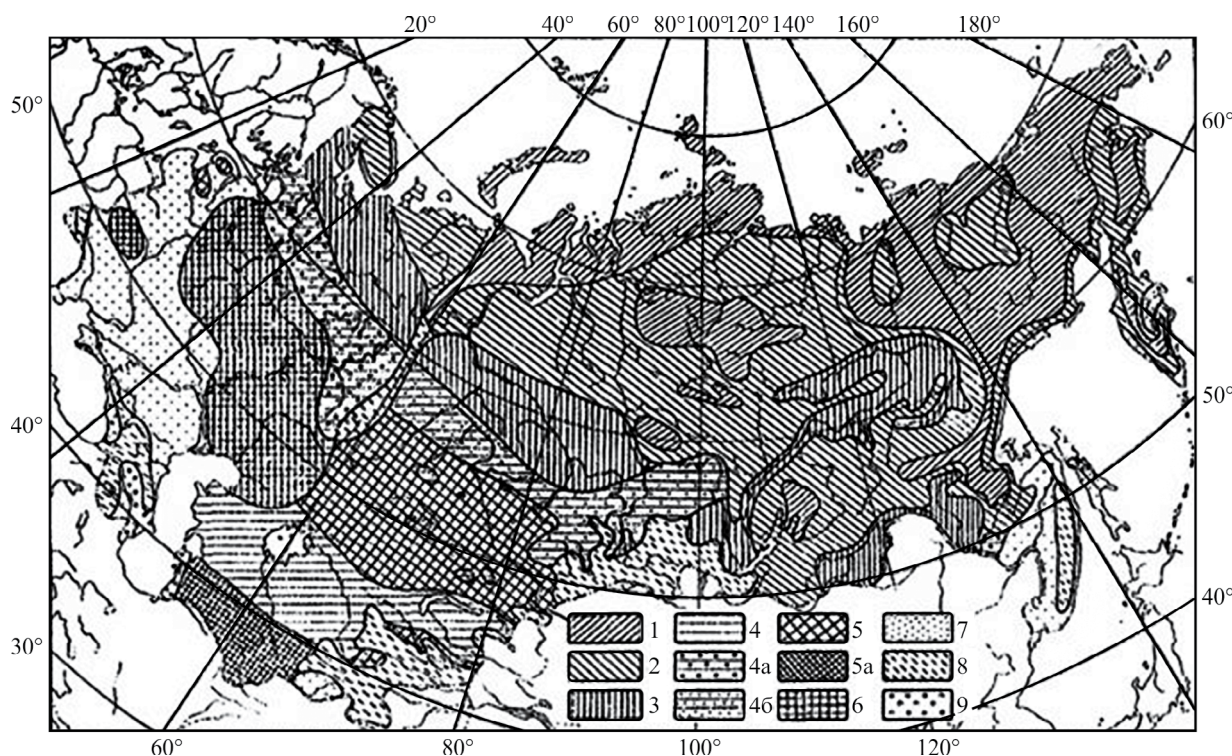


Рис. 2. Вероятность опасных заморозков осенью (на десятилетие): 1 — ежегодные (нет посевов); 2 — более пяти лет (опасны летом); 3 — от трех до четырех лет; 4, 4а и 4б — от двух до трех лет; 5 и 5а — от одного года до двух лет; 6 и 6а — один или без заморозков; 7 — не опасны (позднее наступление заморозков); 8 — горные р-ны со сложным распределением заморозков (опасность не характеризуется); 9 — опасны зимой для субтропических культур (по: Гольцберг, 1949).

симптомов поражения, несомненно, свидетельствуют о принадлежности патогена к комплексному виду *Typhula ishkariensis*.

Присутствие *T. hyperborea* на Среднем Поволжье (Республика Марий Эл и Татарстан) можно объяснить следующим образом. С древних времен (ледниковый период) и в настоящее время существует острая конкуренция между низкотемпературными грибами, т.е. биотрофным *T. hyperborea*² или его предковой формой, и некротрофным *Sclerotinia borealis* Bubák et Vleugel. Разница в температурном диапазоне их роста, а также в трофическом режиме позволила им сосуществовать. По данным середины прошлого века (Goltsberg, 1949), частые осенние заморозки на Среднем и Нижнем Поволжье (рис. 2) благоприятствовали некротрофному *S. borealis*, снижая активность биотрофных возбудителей. Этим можно объяснить малочисленность *Typhula hyperborea* в Республике Марий Эл и Казани наряду с широко распространенным *T. ishkariensis* var. *ishkariensis*.

² *T. Hoshino* (не опубликовано) на основании молекулярно-филогенетических данных предположил, что вид *T. hyperborea* в комплексе *T. ishkariensis* является анцестральным.

Обобщенные таксономические характеристики комплексного вида *T. ishkariensis* для России по Hoshino et al. (2022) представлены в табл. 3.

Тема поддержана государственным заданием № 122042700002-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Årsvoll K., Smith J.D. *Typhula ishkariensis* and its varieties, var. *idahoensis* comb. nov. and var. *canadensis* var. nov. Can. J. Bot. 1978. P. 348–364. V. 56. <https://doi.org/10.1139/b78-042>
- Bruehl G.W., Cunfer B.M. *Typhula* species pathogenic to wheat in the Pacific Northwest. Phytopathology. 1975. V. 65 (7). P. 755–760. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-65-755>
- Bruehl G.W., Machtmes R. Cultural variation within *Typhula idahoensis* and *T. ishkariensis* and the species concept. Phytopathology. 1980. V. 70 (9). P. 867–871.
- Bruehl G.W., Machtmes R., Kiyomoto R. Taxonomic relationships among *Typhula* species as revealed by mating experiments. 1975. V. 65 (10). P. 1108–1114. <https://doi.org/10.1094/Phyto-65-1108>
- Ekstrand H. Hostsädens jeh vallgräsens övervintring. Meddelanden Statens Växtskyddanstalt. 1955. V. 67. H. 1–125.

- Ekstrand H. Trädklubba på vintersä Typhula on winter cereals. Växtskyddsnotiser statens Växtskyddsanstalt. Stockholm. 1934. V. 1. P. 3–4.
- Elenkin A.A. About fungal diseases of tulip bulbs. Bolezni rasteniy. 1911. N5–6. P. 105–104 (in Russ.).
- Goltsberg I.A. Climatic characteristics of frosts and methods of dealing with them in the USSR. Gidromereozdat, Leningrad, 1949 (in Russ.).
- Gulyaev V.V. Damping off of pine seedlings in forest nurseries. Trudy lesovodstva Tatarskoy lesnoy opytnoy stantsii. 1948. V. 9. P. 44–49 (in Russ.).
- Gulyaev V.V. Wetting of pine seedlings in forest nurseries. Goslesbumizdat, Moscow, Leningrad, 1950 (in Russ.).
- Hoshino T., Tkachenko O.B., Tojo M. et al. Taxonomic revision of the *Typhula ishikariensis* complex. Mycoscience. 2022. V. 63. P. 118–130. <https://doi.org/10.47371/mycosci.2022.03.003>
- Imai S. On the *Clavariaceae* of Japan. Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc. 1930. V. 11 (1). P. 70–77.
- Kuznetsova A.P. A new type of fungus — *Typhula humulina* A. Kuzn. on underground hop stalks. Botanicheskie materialy Otdela sporovykh rasteniy Botanicheskogo instituta imeni V.L. Komarova AN SSSR. 1953. V. 9. P. 142–145 (in Russ.).
- Matsumoto N. Evolution and adaptation in snow mold fungi. Soil Microorganisms. 1997. V. 50. P. 13–19.
- Matsumoto N., Tajimi A. Continuous variation within isolates of *Typhula ishikariensis* biotypes B and C associated with habitat differences. Can. J. Bot. 1990. V. 68 (8). P. 1768–1773. <https://doi.org/10.1139/b90-228>
- Matsumoto N., Tajimi A. Intra- and intertaxon interactions among dikaryons of *Typhula incarnata* and *T. ishikariensis* biotypes A, B, and C. Trans. Mycol. Soc. Japan. 1983. V. 24. P. 459–465.
- Matsumoto N., Tkachenko O.B., Hoshino T. The pathogenic species of *Typhula*. In: Low temperature plant microbe interactions under snow. National Agricultural Experiment Station, Hokkaido, 2001, pp. 49–59.
- Matsumoto N., Tronsmo A.M., Shimanuki T. Genetic and biological characteristics of *Typhula ishikariensis* isolates from Norway. Europ. J. Plant Pathol. 1996. V. 102. P. 431–439. <https://doi.org/10.1007/BF01877137>
- Potatosova E.G. Critical review of species of the genus *Typhula* on cultivated plants in the USSR. PhD thesis. Leningrad agricultural Institute, Leningrad, 1960a (in Russ.).
- Potatosova E.G. Fungi of the genus *Typhula* in the USSR. Botanicheskiy Zhurnal. 1960b. V. 45. P. 567–572 (in Russ.).
- Protsenko E.P. *Typhula borealis* Ekstrand on tulips in the USSR. Mikologiya i fitopatologiya. 1967. V. 1 (1). P. 107–109 (in Russ.).
- Remsburg R.E. Studies in genus *Typhula*. Mycologia. 1940. V. 32 (1). P. 52–96. <https://doi.org/10.2307/3754544>
- Røed H. Et bigrad til oppklaring av forholdet mellom *Typhula graminum* Karst. og *Typhula incarnata* Lasch. ex Fr. Freesia. 1969. V. 9 (2). P. 219–225.
- Tkachenko O.B. Snow mold fungi in Russia. In: Plant and microbe adaptations to cold — 2012. Springer, N.Y. etc., 2003, pp. 293–303.
- Tkachenko O.B., Matsumoto N., Shimanuki T. Mating patterns of east European isolates of *Typhula ishikariensis* with isolates from distant regions. Mikologiya i fitopatologiya. 1997. V. 31 (1). P. 68–72.
- Гольцберг И.А. (Goltsberg) Климатическая характеристика заморозков и методы борьбы с ними в СССР. Л.: Изд-во и 2-я типолитогр. Гидромереоиздата, 1949. 112 с.
- Гуляев В.В. (Gulyaev) Выпревание семян сосны в лесных питомниках // Труды лесоводства Татарской лесной опытной станции. 1950. Т. 9. С. 44–49.
- Гуляев В.В. (Gulyaev) Увлажнение семян сосны в лесных питомниках. М.; Л.: Гослесбумиздат, 1950. С. 3–11.
- Еленкин А.А. (Elenkin) О грибных болезнях лукович тюльпанов // Болезни растений. 1911. № 5–6. С. 105–124.
- Кузнецова А.П. (Kuznetsova) Новый вид гриба — *Typhula humulina* А. Кузн. на подземных стеблях хмеля // Ботанические материалы отдела спорых растений Ботанического института. В.Л. Комарова АН СССР. 1953. Т. 9. С. 142–145.
- Потатосова Е.Г. (Potatosova) Грибы рода *Typhula* в СССР // Ботанический журнал. 1960. Т. 45. С. 567–572.
- Потатосова Е.Г. (Potatosova) Критический обзор видов рода *Typhula* на культурных растениях в СССР. Дис. ... канд. с.-х. наук. Л.: Ленинградский сельскохозяйственный институт, 1960. 18 с.
- Проценко Е.П. (Protsenko) *Typhula borealis* на тюльпанах в СССР // Микология и фитопатология. 1967. Т. 1 № 1. С. 107–109.

Taxonomy of the *Typhula ishkariensis* complex in Russia

O.B. Tkachenko^{a,#}, T. Hoshino^{b, c,##}, and N. Matsumoto^{d,###}

^a N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^b Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Sapporo, Japan

^c Hachinohe Institute of Technology, Aomori, Japan

^d National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan

[#]e-mail: ol-bor-tkach@yandex.ru

^{##}e-mail: t-hoshino@hi-tech.ac.jp

^{###}e-mail: nowmat@a011.broad.jp

The purpose of this publication is to show the history of the taxonomy of the *Typhula ishkariensis* complex and to provide more detailed geographical descriptions of those fungi in Russia. Three features on the description of this complex species are noted: morphological, crossing and molecular. Often, species described on different host plants have been recognized as synonyms of another previously described species, for example, *T. humulina* isolated from hop rhizomes and *T. graminearum* from first year seedlings of *Pinus sylvestris* and grass weeds have been synonymized with *Typhula idahoensis*. The latest work by Hoshino et al. distinguished four taxa (three species) based on dendrograms obtained by ITS and ribosomal DNA sequencing, crossing results, morphological and physiological characters: *T. ishkariensis* var. *ishkariensis*, *T. ishkariensis* var. *idahoensis*, *T. hyperborea*, and *T. canadensis*. *T. ishkariensis* var. *idahoensis* was found only in North America, and the last two species (*T. hyperborea* and *T. canadensis*) mainly in areas with extreme winter conditions. In Russia, *Typhula ishkariensis* var. *ishkariensis*, was recorded in the European part of Russia beyond the Arctic Circle: Apatity (Kola Peninsula), in places with a temperate climate: Moscow, St. Petersburg, the republics of Chuvashia and Mari El; and in Asia with a more severe climate: Sverdlovsk Region, Novosibirsk, Irkutsk Region (Hamar-Daban) and Sakhalin. *T. canadensis* and, presumably, the oldest *T. hyperborea*, inhabit mainly in areas with unstable and severe winter climates. *T. canadensis* in Russia was noted by us in Asia in the Baikal region in the Ice Age refugium Khamar-Daban, Kamchatka and Sakhalin, and *T. hyperborea* in Asia in the Sverdlovsk region, Novosibirsk, Kamchatka and Chukotka (Anadyr), along with the European regions of Russia with a temperate climate in the Volga republics of Mari El and Tatarstan. These areas are characterized frequent autumn frosts, which promoted competition with another snow mold pathogen, the necrotroph *Sclerotinia borealis*. Underground damage of plant tissues, such as tulip bulb bases and roots, and hop rhizomes by *T. ishkariensis* var. *ishkariensis* occurred only in Russia. Perhaps the diversity in winter climate evolved and preserved diverse taxa, including ancestral forms. Obviously, such climatic fluctuations evolved organisms capable of survival under unstable stressful conditions, especially when climatic conditions change.

Keywords: complex species, psychrophilic fungi, snow mold, stress, taxonomy.

УДК 582.28 (092)

К ЮБИЛЕЮ АКАДЕМИКА РАН ОЛЬГИ СИЛЬВЕСТРОВНЫ АФАНАСЕНКО



13 декабря 2023 г. юбилей академика Российской академии наук (РАН), доктора биологических наук, профессора Ольги Сильвестровны Афанасенко.

О.С. Афанасенко родилась 13 декабря 1948 г. в г. Ленинграде в семье доктора сельскохозяйственных наук, профессора Сильвестра Ивановича Боголюбского. Окончила школу в г. Пушкине и поступила в Ленинградский сельскохозяйственный институт на факультет защиты растений. В 1971 г. окончила Ленинградский СХИ, а в 1975 г. поступила в аспирантуру Всесоюзного (ныне Всероссийского) института защиты растений (ВИЗР). Будучи в аспирантуре, выполнила под руководством М.М. Левитина диссертационную работу

“Изучение структуры популяций возбудителя сетчатой пятнистости ячменя по признаку вирулентности в связи с селекцией устойчивых сортов” и в 1978 г. защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук. После окончания аспирантуры осталась работать в ВИЗРе, пройдя путь от младшего научного сотрудника до руководителя лаборатории Иммунитета растений к болезням. С 1996 г. является руководителем лаборатории Иммунитета растений к болезням ВИЗР. В 1996 г. она успешно защитила докторскую диссертацию на тему “Закономерности изменчивости популяций возбудителей гельминтоспориозных пятнистостей ячменя и генетический контроль устойчивости к *Pyrenophora teres* Drechs.”. В 2007 г. ей было присвоено звание профессора, в 2010 г. была избрана членом-корреспондентом Россельхозакадемии (ныне РАН) и в 2016 г. — академиком РАН.

Научные исследования О.С. Афанасенко посвящены проблемам генетики иммунитета растений к болезням. Более 40 лет она занимается проблемами изменчивости популяций фитопатогенных грибов и генетики устойчивости зерновых культур к болезням, проводит глубокое экспериментальное изучение механизмов изменчивости возбудителей болезней, расообразовательных процессов, межорганизменной генетики патосистем “злаковые — гемибiotрофные патогены”. Под ее руководством и при непосредственном участии создан международный набор сортов-дифференциаторов ячменя для анализа популяций возбудителя сетчатой пятнистости.

Ею впервые доказан характер взаимоотношений в патосистеме *Pyrenophora teres* f. *teres* — *Hordeum vulgare* по типу “ген-на-ген”. На основании изучения географических популяций гемибiotрофных патогенов ячменя О.С. Афанасенко разработана стратегия рационального использования генетических ресурсов устойчивости в селекции ячменя.

Ольгой Сильвестровной, в ходе совместной с коллегами из Научного центра зерна им. П.П. Лукьяненко экспедиции по Краснодарскому

краю, впервые обнаружена новая для РФ вредоносная болезнь ячменя — рамуляриоз.

Отличительной чертой научной деятельности О.С. Афанасенко является руководство и выполнение многопрофильных исследований на стыке различных научных направлений за счет объединения компетенций фитопатологов, микологов, молекулярных генетиков, биотехнологов, специалистов по генетическим ресурсам растений, селекционеров.

Исследования по идентификации генов устойчивости зерновых культур и картофеля к наиболее вредоносным патогенам проводились и проводятся в кооперации с коллегами из ВИРа, а также из профильных учреждений Беларуси, Германии, Финляндии, Австралии. Длительное и обширное сотрудничество Ольги Сильвестровны с зарубежными профильными учреждениями позволяет использовать новейшие технологии в изучении генетического разнообразия устойчивости растений к болезням в лаборатории иммунитета растений к болезням ВИЗР, которой она руководит 27 лет.

Ольга Сильвестровна являлась инициатором исследований по выявлению эффективных генов устойчивости против угандийской расы стеблевой ржавчины. Эта работа проводилась совместно с проф. Б. Стеффенсоном в Миннесотском университете США и получила свое развитие в лаборатории иммунитета растений к болезням в направлении молекулярного скрининга коллекций пшеницы.

Работа по изучению эпидемиологии опасного карантинного заболевания вириота картофеля, механизмов взаимоотношений в патосистеме и оценки толерантности сортов была проведена в рамках проекта РНФ вместе с коллегами из ИЦиГ и Японии.

Совместно с коллегами из Австралии опубликован цикл работ по идентификации путем ассоциативного картирования генов устойчивости пшеницы к возбудителям бурой ржавчины и желтой пятнистости.

При изучении генетического разнообразия устойчивости ячменя к гемиботрофным патогенам Ольгой Сильвестровой впервые была показана расоспецифичность малых генов, контролирующих устойчивость ячменя к возбудителю сетчатой пятнистости. Путем ассоциативного картирования (GWAS) в обширной коллекции генетических ресурсов ячменя ВИР и в созданных дигиплоидных популяциях выявлено генетическое разнообразие устойчивости ячменя к возбудителям гельминтоспориозных пятнистостей. Идентифицированы гены качественной и количественной устойчивости ячменя к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей на всех хромосомах

ячменя, в том числе и новые для науки, и определены их молекулярные маркеры. Созданная коллекция генетически охарактеризованных доноров устойчивости ячменя и молекулярных маркеров генов устойчивости является необходимой составляющей селекции ячменя на устойчивость к вредоносным болезням. С использованием новых доноров созданы перспективные устойчивые к гельминтоспориозным пятнистостям линии ячменя в Научно-практическом центре НАН Беларуси по земледелию.

О.С. Афанасенко опубликовано более 300 печатных работ, в том числе в таких журналах как “Микология и фитопатология”, “Генетика”, “Экологическая генетика”, “Вавиловский журнал генетики и селекции”, “Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции” и др., а также в высокорейтинговых зарубежных журналах, таких как “Journal of Phytopathology”, “Plant Breeding”, “Plant Science”, “Plant Disease”, “European Journal of Plant Pathology”, “Genome”, “Plant Pathology”, “Theoretical and Applied Genetics”, “Genetic Resources and Crop Evolutions”, “BMC Plant Biology”, “Frontiers in Plant Science”, “Agronomy”, “Agriculture” и др. Ольга Сильвестровна — соавтор многих книг и методических рекомендаций для фитопатологов и селекционеров.

О результатах исследований она неоднократно докладывала на различных конгрессах, конференциях и совещаниях как в России, так и за рубежом.

О.С. Афанасенко является членом оргкомитета международной конференции по пятнистостям ячменя и куратором проблемы от России, членом совета Международной научной ассоциации по защите растений. О.С. Афанасенко много лет возглавляла Государственную аттестационную комиссию СПГАУ, являлась членом экспертного совета ВАК. В настоящее время является членом ученого и докторского советов ВИЗРа, заместителем главного редактора журнала “Микология и фитопатология”, членом редколлегий журналов “Вестник защиты растений”, “Вавиловский журнал генетики и селекции”, “Microbiology Independent Research Journal”, “Труды по прикладной ботанике и селекции”, “Сибирский вестник сельскохозяйственной науки”. Под ее руководством защищено восемь кандидатских и одна докторская диссертация.

Благодаря гармоничному сочетанию в характере Ольги Сильвестровны свойств Ученого — преданность науке, стремление к новому, широкий спектр научных интересов, и Человека — доброта, отзывчивость и внимание к своим коллегам, она пользуется авторитетом и уважением в мировом

научном сообществе и родном коллективе. Коллектив ВИЗР, редколлегия журнала “Микология и фитопатология”, коллеги, друзья, ученики от всей души поздравляют Ольгу Сильвестровну с юбилеем и желают ей крепкого здоровья и творческих успехов!

Список основных трудов О.С. Афанасенко за 2017–2023 гг.

- Riaz A., Athiyannan N., Periyannan S., Afanasenko O., Mitrofanova O., Aitken E., Lagudah E., Hickey L. Mining Vavilov's treasure chest of wheat diversity for adult plant resistance to *Puccinia triticina* // *Plant Disease*. 2017. V. 101 (2). P. 317–323.
- Riaz A., Hathorn A., Dinglasan E., Ziems L., Richard C., Singh D., Mitrofanova O., Afanasenko O., Aitken E., Godwin I., Hickey L. Into the vault of the Vavilov wheats: old diversity for new alleles // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2017. V. 64 (3). P. 531–544. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0380-5>
- Riaz A., Athiyannan N., Periyannan S.K., Afanasenko O.S., Mitrofanova O.P., Platz G.J., Aitken E.A.B., Snowdon R.G., Lagudah E.S., Hickey L.T., Voss-Fels K.P. Unlocking new alleles for leaf rust resistance in the Vavilov wheat collection // *Theor. Appl. Genet.* 2017. P. 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2990-5>
- Bykova I.V., Lashina N.M., Efimov V.M., Afanasenko O.S., Khlestkina E.K. Identification of 50 K Illumina-chip SNPs associated with resistance to spot blotch in barley // *BMC Plant Biology*. 2017. V. 17 (Art. 250). P. 95–103. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1198-9>
- Kochetov A.V., Glagoleva A. Yu., Strygina K.V., Khlestkina E.K., Gerasimova S.V., Ibragimova S.M., Shatskaya N.V., Vasilyev G.V., Afonnikov D.A., Shmakov N.A., Antonova O. Yu., Gavrilenko T.A., Alpatyeva N.V., Khiutti A., Afanasenko O.S. Differential expression of NBS–LRR encoding genes in the root transcriptomes of two *Solanum phureja* genotypes with contrasting resistance to *Globodera rostochiensis* // *BMC Plant Biology*. 2017. V. 17 (Art. 251). P. 41–50. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1193-1>
- Анисимова А.В., Новикова Л.Ю., Новакази Ф., Копанке Д., Зубкович А.А., Афанасенко О.С. Полиморфизм по признаку вирулентности и особенности микроэволюции в популяциях возбудителя сетчатой пятнистости ячменя *Pyrenophora teres f. teres* // *Микология и фитопатология*. 2017. Т. 51. № 4. С. 229–240.
- Мироненко Н.В., Анисимова А.В., Баранова О.А., Зубкович А.А., Афанасенко О.С. Анализ структуры популяций *Pyrenophora teres f. teres* по признакам вирулентности и SSR маркерам // *Микология и фитопатология*. 2017. Т. 51. № 5. С. 305–313.
- Khiutti A.V., Antonova O. Yu., Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Potato resistance to quarantine diseases // *Russian J. Genetics: Appl. Res.* 2017. V. 7 (8). P. 833–844.
- Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Афанасенко О.С., Михайлова Л.А. Селективное влияние сортов пшеницы с геном Tsn1 на формирование популяции возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* // *Вестник защиты растений*. 2017. Т. 3 (93). P. 23–27.
- Riaz A., Athiyannan N., Periyannan S.K., Afanasenko O.S., Mitrofanova O.P., Platz G.J., Aitken E.A.B., Snowdon R.J., Lagudah E.S., Hickey L.S., Voss-Fels K.P. Unlocking new alleles for leaf rust resistance in the Vavilov wheat collection // *Theor. Appl. Genetics*. 2018. V. 131. P. 127–144. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2990-5>
- Vossen B. van de, Westenberg M., Adams I., Afanasenko O., Besheva A., Boerma M., Choiseul J., Dekker T., Flath K., Gent-Pelzer M. van. Euphresco Sento: An international laboratory comparison study of molecular tests for *Synchytrium endobioticum* detection and identification // *Eur. J. Plant Pathol.* 2018. V. 151 (3). P. 757–766. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1411-6>
- Dinglasan E.G., Singh D., Shankar M., Afanasenko O., Platz G., Godwin I.D., Voss-Fels K.P., Hickey L. Discovering new alleles for yellow spot resistance in the Vavilov wheat collection // *Theoret. Appl. Genetics*. 2019. V. 132. P. 149–162. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3204-5>
- Dinglasan E., Hickey L., Ziems L., Fowler R., Anisimova A., Baranova O., Lashina N., Afanasenko O. Genetic characterization of resistance to *Pyrenophora teres f. teres* in the International Barley Differential Canadian Lake Shore // *Front. Plant Sci.* 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00326>
- Novakazi F., Afanasenko O., Anisimova A., Platz J., Snowdon R., Kovaleva O., Zuckovich A., Oordon F. Genetic analysis of a worldwide barley collection for resistance to net form of net blotch disease (*Pyrenophora teres f. teres*) // *Theor. Appl. Genetics*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03378-1>
- Dinglasan E.G., Singh D., Shankar M., Afanasenko O.S., Platz G., Godwin I.D., Voss-Fels K.P., Hickey L. Discovering new alleles for yellow spot resistance in the Vavilov wheat collection // *Theor. Appl. Genet.* 2019. V. 132 (1). P. 149–162. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3204-5>
- Rozanova I.V., Lashina N.M., Mustafin Z.S., Gorobets S.A., Efimov V.M., Afanasenko O.S., Khlestkina E.K. SNPs associated with barley resistance to isolates of *Pyrenophora teres f. teres* // *BMC Genomics*. 2019.

V. 20. Suppl. 3 (292).

<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5623-3>

Matsushita Y., Yanagisawa H., Khiutti A., Mironenko N., Ohto Y., Afanasenko O. First report of Chrysanthemum stunt viroid, isolated from potato (*Solanum tuberosum*) plants in Russia // *J. General Plant Pathol.* 2019. V. 85 (4). P. 311–313.

<https://doi.org/10.1007/s10327-019-00851-z>

Афанасенко О.С., МIRONENKO Н.В., Беспалова Л.А., Аблова И.Б., Лашина Н.М. Рамуляриоз ячменя в Российской Федерации: диагностика и распространение // *Микология и фитопатология.* 2019. Т. 53. № 4. С. 245–254.

<https://doi.org/10.1134/S0026364819040032>

Yanagisawa H., Matsushita Y., Khiutti A., Mironenko N., Ohto Y., Afanasenko O. Complete genome sequence of a divergent strain of potato virus P isolated from *Solanum tuberosum* in Russia // *Archives of Virology.* 2019. V. 164 (11). P. 2891–2894.

<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04397-5>

Лашина Н.М., Афанасенко О.С. Поражаемость пятнистостями сортов ячменя, включенных в Государственный реестр селекционных достижений и находящихся на сортоиспытаниях в условиях Северо-Запада Российской Федерации // *Вестник защиты растений.* 2019. № 2 (100). С. 23–28. [https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-2\(100\)-23-28](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-2(100)-23-28)

Зеленева Ю.В., Афанасенко О.С., Судникова В.П. Видовой состав возбудителей болезней пшеницы в ЦЧР // *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета.* 2019. № 3 (58). С. 65–70.

Rozanova I.V., Lashina N.M., Efimov V.M., Afanasenko O.S., Khlestkina E.K. The in-silico development of DNA markers for breeding of spring barley varieties that are resistant to spot blotch in Russia // *Agriculture.* 2020. V. 10 (11). P. 505.

<https://doi.org/10.3390/agriculture10110505>

Novakazi F., Afanasenko O., Lashina N., Platz G.J., Snowdon R., Loskutov I., Ordon F. Genome-wide association studies in a barley (*Hordeum vulgare*) diversity set reveal a limited number of loci for resistance to spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) // *Plant Breeding.* 2020. V. 139. P. 521–535.

<https://doi.org/10.1111/pbr.12792>

Хютти А.В., Рыбаков Д.А., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2020. Т. 24. № 4. С. 363–375. <https://doi.org/10.18699/VJ20.629>

Афанасенко О.С. Генетическая защита зерновых культур: итоги и перспективы // *Защита и карантин растений.* 2020. № 9. С. 3–7.

Gavrilenko T.A., Khiutti A.V., Klimenko N.S., Antonova O.Y., Fomina N.A., Afanasenko O.S. Phenotypic and DNA marker-assisted characterization of Russian potato cultivars for resistance to potato cyst nematodes. *Agronomy.* 2021. V. 11 (2400).

<https://doi.org/10.3390/agronomy11122400>

Kochetov A.V., Afonnikov D.A., Shmakov N., Vasiliev G.V., Antonova O. Yu., Shatskaya N.V., Glagoleva A.Y., Ibragimova S.M., Khiutti A., Afanasenko O.S. et al. NLR genes related transcript sets in potato cultivars bearing genetic material of wild Mexican *solanum* species // *Agronomy.* 2021. V. 11. (2426).

<https://doi.org/10.3390/agronomy11122426>

Yanagisawa H., Matsushita Y., Khiutti A., Mironenko N., Ohto Y., Afanasenko O. Occurrence and distribution of viruses infecting potato in Russia // *Letters in Appl. Microbiol.* 2021. V. 73 (1). P. 64–72.

<https://doi.org/10.1111/lam.13476>

Matsushita Y., Yanagisawa H., Khiutti A., Mironenko N., Ohto Y., Afanasenko O. Genetic diversity and pathogenicity of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid isolates in Russia // *Eur. J. Plant Pathol.* 2021. V. 161. P. 529–542.

<https://doi.org/10.1007/s10658-021-02339-z>

Zeleneva Yu.V., Afanasenko O.S., Sudnikova V.P. Influence of agroclimatic conditions, life form, and host species on the species complex of wheat septoria pathogens // *Biology Bulletin.* 2021. V. 48 (10). P. 74–80.

Kochetov A.V., Pronozin A.Y., Shatskaya N.V., Afonnikov D.A., Afanasenko O.S. Potato spindle tuber viroid // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2021. T. 25 (3). P. 269–275. <https://doi.org/10.18699/VJ21.030>

Кочетов А.В., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Новые генетические технологии защиты растений от паразитических нематод // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2021. Т. 125 № 3. 337–343.

<https://doi.org/10.18699/VJ21.037>

МIRONENKO Н.В., Лашина Н.М., Баранова О.А., Зубкович А.А., Афанасенко О.С. Гибридизация между формами *Ryzenophora teres* в природных популяциях России и республики Беларусь // *Микология и фитопатология.* 2021. Т. 55. № 1. С. 51–58. <https://doi.org/10.31857/S0026364821010074>

Afanasenko O., Rozanova I., Gofman A., Lashina N., Novakazi F., Mironenko N., Baranova O., Zubkovich A. Validation of molecular markers of barley net blotch resistance loci on chromosome 3H for marker-assisted selection // *Agriculture.* 2022. V. 12 (4). P. 439. <https://doi.org/10.3390/agriculture12040439>

Afanasenko O.S., Khiutti A.V., Mironenko N.V., Lashina N.M. Transmission of potato spindle

tuber viroid between *Phytophthora infestans* and host plants // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022. V. 26 (3). P. 272–280.

<https://doi.org/10.18699/VJGB-22-34> 10.18699/VJGB-22-34

Afanasenko O.S., Lashina N.M., Mironenko N.V., Kyrova E.I., Rogozina E.V., Zubko N.G., Khiutti A.V. Evaluation of responses of potato cultivars to different strains of potato spindle tuber viroid and symptoms of mixed viroid/viral infection // *Agronomy*. 2022. V. 12 (2916). <https://doi.org/10.3390/agronomy12122916>

Jambuthenne D.T., Riaz A., Athiyannan N., Alahmad S., Ng W.L., Ziems L., Afanasenko O., Periyannan S.K., Aitken E., Platz G., Godwin I., Voss-Fels K.P., Dinglasan E., Hickey L.T. Mining the Vavilov wheat diversity panel for new sources of adult plant resistance to stripe rust // *Theor. Appl. Genetics*. 2022. V. 135. P. 1355–1373.

<https://doi.org/10.1007/s00122-022-04037-8>

Akhmetova M.M., Rubel M.S., Afanasenko O.S., Kolpashchikov D.M. Barley haplotyping using biplex deoxyribozyme nanomachine // *Sensors and Actuators Reports*. 2022. V. 4 (100132).

<https://doi.org/10.1016/j.snr.2022.100132>

Мироненко Н.В., Кочетов А.В., Афанасенко О.С. Влияние аллельного полиморфизма 3'-нетранслируемой области гена StTCP23 на толерантность сортов картофеля к вирусу веретеновидности клубней // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023. Т. 184. № 1. С. 137–143.

Мироненко Н.В., Хютти А.В., Кырова Е.И., Белов Д.А., Афанасенко О.С. Первое обнаружение вириода веретеновидности клубней картофеля

в природных изолятах возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* // *Микология и фитопатология*. 2022. Т. 56. № 4. С. 284–293. <https://doi.org/10.31857/S0026364822040079>

Мироненко Н.В., Хютти А.В., Кырова Е.И., Лашина Н.М., Афанасенко О.С. *Solanum nigrum* L.—резерватор вириода веретеновидности клубней картофеля // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022. Т. 183. № 3. С. 194–203.

<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-3-194-203>

Мироненко Н.В., Кочетов А.В., Афанасенко О.С. Влияние аллельного полиморфизма 3'-нетранслируемой области гена StTCP23 на толерантность сортов картофеля к вирусу веретеновидности клубней // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023. Т. 184. № 1. С. 137–143. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-1-137--143>

Мироненко Н.В., Орина А.С., Лашина Н.М., Афанасенко О.С. Экспрессия гена фактора транскрипции StTCP23 в растениях картофеля, инокулированных вириодом веретеновидности клубней // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023. Т. 184. № 3. С. 1–7.

<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-3-1-7>

Kochetov A.V., Shmakov N., Afonnikov D.A., Vasiliev G.V., Shatskaya N.V., Egorova A.A., Mironenko N.V., Lashina N.M., Khiutti A.V., Afanasenko O.S. Three cycles of continuous propagation of a severe PSTVd strain NicTr-3 in *Solanum lycopersicum* cv. rutgers resulted in its attenuation and very mild disease symptoms in potato // *Agronomy*. 2023. V. 13. P. 684.

<https://doi.org/10.3390/agronomy13030684>

Towards the Jubilee of Olga Silvestrovna Afanasenko, Academician of the Russian Academy of Sciences

© 2024. All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

К 90-ЛЕТИЮ ЛИДИИ ВАСИЛЬЕВНЫ ГАРИБОВОЙ

© 2024 г. М. Ю. Дьяков^{1,*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

*e-mail: max_fungi@mail.ru



14 ноября 2023 г. исполнилось 90 лет профессору кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, заслуженному профессору МГУ, Лидии Васильевне Гарибовой — известному микологу и биотехнологу, талантливому педагогу и популяризатору науки.

Вся плодотворная профессиональная жизнь Лидии Васильевны связана с Московским университетом, где в 1952 г. она выбрала кафедру низших растений (впоследствии кафедра микологии и альгологии). В студенческие годы Лидия Васильевна увлеклась практическими проблемами, связанными с культивированием макромицетов, и эта тема становится основной в ее профессиональной деятельности. В 1964 году она окончила аспирантуру, защитив кандидатскую диссертацию по теме “Биологические особенности различных штаммов культивируемого шампиньона и их связь

с урожайностью”. Была оставлена на кафедре, где и работает по настоящее время в должности профессора. В 1983 г. защитила докторскую диссертацию по теме “Морфология, биология и систематика рода *Agaricus* Fr. emend. Karst.”. Область научных интересов — микология, основное направление исследований — биология базидиальных грибов (макромицетов), особенности их роста и развития.

Основные объекты научных работ Л.В. Гарибовой — культивируемые макромицеты. Первые научные исследования в этом направлении были выполнены Лидией Васильевной в годы аспирантуры под руководством Е.С. Ключниковой. И уже в них прослеживается прочная связь фундаментального научного подхода к поставленным задачам и прикладной составляющей, нацеленной на решение реальных производственных задач. Со временем Л.В. Гарибова становится одним из ключевых организаторов грибоводческой индустрии Советского Союза. Она активно участвует в разработке технологий по производству грибов, грибных субстратов и посевного мицелия, в создании первых коллекций производственных сортов культивируемых грибов, в организации селекционных работ по получению отечественных сортов шампиньона, в подготовке профессиональных специалистов. Фактически благодаря деятельности Лидии Васильевны отечественное грибоводство сразу создавалось на высоком технологическом и научном уровне.

После экономического кризиса 1990-х гг. Лидия Васильевна приняла активное участие в создании консалтинговой компании “Школа грибоводства” и одноименного журнала для руководителей и технологов грибоводческих хозяйств. Тесное сотрудничество с этими структурами продолжается и в настоящее время.

Лидия Васильевна за прошедшие годы подготовила более 20 кандидатов наук и двух докторов наук по микологии. Ею разработан ряд лекционных и практических курсов. Опубликовано более 200 научных статей, две коллективные монографии.

В соавторстве написаны и изданы пять учебников и учебных пособий. Учебник “Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов” (2005) награжден дипломом Московского общества испытателей природы и дипломом лауреата премии им. Д.А. Сабина.

Одной из важных и значительных сторон деятельности Л.В. Гарибовой является научно-просветительская работа в области микологии, включающая чтение научно-популярных лекций, публикации статей в журналах, научно-популярных книг о грибах (более 20). С 1994 г. по настоящее время она является членом редколлегии журнала “Микология и фитопатология”.

Еще одно немаловажное качество Лидии Васильевны — ее широкая эрудиция. Она большой ценитель и знаток классической литературы. Вероятно, это также повлияло на успехи на научном поприще. При этом, как истинный педагог, она всегда готова щедро делиться своим богатым опытом в науке и в жизни с коллегами и учениками.

За экспериментальные работы с грибами Л.В. Гарибова удостоена медали им. А.С. Попова (2008). За научную и педагогическую деятельность

награждена высшей профессиональной наградой микологов — медалью им. А.А. Ячевского, учрежденной Национальной академией микологии.

Невзирая на почтенный возраст, Лидия Васильевна не прекращает активную научную и педагогическую деятельность. Она читает лекционные курсы и проводит практические занятия, руководит работами студентов и аспирантов, участвует в научных семинарах и конференциях. В прошлом году под ее руководством и с активным участием разработан новый лекционный онлайн-курс “Приусадебное грибоводство”. В настоящий момент подготовлено и сдано в печать учебное пособие “Биологические основы культивирования макромицетов *in vitro*”.

От имени кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, коллег Ботанического института имени В.Л. Комарова и всего микологического сообщества искренне поздравляем Лидию Васильевну с юбилеем. Желаем доброго здоровья, бодрого настроения и активной творческой деятельности.

To the 90th Anniversary of Lidiya Vasilyevna Garibova

M. Yu. Dyakov^{a, #}

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[#]*e-mail: max_fungi@mail.ru*

Журналы РАН, выходящие в свет на русском языке

Автоматика и телемеханика
 Агрохимия
 Азия и Африка сегодня
 Акустический журнал
 Астрономический вестник. Исследования солнечной системы
 Астрономический журнал
 Биологические мембраны
 Биология внутренних вод
 Биология моря
 Биоорганическая химия
 Биофизика
 Биохимия
 Ботанический журнал
 Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук
 Вестник древней истории
 Вестник Российской академии наук
 Вестник российской сельскохозяйственной науки
 Водные ресурсы
 Вопросы истории естествознания и техники
 Вопросы ихтиологии
 Вопросы языкознания
 Вулканология и сейсмология
 Высокомолекулярные соединения. Серия А
 Высокомолекулярные соединения. Серия Б
 Высокомолекулярные соединения. Серия С
 Генетика
 Геология рудных месторождений
 Геомагнетизм и аэрономия
 Геоморфология и палеогеография
 Геотектоника
 Геохимия
 Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология
 Государство и право
 Дефектоскопия
 Дифференциальные уравнения
 Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления
 Доклады Российской академии наук. Науки о жизни
 Доклады Российской академии наук. Науки о Земле
 Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки
 Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах
 Журнал аналитической химии
 Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова
 Журнал вычислительной математики и математической физики
 Журнал неорганической химии
 Журнал общей биологии
 Журнал общей химии
 Журнал органической химии
 Журнал прикладной химии
 Журнал физической химии
 Журнал эволюционной биохимии и физиологии
 Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Записки Российского минералогического общества
 Зоологический журнал
 Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа
 Известия Российской академии наук. Механика твердого тела
 Известия Российской академии наук. Серия биологическая
 Известия Российской академии наук. Серия географическая
 Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка
 Известия Российской академии наук. Серия физическая
 Известия Российской академии наук. Теория и системы управления
 Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана
 Известия Российской академии наук. Энергетика
 Известия Русского географического общества
 Исследование Земли из Космоса
 Кинетика и катализ
 Коллоидный журнал
 Координационная химия
 Космические исследования
 Кристаллография
 Латинская Америка
 Лёд и Снег
 Лесоведение
 Литология и полезные ископаемые
 Мембраны и мембранные технологии
 Металлы
 Микология и фитопатология
 Микробиология
 Микроэлектроника
 Молекулярная биология
 Нейрохимия
 Неорганические материалы
 Нефтехимия
 Новая и новейшая история
 Общественные науки и современность
 Общество и экономика
 Океанология
 Онтогенез
 Палеонтологический журнал
 Паразитология
 Петрология
 Письма в Астрономический журнал
 Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования
 Почвоведение
 Приборы и техника эксперимента
 Прикладная биохимия и микробиология
 Прикладная математика и механика
 Проблемы Дальнего Востока
 Проблемы машиностроения и надежности машин
 Проблемы передачи информации
 Программирование
 Психологический журнал
 Радиационная биология. Радиоэкология
 Радиотехника и электроника
 Радиохимия
 Расплавы
 Растительные ресурсы
 Российская археология
 Российская история
 Российская сельскохозяйственная наука
 Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова
 Русская литература
 Русская речь
 Сенсорные системы
 Славяноведение
 Современная Европа
 Социологические исследования
 Стратиграфия. Геологическая корреляция
 США и Канада: экономика, политика, культура
 Теоретические основы химической технологии
 Теплофизика высоких температур
 Успехи современной биологии
 Успехи физиологических наук
 Физика Земли
 Физика и химия стекла
 Физика металлов и металловедение
 Физика плазмы
 Физикохимия поверхности и защита материалов
 Физиология растений
 Физиология человека
 Химическая физика
 Химия высоких энергий
 Химия твердого топлива
 Цитология
 Человек
 Экология
 Экономика и математические методы
 Электрохимия
 Энтомологическое обозрение
 Этнографическое обозрение
 Ядерная физика