

УДК 632.4.01/08

Токсинопродуцирующая способность штаммов гриба *Fusarium proliferatum*, выделенных из зерна

О. П. Гаврилова^{1*}, А. С. Орина¹, Т. Ю. Гагкаева¹, Н. Н. Гогина²¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, 196608 Россия²Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, Сергиев Посад, 141311 Россия

*E-mail: olgavrilova1@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.10.2024

Принята к печати 02.12.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27546

РЕФЕРАТ Гриб *Fusarium proliferatum* распространен повсеместно, способен инфицировать широкий спектр растений и синтезирует разнообразные микотоксины, количество которых может значительно варьировать. Проанализированы 12 штаммов *F. proliferatum sensu lato*, выделенных из зерна пшеницы (6), овса (4) и кукурузы (2). С целью идентификации штаммов проводили филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов фактора элонгации трансляции EF-1a, β-тубулина и второй субъединицы РНК-полимеразы II. Тип спаривания определяли с помощью специфичной ПЦР. Профиль микотоксинов, продуцируемых штаммами, определяли методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Все 12 штаммов *Fusarium* формировали на филогенетическом дереве отдельную кладу с референсными штаммами *F. proliferatum*, что подтверждает их видовую принадлежность. Установлено присутствие в каждом штамме только одной идиоморфы в локусе MAT, что указывает на гетероталличный тип спаривания гриба. Идиоморфа MAT1-1 встречалась в 2 раза чаще, чем MAT1-2. Все штаммы *F. proliferatum* активно продуцировали фумонизины В₁ (71–6175 мг/кг), В₂ (12–2661 мг/кг) и В₃ (6–588 мг/кг), а также высокие количества боверицина (64–455 мг/кг) и более низкие количества (12–6565 мкг/кг) монилиформина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Fusarium*, филогенетический анализ, микотоксины, ВЭЖХ-МС/МС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FF – *Fusarium fujikuroi*; *tef* – ген фактора элонгации трансляции EF-1a; *tub* – ген β-тубулина; *rpb2* – ген второй субъединицы РНК-полимеразы II; ML (maximum likelihood) – метод максимального правдоподобия; BP (Bayesian probability) – значение Байесовской апостериорной вероятности; MAT-локус – локус типа спаривания; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией; ФУМ – фумонизины группы В; ФВ₁ – фумонизин В₁; ФВ₂ – фумонизин В₂; ФВ₃ – фумонизин В₃; БОВ – боверицин; МОН – монилиформин.

ВВЕДЕНИЕ

Комплекс видов *Fusarium fujikuroi* (FF) представляет одну из наиболее крупных групп в пределах рода *Fusarium* и является ярким примером значительных преобразований видовой концепции рода. Сравнительные морфологические и молекулярно-филогенетические исследования позволили установить, что комплекс видов FF представлен более чем 60 различными видами, но это, с большой вероятностью, не полный список [1]. Характеристика каждого таксона в комплексе видов FF проводится по сумме физиолого-биохимических признаков, поскольку для разграничения видов диапазона морфо-

логических характеристик недостаточно, поскольку они не всегда очевидны, стабильны и надежны. С внедрением молекулярных технологий показано, что ранее описанные виды FF являются полифилетическими, состоящими из морфологически сходных, но филогенетически различных видов [2–4].

В комплексе FF встречаются как патогенные, так и/или эндофитные для широкого круга растений организмы, а также возбудители заболеваний человека и животных [5]. Эти грибы вырабатывают структурно разнообразные вторичные метаболиты, включая микотоксины, а также фитогормоны – гиббереллины, ауксины и цитокинины [6, 7]. Спектр вто-

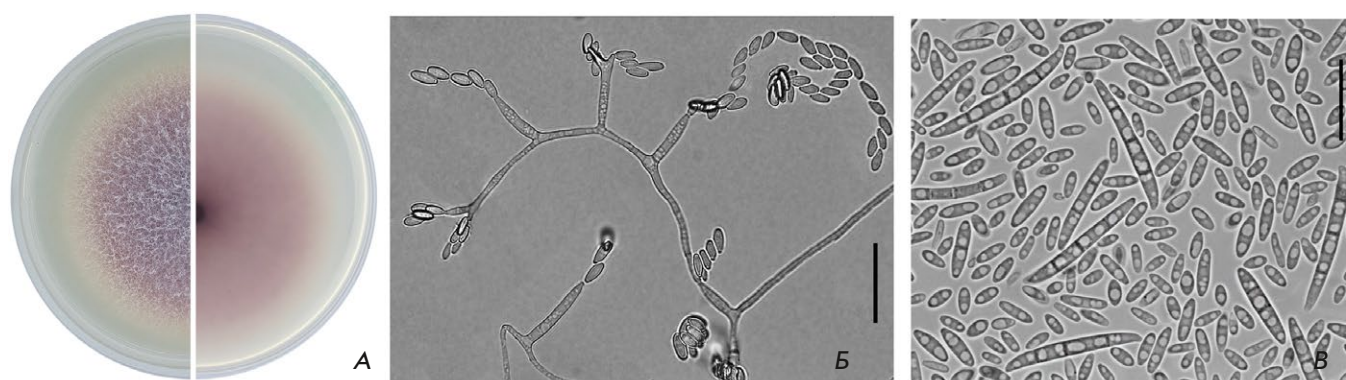


Рис. 1. А – культура гриба *F. proliferatum* MFG 58486 (картофельно-сахарозный агар, 7 сут, 25°C, в темноте); Б – микроконидии на моно- и полифиалидах; В – микроконидии и макроконидии (синтетический агар Ниренберг, 14 сут, 25°C, в темноте)

ричных метаболитов у многих видов комплекса FF еще требует уточнения и может отличаться даже у близкородственных видов [8–10]. Четкое определение границ видов *Fusarium* и характеристика их свойств помогают более надежно идентифицировать штаммы и улучшают понимание их биологии.

Гриб *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg (Matsush.) является одним из активно изучаемых представителей комплекса видов FF из-за его повсеместного распространения и способности инфицировать широкий спектр растений [11], включая злаковые, бобовые [12, 13], овощные [14] и плодовые культуры [15–17]. Болезни, вызванные *F. proliferatum*, могут проявляться в виде гнилей или увядания [13, 18, 19], а, кроме того, инфекционный процесс в растении часто протекает бессимптомно. Наряду с близкородственным видом *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. proliferatum* является одним из наиболее вредоносных патогенов кукурузы, вызывающим гнили початков и стеблей [20]. На зерновых культурах в благоприятных для гриба условиях зараженное зерно пшеницы может быть щуплым с признаками черного зародыша [21], а у инфицированного овса отмечали обесцвечивание и некротическую штриховатость колосковых чешуек, а также покоричневение зерна [22].

Благодаря обильному образованию микроконидий, собранных в фальшивые головки, короткие цепочки на моно- и полифиалидных клетках, а также макроконидий (рис. 1), *F. proliferatum* легко распространяется по воздуху и переносится насекомыми на новые неинфицированные растения [23]. Как и многие другие патогены, он сохраняется в семенах [14] и на растительных остатках в почве [24].

Fusarium proliferatum способен образовывать телеоморфную стадию, формируя перитеции с аскоспорами на поверхности субстрата [25]. У гетеро-

талличных видов FF половое размножение может происходить только между особями противоположного типа спаривания, регулируемого МАТ-локусом, представленным двумя идиоморфами – МАТ1-1 и МАТ1-2 [26]. Эффективный размер популяции гетероталличного вида должен содержать более или менее одинаковое число особей, характеризующихся определенной идиоморфой, что приводит к возникновению полового процесса, в то время как значительный перекося в частоте встречаемости одного из типов спаривания может привести к неспособности гриба к половому спороношению и снижению его внутривидового разнообразия [27].

Как и другие представители комплекса видов FF, *F. proliferatum* синтезирует токсичные вторичные метаболиты: ФУМ, БОВ, МОН, фузапролиферин, фузарины, фузариевую кислоту и др., способные накапливаться в зерне и представлять опасность для здоровья его потребителей [28]. Установлена достоверная связь между зараженностью *F. proliferatum* зерна пшеницы и количеством обнаруженных в нем ФУМ [29, 30]. Обобщение накопленной к настоящему времени информации о контаминации микотоксинами зерна разных злаков показывает, что пшеница или ячмень накапливают ФУМ в меньших количествах [31–33], чем кукуруза, в зерне которой эти метаболиты часто встречаются в высоких количествах [34, 35]. Известно, что количество микотоксинов, продуцируемых штаммами *F. proliferatum* различного субстратного происхождения, может значительно варьировать, среди них могут встречаться как активные продуценты, так и нетоксигенные штаммы [8, 28, 29, 36–38].

Цель исследования состояла в идентификации с помощью филогенетического анализа штаммов *F. proliferatum*, выделенных из зерновых культур, и определении их токсинопродуцирующей способности *in vitro*.

Таблица 1. Штаммы *F. proliferatum*, выбранные для исследований

Штамм из коллекции	Происхождение	Растение-хозяин	Год	Номер последовательности в GenBank		
				<i>tef</i>	<i>tub</i>	<i>rpb2</i>
MFG* 58227	Краснодарский край	пшеница	2009	MW811114	OK000500	OK000527
MFG 58471	Краснодарский край	пшеница	2012	MW811115	OK000501	OK000528
MFG 58486	Краснодарский край	пшеница	2012	MW811117	OK000503	OK000530
MFG 59046	Краснодарский край	пшеница	2016	MW811122	OK000508	OK000535
MFG 60309	Краснодарский край	пшеница	2017	MW811125	OK000513	OK000540
MFG 60803	Амурская обл.	пшеница	2019	MW811134	OK000522	OK000549
MFG 58589	Ленинградская обл.	овес	2013	MW811118	OK000504	OK000531
MFG 58590	Приморский край	овес	2013	MW811119	OK000505	OK000532
MFG 92501	Ленинградская обл.	овес	2007	MW811135	OK000524	OK000551
MFG 58667	Нижегородская обл.	овес	2014	MW811121	OK000507	OK000534
MFG 58484	Воронежская обл.	кукуруза	2012	MW811116	OK000502	OK000529
MFG 58603	Липецкая обл.	кукуруза	2012	MW811120	OK000506	OK000533

*MFG – коллекция культур лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР, Санкт-Петербург, Россия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы грибов *Fusarium*

Из коллекции чистых культур грибов, хранящихся в лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР, выбрали 12 штаммов (табл. 1), предварительно идентифицированных по сумме морфологических признаков как представители комплекса видов FF. Все штаммы выделены из собранных в различных регионах РФ образцов зерна: шесть – из пшеницы (*Triticum aestivum* L.), четыре – овса (*Avena sativa* L.) и два – из кукурузы (*Zea mays* L.).

Молекулярно-генетический анализ

Все культуры грибов выращивали на картофельно-сахарозной агаризованной среде (КСА) в термостатируемом шкафу Binder KBW 400 (Германия) при 25°C в течение 7 сут. ДНК выделяли из мицелия по стандартной методике с помощью 2% раствора цетилтриметиламмонийбромиды и хлороформа.

Фрагменты генов *tef*, *tub* и *rpb2* амплифицировали с использованием праймеров EF1 / EF2, T1 / T2 и fRPB2-5F / fRPB2-7Cr [39]. Полученные фрагменты секвенировали методом Сэнгера на секвенаторе ABIPrism 3500 (Applied Biosystems – Hitachi, Япония) с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, США). Консенсусные нуклеотидные последовательности выравнивали в программе Vector NTI Advance 10 (Thermo Fisher Scientific, США) и депонировали в базу данных NCBI GenBank (табл. 1).

В филогенетический анализ были включены нуклеотидные последовательности репрезентатив-

ных штаммов *Fusarium* spp. из коллекций Службы сельскохозяйственных исследований (NRRL, США), Института грибного биоразнообразия Вестердейк (CBS, Нидерланды) и других коллекций (табл. 2). Филогенетические отношения между таксонами оценивали методом ML с помощью программы IQ-TREE 2 v.2.1.3. Лучшую модель замены нуклеотидов, используемую для построения деревьев ML (TIM2e+R2), также определяли в программе IQ-TREE 2 v.2.1.3. Достоверность топологии филогенетических деревьев определяли посредством бутстреп-анализа (1000 повторностей). Также рассчитывали значения BP с помощью MrBayes v. 3.2.1 на платформе Armadillo 1.1.

Тип спаривания штаммов идентифицировали с помощью аллель-специфической ПЦР с праймерами Gfmat1a/Gfmat1b (MAT1-1) и Gfmat1c/Gfmat1d (MAT1-2), разработанными для видов комплекса FF, и температурой отжига 55°C согласно протоколу [40]. Размеры фрагментов, соответствующих аллелям MAT1-1 и MAT1-2, составили 200 и 800 п.н. соответственно.

Анализ токсинопродуцирующей способности грибов

В стеклянных сосудах объемом 250 мл смешивали 20 г рисовых зерен и 12 мл воды и автоклавировали при 121°C в течение 40 мин. Автоклавированные зерна риса охлаждали и инокулировали двумя дисками диаметром 5 мм, вырезанными из предварительно выращенных на КСА чистых культур грибов. Неинокулированные зерна использовали в качестве контроля. В течение двух недель колбы инкубиро-

Таблица 2. Референсные штаммы *Fusarium* spp., включенные в филогенетический анализ

Вид	Номер штамма	Происхождение	Субстрат	Год	Номер последовательности в GenBank		
					<i>tef</i>	<i>tub</i>	<i>rpb2</i>
<i>F. acutatum</i>	CBS 402.97 T	Индия		1995	MW402125	MW402323	MW402768
<i>F. acutatum</i>	NRRL 13308	Индия		1985	AF160276	MW402348	MN193883
<i>F. agapanthi</i>	NRRL 54463 T	Австралия	<i>Agapanthus</i> sp.	2010	KU900630	KU900635	KU900625
<i>F. agapanthi</i>	NRRL 54464	Австралия	<i>Agapanthus</i> sp.	2010	MN193856	KU900637	KU900627
<i>F. aglaonematis</i>	ZHKUCC 22-0077 T	Китай	<i>Aglaonema modestum</i> , стебель	2020	ON330437	ON330440	ON330443
<i>F. aglaonematis</i>	ZHKUCC 22-0078	Китай	<i>Aglaonema modestum</i> , стебель	2020	ON330438	ON330441	ON330444
<i>F. anthophilum</i>	CBS 119859	Новая Зеландия	<i>Cymbidium</i> sp., листья		MN533991	MN534092	MN534233
<i>F. anthophilum</i>	CBS 222.76 T	Германия	<i>Euphorbia pulcherrima</i> , стебель		MW402114	MW402312	MW402811
<i>F. concentricum</i>	CBS 450.97 T	Коста-Рика	<i>Musa sapientum</i> , плод	1983	AF160282	MW402334	JF741086
<i>F. concentricum</i>	CBS 453.97	Гватемала	<i>Musa sapientum</i>	1996	MN533998	MN534123	MN534264
<i>F. elaeagni</i>	LC 13627 T	Китай	<i>Elaeagnus pungens</i>	2017	MW580466	MW533748	MW474412
<i>F. elaeagni</i>	LC 13629	Китай	<i>Elaeagnus pungens</i>	2017	MW580468	MW533750	MW474414
<i>F. erosum</i>	LC 15877 T	Китай	кукуруза, стебель	2021	OQ126066	OQ126321	OQ126518
<i>F. erosum</i>	LC 18581	Китай	кукуруза, початок	2021	OQ126067	OQ126320	OQ126519
<i>F. fujikuroi</i>	CBS 221.76 T	Тайвань	<i>Oryza sativa</i> , стебель	1973	MN534010	MN534130	KU604255
<i>F. fujikuroi</i>	CBS 257.52	Япония	<i>Oryza sativa</i> , проросток	1947	MW402119	MW402317	MW402812
<i>F. globosum</i>	CBS 428.97 T	ЮАР	<i>Zea mays</i> , семена	1992	KF466417	MN534124	KF466406
<i>F. globosum</i>	CBS 120992	ЮАР	<i>Zea mays</i> , семена	1992	MW401998	MW402198	MW402788
<i>F. hechiense</i>	LC 13644 T	Китай	<i>Musa nana</i>	2017	MW580494	MW533773	MW474440
<i>F. hechiense</i>	LC 13646	Китай	<i>Musa nana</i>	2017	MW580496	MW533775	MW474442
<i>F. lumajangense</i>	InaCCF 872 T	Индонезия	<i>Musa acuminata</i> , стебель	2014	LS479441	LS479433	LS479850
<i>F. lumajangense</i>	InaCCF 993	Индонезия	<i>Musa acuminata</i> , стебель	2014	LS479442	LS479434	LS479851
<i>F. mangiferae</i>	CBS 120994 T	Израиль	<i>Mangifera indica</i>	1993	MN534017	MN534128	MN534271
<i>F. mangiferae</i>	NRRL 25226	Индия	<i>Mangifera indica</i>		AF160281	U61561	HM068353
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 744.97	США	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1994	AF160312	U34424	LT575065

Таблица 2 (продолжение).

Вид	Номер штамма	Происхождение	Субстрат	Год	Номер последовательности в GenBank		
					<i>tef</i>	<i>tub</i>	<i>rpb2</i>
<i>F. nygamai</i>	NRRL 13448 T	Австралия	<i>Sorghum bicolor</i>	1980	AF160273	U34426	EF470114
<i>F. nygamai</i>	CBS 834.85	Индия	<i>Cajanus cajan</i>		MW402154	MW402355	MW402821
<i>F. panlongense</i>	LC 13656 T	Китай	<i>Musa nana</i>	2017	MW580510	MW533789	MW474456
<i>F. panlongense</i>	MUCL 55950	Китай	<i>Musa</i> sp.	2012	LT574905	LT575070	LT574986
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22944	Германия	<i>Cymbidium</i> sp.	1994	AF160280	U34416	JX171617
<i>F. proliferatum</i>	ITEM 2287	Италия			LT841245	LT841243	LT841252
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 31071	США	пшеница	2001	AF291058	AF291055	
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 32155	Индия	<i>Cicer arietinum</i>		FJ538242		
<i>F. proliferatum</i>	CBS 131570	Иран	пшеница		JX118976		JX162521
<i>F. sacchari</i>	CBS 223.76 T	Индия	<i>Saccharum officinarum</i>	1975	MW402115	MW402313	JX171580
<i>F. sacchari</i>	CBS 131372	Австралия	<i>Oryzae australiensis</i> , стебель	2009	MN534033	MN534134	MN534293
<i>F. sanyaense</i>	LC 15882 T	Китай	кукуруза, стебель	2021	OQ126093	OQ126322	OQ126547
<i>F. sanyaense</i>	LC 18540	Китай	кукуруза, стебель	2021	OQ126095	OQ126308	OQ126549
<i>F. siculi</i>	CBS 142222 T	Италия	<i>Citrus sinensis</i>	2015	LT746214	LT746346	LT746327
<i>F. siculi</i>	CPC 27189	Италия	<i>Citrus sinensis</i>		LT746215	LT746347	LT746328
<i>F. sterilihyposum</i>	NRRL 53991	Бразилия	<i>Mangifera indica</i>	2009	GU737413	GU737305	
<i>F. sterilihyposum</i>	NRRL 53997	Бразилия	<i>Mangifera indica</i>	2009	GU737414	GU737306	
<i>F. subglutinans</i>	CBS 536.95				MW402139	MW402339	
<i>F. subglutinans</i>	CBS 136481	Италия	кровь человека		MW402059	MW402258	MW402748
<i>F. verticillioides</i>	NRRL 22172	Германия	кукуруза	1992	AF160262	U34413	EF470122
<i>F. verticillioides</i>	CBS 531.95		<i>Zea mays</i>		MW402136	MW402336	MW402771
<i>F. xylaroides</i>	NRRL 25486 T	Кот-д'Ивуар	<i>Coffea</i> sp., ствол	1951	AY707136	AY707118	JX171630
<i>F. xylaroides</i>	CBS 749.79	Гвинея	<i>Coffea robusta</i>	1963	MN534049	MN534143	MN534259

Примечание. CBS – номер штамма в коллекции Института грибного биоразнообразия Вестердейк (Утрехт, Нидерланды); InaCCF – номер штамма в коллекции культур Индонезийского научно-исследовательского центра биологии (Чибинонг, Индонезия); ITEM – номер штамма в коллекции культур Института пищевых производств (Бари, Италия); LC – номер штамма в коллекции культур лаборатории Dr. Lei Cai Института микробиологии Китайской академии наук (Пекин, Китай); MUCL – номер штамма в коллекции лаборатории микологии Лувенского католического университета (Оттиньи-Лувен-ла-Нев, Бельгия); NRRL – номер штамма в коллекции Службы сельскохозяйственных исследований (Пеория, США); ZHКУСС – номер штамма в коллекции культур Чжункайского университета сельского хозяйства и инженерии (Гуанчжоу, Китай); T – типовой штамм вида.

вали в темноте при 25°C, ежедневно встряхивая. Затем образцы высушивали при 55°C в течение 24 ч, измельчали на лабораторной мельнице (ИКА, Германия) при 25000 об/мин в течение 1 мин и хранили при -20°C.

Профиль вторичных токсичных метаболитов, продуцируемых грибами, определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС [41]. К 5 г рисовой муки добавляли 20 мл экстракционного растворителя (ацетонитрил/вода/уксусная кислота, 79 : 20 : 1). Обнаружение и количественное определение вторичных метаболитов выполняли на системе AB SCIEX Triple Quad™ 5500 MS/MS (Applied Biosystems, США), оснащенной источником ионизации с электрораспылением 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).

В экстрактах анализировали содержание БОВ, МОН, ФВ₁, ФВ₂ и ФВ₃. Степень извлечения микотоксинов составила 79–105%. Количество микотоксинов определяли, сравнивая площади пиков с калибровочными кривыми, полученными с использованием стандартных растворов (Romer Labs Diagnostic GmbH, Австрия). Нижние пределы количественного определения БОВ и МОН составили 1.9 и 3.1 мкг/кг, а ФВ₁, ФВ₂ и ФВ₃ – 8.7, 3.2 и 3.2 мкг/кг соответственно.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ MS Excel 2010 и Minitab 17.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов

В филогенетический анализ вошли комбинированные последовательности (1913 п.н.) трех локусов: *tef* – 615 п.н., *tub* – 473 п.н. и *rpb2* – 825 п.н., число информативных сайтов в которых составило 154 п.н. (25.0%), 70 п.н. (14.8%) и 141 п.н. (17.1%) соответственно. Все 12 штаммов вошли в отдельную кладу с бутстреп-поддержкой ML/BP 94/1.0, также включающую пять референсных штаммов *F. proliferatum* (рис. 2). Клада *F. proliferatum* распределялась среди азиатской группы видов FF, топология филогенетических деревьев, построенных разными методами, была сходной и соответствовала реконструированной ранее [1]. Полученное филогенетическое дерево показывает генетическое разнообразие *F. proliferatum*: анализируемые и референсные штаммы внутри клады распределились в несколько групп, состав которых не связан с географиче-

ским или субстратным происхождением штаммов. Сходное разделение *F. proliferatum* на группы, обусловленное высокой внутривидовой изменчивостью этого вида гриба, не связанное с происхождением штаммов, отмечали и ранее [8, 42, 43].

С помощью специфичной ПЦР установлено, что в генотипе каждого штамма *F. proliferatum* присутствует только одна идиоморфа в МАТ-локусе, а соотношение МАТ1-1 и МАТ1-2 идиоморф у анализируемых штаммов составило 8 : 4. Причем у штаммов, выделенных из кукурузы, МАТ-локус представлен только идиоморфой МАТ1-2, тогда как у штаммов, выделенных из овса, – только МАТ1-1. В штаммах, выделенных из пшеницы, найдены разные аллели МАТ-локуса – соотношение МАТ1-1 к МАТ1-2 составило 4 : 2.

Очевидно, несбалансированная встречаемость штаммов *F. proliferatum* с альтернативным типом спаривания в популяции гриба сказывается на уменьшении частоты формирования половой стадии в природе, что снижает его генетическую изменчивость, а также, как следствие, на адаптации патогена к изменяющимся условиям окружающей среды. Ранее показали, что соотношение штаммов *F. proliferatum*, выделенных из культурных растений, имеющих разные идиоморфы в МАТ-локусе, может варьировать [8, 42]. Однако штаммы *F. proliferatum*, выделенные из зерна твердой пшеницы в Аргентине, характеризовались равной частотой альтернативных аллелей МАТ-локуса, что позволило прогнозировать высокую вероятность обнаружения половой стадии гриба на полях пшеницы [42].

Профиль микотоксинов, продуцируемых *F. proliferatum*

В экстрактах, полученных из инокулированных зерен риса, выявлены все пять анализируемых микотоксинов – БОВ, МОН и ФВ₁, ФВ₂, ФВ₃, тогда как в исходном автоклавированном зерне риса эти соединения не обнаружены.

Все штаммы *F. proliferatum* были активными продуцентами ФУМ (суммарное количество трех микотоксинов составило 100–9424 мг/кг), из которых наиболее представленным был ФВ₁ (53–82% от суммы ФУМ), количества других были ниже – ФВ₂ (9–28%), ФВ₃ (2–39%). Штамм MFG 58590, выделенный из зерна овса из Приморского края, продуцировал наибольшее количество всех ФУМ. У двух штаммов – MFG 92501 и MFG 60803 – суммарное количество ФВ₁, ФВ₂, ФВ₃ составило 100 и 135 мг/кг, что значимо ниже, чем у других штаммов – 1077–7077 мг/кг (рис. 3).

Все штаммы *F. proliferatum* также продуцировали сходные высокие количества

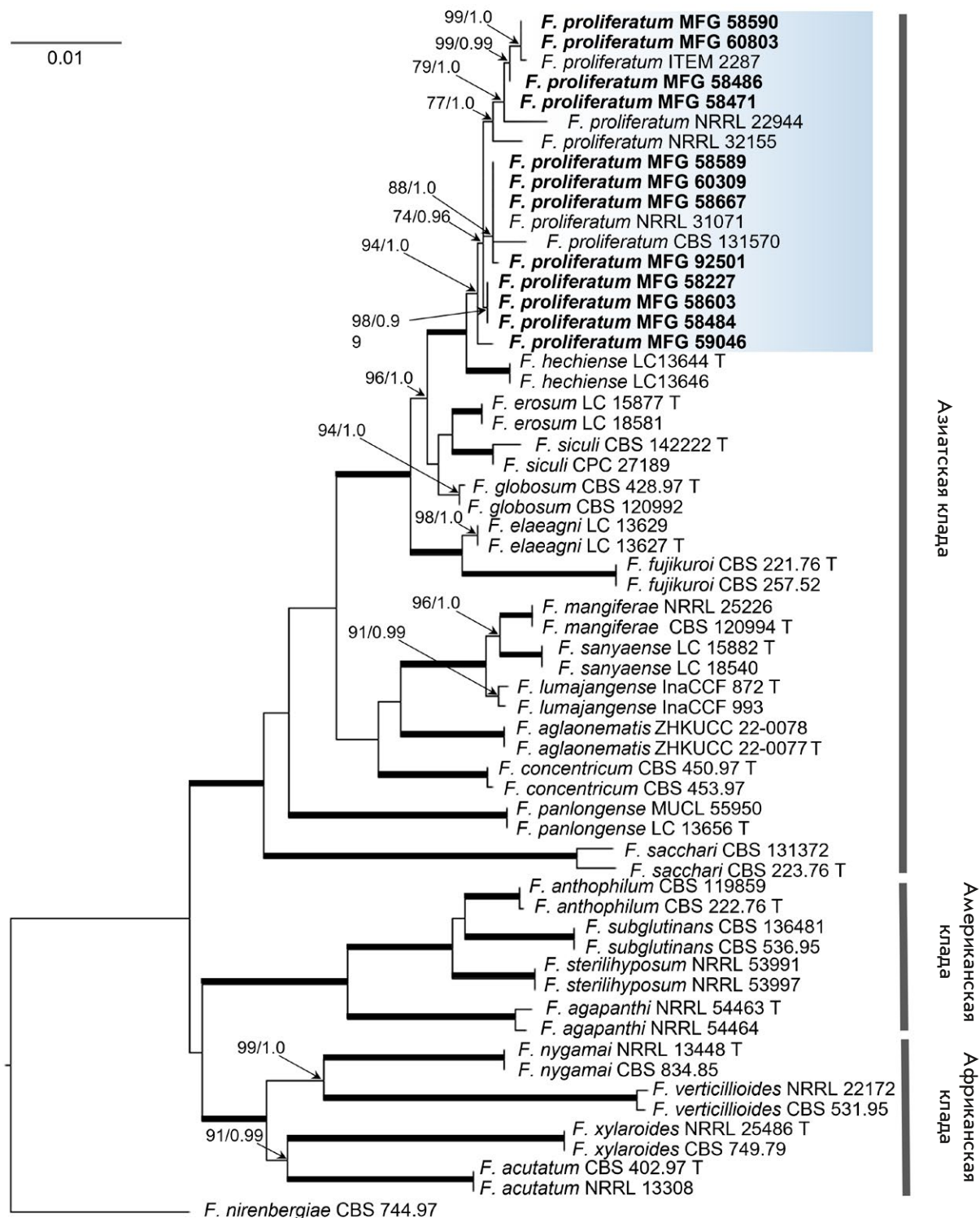


Рис. 2. Дендрограмма филогенетического сходства *Fusarium* spp., построенная на основе комбинированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *tef*, *tub* и *rpb2* методом ML. В узлах приведены значения бутстреп-поддержки (> 70%) при анализе методом ML, а также значения BP (> 0.95). Утолщенные линии обозначают поддержку ML/BP 100/1.0. Полуужирным шрифтом показаны штаммы из коллекции MFG, включенные в исследование. Штамм *F. nirenbergiae* CBS 744.97 выбран в качестве внешней группы

БОВ – от 64 до 455 мг/кг. Продукция МОН была существенно ниже, чем четырех других микотоксинов, и варьировала – от 12 до 6565 мкг/кг. В профиле микотоксинов штамма MFG 92501 МОН не выявлен.

Преобладание ФВ₁ по сравнению с другими ФУМ характерно для профиля микотоксинов *F. proliferatum* независимо от субстратного происхождения штаммов [12, 37, 38, 44]. В нашем исследовании не выявлено значимого влияния субстратного происхождения штамма на его способность к токсинообразованию (табл. 3). Известно, что на рост *F. proliferatum* и его способность продуцировать ФУМ влияет множество абиотических и биотических факторов [45–47]. Широкий спектр растений-хозяев *F. proliferatum* указывает на его высокие адаптационные способности, в том числе за счет синтезируемых вторичных метаболитов. Установлено, что способность продуцировать микотоксины не связана с растением-хозяином, из которого выделен *F. proliferatum* [23]. Заражение пшеницы штаммами этого гриба, выделенными из разных хозяев, приводило к накоплению в зерне ФВ₁ и БОВ [23], несмотря на то что изначально они различались по активности токсинообразования, и выявленное количество ФВ₁ в зараженных зернах пшеницы оказалось намного ниже, чем обычно встречается в кукурузе. Ранее показали, что у штаммов *F. proliferatum*, выделенных из зерна кукурузы, признак образования ФВ₁ оказался более вариабельным, чем у штаммов из зерна пшеницы [36]. Представление о роли ФУМ, в частности ФВ₁, как фактора патогенности *F. proliferatum* до сих пор противоречиво [48]. У грибов *Fusarium*, продуцентов ФУМ, выявлен кластер генов (*FUM*), ответственных за биосинтез этих микотоксинов [1, 11]. Показано, что гены *FUM1*, *FUM6*, *FUM8* и *FUM21*, в отличие от *FUM19*, необходимы для синтеза ФУМ штаммами *F. proliferatum*. Делеция этих генов приводит не только к утрате способности синтезировать микотоксины, но и к уменьшению агрессивности штаммов в отношении растения-хозяина [49]. В то же время недавно установили, что штаммы *F. proliferatum*, выделенные из чеснока, могли продуцировать ФУМ *in vitro*, но не обязательно продуцировали их *in planta*

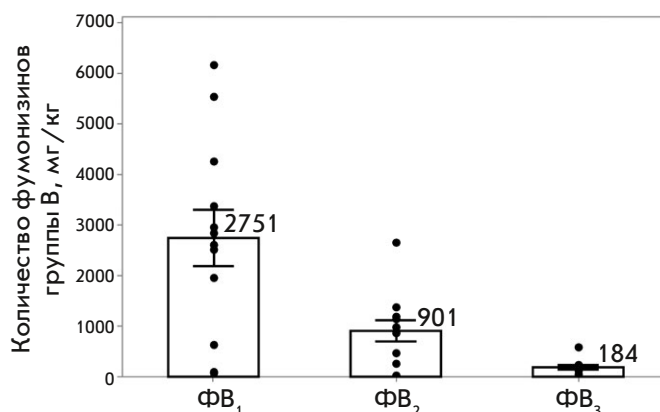


Рис. 3. Способность штаммов *F. proliferatum* продуцировать ФУМ (автоклавированный рис, 25°C, 14 сут, без освещения). Показаны средние значения и доверительные интервалы при уровне значимости $p < 0.05$; точками отмечены значения для индивидуальных штаммов

[38]. Кроме того, при колонизации растения гриб подвергается воздействию метаболитов хозяина, которые также могут влиять на синтез и количество продуцируемых микотоксинов [50]. До сих пор, несмотря на присутствие *F. proliferatum* в микобиоте пшеницы, ячменя и овса, выращенных на территории Евразии, обнаружение высоких количеств ФУМ в зерне этих злаков является нетипичной ситуацией, в отличие от частой контаминации их БОВ и реже МОН [30, 51, 52]. Предположительно, зерно пшеницы, в сравнении с кукурузой, является менее благоприятным субстратом для накопления ФУМ [23, 44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Филогенетический анализ штаммов *F. proliferatum*, выделенных из трех зерновых культур, выращенных на территории РФ, показал значительную внутривидовую гетерогенность гриба, не связанную с географическим и субстратным происхождением штаммов. Несбалансированная встречаемость штаммов *F. proliferatum* различного типа спаривания, вероятно, приводит к снижению роли полового процесса в жизненном цикле этого гетероталлического гриба. Высокая токсинопродуцирующая способность *F. proliferatum*

Таблица 3. Токсинопродуцирующая способность штаммов *F. proliferatum*, выделенных из разных зерновых культур

Растение-хозяин (число штаммов)	Микотоксины*		
	ФУМ, мг/кг	БОВ, мг/кг	МОН, мкг/кг
Пшеница (6)	3470 ± 1008	307 ± 67	1690 ± 764
Овёс (4)	4024 ± 1930	385 ± 43	260 ± 158
Кукуруза (2)	3538; 5578	363; 158	1041; 6565

*Приведены средние значения и доверительный интервал при уровне значимости $p < 0.05$.

в совокупности с благоприятными факторами предполагает риск контаминации зерна микотоксинами и необходимость мониторинга загрязнения. ●

Работа выполнена при поддержке
Российского научного фонда
(проект № 19-76-30005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yilmaz N., Sandoval-Denis M., Lombard L., Visagie C.M., Wingfield B.D., Crous P.W. // *Persoonia*. 2021. V. 46. P. 129–162.
2. Leslie J.F. // *Canadian J. Botany*. 1995. V. 7. P. 282–291.
3. O'Donnell K., Nirenberg H.I., Aoki T., Cigelnik E. // *Mycoscience*. 2000. V. 41. P. 61–78.
4. Kvas M., Marasas W.F.O., Wingfield B.D., Wingfield M.J., Steenkamp E.T. // *Fungal Diversity*. 2009. V. 34. P. 1–21.
5. Wigmann E.F., Behr J., Vogel R.F., Niessen L. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 5323–5337.
6. Brown D.W., Proctor R.H. // *Fungal Genetics Biol.* 2016. V. 89. P. 37–51.
7. Niehaus E.-M., Münsterkötter M., Proctor R.H., Brown D.W., Sharon A., Idan Y., Oren-Young L., Sieber C. M., Novák O., Pěňčík A., et al. // *Genome Biol. Evol.* 2016. V. 8. № 11. P. 3574–3599.
8. Jurado M., Marín P., Callejas C., Moretti A., Vázquez C., González-Jaén M.T. // *Food Microbiol.* 2010. V. 27. № 1. P. 50–57.
9. Proctor R.H., van Hove F., Susca A., Stea G., Busman M., van der Lee T., Waalwijk C., Moretti A., Ward T.J. // *Mol. Microbiol.* 2013. V. 90. № 2. P. 290–306.
10. Stępień L., Koczyk G., Waśkiewicz A. // *Fungal Biol.* 2011. V. 115. № 2. P. 112–123.
11. Proctor R.H., Desjardins A.E., Moretti A. The role of plant pathology in food safety and food security / Eds Strange R., Gullino M. Dordrecht: Springer, 2010. V. 3. P. 97–111.
12. Qiu J., Lu Y., He D., Lee Y.W., Ji F., Xu J., Shi J. // *Plant Disease*. 2020. V. 104. № 8. P. 2193–2201.
13. Yu H., Hwang S.F., Strelkov S.E. // *Pathogens*. 2024. V. 13. № 5. P. 407.
14. Mondani L., Chiusa G., Pietri A., Battilani P. // *Postharvest Biol. Technol.* 2021. V. 173. Art. 111407.
15. Xie L., Wu Y., Duan X., Li T., Jiang Y. // *Microbiol. Res.* 2022. V. 256. Art. 126952.
16. Duan Y.N., Jiang W.T., Zhang R., Chen R., Chen X.S., Yin C.M., Mao Z.Q. // *Plant Dis.* 2022. V. 106. № 11. P. 2958–2966.
17. López-Moral A., Antón-Domínguez B.I., Lovera M., Arquerro O., Trapero A., Agustí-Brisach C. // *Sci. Repts.* 2024. V. 14. Art. 5720.
18. Gaige A.R., Todd T., Stack J.P. // *Plant Dis.* 2020. V. 104. № 8. P. 2102–2110.
19. Koo Y.M., Ahsan S.M., Choi H.W. // *Mycobiology*. 2023. V. 51. № 3. P. 186–194.
20. Munkvold G.P. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2003. V. 109. P. 705–713.
21. Desjardins A.E., Busman M., Proctor R.H., Stessman R. // *Food Addit. Contam. Part A*. 2007. V. 24. № 10. P. 1131–1137.
22. Molnár O. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2016. V. 146. P. 699–703.
23. Guo Z., Pfohl K., Karlovsky P., Dehne H.W., Altincicek B. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 9. Art. e0204602.
24. Gaige A.R., Giraldo M., Todd T., Stack J.P. // *Canadian J. Plant Pathol.* 2019. V. 41. № 2. P. 242–250.
25. Booth C. The genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.
26. Martin S.H., Wingfield B.D., Wingfield M.J., Steenkamp E.T. // *Fungal Genet. Biol.* 2011. V. 48. P. 731–740.
27. Leslie J.F., Klein K.K. // *Genetics*. 1996. V. 144. P. 557–567.
28. Stankovic S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A., Moretti A. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2007. V. 118. P. 165–172.
29. Guo Z., Pfohl K., Karlovsky P., Dehne H.-W., Altincicek B. // *Agricult. Food Sci.* 2016. V. 25. P. 138–145.
30. Senatore M.T., Prodi A., Tini F., Balmas V., Infantino A., Onofri A., Cappelletti E., Oufensou S., Sulyok M., Covarelli L. // *J. Sci. Food Agriculture*. 2023. V. 103. № 9. P. 4503–4521.
31. Stanković S., Lević J., Krnjaja V. // *Biotechnol. Animal Husbandry*. 2011. V. 27. № 3. P. 631–641.
32. Cendoya E., Chiotta M.L., Zachetti V., Chulze S.N., Ramirez M.L. // *J. Cereal Sci.* 2018. V. 80. P. 158–166.
33. Kononenko G.P., Burkin A.A., Zotova Ye.V. // *Veterinary Sci. Today*. 2020. V. 2. P. 139–145.
34. Kamle M., Mahato D.K., Devi S., Lee K.E., Kang S.G., Kumar P. // *Toxins*. 2019. V. 11. № 6. Art. 328.
35. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Зотова Е.В., Смирнов А.М. // *Рос. сельскохозяй. наука*. 2019. № 3. С. 28–31.
36. Tancic S., Stankovic S., Levic J., Krnjaja V., Vukojevi J. // *Genetica*. 2012. V. 44. № 1. P. 163–176.
37. Gálvez L., Urbaniak M., Waśkiewicz A., Stępień Ł., Palmero D. // *Food Microbiol.* 2017. V. 67. P. 41–48.
38. Gasser K., Sulyok M., Spangl B., Krska R., Steinkellner S., Hage-Ahmed K. // *Postharvest Biol. Technol.* 2023. V. 200. Art. 112312.
39. O'Donnell K., Laraba I., Geiser D.M. *Fusarium wilt. Methods in molecular biology*. New York: Humana, 2022. P. 1–20.
40. Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Coutinho T.A., Zeller K.A., Wingfield M.J., Marasas W.F.O., Leslie J.F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 4378–4382.
41. Malachová A., Sulyok M., Beltrán E., Berthiller F., Krska R. // *J. Chromatography A*. 2014. V. 1362. P. 145–156.
42. Palacios S.A., Susca A., Haidukowski M., Stea G., Cendoya E., Ramírez M.L., Chulze S.N., Farnochi M.C., Moretti A., Torres A.M. // *Internat. J. Food Microbiol.* 2015. V. 201. P. 35–41.
43. Wang L., Liu Q., Ge S., Liang W., Liao W., Li W., Jiao G., Wei X., Shao G., Xie L., et al. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 1004454.
44. Busman M., Desjardins A.E., Proctor R.H. // *Food Addit. Contam. Part A*. 2012. V. 29. № 7. P. 1092–1100.
45. Cendoya E., Pinson-Gadais L., Farnochi M.C., Ramirez M.L., Chéreau S., Marcheguy G., Ducos C., Barreau C., Richard-Forget F. // *Internat. J. Food Microbiol.* 2017. V. 253. P. 12–19.
46. Vismer H.F., Shephard G.S., van der Westhuizen L., Mngqawa P., Bushula-Njah V., Leslie J.F. // *Internat. J. Food Microbiol.* 2019. V. 296. P. 31–36.
47. Dong T., Qiao S., Xu J., Shi J., Qiu J., Ma G. // *Toxins*. 2023. V. 15. № 4. Art. 260.
48. Xie L., Wu Y., Wang Y., Jiang Y., Yang B., Duan X., Li T. // *Environ. Poll.* 2021. V. 288. Art. 117793.
49. Sun L., Chen X., Gao J., Zhao Y., Liu L., Hou Y., Wang L., Huang S. // *Toxins*. 2019. V. 11. № 6. Art. 327.
50. Łalak-Kańczugowska J., Witaszak N., Waśkiewicz A., Bocianowski J., Stępień Ł. // *Internat. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 3. Art. 3002.
51. Fraeyman S., Croubels S., Devreese M., Antonissen G. // *Toxins*. 2017. V. 9. № 7. Art. 228.
52. Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Orina A.S., Gogina N.N. // *Dokl. Biol. Sci.* 2023. V. 508. № 1. P. 9–19.