

Обзоры

УДК 632.4.01/.08:582.282.192.3:57.065:577.21

doi: 10.15389/agrobiologia.2016.3.275rus

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ТАКСОНОМИИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИХ ГРИБОВ РОДА *Fusarium*. УСПЕХИ И ПРОБЛЕМЫ*

(обзор)

А.А. СТАХЕЕВ¹, Л.В. САМОХВАЛОВА¹, Д.Ю. РЯЗАНЦЕВ¹, С.К. ЗАВРИЕВ^{1, 2}

Аскомицетные рода *Fusarium*, выделенного в качестве отдельной таксономической группы в 1809 году Генрихом Фридрихом Линком (Heinrich Friedrich Link), распространены по всему миру и занимают различные экологические ниши. Их обнаруживают в почве и растениях в качестве эндофитов, сапротрофов либо паразитов. Заболевания сельскохозяйственных культур, вызванные представителями рода *Fusarium*, ежегодно наносят существенный ущерб, выражаемый сотнями миллионов долларов. Помимо снижения урожая и ухудшения его качества, опасность заражения культурных растений возбудителями фузариоза обусловлена их способностью продуцировать токсические метаболиты (фузариотоксины). В 1930-1940-х годах потребление перезимовавшего в поле зерна, содержащего фузариотоксины, привело к гибели десятков тысяч людей в Поволжье и на Урале. Приведенные факты делают необходимым тщательное изучение морфологии, биохимии и генетики этих организмов. На сегодняшний день не существует универсальной таксономической системы рода *Fusarium*, поэтому во многих случаях идентифицировать штамм с точностью до вида затруднительно. Высокая изменчивость морфологических структур с одной стороны, и их сходство у близкородственных видов — с другой, создают огромные проблемы для исследователей, использующих классические методы идентификации и систематизации представителей этой группы. Все более важную роль в изучении разнообразия представителей рода *Fusarium* играют методы, основанные на применении ДНК-маркеров, позволяющие идентифицировать вид по характерной последовательности нуклеотидов его ДНК. Применение такого подхода дало возможность выявить целый ряд новых видов в составе рода. Так, в исследованиях Т. Yli-Mattila с соавт. (2009, 2011) использование мультилокусного филогенетического анализа позволило выделить в качестве новых видов *F. sibiricum* и *F. ussuriarum*, которые были обнаружены в Сибири и на Дальнем Востоке и морфологически сходны соответственно с *F. langsethiae* и *F. graminearum*. Авторами настоящей статьи с помощью ДНК-маркеров впервые на территории России идентифицирован вид *F. torulosum*, морфологически сходный с *F. avenaceum*. Не менее важно и то, что анализ меж- и внутривидового полиморфизма ДНК делает возможным создание высокоспецифичных систем молекулярной детекции грибов рода *Fusarium*, в том числе поражающих растения и синтезирующих токсины. Использование таких систем, например описанных М. Nicolaisen с соавт. (2009) или А.А. Стахеев с соавт. (2011), позволяет не только своевременно обнаружить заражение растений продуцентами микотоксинов, но и количественно оценить их содержание в пробе. В то же время ряд проблем остаются нерешенными: в частности, до сих пор идут споры о наиболее информативном и корректно отражающем эволюционную историю рода маркере; кроме того, использование различных концепций вида (морфологической, биологической, филогенетической) усложняет задачу создания единой универсальной таксономической системы рода. В настоящем обзоре обсуждаются основные достижения и проблемы филогенетики рода *Fusarium*, и перспективы использования молекулярно-генетического подхода в исследовании этой группы организмов.

Ключевые слова: род *Fusarium*, таксономия, ДНК-маркер, микотоксины, филогенетический анализ.

Род *Fusarium* выделен в отдельную таксономическую группу в 1809 году Г.Ф. Линком (Heinrich Friedrich Link) (1, 2). С тех пор было сделано много попыток создания единой универсальной системы рода, однако до сегодняшнего дня они не увенчались успехом. Долгое время в систематике рода *Fusarium* царил полный хаос: на определенном этапе сложилась ситуация, когда род включал более 1000 видов. Во многом такой беспорядок

* Работа поддержана средствами гранта РФФИ № 15-29-02527.

был обусловлен ошибочным представлением о том, что каждому виду гриба соответствует одно растение-хозяин (3), вследствие чего каждый новый выделенный изолят мог быть классифицирован как отдельный вид. Число видов в различных таксономических системах значительно варьировалось и составляло от 9 (4) до 78 (5), демонстрируя тем самым сложность классификации этой группы организмов, что во многом обусловлено высокой изменчивостью морфологических структур, затрудняющей установление стандартов видов и, как следствие, делающей таксономический статус многих представителей рода *Fusarium* спорным (6). Кроме того, с течением времени появлялись все новые данные, которые еще более усложняли трактовку: например, было обнаружено, что серповидно-веретеновидные конидии — признак, который был использован Г.Ф. Линком для выделения *Fusarium* в отдельный род, не может считаться чертой, типичной строго для указанной группы организмов. Кроме того, выявлено, что зачастую виды, сходные морфологически, демонстрируют значительные различия по генетическим и метаболическим характеристикам. В настоящее время очевидно следующее: идентификация, основанная исключительно на изучении и сравнении морфологических данных, зачастую не вполне корректна. Не в последнюю очередь это связано с так называемым человеческим фактором: далеко не все исследователи, занимающиеся определением грибов, обладают достаточной квалификацией и опытом. Комплекс всех перечисленных трудностей сделал необходимостью внедрение современных молекулярных методов в исследования таксономии, разнообразия грибов рода *Fusarium*, а также разработку новых подходов для быстрой и корректной диагностики зараженности растений этими опасными патогенами (3, 6).

На сегодняшний день можно выделить три основных концепции вида — морфологическую, биологическую и филогенетическую. Морфологическая основана на таких характеристиках, как форма и размер макроконидий, микроконидий, хламидоспор, тип конидиогенных клеток; также во внимание принимаются типы продуцируемых пигментов и вторичных метаболитов. Биологическая концепция базируется в первую очередь на данных экспериментов по скрещиванию штаммов. Применительно к роду *Fusarium* возможности использования такого подхода ограничены тем, что значительное число представителей указанной группы организмов в цикле развития не имеют половой стадии и размножаются исключительно бесполом путем (7-9). В то же время необходимо отметить, что биологическая концепция (в тех случаях, когда она применима) позволяет наиболее точно охарактеризовать границы видов, так как в ее основе лежат однозначные данные о возможности либо невозможности штаммов скрещиваться друг с другом и давать фертильное потомство (3, 10). В качестве примера использования биологической концепции можно привести изучение комплекса видов *Gibberella fujikuroi* (бесполовая стадия — *Fusarium fujikuroi*), в составе которого выделили девять видов (11-13). Основой филогенетической концепции вида служит сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов ДНК, что позволяет устанавливать родство таксонов и анализировать их эволюционную историю (14). Для изучения генетического полиморфизма на уровне различных таксономических групп используются либо методы произвольного маркирования ДНК, такие как случайная амплификация полиморфной ДНК (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (15, 16), а также ее вариант с использованием праймеров к микросателлитным последовательностям (inter simple sequence repeats, ISSR) (17), анализ полиморфизма длин фрагментов амплификации (amplification fragments lengths polymorphism, AFLP) (18, 19) либо анализ полиморфизма последовательностей с охарактеризованной структурой (sequence characterized

amplified regions, SCAR-маркеры) (3, 6, 20). К существенным недостаткам первой группы методов относится низкая воспроизводимость результатов (прежде всего применительно к RAPD), а также высокие требования к качеству и концентрации анализируемого образца ДНК. SCAR-маркеры в настоящее время рассматриваются как наиболее достоверные инструменты генетического маркирования, позволяющие в большинстве случаев однозначно идентифицировать организм по характерной последовательности нуклеотидов одного или нескольких локусов ДНК. При филогенетическом подходе часто используется понятие скрытого (cryptic) вида, который выделяется в качестве отдельного таксона исключительно на основе генетических различий (21, 22). Метод, применяемый для установления границ видов при мультилокусном филогенетическом анализе, называется филогенетическим распознаванием вида на основе генеалогического соответствия (genealogical concordance phylogenetic species recognition, GCPSR) (23). Сверхзадача филогенетического подхода — поиск универсального маркера (ДНК-штрихкода), анализ которого давал бы возможность охарактеризовать таксономический статус представителей широкой группы организмов (24). Примером штрихкода может служить ген субъединицы 1 митохондриальной цитохром С-оксидазы для представителей царства Животные (*Animalia* Linnaeus, 1758). В то же время к царству Грибы [*Fungi* (L., 1753) R.T. Moore, 1980] упомянутый маркер в целом слабо применим, хотя и был успешно использован для таксономических исследований рода *Penicillium*. Большинство исследователей считают внутренние транскрибируемые спейсеры рибосомальной ДНК (*ITS*) наиболее филогенетически информативным маркером для грибов (25). Однако ряд данных показывает, что для рода *Fusarium* филогенетический анализ указанных локусов не всегда объективно отражает эволюционную историю и таксономические отношения между видами. Одна из причин — тот факт, что у многих видов (например, комплекса *Fusarium fujikuroi*) спейсер *ITS2* представлен в двух неортологических копиях (3, 26). Таким образом, поиск высокоинформативных полиморфных маркеров, которые позволили бы однозначно определять таксономический статус представителей рода *Fusarium*, по-прежнему остается актуальной задачей (27-29).

За последние 10-15 лет опубликовано значительное число работ, посвященных изучению генетического полиморфизма у грибов рода *Fusarium* и представляющих результаты анализа ряда генов, кодирующих белки, а также участков, кодирующих рибосомальную РНК. Такие локусы, как гены фактора элонгации трансляции 1 альфа (*tefla*) (30), бета-тубулина (*β -tub*) (31), фосфатпермеазы (*PHO*) (32, 33), стерол-14-деметилазы (*CYP51C*) (19), аминоксипат-редуктазы (*lys2*) (20, 21), межгенные спейсеры рибосомальной РНК (*IGS*) (22), а также ряд генов, вовлеченных в каскады синтеза токсических соединений, продемонстрировали высокий меж- и внутривидовой полиморфизм и могут успешно применяться в филогенетических исследованиях рода. В настоящее время наиболее информативным локусом для филогенетического анализа представителей рода *Fusarium* считается ген *tefla*, который по свойствам наиболее близок к определению ДНК-штрихкода. Создана база данных (FUSARIUM-ID v. 1.0) (23), составленная из фрагментов гена *tefla* с установленной последовательностью нуклеотидов, использование которой во многих случаях ускоряет и упрощает идентификацию неизвестного штамма. Проблемой остается слабая представленность последовательностей некоторых групп видов в базе, а также не всегда корректная первоначальная идентификация штаммов, что ведет к путанице при соотнесении последовательности с тем или иным видом.

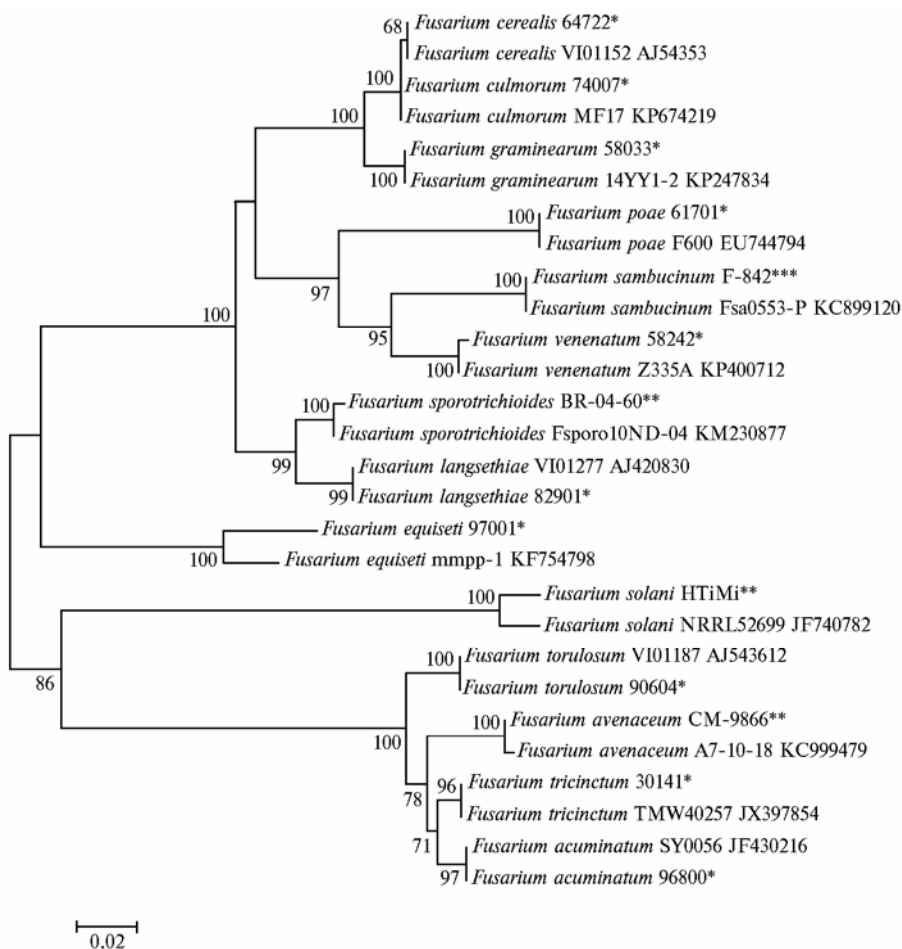
Определенные сложности при мультилокусном филогенетическом

анализе создаются различиями в эволюционной истории разных генов. Примером может служить ген фосфатпермеазы (*PHO*), который был использован для исследований таксономии нескольких групп возбудителей фузариоза. Так, в работе J.B. Scott и S. Chakraborty (40) ген *PHO* был успешно применен в качестве маркера для выделения *F. pseudograminearum* в отдельный вид. Позднее (33) ген *PHO* использовался в рамках четырехлокусного анализа, позволившего выделить ряд изолятов из Сибири и Дальнего Востока, первоначально охарактеризованных как *F. poae*, в отдельный филогенетический вид *F. sibiricum*. В то же время ген *PHO* не обладал достаточным полиморфизмом для того, чтобы дифференцировать *F. culmorum* от близкородственного *F. cerealis* (41). Авторы настоящей статьи использовали *PHO* в качестве маркера для исследования внутри- и межвидового полиморфизма группы видов (*F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. torulosum*), продуцирующих токсины энниатиновой группы, а также монилиформин (32). Было показано, что для этой группы видов *PHO* характеризуется более высокой вариабельностью, чем «классические» маркеры, такие как *tef1α*, *β-tub*, или ген энниатин синтетазы (*Esyn1*). Филогенетический анализ штаммов *F. avenaceum* из разных регионов России с использованием последовательностей гена *PHO* продемонстрировал, что четыре из них формируют независимый кластер, филогенетически более близкий к виду *F. torulosum*, чем к *F. avenaceum*, и условно названный *F. avenaceum*-V. Вероятно, такая группа штаммов может рассматриваться как отдельный филогенетический вид, однако этот факт не был подтвержден при анализе других маркеров и требует дальнейшего изучения. В то же время нами не выявлена корреляция между филогенией исследуемых штаммов и их делением на условные группы I и II, предложенным Т. Yli-Mattila с соавт. (31, 38). Кроме того, применение этого комплекса маркеров не позволило выделить штамм, идентифицированный как *F. arthrosporioides*, в отдельный таксон, отличный от *F. avenaceum*, подтвердив тем самым гипотезу о том, что *F. arthrosporioides* не является отдельным видом. Еще одним примером различной эволюционной истории может служить ген аминокислот-редуктазы (*lys2*). Было показано (35, 36), что ген *lys2* филогенетически более информативен, чем ряд традиционных маркеров, однако топология филогенетического дерева, построенного на основе сравнительного анализа последовательностей *lys2*, существенно отличалась от топологии дендрограмм, полученных с другими генами. Возможное решение такого рода проблем заключается в использовании мультилокусного анализа с сочетанием нескольких генов, что позволяет сглаживать возможные различия в механизмах эволюции и степени полиморфизма анализируемых локусов и получать картину, максимально близкую к объективной (42, 43).

Несмотря на все сложности, использование молекулярных маркеров внесло существенный вклад в исследования биологии и таксономии грибов рода *Fusarium*. Примеры этого — выделение новых таксономических групп в составе рода, таких как уже упомянутые выше *F. sibiricum* и *F. pseudograminearum*, а также *F. ussurianum* (44). Кроме того, применение комплекса ДНК-маркеров позволило выявить девять филогенетических видов в составе вида *F. graminearum* (45). Филогенетический анализ на основе последовательностей гена *tef1α* позволил выделить два кластера (североевропейский и южноевропейский) в составе вида *F. equiseti* (46). Также были обнаружены новые таксономические группы в составе комплексов видов *F. fujikuroi* и *F. solani* (3).

Изучение генетического полиморфизма российской популяции возбудителей фузариоза и разработка соответствующих маркеров позволили

впервые идентифицировать на территории России вид *F. torulosum* (47), морфологически сходный с *F. avenaceum*. Кроме того, была уточнена видовая идентификация штаммов рода *Fusarium* из всероссийских коллекций — Всероссийской коллекции микроорганизмов (на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино), коллекций Всероссийского НИИ защиты растений (ВИЗР, г. Санкт-Петербург) и Всероссийского НИИ фитопатологии (ВНИИФ, Московская обл.). Молекулярно-генетический подход сделал возможной оценку родства между видами, которое представлялась неочевидным при анализе морфологических признаков. В качестве примера можно привести вид *F. tricinctum*, традиционно рассматриваемый в качестве близкородственного видам *F. sporotrichioides* и *F. poae* и относимый к секции *Sporotrichiella* (48–50). В то же время *F. tricinctum* — продуцент таких токсических метаболитов, как энниатины и монилиформин, что отличает его от *F. sporotrichioides* и *F. poae*, секретирующих в основном микотоксины трихотеценовой группы. По этому признаку *F. tricinctum* близок к видам *F. avenaceum* и *F. acuminatum*, относимых соответственно к секциям *Roseum* и *Gibbosum* (51). Филогенетический анализ с использованием нескольких генов подтвердил близкое родство *F. tricinctum*, *F. avenaceum* и *F. acuminatum*.



Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа частичных последовательностей нуклеотидов гена *tef1a* штаммов 14 видов грибов рода *Fusarium* из всероссийских коллекций, а также последовательностей, депонированных в GenBank NCBI (National Center for Biotechnological Information, США). Для построения дендрограммы использовался алгоритм

присоединения соседней (neighbor joining) в программе MEGA5. Показаны значения бутстрэпа более 50 %. Для последовательностей, депонированных в GenBank, приведены accession numbers. Одна, две и три звездочки — соответственно штаммы из коллекции Всероссийского НИИ защиты растений (ВИЗР, г. Санкт-Петербург), Всероссийского НИИ фитопатологии (ВНИИФ, Московская обл.) и Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, г. Пушкино).

На рисунке представлено дерево, построенное на основании филогенетического анализа частичных последовательностей гена *teflα* для 14 видов рода *Fusarium* из всероссийских коллекций, расшифрованных авторами настоящей статьи, и последовательностей, депонированных в GenBank NCBI (National Center for Biotechnological Information, США; номера коллекционных штаммов приведены в таблице). Обращает на себя внимание тот факт, что виды кластеризуются в четком соответствии с профилями синтезируемых ими микотоксинов: продуценты трихотеценовых токсинов типа А (*F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*); продуценты трихотеценовых токсинов типа В (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, а также виды, преимущественно продуцирующие В-трихотецены, — *F. poae*, *F. venenatum*, *F. sambucinum*); продуценты токсинов энниатиновой группы и монилиформина (*F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. torulosum*).

Штаммы грибов рода *Fusarium* из всероссийских коллекций, использованные для филогенетического анализа

Штамм	Вид	Происхождение	Растение-хозяин
96800 ¹	<i>F. acuminatum</i>	Северная Осетия	Пшеница
СМ-9866 ²	<i>F. avenaceum</i>	Смоленская обл.	Пшеница
64722 ¹	<i>F. cerealis</i>	Хабаровский край	Пшеница
74007 ¹	<i>F. culmorum</i>	Архангельская обл.	Картофель
97001 ¹	<i>F. equiseti</i>	Северная Осетия	Пшеница
58033 ¹	<i>F. graminearum</i>	Ленинградская обл.	Ячмень
82901 ¹	<i>F. langsethiae</i>	Орловская обл.	Овес
61701 ¹	<i>F. poae</i>	Саратовская обл.	Пшеница
F-842 ³	<i>F. sambucinum</i>	Белая Церковь, Украина	Картофель
НТiMi ²	<i>F. solani</i>	Неизвестно	Неизвестно
BR-04-60 ²	<i>F. sporotrichioides</i>	Брянская обл.	Пшеница
90604 ¹	<i>F. torulosum</i>	Ленинградская обл.	Ячмень
30141 ¹	<i>F. tricinctum</i>	Финляндия	Ячмень
58242 ¹	<i>F. venenatum</i>	Германия	Неизвестно

Примечание. 1, 2 и 3 — соответственно штаммы из коллекции Всероссийского НИИ защиты растений (ВИЗР, г. Санкт-Петербург), Всероссийского НИИ фитопатологии (ВНИИФ, Московская обл.) и Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, г. Пушкино).

Данные о межвидовом полиморфизме определенных локусов ДНК дали возможность создавать высокоспецифичные системы детекции возбудителей фузариоза, основанные на классической ПЦР либо ее модификациях (52-61). Применение подобных систем в рутинной практике позволяет точно и с минимальными затратами времени идентифицировать патоген с точностью до вида, подвида или группы видов (в зависимости от поставленной задачи) и, следовательно, предсказывать спектр микотоксинов, накопление которых в анализируемом образце потенциально вероятно. С использованием количественной ПЦР (ПЦР в реальном времени) (62) можно определять содержание ДНК патогена в пробе, тем самым отслеживая развитие инфекции и эффективность действия фунгицидов, а также осуществлять регулярный мониторинг зараженности возбудителями фузариоза (например, для зерна и продуктов его переработки). Интересная альтернатива методу ПЦР предложена L. Niessen с соавт. (63), которые использовали для детекции *F. tricinctum* в чистых культурах и образцах зерна петлевую изотермическую амплификацию (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) (64). Ее чувствительность оказалась сопоставима с чувствительностью классической ПЦР (0,95 пг целевой ДНК на реакцию), однако отмечались перекрестные реакции с ДНК штаммов вида *F. acumi-*

natum, то есть этот метод не был абсолютно специфичен. Тем не менее, он может оказаться перспективным, поскольку по сравнению с ПЦР не требует сложного и дорогостоящего оборудования.

Итак, несмотря на ряд проблем, с которыми приходится сталкиваться исследователям, молекулярно-генетический подход имеет серьезные перспективы и потенциал для решения сложных задач в систематике рода *Fusarium*. В то же время не стоит рассматривать эти приемы в качестве «средства спасения» от трудностей, связанных с классификацией указанной группы организмов. Использование филогенетических методов в отрыве от исследований морфологии, экспериментов по скрещиванию штаммов, изучения метаболических профилей способно только усложнить ситуацию. Лишь разумная комбинация нескольких подходов позволит получить достоверные и надежные данные, на основе которых может быть создана относительно универсальная таксономическая система, которая удовлетворила бы специалистов, так или иначе связанных с этой группой фитопатогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson P.E. History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology*, 1991, 81(9): 1045-1048.
2. Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie E.J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, 7(4): 479-504 (doi: 10.1128/CMR.7.4.479).
3. Leslie J.F., Summerell B.A. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, 2006.
4. Snyder W.C., Hansen H.N. Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1954, 60: 16-23.
5. Gerlach W. The present concept of *Fusarium* classification. Pennsylvania State University Press, 1981.
6. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур. Защита и карантин растений, 2011, 5: 69-120.
7. Dobzhansky T. Mendelian populations and their evolution. *American Naturalist*, 1950, 84(9): 401-418.
8. Mayr E. Animal species and evolution. Harvard University Press, 1963.
9. Britz H., Coutinho T.A., Wingfield M.J., Marasas W.F.O., Gordon T.R., Leslie J.F. *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(3): 1198-1201.
10. Proctor R.H., Brown D.W. *Fusarium*: genomics, molecular and cellular biology. Caister Academic Press, 2013.
11. Leslie J.F. Mating populations in *Gibberella fujikuroi*. *Phytopathology*, 1991, 81: 1058-1060.
12. Leslie J.F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Can. J. Bot.*, 1995, 73(Suppl. 1): S282-S291 (doi: 10.1139/b95-258).
13. Leslie J.F. Genetic status of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Plant Pathol. J.*, 1999, 15: 259-269.
14. Harrington T.C., Rizzo D.M. Defining species in the fungi. In: Structure and dynamics of fungal populations /J.J. Worrall (ed.). Kluwer Academic Publishers, 1999.
15. Стахеев А.А., Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Выявление новых генетических маркеров для таксономической характеристики и идентификации грибов рода *Fusarium*. Биоорганическая химия, 2011, 37(5): 662-671 (doi: 10.1134/S1068162011050189).
16. Turner A.S., Lees A.K., Rezanoor H.N., Nicholson P. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phonetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathol.*, 1998, 47: 278-288 (doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00250.x).
17. Nirmaladevi D., Venkataramana M., Srivastava R.K., Uppalapati S.R., Gupta V.K., Yli-Mattila T., Tsui K.M.C., Srinivas C., Niranjana S.R., Chandra N.S. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 21367 (doi: 10.1038/srep21367).
18. Jurgenson J.E., Bowden R.L., Zeller K.A., Leslie J.F., Alexander N.J., Plattner R.D. A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Genetics*, 2002, 160: 1452-1460.
19. Zeller K.A., Bowden R.L., Leslie J.F. Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quadrats in Kansas and North Dakota. *Phytopathology*, 2003, 93: 874-880 (doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.7.874).
20. Paran I., Michelmore R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 1993, 85: 985-993 (doi: 10.1007/BF00215038).
21. Crespo A., Lumbsch H.T. Cryptic species in lichen-forming fungi. *IMA Fungus*, 2010,

- 1(2): 167-170.
22. Taylor J.W., Turner E., Pringle A. Fungal species: thoughts on their recognition, maintenance and selection. In: *Fungi in the environment* /G.M. Gadd, S.C. Watkinson, P.S. Dyer (eds.). Cambridge University Press, 2007.
 23. Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbert D.S., Fisher M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fung. Genet. Biol.*, 2000, 31: 21-32 (doi: 10.1006/fgbi.2000.1228).
 24. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений — способ их молекулярной идентификации и изучение биоразнообразия. *Журнал общей биологии*, 2009, 70(4): 296-315.
 25. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *PNAS*, 2012, 109: 6241-6246 (doi: 10.1073/pnas.1117018109).
 26. Harrow S.A., Farrokhi-Nejad R., Pitman A.R., Scott I.A.W., Bentley A., Hide C., Cromey M.G. Characterization of New Zealand *Fusarium* populations using a polyphasic approach differentiates the *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* species complex in cereal and grassland systems. *Fungal Biology*, 2010, 114: 293-311 (doi: 10.1016/j.funbio.2010.01.005).
 27. Geiser D.M., Klich M.A., Frisvad J.C., Peterson S.W., Varga J., Samson R.A. The current status of the species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.*, 2007, 59: 1-10 (doi: 10.3114/sim.2007.59.01).
 28. Seifert K.A., Samson R.A., deWaard J.R. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *PNAS USA*, 2007, 104: 3901-3906 (doi: 10.1073/pnas.0611691104).
 29. Aveskamp M.M., de Gruyter J., Woudenberg J.H.C. Highlights of the *Didymella-aceae*: a polyphasic approach to characterize *Phoma* and related pleosporalean genera. *Stud. Mycol.*, 2010, 65: 1-60 (doi: 10.3114/sim.2010.65.01).
 30. Kristensen R., Torp M., Kosiak B., Holst-Jensen A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycol. Res.*, 2005, 109: 173-186 (doi: 10.1017/S0953756204002114).
 31. Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Bulat S.A., Alekhina I.A., Nirenberg H.I. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex — a polyphasic approach. *Mycol. Res.*, 2002, 106(6): 655-669 (doi: 10.1017/S0953756202006020).
 32. Stakheev A.A., Khairulina D.R., Zavriev S.K. Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *Int. J. Food Microbiol.*, 2016, 225: 25-37 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.012).
 33. Yli-Mattila T., Ward T.J., O'Donnell K., Proctor R.H., Burkin A.A., Kononenko G.P., Gavrilova O.P., Aoki T., McCormick S.P., Gagkaeva T.Y. *Fusarium sibiricum* sp. nov, a novel type A trichothecene-producing *Fusarium* from northern Asia closely related to *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 147: 58-68 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.007).
 34. Fernández-Ortugo D., Loza-Reyes E., Atkins S.L., Fraaije B.A. The *CYP51C* gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 144: 301-309 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.013).
 35. Watanabe M., Yonezawa T., Lee K-I., Kumagai S., Sugita-Konishi Y., Goto K., Hara-Kudo Y. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. *J. Sci. Food Agr.*, 2011, 91: 2500-2504 (doi: 10.1002/jsfa.4507).
 36. Watanabe M., Yonezawa T., Lee K-I., Kumagai S., Sugita-Konishi Y., Goto K., Hara-Kudo Y. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evol. Biol.*, 2011, 11: 322 (doi: 10.1186/1471-2148-11-322).
 37. Llorens A., Hinojo M.J., Mateo R., Gonsales-Jaen M.T., Valle-Algarra F.M., Logrieco A., Jimenez M. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the rRNA gene (rDNA). *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 106: 297-306 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.005).
 38. Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Parikka P., Konstantinova P., Gagkaeva T.Y. Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and north-western Russia. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2004, 110: 573-585 (doi: 10.1023/B:EJPP.0000032397.65710.69).
 39. Geiser D.M., Jimenes-Gasco M., Kang S., Makalowska I., Veeraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A., O'Donnell K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2004, 110: 473-479 (doi: 10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0).
 40. Scott J.B., Chakraborty S. Multilocus sequence analysis of *Fusarium pseudograminearum* reveals a single phylogenetic species. *Mycol. Res.*, 2006, 110: 1413-1425 (doi:

- 10.1016/j.mycres.2006.09.008).
41. Obanor F., Erginbas-Orakci G., Tunali B., Nicol J.M., Chakraborty S. *Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis. *Fungal Biol.*, 2010, 114: 753-765 (doi: 10.1016/j.funbio.2010.07.001).
 42. Kulik T., Pszczolkowska A., Lojko M. Multilocus phylogenetics show high intraspecific variability within *Fusarium avenaceum*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, 12: 5626-5640 (doi: 10.3390/ijms12095626).
 43. O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Gueidan C., Crous P.W., Geiser D.M. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamyosporum* species complexes within the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, 47: 3851-3861 (doi: 10.1128/JCM.01616-09).
 44. Yli-Mattila T., Gagkaeva T., Ward T.J., Aoki T., Kistler H.C., O'Donnell K. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from Russian Far East. *Mycologia*, 2009, 101(6): 841-852 (doi: 10.3852/08-217).
 45. O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D.M., Kistler H.C., Aoki T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.*, 2004, 41: 600-623 (doi: 10.1016/j.fgb.2004.03.003).
 46. Marin P., Moretti A., Ritieni A., Jurado M., Vázquez C., Gonzalez Jaén M.T. Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* from cereals from Southern Europe. *Food Microbiol.*, 2012, 31: 229-237 (doi: 10.1016/j.fm.2012.03.014).
 47. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Стахеев А.А., Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Первое обнаружение в России гриба *Fusarium torulosum*. *Микология и фитопатология*, 2012, 46: 86-91.
 48. Booth C. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, 1971.
 49. Gerlach W., Nirenberg H.I. The genus *Fusarium* — a pictorial atlas. *Mitt. Biol. Bundesanst Land-u Forstwirsch Berlin-Dahlem*, 1982.
 50. Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, 1983.
 51. Jestoi M. Emerging *Fusarium* mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin — a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48: 21-49 (doi: 10.1080/10408390601062021).
 52. Fernández-Ortuno D., Waalwijk C., Van der Lee T., Fan J., Atkins S., West J.S., Fraaije B.A. Simultaneous real-time PCR detection of *Fusarium asiaticum*, *F. ussuriarum* and *F. vorosii*, representing the Asian clade of the *F. graminearum* species complex. *Int. J. Food Microbiol.*, 2013, 166: 148-154 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.007).
 53. Fredlund E., Gidlund A., Sulyok M., Börjesson T., Krska R., Olsen M., Lindblad M. Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats — occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 2013, 167: 276-283 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.026).
 54. Jurado M., Vazquez C., Marin S., Sanchis V., Tereza Ganzalez-Jaen M. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2006, 29: 681-689 (doi: 10.1016/j.syapm.2006.01.014).
 55. Kulik T. Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. *J. Appl. Genet.*, 2008, 49: 305-311 (doi: 10.1007/BF03195628).
 56. Kulik T., Jestoi M. Quantification of *Fusarium poae* DNA and associated mycotoxins in asymptotically contaminated wheat. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, 130: 233-237 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.036).
 57. Nicolaisen M., Suproniene S., Nielsen L.K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justesen A.F. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *J. Microbiol. Meth.*, 2009, 76: 234-240 (doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.016).
 58. Niessen M.L., Vogel R.F. Group-specific PCR detection of potential trichothecene-producing *Fusarium* species in pure cultures and cereal samples. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1998, 21: 618-631 (doi: 10.1016/S0723-2020(98)80075-1).
 59. Stakheev A.A., Ryazantsev D.Yu., Gagkaeva T.Yu., Zavriev S.K. PCR detection of *Fusarium* fungi with similar profiles of the produced mycotoxins. *Food Control*, 2011, 22: 462-468 (doi: 10.1016/j.foodcont.2010.09.028).
 60. Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Parikka P., Jestoi M., Klemsdal S.S., Rizzo A. Genetic variation, real-time PCR, metabolites and mycotoxins of *Fusarium avenaceum* and related species. *Mycotoxin Res.*, 2006, 2: 79-86 (doi: 10.1007/BF02956768).
 61. Рязанцев Д.Ю., Абрамова С.Л., Евстратова С.В., Гагкаева Т.Ю., Завриев С.К. Диагностика токсигенных грибов рода *Fusarium* методом FLASH-ПЦР. *Биоорганическая химия*, 2008, 34(6): 799-807 (doi: 10.1134/S1068162008060113).
 62. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wit-

- twer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 2009, 55: 611-622 (doi: 10.1373/clinchem.2008.112797).
63. Niessen L., Grafenhan T., Vogel R.F. ATP citrate lyase I (*acI1*) gene-based loop-mediated amplification assay for the detection of the *Fusarium tricinctum* species complex in pure cultures and in cereal samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 158: 171-185 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.021).
64. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28: e63.

¹ФГБУН Институт биоорганической химии

Поступила в редакцию

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 26 февраля 2016 года

117997 Россия, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
e-mail: samokhlar@mail.ru, d.yu.ryazantsev@gmail.com, stakheev.aa@gmail.com;

²ФГБНУ Всероссийский НИИ фитопатологии,

143050 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н,
пос. Большие Вяземы, ул. Институт, вл. 5,
e-mail: szavriev@ibch.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 3, pp. 275-284

MOLECULAR GENETIC APPROACHES FOR INVESTIGATION OF TAXONOMY AND SPECIFIC IDENTIFICATION OF TOXIN- PRODUCING *Fusarium* SPECIES: ACHIEVEMENTS AND PROBLEMS (review)

A.A. Stakheev¹, L.V. Samokhvalova¹, D.Yu. Ryazantsev¹, S.K. Zavriev^{1, 2}

¹M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Federal Agency of Scientific Organizations, 16/10, ul. Miklukho-Maklaya, Moscow, 117997 Russia, e-mail samokhlar@mail.ru, d.yu.ryazantsev@gmail.com, stakheev.aa@gmail.com;

²All-Russian Research Institute of Phytopathology, Federal Agency of Scientific Organizations, 5, ul. Institute, pos. Bol'shie Vyazemy, Odintsovskii Region, Moscow Province, 143050 Russia, e-mail szavriev@ibch.ru

Acknowledgements:

Supported by Russian Foundation for Basic Research, project № 15-29-05902.

Received February 26, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2016.3.275eng

Abstract

Ascomycetous fungi of the genus *Fusarium*, which was separated as a single taxonomic group in 1809 by Heinrich Friedrich Link, are distributed worldwide and have different ecological niches. They have been found in soil and plants as endophytes, saprotrophs and parasites. Infections of agricultural plants, caused by *Fusarium* fungi, lead to annual damage, estimated in hundred million dollars. In addition to decrease harvest quality and quantity, *Fusarium* fungi are able to produce toxic metabolites (fusariotoxins). The consumption of fusariotoxin-contaminated winter grain led to deaths of tens of thousands of people in Volga and Ural regions in 1930s-1940s. These factors make necessary investigation of morphology, biochemistry and genetics of those organisms. Nowadays there is no universal taxonomic system of the genus *Fusarium*, so it is not possible to identify an isolate to species level in many cases. The high variability of morphological structures, and, on the other side, their similarity for closely related species, are major problems for researchers which use classical methods for identification and systematization of this group of fungi. Today, the molecular methods, based on the use of specific DNA sequence, are playing an increasingly important role in *Fusarium* systematics. The application of this approach has led to establishment of a number of new species in the genus. T. Yli-Mattila et al. (2009, 2011) used multilocus phylogenetic analysis to describe the novel species *F. sibiricum* and *F. ussurianum* which were found in Siberia and Far East and proved to be morphologically similar to *F. graminearum* and *F. langsethiae*, respectively. The authors of this paper identified the species *F. torulosum* (morphologically similar to *F. avenaceum*) in Russia for the first time based on the use of DNA markers. It is no less important that the analysis of inter- and intraspecific polymorphism makes possible the development of highly-specific assays for molecular detection of *Fusarium* fungi, including ones which infect plants and produce mycotoxins. The use of these assays (for example, ones described by M. Nicolaisen et al., 2009 and A.A. Stakheev et al., 2011) allows not only to detect the contamination of plants by mycotoxin producers, but also to estimate the quantity of their content in a probe. At the same time, a lot of questions are still unanswered: particularly, simultaneous application of different species concepts (morphological, biological and phylogenetic) makes it difficult to develop universal taxonomic system of the genus; also the most informative and reliable marker, which would reflect the evolutionary history of the genus, has not been found. The main achievements and problems of *Fusarium* phylogenetics, and perspectives of the application of molecular approach for studies of this group of organisms are discussed in this review.

Keywords: genus *Fusarium*, taxonomy, DNA marker, mycotoxins, phylogenetic analysis.