

крупных стволах гидротермический эврибионт *Fomes fomentarius* (8) – на березе и осине, то в прохладно-влажном 2014 г. доминантами стали характерный для ив *Fomitiporia punctata* (12), развивающийся на поздних стадиях разложения лиственных пород *Steccherinum ochraceum* (12) и на давно усохших ветвях сосны *Postiacaesia* (8). Примечательно многократное увеличение численности *Hapalopilus rutilans* (с 1 до 7), характерного для тонких стволов и ветвей лиственных. В прохладно-влажных условиях отмечается тенденция увеличения разнообразия и обилия грибов за счет видов, осуществляющих поздние стадии разложения (*Steccherinum ochraceum*, *Postia caesia*, *Antrodiella semisupina*, *Skeletocutis nivea*, *Junghunia nitida*, *Polyporus varius* и др.).

Литература

Арефьев С.П. Климатические факторы в древесно-кольцевых хронологиях города Тюмени // Вестн. Тюменского гос. ун-та. 2013. № 12. С. 34-42.

Арефьев С.П. Системный анализ биоты дереворазрушающих грибов. Новосибирск: Наука, 2010. 260 с.

Начальный этап мониторинга экосистем г. Тюмени и его пригородной зоны / С.Н. Гашев, О.А. Алешина, С.П. Арефьев и др. // Вестн. экологии, лесоведения и ландшафтоведения. Вып. 3. 2002. С. 80-93.

Сафонов М.А., Сафонова Т.И., Каменева И.Н. Многолетняя динамика видовой структуры локальной микобиоты в лесах предгорий Южного Урала // Фундаментальные исследования. 2013. № 10 (часть 3). С. 575-579. URL: www.rae.ru/fs/?section=content&op=show_article&article_id=10001532

Ширяев А.Г. Изменение микобиоты Урало-Сибирского региона в условиях глобального потепления и антропогенного воздействия // Вестн. экологии, лесоведения и ландшафтоведения. 2008. № 9. С. 37-47.

Эколого-географические последствия глобального потепления климата XXI века на Восточно-Европейской равнине и в Западной Сибири. М.: МАКСПресс, 2011. 496 с.

Berglund H., Edman M., Ericson L. Temporal variations of wood-fungi diversity in boreal old-growth forests: implications for monitoring // Ecological Applications. 2005. 15. Pp. 970–982.

ГЕНЕТИКО-ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОМИЦЕТОВ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Баранов О.Ю.¹, Пантелеев С.В., Рубель И.Э.

Институт леса НАН Беларуси, betula-belarus@mail.ru¹

GENETIC AND TAXONOMIC ANALYSIS OF MICROMYCETES BASED ON GENOMIC SEQUENCING DATA

Baranov O.Y.¹, Panteleev S.V., Rubel I.E.

The increasing quantity and quality of DNA sequence data and decreasing cost of sequencing have given powerful impulse to the application of molecular biology approaches in taxonomy and phylogenetics. In this paper we describe comparison of the previously sequenced native strain of *Phoma* sp.1 with other micromycetes based on the sequences of some genes of virulence, mitochondrial and ribosomal DNA.

В конце XX – начале XXI века данные о последовательности ДНК того или иного организма, полученные в результате секвенирования, стали все шире применяться в различных отраслях биологии и медицины. Несомненным преимуществом использования молекулярно-генетического подхода является то, что исследователь получает доступ к первичной, не измененной на последующих уровнях организации живого информации в виде последовательности ДНК (или РНК у многих вирусов). Это позволило существенно повысить разрешающую способность биологического анализа и проводить исследования на принципиально новом уровне. На сегодняшний день возможна дискретная идентификация и локализация малейших различий в последовательностях ДНК разных организмов, включая любые типы мононуклеотидных мутаций, включая синонимичные замены – не изменяющих аминокислотную последовательность белковых молекул и, соответственно, не выявляемых при анализе полипептидных цепей и, тем более, при анализе фенотипических признаков. Второе важное преимущество современных методов молекулярно-генетического маркирования, – возможность предсказания числа и типа белковых продуктов, их свойств и функ-

ций в биохимических и физиологических процессах, в том числе описание структуры и свойств белков, которые ранее не были охарактеризованы.

На протяжении последних десятилетий широкомасштабному внедрению молекулярно-генетических методов анализа, в первую очередь, геномного секвенирования, во всех сферах биологии и смежных наук, включая анализ лесных видов, препятствовали такие факторы, как высокая себестоимость и относительно низкая эффективность каждой отдельной процедуры секвенирования. Например, при секвенировании по методу Сэнджера удавалось проанализировать, как правило, не более 800 п.н., и соответственно, для установления последовательности больших фрагментов ДНК (порядка 10^6 – 10^9 п.н.) приходилось последовательно секвенировать огромное число коротких участков этого фрагмента, а затем при помощи специализированных программных средств осуществлять сборку и аннотацию исходной последовательности.

Начиная с 2005 года, на рынке диагностического оборудования стали появляться системы высокопроизводительного секвенирования (англ. NGS - next-generation sequencing), принципы работы которых начали разрабатываться в начале 90-х гг. Следует заметить, что интенсивное развитие новейших подходов в секвенировании ДНК связано, прежде всего, с достижениями в других инновационных отраслях – микроэлектронике, оптике, информатике. Именно совершенствование методов ультрадетекции сигналов (оптических, электрических и т.д.) в совокупности с увеличением производительности компьютеров и совершенствованием программного обеспечения, необходимого для обработки данных, позволило значительно повысить суммарную длину последовательности ДНК, прочитанной за один цикл работы секвенатора, и, соответственно, снизить себестоимость исследований в пересчете на единицу анализируемой информации. Получаемые массивы данных содержат значительное число маркерных локусов, которые могут быть успешно использованы для решения широкого спектра задач в различных областях биологии: типировка и паспорттизация хозяйственно-ценных генов, генотипов, индивидов, включая анализ трансгенных растений; коммерческая сертификация; анализ генетического родства и происхождения особей, сортов, форм, насаждений; исследование генетической структуры популяций и ее динамики; изучение уровня генетического разнообразия видов; анализ филогенетических взаимоотношений видов; решение спорных вопросов таксономии; диагностика инфекций; построение генетических карт и др.

За последнее десятилетие для значительного числа хозяйственно-важных фитопатогенов проведено секвенирование их геномов. Данная информация задепонирована в электронных генетических банках данных и ежедневно пополняется. Однако следует отметить, что для большинства видов лесных фитопатогенов окончательная аннотация их геномов, или отдельных групп сцепления (хромосом) отсутствует, и зачастую генетическая информация представлена в виде небольших по размеру выровненных консенсусных последовательностей. Кроме того, особое внимание необходимо уделить и наличию географической изменчивости ДНК-локусов изолятов одного и того же вида.

Целью данной работы явился сравнительный генетико-таксономический анализ нового фитопатогенного гриба *Phoma* sp.1 с различными представителями отдела *Ascomycotana* основе использования данных геномного секвенирования.

В ходе исследований в качестве генетических маркеров были использованы: основной мотив оперона ядерной рДНК (размер у *Phoma* sp.1 составил 7524 п.н.), включающий в себя межгенный спейсер (1932 п.н.), ген 18S рНК (1798 п.н.), внутренний транскрибируемый спейсер 1 (139 п.н.), ген 5,8S рНК (158 п.н.), внутренний транскрибируемый спейсер 2 (148 п.н.), ген 26S рНК (3349 п.н.); митохондрии (размер мтДНК у *Phoma* sp.1 составил 31916 п.н.), представленный тремя генами митохондриальной рНК, шестью генами энергетического обмена (цитохром, НАДН-дигидрогеназа, АТФ-синтетаза), 23 генами тРНК; локусы, детерминирующие патогенность и вирулентность – поликетидсинтаза PKS1 и нерибосомальные пептидсинтазы NRPS6 и HC.

Для проведения сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов рНК и факторов вирулентности были использовано 106 образцов, относящихся к 23 родам отдела *Ascomycota* (*Teratosphaeria*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Venturia*, *Sphaeropsis*, *Gibberella*, *Discula*, *Rosellinia*, *Hymenoscyphus*, *Phacidium*, *Botrytis*, *Lophodermium*, *Microsphaera*, *Cronartium* и др.) из коллекции ДНК-локусов микромицетов Института леса НАН Беларуси. Полные нуклеотидные последовательности митохондрий семи видов грибов из различных классов отдела *Ascomycota* (*Candida*

norvegica, *Madurella mycetomatis*, *Beauveria pseudobassiana*, *Beauveria bassiana*, *Cordyceps militaris*, *Talaromyces marneffeii*, *Aspergillus nidulans*) были предоставлены Генным Банком NCBI.

На основании результатов секвенирования локусов рДНК были рассчитаны коэффициенты генетической дифференциации, отражающие уровень генетического сходства между видами. Анализ полученных данных показал, что большинство таксонов соответствует современной систематике грибов, основанной на изучении морфологических признаков. Так, в рамках отдела Аскомицеты выделено 6 групп, соответствующих отдельным классам грибов. Исключение составила группа №1 (*Phoma*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Lewia* и др.), которая наряду с группой №3 (*Cladosporium*, *Teratosphaeria* и др.) согласно литературным данным, относится к одному классу *Dothideomycetes*. *Dothideomycetes* – многовидовому и самому разнообразному классу. Полученное таксономическое распределение можно объяснить тем, что виды 1-ой и 3-ей групп являются представителями двух крупных подклассов. Однако согласно полученным данным, группа № 1 имела высокий процент отличий ($\approx 20\%$) по генетической структуре с видами того же класса. В связи с чем корректно будет выделить данный таксон в ранг отдельного класса.

При этом необходимо отметить, что род *Phoma*, имеющий неопределенное таксономическое положение, по данным анализа рДНК входил наряду с *Epicoccum* и *Alternaria* в семейство *Pleosporaceae*. А род *Alternaria* и *Lewia* явились разными стадиями в жизненном цикле одних и тех же грибов, что согласуется с микологическими исследованиями последних лет.

Таксономическое распределение видов группы № 2 соответствовало литературным данным. Представители данной группы относились к классу *Sordariomycetes* (*Fusarium*, *Calonectria* – порядок *Hypocreales*, *Truncatella*, *Pestalotiopsis* – *Xylariales*; *Ceratocystis* – *Microascales*).

Родовое разделение в группе №3, за небольшим исключением, соответствовало литературной систематике. Так, например, *Mycosphaerella* и *Cercospora* отделились в порядок *Capnodiales*, в одно семейство *Mycosphaerellaceae*; *Phaeocryptopus* и *Teratosphaeria* – в порядок *Pleosporales*. При этом наблюдается разделение их в разные семейства: *Phaeocryptopus* (*Venturiaceae*), *Teratosphaeria* (*Pleosporaceae*). При этом *Mycosphaerella* имела значительные отличия ($\approx 21\%$) по генетической структуре от других видов данного рода. В связи с этим, данный вид, вероятно, следует отнести к другому семейству и порядку.

Имеющие неопределенное таксономическое положение грибы родов *Oidiodendron* и *Geomyces* из группы №4 по генетической структуре относятся к классу *Leotiomycetes* и входят в порядок *Helotiales*, включающий такие роды как *Meria* и *Botrytis*. Полученные данные соответствовали литературным и в некоторой степени дополняли их. Коэффициент генетической дифференциации между данными видами не превысил 4%, что свидетельствует об их родстве. С другой стороны у *Coleophoma* и *Sphaeropsis* большее генетическое сходство отмечено с представителями класса *Leotiomycetes*, а не *Dothideomycetes*, описанного в литературе. Род *Rhizosphaera*, который по таксономическому описанию относится к семейству *Venturiaceae*, следует включить в семейство *Dothioraceae* наряду с *Kabatina* и *Sclerophoma*.

Генетико-таксономическое положение остальных родов в целом соответствовало литературной классификации согласно базе данных по номенклатуре и систематике грибов *Mycobank*. Мучнисторосяные грибы (род *Microsphaera*) группы №5 отделились в отдельный порядок *Erysiphales*. А *Wilcoxina* (группа №6) вошла в отдельный класс *Pezizomycetes*.

Сопоставление структуры гена *PKS1* с гомологичными локусами различных видов микромицетов выявило существенные различия в уровне сходства полинуклеотидных цепей – 59-84%. При этом следует отметить, что видоспецифические SNP были дисперсно распределены по всему гену. В тоже время, в ходе детального изучения у типов филогенетических изменений было выявлено отсутствие существенных перестроек структуры домена каталитического центра, что указывает на сохранении сходной функциональной активности фермента *PKS1* у различных таксономических групп. Частота встречаемости синонимичных кодонов для референсных микромицетов составила от 16 до 24%, что и обусловило более высокий уровень сходства полипептидных цепей (72-98%), по сравнению с исходной ДНК-матрицей. На основании результатов сопоставления нуклеотидных последовательностей гена *PKS1* у различных видов микромицетов, также были рассчитаны коэффициенты генетической дифференциации, отражающие генетико-таксономические взаимоотношения среди проанализированных патогенов. Полученные данные для большинства представленных видов соответствовали существующей систематике грибов, что указывает на ортологичный харак-

тер происхождения данного локуса и относительно равной скорости эволюции последовательностей генетических макромолекул среди исследованных таксономических единиц.

Проведенный сравнительный анализ полного фрагмента гена NRPS6 некротрофных фитопатогенов выявил также существенные различия в уровне сходства нуклеотидной структуры генов среди видов микромицетов – 66–75%. При этом, для всех видов фитопатогенов сходство аминокислотных последовательностей превысило аналогичный показатель, рассчитанный (с учетом неперекрывающихся областей) для нуклеотидных цепей, что по всей видимости объясняется присутствием значительной доли синонимичных замен в общем количестве диагностируемых межвидовых вариаций. Кроме того, в структуре полипептидной цепи от 15 до 25% аминокислотных замен характеризовались сходным общим зарядом молекул, что в свою очередь, также обусловило низкий уровень межвидовых особенностей на уровня вторичной и третичной организации структуры фермента NRPS6, и как следствие отсутствие существенных изменений в каталитических свойствах и функциях, несмотря на высокую степень различий на уровне ДНК-матриц. Результаты кластеризации для большинства представленных видов соответствовали существующей систематике грибов, что также указывает на ортологичный характер происхождения данного локуса и относительно равной скорости эволюции последовательностей генетических макромолекул среди исследованных таксономических единиц.

Проведенные сравнительный анализ фрагмента *HC*-гена выявил более существенные различия, по сравнению с локусом NRPS6, в степени сходства нуклеотидной структуры генов среди представителей изученных видов микромицетов – 44–96%. При этом, как и в предыдущем случае, для всех видов степень сходства аминокислотных последовательностей превысила аналогичные значения, рассчитанные (с учетом неперекрывающихся областей) для нуклеотидных цепей, что по всей видимости также объясняется присутствием значительной доли синонимичных замен в общем числе диагностируемых межвидовых вариаций. Аналогичные результаты (16–22%) были выявлены и по количеству аминокислотных замен, характеризующихся сходным зарядом молекул. Результаты молекулярно-генетического анализа гена *HC*-токсина для ряда грибов порядка Плеоспоровые и Хелотиевые показали неполное соответствие существующей систематике грибов, что по всей видимости указывает на паралогичный характер изученных локусов, или наличие горизонтального переноса генетического материала в ходе филогенеза.

Генетико-таксономический анализ с использованием в качестве маркера митохондриального генома выявил наибольший уровень межвидовой дифференциации, что связано как с изменчивостью нуклеотидных последовательностей генов и межгенных регионов мтДНК, так и структурой их взаимного расположения в митохондрии. Кроме того, существенным моментом, оказывающим влияние на степень сходства структур мтДНК различных видов грибов оказывало и соответствие перечня генов и межгенных регионов, выявляемых у исследуемых объектов. Так различия между родственными видами *Beauveria pseudobassiana* и *Beauveria bassiana* превысили 11%, близкими родами *Beauveria* и *Cordyceps* – 25%. Степень генетической дифференциации митохондрии *Phoma* sp1. (*Dothideomycetes*) от вышеуказанных родов класса *Sordariomycetes* составила 90,8%. *Talaromyces marneffeii* и *Aspergillus nidulans*, входящие в класс *Eurotiomycetes*, объединились в единую группу с 34% уровнем различий, при этом консенсусная последовательность, характерная для данного класса отличалась до 68% от усредненного генома мтДНК *Sordariomycetes* и *Dothideomycetes*. В целом распределение изученных видов за небольшим исключением, соответствовало существующей систематике *Fungi* – *Madurella mycetomatis* (*Sordariomycetes*) по уровню генетического сходства оказался ближе к *Candida norvegica*, представляющего неродственный класс *Saccharomycetes*. Данные результаты, по всей видимости можно объяснить ограничениями существующих биоинформационных алгоритмов применительно к крупным полинуклеотидным последовательностям, характеризующихся специфическими филогенетическими особенностями.

В целом проведенные, на основании данных геномного секвенирования, генетико-таксономические исследования различных видов микромицетов показали, что направленность изменений нуклеотидной структуры ортологичных локусов отражает филогенетические процессы, протекающие в отделе *Ascomycota*. В тоже время отдельные внутригеномные перестройки, включая инсерции, делеции, транслокации, дубликации и горизонтальный перенос отдельных генов связаны с особенностями экологической специализации изученных патогенных видов.