

16. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. // J. Bacteriol. – 1981. – **145**, N3. – P.1365–1373.
17. Kues U. Stahl U. Replication of plasmids in Gram-negative bacteria // Microbiol. Rev. – 1989. – **53**, N 4. – P.491–516.
18. Law D., Crickmore N. Use of a simplified rapid size screen protocol for the detection of recombinant plasmids. – Elsevier Trends Technical Tips, 1997.
19. Purish L.M., Asaulenko L.G., Abdulina D.R., Vasyliov V.N., Iutyńska G.A. Role of polymeric complexes in the formation of biofilms by corrosive bacteria on steel surface // Appl. Biochem. Microbiology. – 2012. – **48**, N 3. – P. 262–269.
20. Rousset M., Casalot L., Rapp-Giles B. J., Dermoun Z., de Philip P. New shuttle vectors for the introduction of cloned DNA in *Desulfovibrio* // Plasmid. –1998 – **9**, N 2. – P. 114–122.
21. Smalla K., Sobecky P.A. The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches // FEMS Microbiol. Ecol. – 2002. – **42**. – P. 165–175.
22. Smets B.F., Morrow J.B., Pinedo C.A. Plasmid introduction in metal-stressed, substrate-derived microcosms: plasmid fate and community response // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – **69**, N 7. – P. 4087–4097.
23. Thomas C. M., Nielsen K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria // Nature Rev. Microbiol. – 2005. – **3**. – P. 711–721.

Отримано 27.11.2012

УДК 582.288

И.Н. Курченко, Е.С. Цыганенко

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
ул. Заболотного, 154, Д 03680, Киев ГСП, Украина*

ТРИХОТЕЦЕНОВЫЕ МИКОТОКСИНЫ *FUSARIUM ROAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

*Проведено сравнительное исследование способности к синтезу токсинов трихотеценовой природы у трех штаммов *Fusarium roae*, выделенных из различных источников: лесная почва, зерно пшеницы (фитопатоген), корень клевики (эндофитный штамм).*

Установлено, что все три штамма образуют Т-2 токсин, НТ-2 токсин и Т-2 тетраол. При этом почвенный штамм 50660 характеризовался высоким уровнем образования как НТ-2 токсина, так и Т-2 тетраола; фитопатогенный штамм 50674 и эндофитный штамм 50685 – высоким уровнем образования Т-2 тетраола и более низким уровнем образования НТ-2 токсина. Базовый трихотеценовый микотоксин этой группы – Т-2 токсин – у всех трех штаммов был представлен в следовых количествах.

*К л ю ч е в ы е с л о в а: *Fusarium roae*, трихотеценовый микотоксин, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, Т-2 тетраол, эндофитный штамм, фитопатоген.*

Вид *Fusarium roae* (Peck) Wollenw. широко распространен в регионах с умеренным климатом. Его выделяют из разных типов почв, сухих и влажных пастбищ, песчаных дюн [1, 11]. Он постоянно встречается на зерновых (пшенице, ячмене, овсе, кукурузе), в ризосфере и филлоплане различных растений. *F. roae*, как правило, присутствует в комплексах фитопатогенов, причастных к фузариозам зерновых культур, дикорастущих злаков и является возбудителем корневых и стеблевых гнилей растений [1, 2, 4, 6, 11, 16]. Он в ассоциациях с другими грибами-эндофитами развивается в тканях хозяина, не выявляя при этом симптомов заболевания [14, 15].

Так, при изучении эндофитной микобиоты растений порядка *Ericales*, растущих на загрязненных радионуклидами болотах Житомирской и Ровенской областей Украины, с высокой частотой выделялись штаммы *F. roae* [3]. Однако данные о физиологических особенностях таких грибов в литературе практически отсутствуют [14].

© И.Н. Курченко, Е.С. Цыганенко, 2013

Одним из характерных свойств представителей рода *Fusarium*, и в том числе *F. roae*, является их способность к образованию микотоксинов [1, 2, 9 – 11, 16]. Особое место среди них занимают так называемые трихотеценовые микотоксины – широко распространенная и хорошо изученная группа токсических метаболитов.

Многие исследователи считают, что фитопатогенные свойства грибов во многом определяются их способностью к синтезу этих микотоксинов, среди которых группа Т-2 токсина, ниваленол, неосоляниол, диацетоксисцирпенол, фузаренон-Х и другие [1, 2, 7, 9 – 11, 16].

К сожалению, в литературе отсутствуют сравнительные данные относительно особенностей образования этих веществ штаммами *F. roae*, выделенными из различных местообитаний, хотя такие сведения крайне важны для выявления роли микотоксинов как одного из факторов патогенности микромицетов. Важно определить их участие во взаимоотношении «растение – гриб-патоген».

Целью настоящей работы было провести сравнительное исследование способности к синтезу токсинов трихотеценовой природы у штаммов *F. roae*, выделенных из различных источников.

Материалы и методы. Объектами исследования были три штамма *F. roae* из коллекции культур микроскопических грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины: штамм 50660, выделенный из лесной почвы под липой (Киевская обл., 1998 г.); штамм 50674 – фитопатоген, выделенный из зерна пшеницы (Киевская обл., 2007 г.) и 50685 – эндофитный штамм, выделенный из корней клюквы (Житомирская обл., 1999 г.).

В качестве посевного материала использовали стандартную суспензию конидий 1×10^6 кл/мл 10-суточной культуры каждого из штаммов, которую вносили в количестве 10 % к объему среды культивирования [5].

Грибы выращивали в стандартных условиях в колбах Эрленмейера объемом 0,75 л, содержащих 0,1 л стандартной среды Чапека при температуре 27 ± 1 °С в течение 21 сут.

Трихотеценовые микотоксины выделяли из культуральных фильтратов грибов путем экстракции хлороформом, который брали в соотношении 1 : 5. Экстрагировали трижды по 15 минут. Полученные экстракты объединяли и упаривали под сниженным давлением при температуре 45°С при помощи роторного испарителя «Rotadest» (Венгрия).

Полученный маслянистый осадок подвергали предварительной очистке от примесей неполярных липидных веществ (жидкость – жидкостное перераспределение, ацетонитрил : н-гексан); от примесей веществ белковой природы (осаждение 10 %-ным раствором уксуснокислого свинца) и от пигментных примесей (колонка с активированным углем «БАУ-1», элюент – ацетон). Полученный ацетоновый раствор, содержащий микотоксины, пропускали через колонку с безводным сульфатом натрия для освобождения от остаточной влаги и упаривали досуха [7, 8]. Сухой остаток растворяли в 1 мл ацетона и подвергали тонкослойной хроматографии.

На пластину «Silufol» UV 254 (Чехия) размером 15 × 15 см наносили различные концентрации стандартных растворов Т-2 токсина, НТ-2 токсина и Т-2 тетраола («Sigma», США) – 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкг – и смесь микотоксинов в объемах 5 и 10 мкл. Разгонку осуществляли в хроматографической камере, используя систему растворителей хлороформ : метанол (97 : 3) [7]. После разгонки пластины просушивали в токе воздуха и помещали на 30 мин. в сушильный шкаф при температуре 120 °С.

Визуализацию пятен микотоксинов осуществляли путем опрыскивания хроматограмм 3 %-ным раствором 4п-(нитробинзил)пиридина в ацетоне («Sigma», США) и после просушивания – концентрированным раствором аммиака [13]. Пятна анализируемых микотоксинов окрашиваются в голубой цвет, который сохраняется в течение ≈ 20 мин.

Количественную оценку содержания отдельных микотоксинов проводили путем сравнения интенсивности окраски пятен опытного образца с пятнами стандартных растворов [7]. Повторность опытов – трехкратная.

Результаты и их обсуждение. В предварительных опытах методом тонкослойной хроматографии было установлено, что исследуемые штаммы *F. roae* образуют Т-2 токсин, НТ-2 токсин и Т-2 тетраол. Других микотоксинов трихотеценовой природы (неосоляниол, фузаренон-Х, Т-2 триол) в анализируемых образцах не было обнаружено.

Данные сравнительного изучения способности штаммов *F. roae*, выделенных из различных источников, к синтезу трихотеценовых микотоксинов представлены в табл. 1. Базовый и наиболее токсичный из этой группы Т-2 токсин у всех культур представлен в следовых количествах, в то время как содержание других трихотеценов существенно варьирует. Так, почвенный штамм 50660 образует довольно высокие концентрации как НТ-2 токсина, так и Т-2 тетраола (186,6 и 204,5 мкг/л соответственно). Для других исследуемых штаммов характерен высокий уровень образования Т-2 тетраола, немного уступающий почвенному штамму (191,8 и 188,7 мкг/л соответственно). Однако по содержанию НТ-2 токсина исследуемые штаммы существенно различаются. Так, фитопатогенный штамм 50674 образует 142,7 мкг/л НТ-2 токсина, в то время как эндофитный 50685 – всего лишь 81,3 мкг/л.

Принимая во внимание то обстоятельство, что НТ-2 токсин и Т-2 тетраол фактически являются метаболитами Т-2 токсина [9, 12, 17], содержащегося в следовых количествах у всех исследуемых штаммов, можно предположить, что для них характерна трансформация базового метаболита в менее токсичные НТ-2 токсин и Т-2 тетраол [17], осуществляемая при помощи специфических ферментных систем. Некоторые исследователи рассматривают это как защитный механизм продуцента от собственных токсических агентов [9, 12]. Благодаря такому механизму для трихотеценообразующих микромицетов является характерным образование семейств химически близкородственных метаболитов, существенно различающихся по биологической активности [16].

Таблица 1

Содержание микотоксинов в культуральных фильтратах штаммов *Fusarium roae*, выделенных из разных местообитаний

Штаммы	Микотоксины, мкг/л		
	Т-2 токсин	НТ-2 токсин	Т-2 тетраол
50660, почвенный	следы*	186,6 ± 22,1	204,5 ± 14,9
50674, фитопатоген	следы*	142,7 ± 13,4	191,8 ± 16,2
50685, эндофит	следы*	81,3 ± 5,8	188,7 ± 17,3

Примечание: * – следовые количества Т-2 токсина обнаруживаются после нанесения на пластину не менее 20 мкл анализируемой смеси.

Естественно, что функционирование такого защитного механизма во многом зависит от разных факторов, в том числе и от особенностей среды обитания микромицетов.

С учетом изложенного, низкое содержание НТ-2 токсина у штамма 50685, по-видимому, можно рассматривать как возможность его существования, а также других штаммов *F. roae* в растениях в качестве эндофитов, которые часто называют латентными паразитами [14, 15].

І.М. Курченко, К.С. Циганенко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ТРИХОТЕЦЕНОВІ МИКОТОКСИНИ *FUSARIUM ROAE*, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ

Резюме

Проведено порівняльне дослідження здатності до синтезу токсинів трихотеценової природи у трьох штамів *Fusarium roae*, виділених з різних джерел: лісовий ґрунт, зерно пшениці (фітопатоген), корінь журавлини (ендофітний штам).

Встановлено, що всі три штами здатні синтезувати Т-2 токсин, НТ-2 токсин та Т-2 тетраол. При цьому ґрунтовий штам 50660 характеризувався високим рівнем синтезу як НТ-2 токсину, так й Т-2 тетраолу; фітопатогенний штам 50674 та ендофітний штам 50685 – високим рівнем синтезу Т-2 тетраолу та нижчим рівнем синтезу НТ-2 токсину. Основний трихотеценовий микотоксин цієї групи – Т-2 токсин – у всіх трьох штамів був представлений в слідових кількостях.

Ключові слова: *Fusarium roae*, трихотеценовий микотоксин, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, Т-2 тетраол, ендофітний штам, фітопатоген.

I.M. Kurchenko, K.S. Tsyganenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

TRICHOHECENE MYCOTOXINS OF *FUSARIUM POAE* FROM DIFFERENT HABITATS

Summary

Comparative study of the ability of three strains of *Fusarium poae* for the synthesis of trichothecene mycotoxins has been carried out. Studied strains were isolated from different habitats: forest soil, wheat (plant pathogen) and cranberry root (endophytic strain).

All three strains were able to synthesize T-2 toxin, HT-2 toxin and T-2 tetraol but they were in various amounts. The soil strain 50660 was characterized by high level of synthesis of both HT-2 toxin and T-2 tetraol; plant pathogenic 50674 and endophytic 50685 strains were characterized by high level of T-2 tetraol synthesis and lower level of HT-2 toxin synthesis. The main trichothecene mycotoxin of this group – T-2 toxin – was detected in trace amounts for all three strains of *Fusarium poae*.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Fusarium poae*, trichothecene mycotoxin, T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 tetraol, endophytic strain, plant pathogen.

The authors' address: Kurchenko I.M. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv MSP, D03680, Ukraine.

1. Билай В.И. Фузариин. – Киев: Наук. думка, 1977. – 443 с.
2. Иващенко В.Г., Шпилова Н.П., Нефедова Л.И., Гагкаяева Т.Ю., Назаровская Л.А., Хлопунова Л.Б. Биологические и фитосанитарные аспекты исследования фузариоза колоса // Микол. и фитопатол. – 2000. – **34**, № 4. – С. 54–68.
3. Курченко И.Н., Соколова Е.В., Орлов А.А., Жданова Н.Н. Эндифитные микромицеты высших растений и их экологическая роль в круговороте ¹³⁷Cs в биогеоценозах сфагновых болот Украинского Полесья // Прикладная радиоэкология леса. – Житомир: Полісся, 2007. – С. 359–412.
4. Левитин М.М., Иващенко В.Г., Шпилова Н.П., Нестеров А.Н., Гагкаяева Т.Ю., Поторочина И.Г., Афанасьева О.Б. Возбудители фузариоза колоса зерновых культур и форм проявления болезни на северо-западе России // Микол. и фитопатол. – 1994. – **28**, № 3. – С. 58–64.
5. Методы экспериментальной микологии: Справочник. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
6. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г., Краев В.Г., Элланская И.А., Зирка Т.И., Мурас В.А.; Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1988. – 552 с.
7. Оценка загрязнения пищевых продуктов микотоксинами // Сб. учебно-методических материалов. Том III / Под ред. В.А. Тутельяна. – Москва: Центр международных проектов ГКНТ, 1985. – 299 с.
8. Савчук Я.И., Зайченко А.М., Цыганенко Е.С. Биологическая активность внеклеточных метаболитов *Penicillium* sp. 10-51 // Микробиол. журн. – **74**, № 4. – С. 52–56.
9. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины: медицинские и биологические аспекты. – Москва: Медгиз, 1985. – 319 с.
10. Bottalico A., Perrone G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe // Europ. J. Plant Pathol. – 2002. – **108**, N 7. – P. 611–624.
11. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi / Second edition. – Eching: IHW-Verlag, 2007. – 672 p.
12. Ohta M., Matsumoto H., Ishii K., Ueno Y. Metabolism of trichothecene mycotoxins. II. Substrate specificity of microsomal deacetylation of trichothecenes // J. Biochem. – 1978. – **84**, N 3. – P. 697–706.
13. Takitani S., Asabe T., Kato M. et al. Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4p-(nitrobenzyl)pyridine on silica gel thin layer chromatograms // J. Chromatogr. – 1979. – **175**, N 3. – P. 335–342.
14. Schulz B., Sucker J., Aust H.J., Krohn K., Ludewig K., Jones P.G., Döring D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species // Mycol. Res. – 1995. – **99**, N 8. – P. 1007–1015.
15. Sinclair J.B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi // Plant Disease. – 1991. – **75**, N 3. – P. 220–224.
16. Stenglein S.A. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention // J. Plant Pathol. – 2009. – **91**, N1. – P. 25–36.
17. Ueno Y. The toxicology of mycotoxins // CRC «Critical Reviews in Toxicology». – 1985. – **14**, N 2. – P. 99–132.

Отримано 28.11.2012