

Использование внутреннего транскрибуируемого спейсера (ITS) и фактора элонгации трансляции (*tef1a*) для идентификации видов рода *Trichoderma*

Use of the internal transcribed spacer (ITS) and translation elongation factor (*tef1a*) to identify *Trichoderma* species

Скапцов М. В., Уварова О. В., Синицына Т. А.

Skaptsov M. V., Uvarova O. V., Sinitsyna T. A.

Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mail: mr.skaptsov@mail.ru; uwarowa@mail.ru; t.sinitsyna@list.ru
Altai State University, Barnaul, Russia

Реферат. Виды рода *Trichoderma* имеют высокое прикладное значение, производят ферменты (целлюлазы, ксиланазы), антибиотики и стимуляторы роста растений. Генетические исследования помогают отбирать новые штаммы и изоляты для практического использования. Молекулярно-генетические исследования видов *Trichoderma* приобретают всё большую актуальность в связи с их биотехнологическим потенциалом, экологической значимостью и сложностями традиционной идентификации. Виды *Trichoderma* обладают высокой морфологической пластичностью, что затрудняет их дифференциацию по микроскопическим и культуральным признакам. Стандартным для идентификации видов является регион ITS (внутренний транскрибуируемый спейсер), но для *Trichoderma* он часто недостаточен из-за высокой консервативности. Некоторые виды имеют идентичные ITS-последовательности, что требует дополнительных генетических маркеров. Целью работы является сравнение ITS и фактора элонгации трансляции (*tef1a*) для идентификации видов рода *Trichoderma*. В результате анализа видовая принадлежность видов была подтверждена с высокой точностью. Маркеры ITS и *tef1a* могут быть использованы как по отдельности, так и совместно для идентификации видов рода, контроля загрязнений в коллекциях и чистоты маточных культур на биотехнологических производствах.

Ключевые слова. Внутренний транскрибуируемый спейсер, ПЦР, секвенирование, фактор элонгации трансляции, *Trichoderma*.

Summary. *Trichoderma* species are of great practical importance, producing enzymes (cellulases, xylanases), antibiotics and plant growth stimulants. Genetic studies help to select new strains and isolates for practical use. Molecular genetic studies of *Trichoderma* species are becoming increasingly important due to their biotechnological potential, ecological significance and difficulties of traditional identification. *Trichoderma* species have high morphological plasticity, which complicates their differentiation by microscopic and cultural features. The ITS (internal transcribed spacer) fragment is standard for species identification, but for *Trichoderma* it is often insufficient due to high conservatism. Some species have identical ITS sequences, which require additional genetic markers. The aim of the work is to compare the ITS fragment and the translation elongation factor (*tef1a*) for identifying *Trichoderma* species. As a result of the analysis, the species identity was confirmed with high accuracy. ITS and *tef1a* markers can be used both individually and jointly to identify species of the genus, contamination control in collections, and purity of mother cultures in biotechnological industries.

Key words. Internal transcribed spacer, PCR, sequencing, translation elongation factor, *Trichoderma*.

Введение. Род *Trichoderma* Pers. включает более 460 видов, широко распространённых в почвах, на растительных остатках и в других экосистемах. Виды рода *Trichoderma* имеют высокое прикладное значение, производят ферменты (целлюлазы, ксиланазы), антибиотики и стимуляторы роста растений. Виды рода имеют важное значение в биоконтроле фитопатогенов, сельском хозяйстве и промышленности, однако их точная идентификация остаётся сложной задачей из-за высокого морфологического сходства между видами и генетического полиморфизма (Pozo et al., 2024).

Традиционные методы идентификации видов *Trichoderma* основаны на морфологическом описании, включающем анализ структуры конидиеносцев, фиалид и конидий, а также на культуральных признаках, таких как скорость линейного роста и окраска колоний (Shah, Afifya, 2019). Внешние признаки, такие как форма и размеры конидий и фиалид, могут значительно различаться даже в пределах од-

ного вида, что затрудняет надёжную идентификацию только на основе морфологии. Некоторые виды *Trichoderma* обладают схожими культуральными характеристиками, например, окраской колонии и скоростью роста, что делает их трудноразличимыми при использовании традиционных методов.

Генетические исследования помогают отбирать новые штаммы и изоляты для практического использования. Молекулярно-генетические исследования видов *Trichoderma* приобретают всё большую актуальность в связи с их биотехнологическим потенциалом, экологической значимостью и сложностями традиционной идентификации. Наиболее широко используется маркер ITS (внутренний транскрибируемый спейсер) – регион, включающий участки ITS1 и ITS2, разделённые геном рибосомной РНК 5.8S. Другими маркерами для идентификации видов *Trichoderma* являются *rpb2* (RNA polymerase II subunit B2) и *tef1* (Translation elongation factor 1-alpha – фактор элонгации трансляции). Молекулярно-генетические методы позволяют преодолеть ограничения традиционных подходов, обеспечивая точную идентификацию на основе генетических различий между видами (Sánchez-García et al., 2017). Публичные базы данных (например, GenBank) содержат множество ошибочно аннотированных последовательностей *Trichoderma*, что приводит к некорректной идентификации таксонов. Базы данных TrichoBLAST, MIST или ресурсы trichokey.com для сравнения с референсными штаммами помогают снизить эти ошибки, но охватывают не все известные виды. Для точной идентификации молекулярные данные должны подтверждаться морфологией, экологией и биохимическими свойствами штамма (Dou et al., 2020; Rahimi et al., 2021; Kubiak et al., 2023).

Молекулярно-генетическая идентификация видов *Trichoderma* представляет собой сложный процесс, требующий комплексного подхода с использованием нескольких генетических маркеров и филогенетического анализа. Точная идентификация особенно актуальна при депонировании штаммов в генетические коллекции, использовании в биотехнологии и при создании средств защиты растений.

Целью нашей работы было сравнение ITS и *tef1a* маркеров для идентификации видов рода *Trichoderma*.

Материалы и методы. Из пробы почвы и растительных остатков на территории Южно-Сибирского ботанического сада Алтайского государственного университета (ЮСБС АГУ, г. Барнаул) были выделены виды *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. et Nirenberg, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. ghanense* Yoshim. Doi, Y. Abe et Sugiy., *T. atroviride* P. Karst., *T. citrinoviride* Bissett. Изоляты *Trichoderma* культивировали на картофельно-декстрозном агаре. Идентификацию проводили морфологическими и молекулярно-генетическими методами. Для выделения ДНК часть колонии скабливали с поверхности агара и переносили в пробирку Эппendorф объёмом 1,5 мл. ДНК выделяли с помощью набора DiamondDNA (ООО «АБТ», Россия). Для молекулярно-генетической идентификации использовали два типа маркеров ITS и *tef1a*, которые амплифицировали по протоколам, описанным ранее. Продукты ПЦР очищали на спин-колонке (Jaklitsch et al., 2006; Skaptsov et al., 2017, 2018a, 2018b). Секвенирование по Сэнгеру проводили в ООО «Синтол», Россия. Данные анализировали в ПО Chromas 2.6.6., выравнивание последовательностей проводили в ПО MEGA 7.

Результаты и обсуждение. В результате секвенирования и BLAST поиска в генбанке максимально близких последовательностей видовая принадлежность видов была подтверждена с высокой схожестью (более 99 %), в том числе с образцами из коллекций CBS (Fungal Biodiversity Centre). Сравнение последовательностей между исследуемыми видами показало достаточно высокую информативность ITS и *tef1a* маркеров. В экзоне 6 гена *tef1a* выявлено более 70 различий. В ITS регионе выявлено более 60 различий. Наибольшую вариабельность показала область ITS1, включая однонуклеотидные полиморфизмы и крупные вставки и делеции. Область ITS2 в основном содержала однонуклеотидные замены. Ген 5.8S оставался максимально консервативным и содержал только одну замену A/G для *T. asperellum*. Один из изолятов *T. asperellum* содержал делецию в области ITS1, уникальную для данного изолята и отличающую его от других изолятов *T. asperellum*.

Тем самым маркеры ITS и *tef1a* могут быть использованы как по отдельности, так и совместно для идентификации данных видов, контроля загрязнений в коллекциях и чистоты маточных культур на биотехнологических производствах. Комплексный подход, включающий анатомо-морфологические и молекулярно-генетические данные, необходим при работе с подобными высоко полиморфными культурами.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта Губернатора Алтайского края (Соглашение № 30-2024-004269).

ЛИТЕРАТУРА

- Dou K., Lu Z., Wu Q., Ni M., Yu C., Wang M., Li Y., Wang X., Xie H., Chen J., Zhang C.** MIST: a Multilocus Identification System for *Trichoderma* // Applied and Environmental Microbiology, 2020. – Vol. 86, № 18. – P. e01532-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01532-20>
- Jaklitsch W. M., Komon M., Kubicek C. P., Druzhinina I. S.** *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph // Mycologia, 2006. – Vol. 98. – Pp. 499–513.
- Kubiak A., Wolna-Maruwka A., Pilarska A. A., Niewiadomska A., Piotrowska-Cyplik A.** Fungi of the *Trichoderma* Genus: Future Perspectives of Benefits in Sustainable Agriculture // Applied Sciences, 2023. – Vol. 13, № 11. – P. 6434. <https://doi.org/10.3390/app13116434>
- Pozo M. J., Herrero B., Martín-García J., Santamaría O., Poveda J.** Evaluating potential side effects of *Trichoderma* as biocontrol agent: A two-edged sword? // Current Opinion in Environmental Science & Health, 2024. – Vol. 41. – P. 100566. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2024.100566>
- Rahimi M. J., Cai F., Grujic M., Chenthamara K., Druzhinina I. S.** Molecular Identification of *Trichoderma reesei* // Methods in Molecular Biology, 2021. – Vol. 2234. – Pp. 167–183. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1048-0_14
- Sánchez-García B., Espinosa E., Villordo-Pineda E., Rodriguez Guerra R., Mora-Avilés M.** *Trichoderma* spp. native strains molecular identification and in vitro antagonistic evaluation of root phytopathogenic fungus of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. *montcalm* // Agrociencia, 2017. – Vol. 51. – Pp. 63–79.
- Shah M. M., Afifya H.** Introductory Chapter: Identification and Isolation of *Trichoderma* spp. – Their Significance in Agriculture, Human Health, Industrial and Environmental Application: IntechOpen. – London, 2019. – 116 p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83528>
- Skaptsov M. V., Kutsev M. G., Smirnov S. V. et al.** The potential use of hyperparasitic *Tuberculina persicina* and *Fusarium sambucinum* for biocontrol of *Puccinia* sp. // Ukrainian Journal of Ecology, 2018a. – Vol. 8, № 4. – Pp. 264–265.
- Skaptsov M., Smirnov S., Kutsev M. et al.** Pathogenicity of *Simplicillium lanosoniveum* to *Coccus hesperidum* // Ukrainian Journal of Ecology, 2017. – Vol. 7, № 4. – Pp. 689–691. https://doi.org/10.15421/2017_1801
- Skaptsov M., Smirnov S., Kutsev M., Matsyura A.** Antifungal activity of several isolates of *Trichoderma* against *Cladosporium* and *Botrytis* // Ukrainian Journal of Ecology, 2018b. – Vol. 8, № 1. – Pp. 88–91. https://doi.org/10.15421/2018_191