



Ревизия коллекции рода *Talaromyces* молекулярно-генетическими методами

Выпускная квалификационная работа магистра
кафедры микологии и альгологии
Антонова Е. А.

Научный руководитель:

д.б.н., вед. н.с. Александрова А. В.

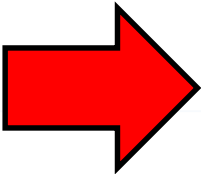


Актуальность. Динамика переноса и описания новых видов *Talaromyces* 2

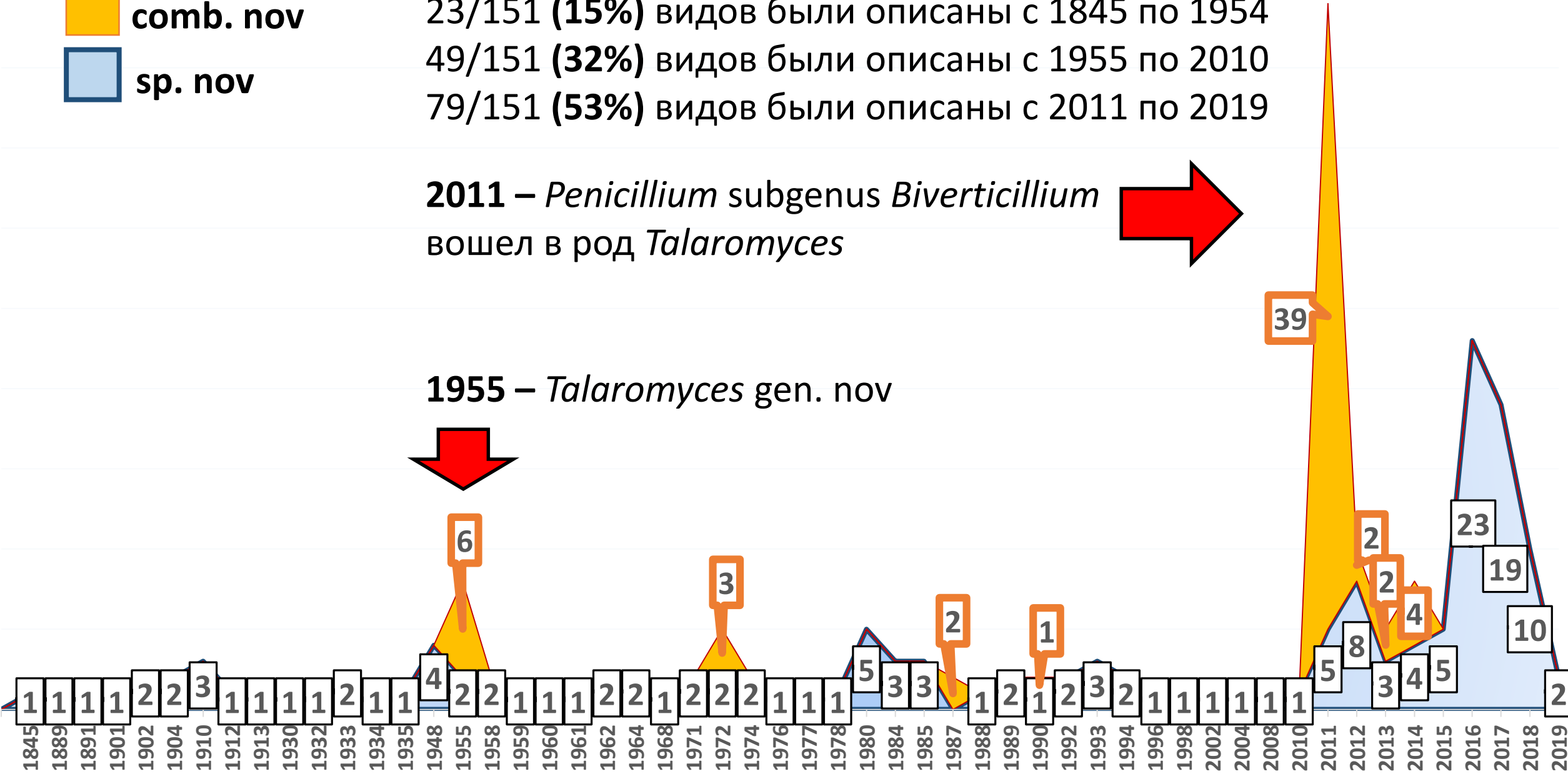
 **comb. nov**
 **sp. nov**

23/151 **(15%)** видов были описаны с 1845 по 1954
49/151 **(32%)** видов были описаны с 1955 по 2010
79/151 **(53%)** видов были описаны с 2011 по 2019

2011 – *Penicillium* subgenus *Biverticillium*
вошел в род *Talaromyces*

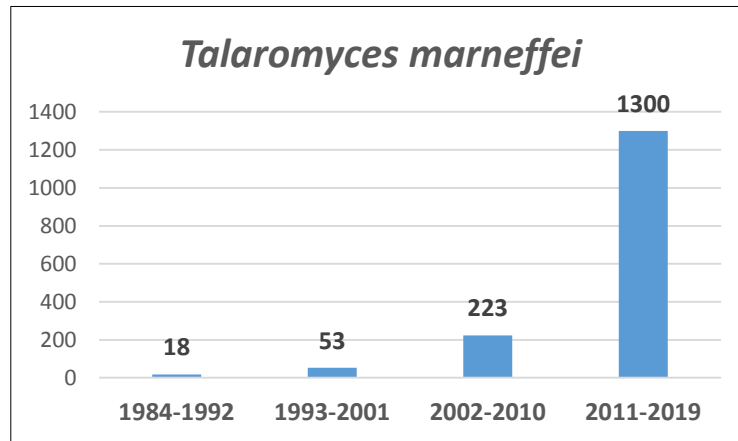


1955 – *Talaromyces* gen. nov



Патоген животных и человека

- *Talaromyces marneffe*
(Deng et al. 1988, Supparatpinyo et al. 1994, Chiang et al. 1998, Hien et al. 2001)



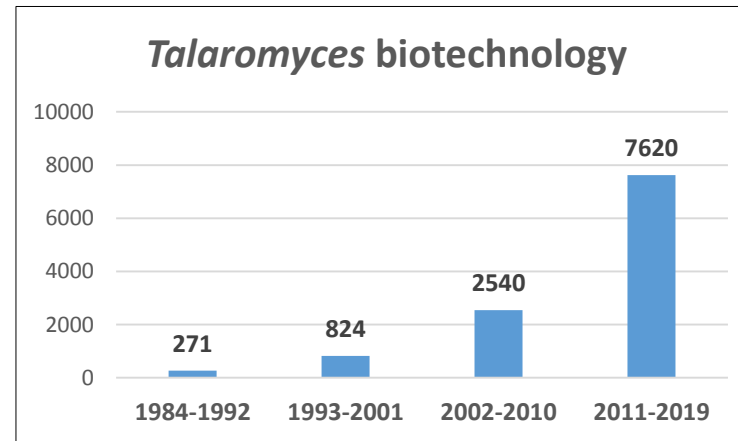
Биотехнология

Ферменты

- *Talaromyces cellulolyticus*
- *Talaromyces funiculosus*
- *Talaromyces pinophilus*
- *Talaromyces rugulosus*
(Brunner et al., 2005; Gohel et al., 2006; Marois et. al., 1984; Punja, 2001).

Пигменты

- *Talaromyces artroseus*
(Frisvad et al., 2013)

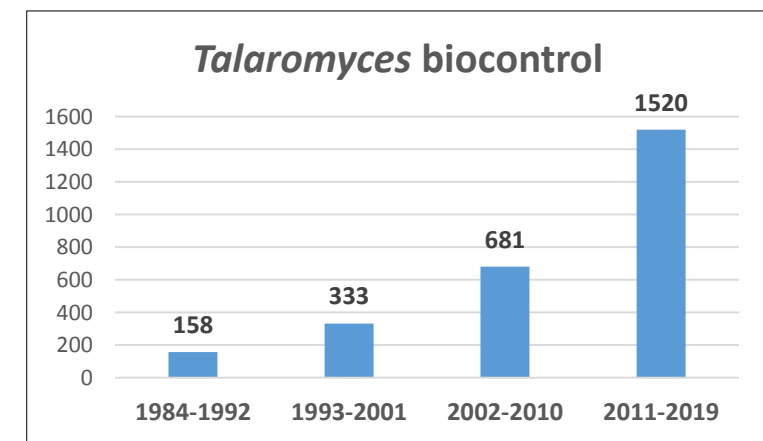


Биометоды защиты растений

- *Talaromyces flavus*

(Brunner et al., 2005; Gohel et al., 2006; Marois et. al., 1984; Punja, 2001).

- *Talaromyces trachyspermus*
(Hemmati, Gholizadeh, 2019)



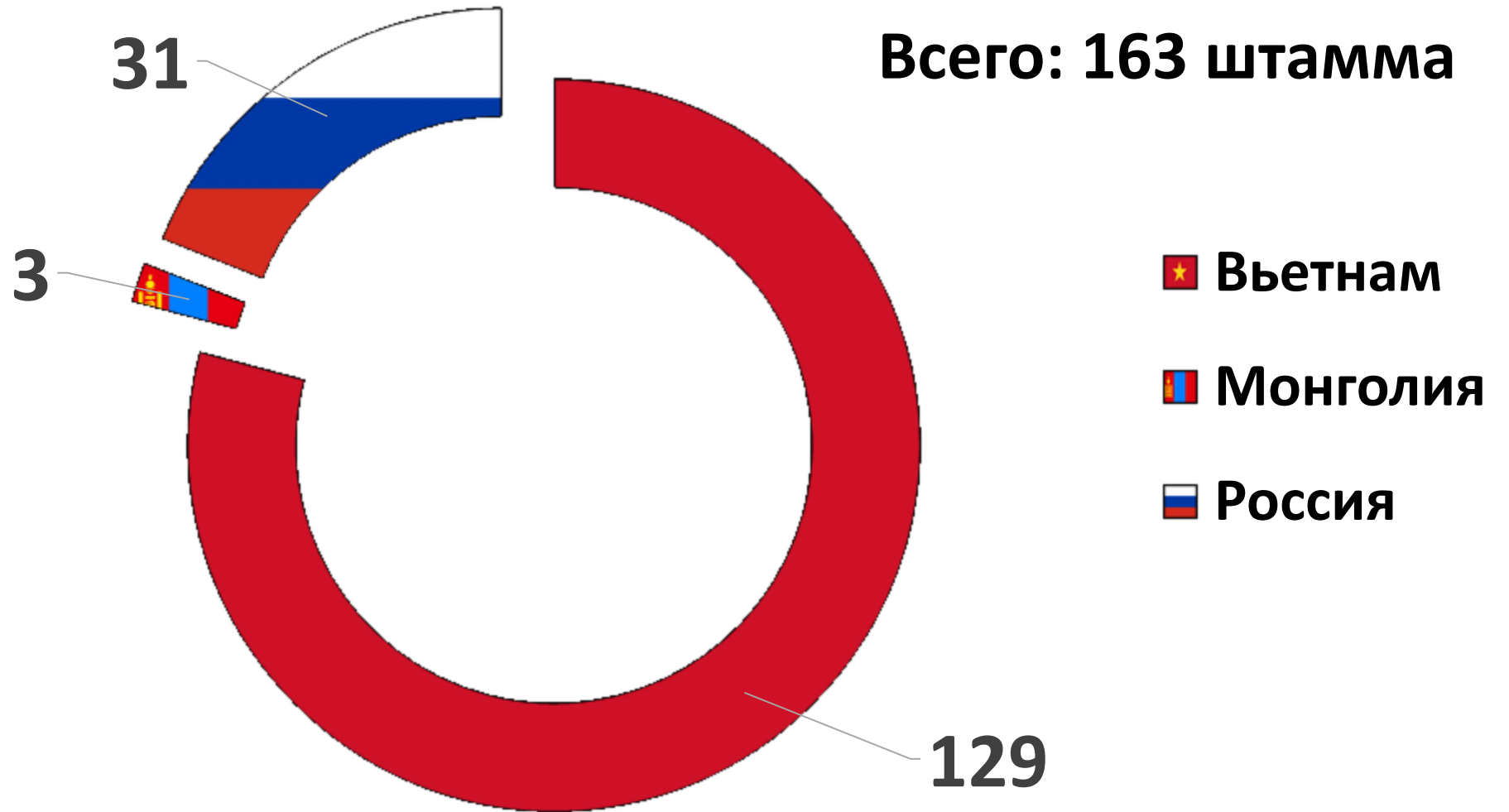
Цель: провести ревизию видов рода *Talaromyces* из коллекции кафедры микологии и альгологии молекулярно-генетическими методами

Задачи:

1. Провести молекулярную диагностику штаммов коллекции с использованием маркёров, оптимально подходящих для видов данного рода
2. Описать морфолого-культуральные признаки штаммов
3. Разработать оптимальную процедуру характеристики штаммов рода *Talaromyces*
4. Провести комплексный филогенетический анализ, и уточнить видовую принадлежность

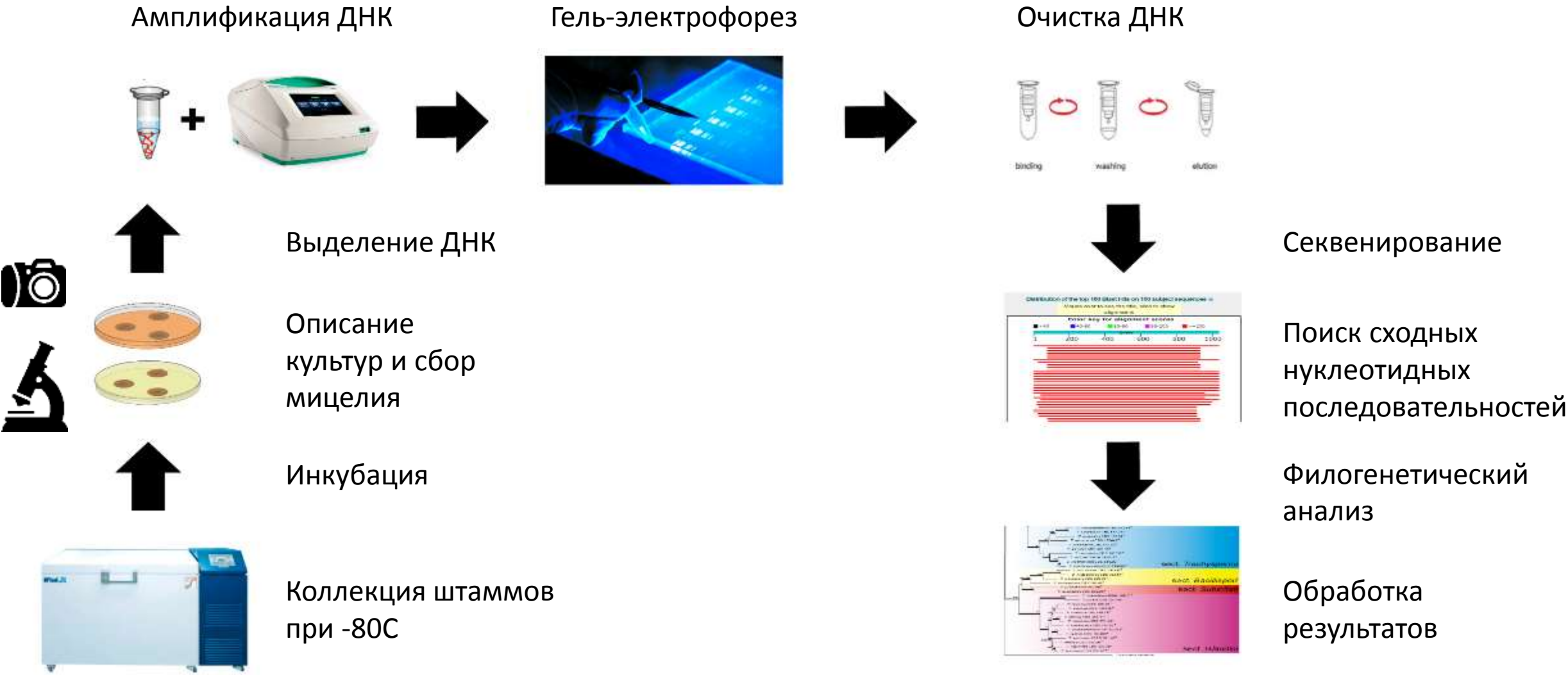
Материалы и методы. Коллекция

Страна происхождения штаммов коллекции



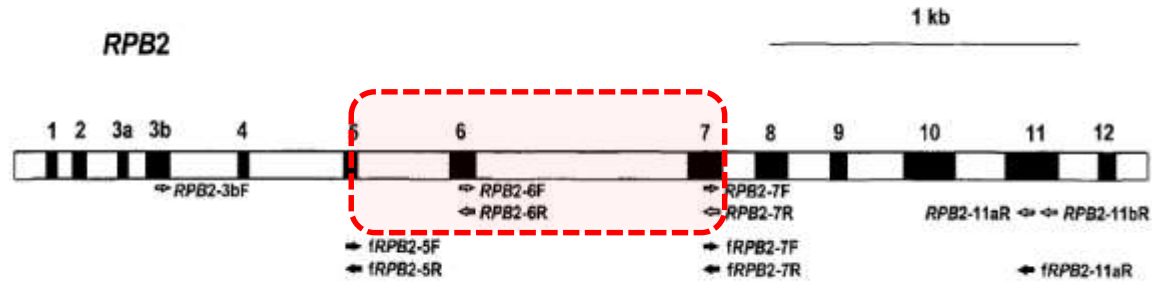
Рабочая
коллекция была
сформирована с
1995 по 2017 год

Материалы и методы



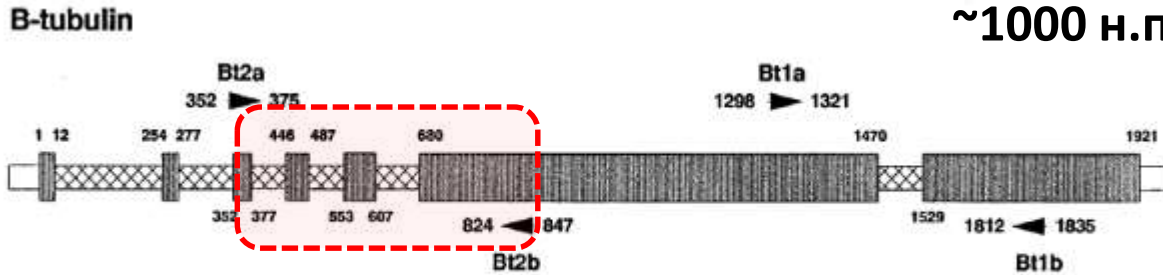
Материалы и методы. Праймеры

1802 Liu et al.



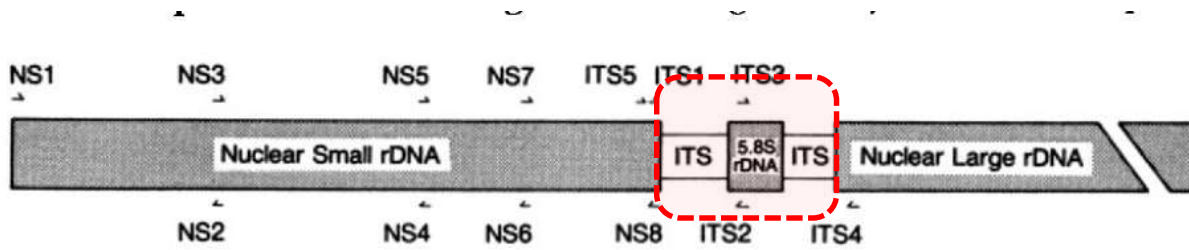
(Liu et al. 1999)

~1000 н.п.



(Glass, Donaldson, 1995)

~500 н.п.



(White et al., 1990)

~600 н.п.

Праймеры для участка RPB2:

5Feur F: GAY GAY CGK GAY CAY TTC GG (Houbraken, 2012)

7CReur R: CCC ATR GCY TGY TTR CCC AT (Houbraken, 2012)

Праймеры для участка BenA:

Bt2a F: GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC (Glass, Donaldson, 1995)

Bt2b R: ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC (Glass, Donaldson, 1995)

Праймеры для участка ITS:

ITS1 F: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G (White et al., 1990)

ITS4 R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (White et al., 1990)

Материалы и методы. ПО

Программное обеспечение

Алгоритм выравнивания нуклеотидных последовательностей MAFFT (Nucleotide alignment)	(Kato et al., 2017 ; https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html)
Выбор нуклеотидной модели замен (Substitution models)	jModelTest v. 2.1.10 (Darriba et al. 2012)
Баесовский подход в филогенетике (BI - bayesian inference)	MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012)
Метод максимального правдоподобия (ML - maximum likelihood)	IQ-TREE v. 1.6.2 (Nguyen et al., 2015 ; Chernomor et al., 2016).
Визуализация результатов	Figtree v. 1.4.3 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree)

Результаты

1. Получена геномная ДНК для 142 штаммов
2. Охарактеризованы морфологические признаки для 126 штаммов
3. Получены последовательности ДНК для участков:
RPB2 (34), BenA (90), ITS (9) и проведен филогенетический анализ
4. Повторно идентифицирован 81 штамм коллекции, для 15 штаммов не обнаружено сходных нуклеотидных последовательностей. Выявлено 25 видов рода *Talaromyces*
5. Разработана упрощенная методика идентификации видов рода *Talaromyces*

Результаты. Видовой состав коллекции

1. Изучено 126 штаммов коллекции (81 при помощи комплексного подхода, остальные 45 штаммов - морфологически), выявлено – 25 видов из 4-х секций (до этого при первичной морфологической идентификации было выявлено только 20 видов)
2. В том числе выявлено 15 штаммов из 6 клад не имеющих сходства ни с одним из описанных на данный момент видов, вероятно, это новые виды



Результаты. Увеличение количества видов

- 1. Разделения видового комплекса *Talaromyces purpureogenus*, который содержит четыре отдельных вида: *T. purpureogenus*, *T. ruber*, *T. amestolkiae*, *T. stollii* ([Yilmaz et al., 2012](#))
- 2. Выявления видов-двойников со сходной морфологией (напр. *Talaromyces verruculosus*, *T. apiculatus*, *T. kendrickii*)
- 3. За счет видов, которые были описаны за последние 8–9 лет (напр. *Talaromyces kendrickii*, *T. annesophieae* и др.)

Было	Стало
<i>Talaromyces funiculosus</i> (18 штаммов)	<i>Talaromyces stollii</i> , <i>T. sayulitensis</i> , <i>T. amestolkiae</i> , <i>T. pinophilus</i> , <i>T. ramulosus</i>
<i>Talaromyces aculeatus</i> (15 штаммов)	<i>T. kendrickii</i> , <i>T. apiculatus</i> , <i>T. verruculosus</i> , <i>T. stollii</i>
<i>Talaromyces flavus</i> (10 штаммов)	<i>Talaromyces wortmanii</i> , <i>T. amazonensis</i> , <i>T. muroii</i> , <i>T. verruculosus</i>

Результаты. Распространение по странам

1. На территориях России и Вьетнама выявлено 7 видов: *Talaromyces pinophilus*, *T. verruculosus*, *T. amestolkiae*, *T. stollii*, *T. muroii*, *T. atroroseus*, *T. islandicus*, можно предположить, что это виды космополиты с широким распространением
2. В Монголии и России был отмечен редкий вид – *Talaromyces kendrickii*, до этого известный только из места описания в Канаде ([Visagie et al., 2015](#))
3. Только во Вьетнаме отмечены 14 видов: *Talaromyces allahabadensis*, *T. wortmannii*, *T. albobiverticillius*, *T. heiheensis*, *T. diversus*, *T. trachyspermus*, *T. ramulosus*, *T. apiculatus*, *T. siamensis*, *T. annesophieae*, *T. purpureogenus*, *T. amazonensis*, *T. thailandensis*, *T. mangshanicus*). Можно предположить, что это виды с циркумэкваториальным распространением
4. Только в России были отмечены 3 вида: *Talaromyces rugulosus*, *T. sayulitensis*, *T. stipitatus*

CBS 133440T
T. albobiverticillius

CBS 206.89
T. albobiverticillius

CBS 133444
T. albobiverticillius

CBS 133448
T. albobiverticillius

CBS 133452
T. albobiverticillius

CBS 133168
T. albobiverticillius

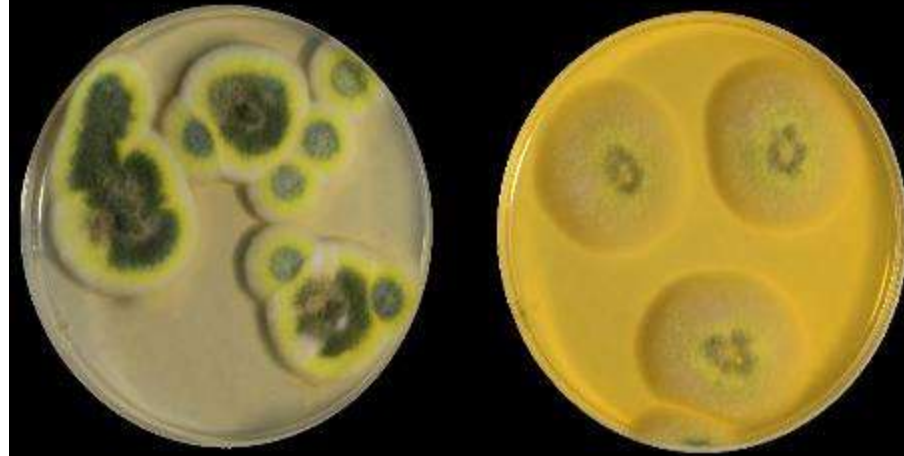
CBS 313.63
T. albobiverticillius



Результаты. Морфологическое описание

453 *Talaromyces kendrickii*

Конидии: сферические, бородавчатые, 2-3 мкм,
пигмента нет



1540 *Talaromyces verruculosus*

Конидии: сферические, бородавчатые, 2-3 мкм,
пигмента нет

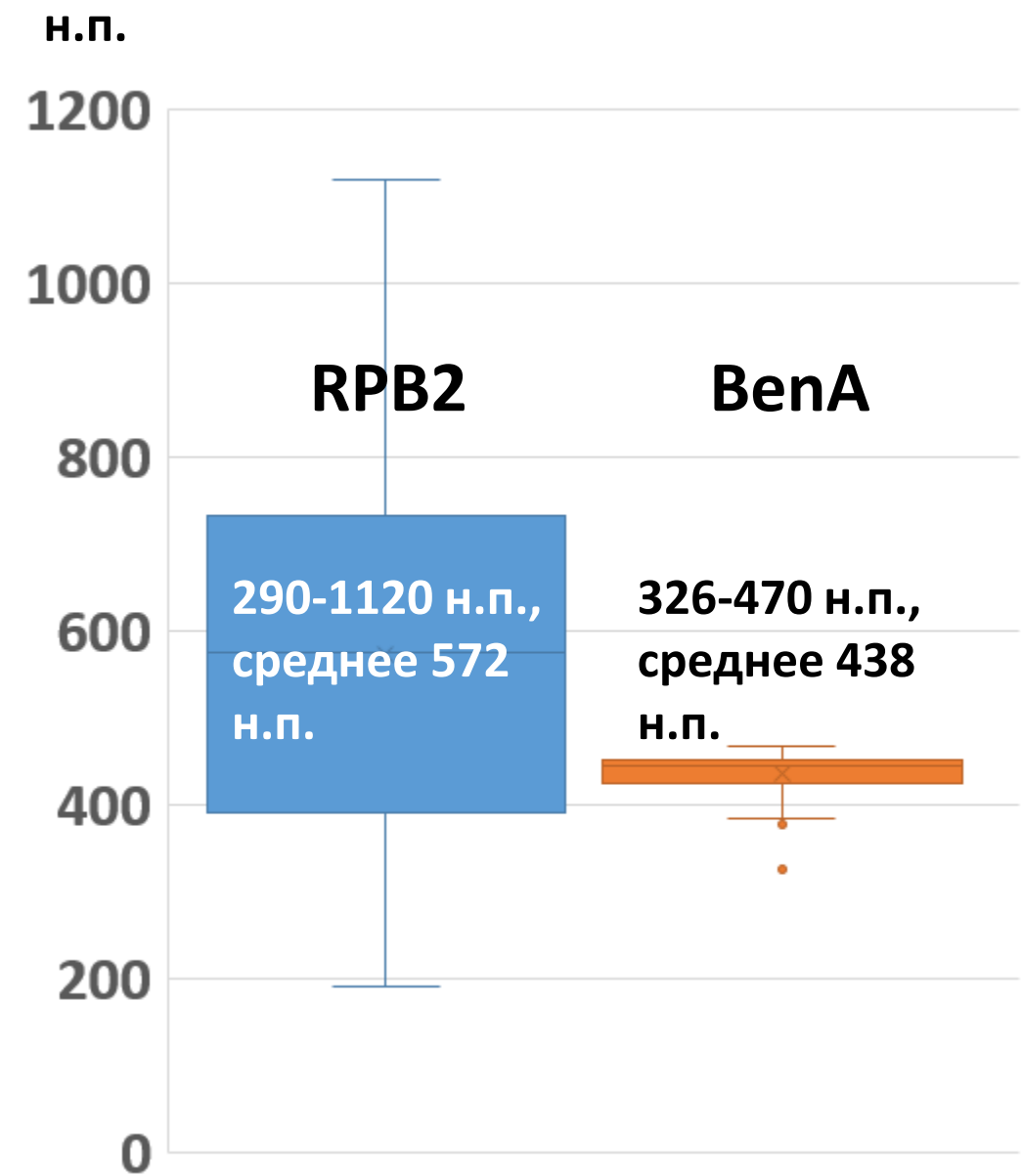
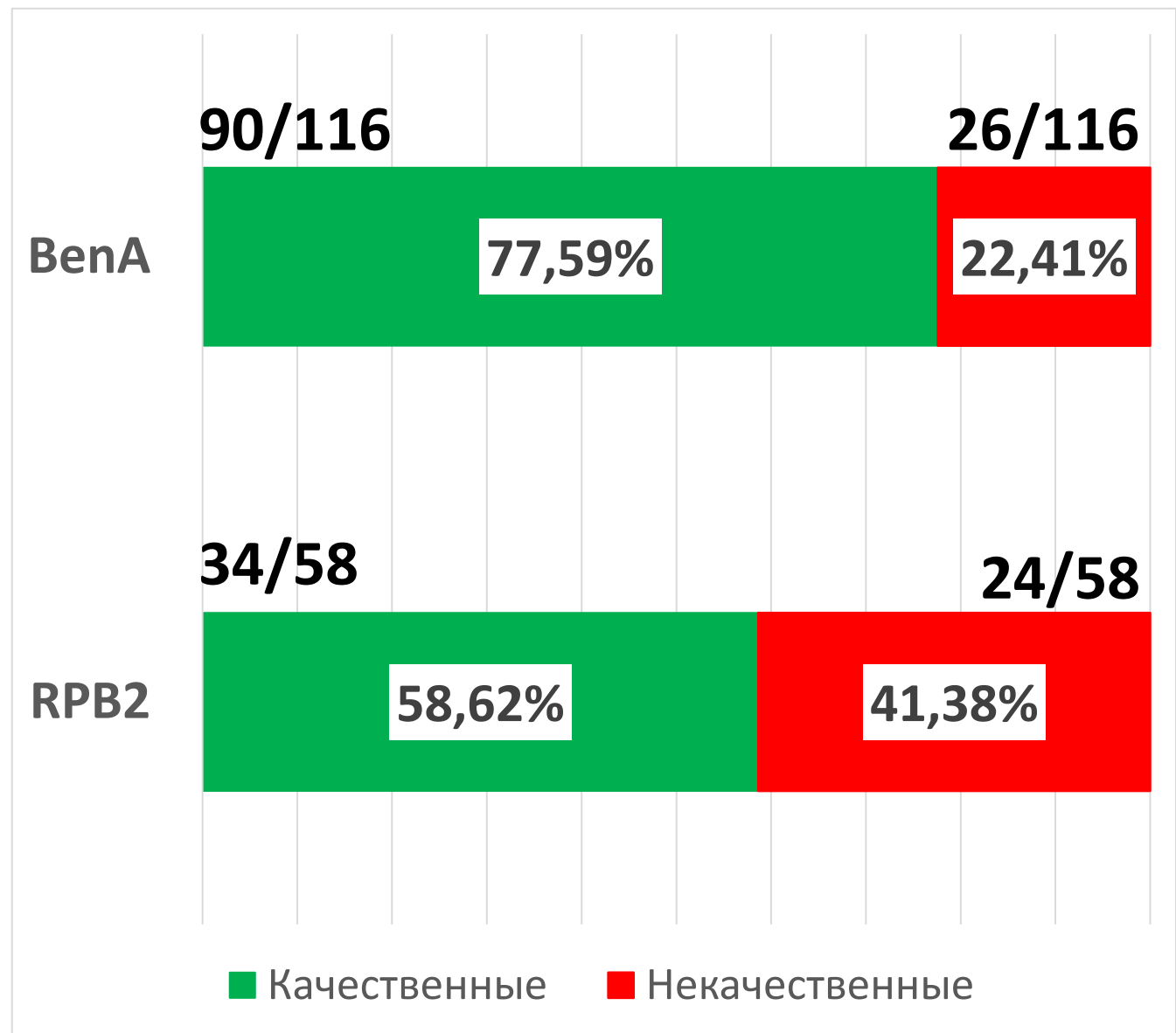


3256 *Talaromyces apiculatus*

Конидии: сферические, бородавчатые, 2-3 мкм,
пигмента нет

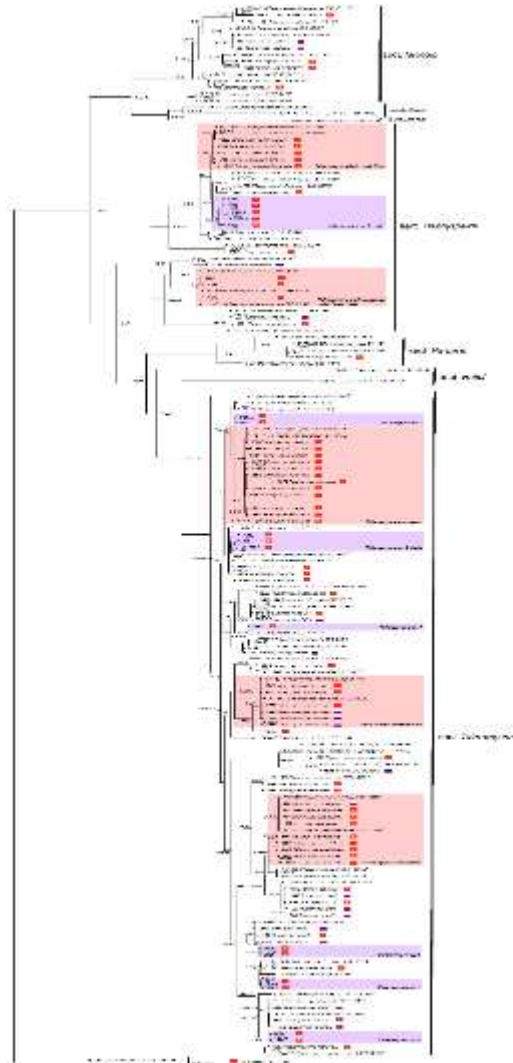


Результаты. Молекулярная диагностика



Результаты. Филогенетический анализ

BenA



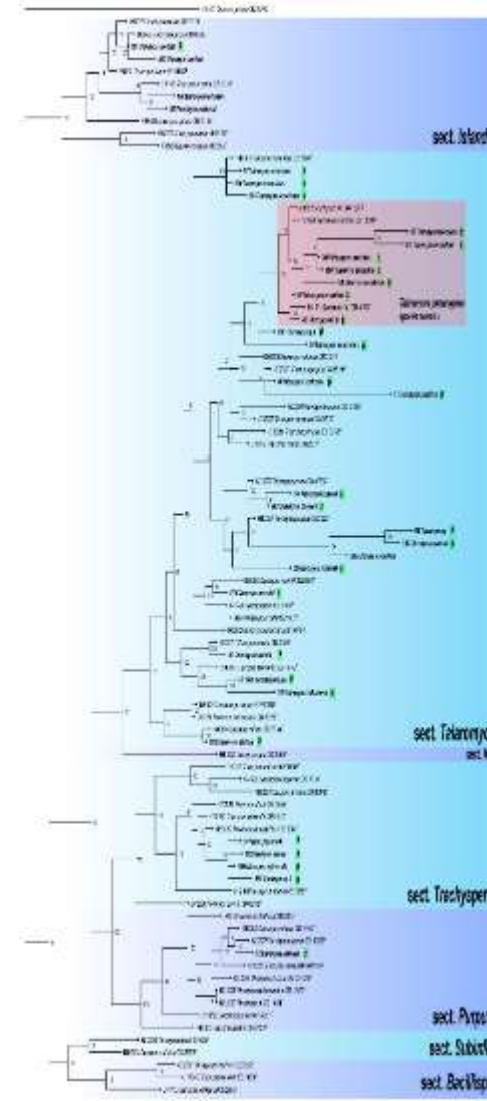
➤ 90 коллекционных последовательностей BenA

➤ 69 референсных последовательностей

➤ Идентифицировано заново: 73 штамма

➤ Не имеющие сходных нуклеотидных последовательностей: 15 штаммов

RPB2



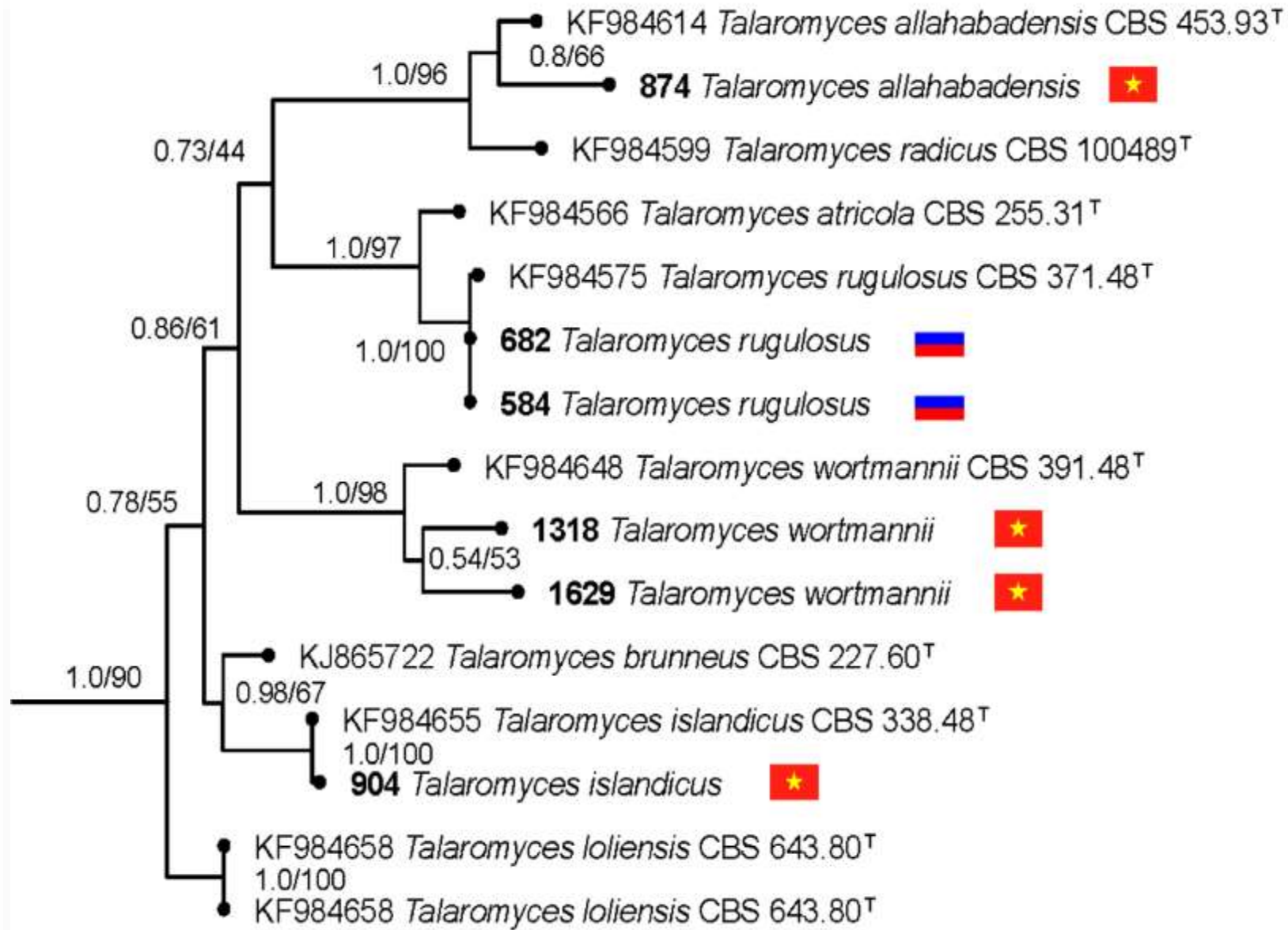
➤ 34 коллекционных последовательности RPB2

➤ 54 референсных последовательности

➤ Идентифицировано заново: 27 штаммов

➤ Не имеющие сходных нуклеотидных последовательностей: 7 штаммов

Результаты. Филогенетический анализ

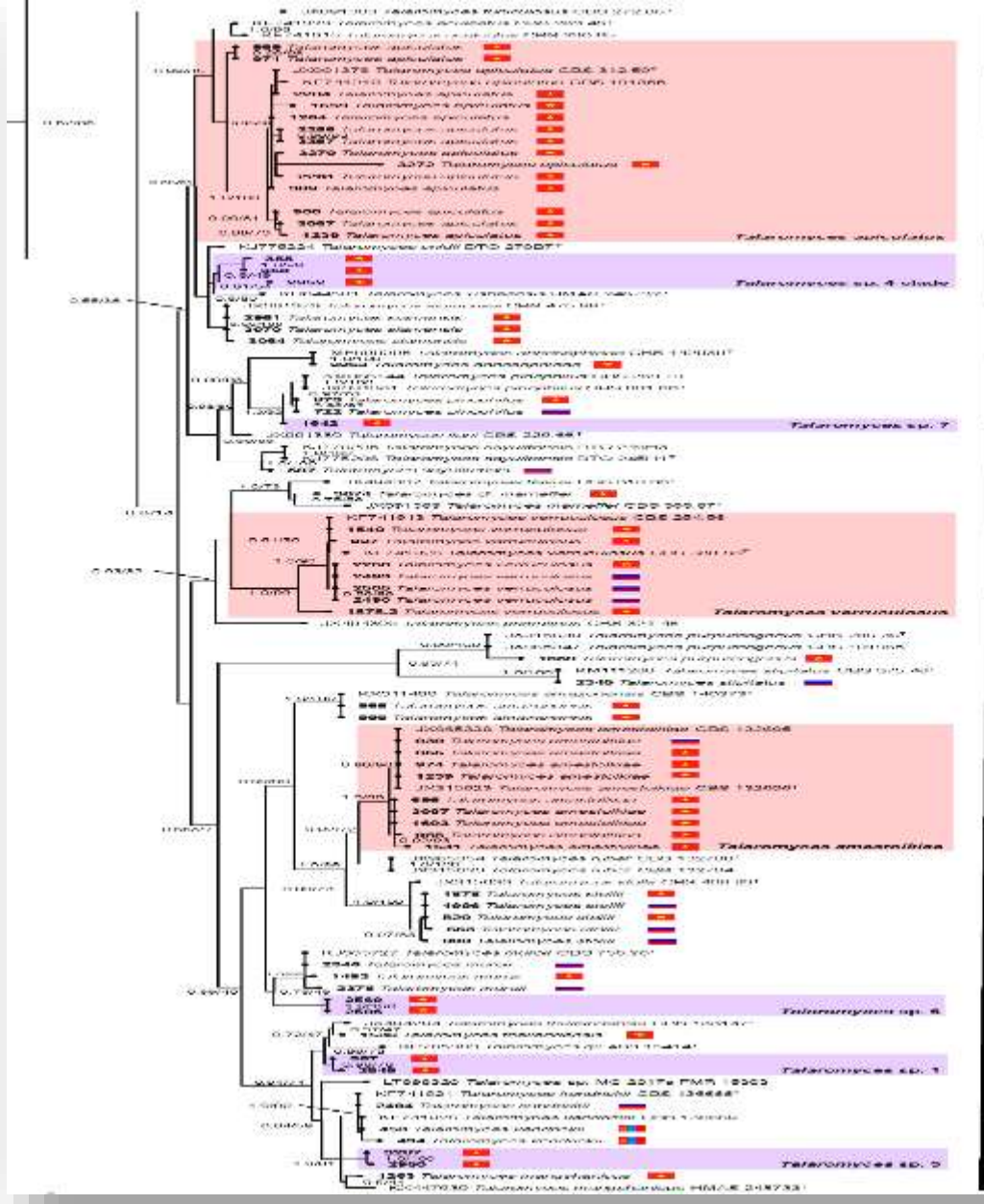


sect. *Islandici*

4 вида

6 штаммов

Результаты. Филогенетический анализ



sect. *Talaromyces*

15 видов

54 штамма

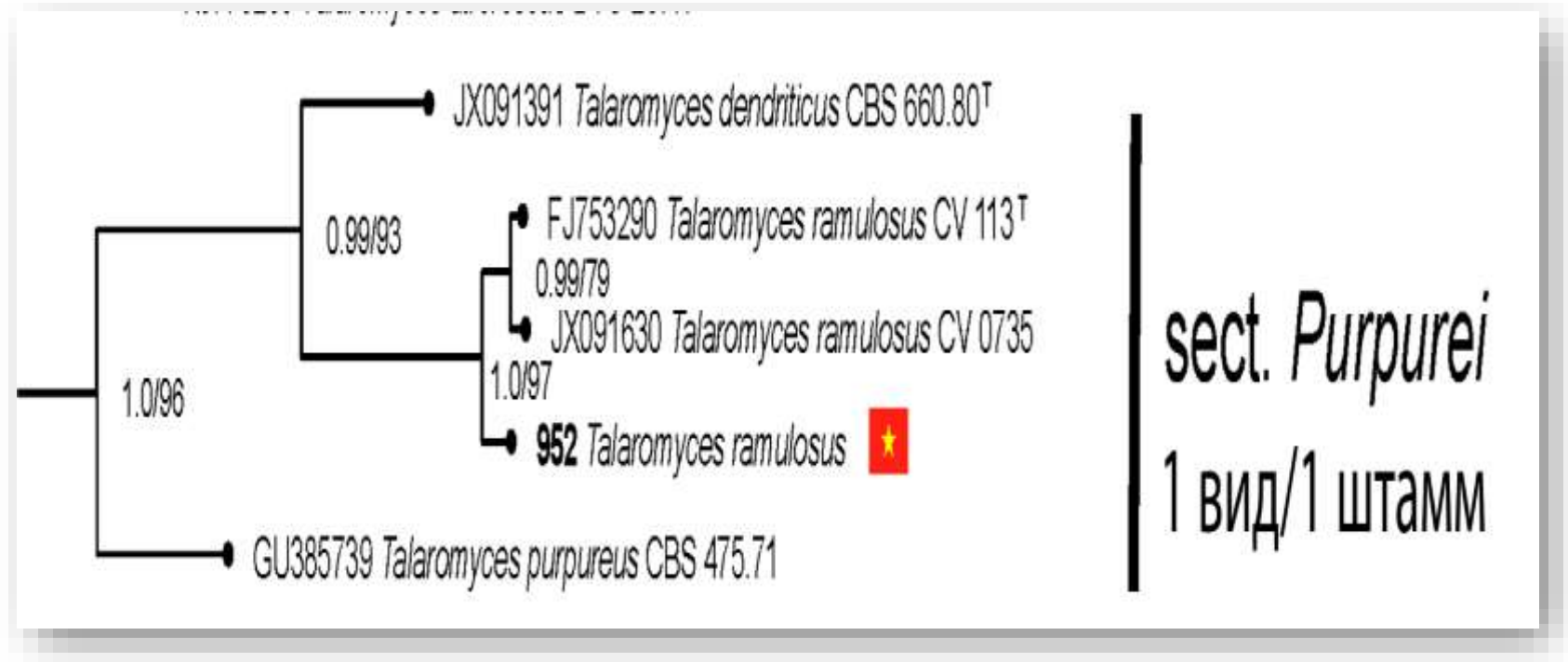
sect. *Talaromyces*

15 видов/
54 штамма

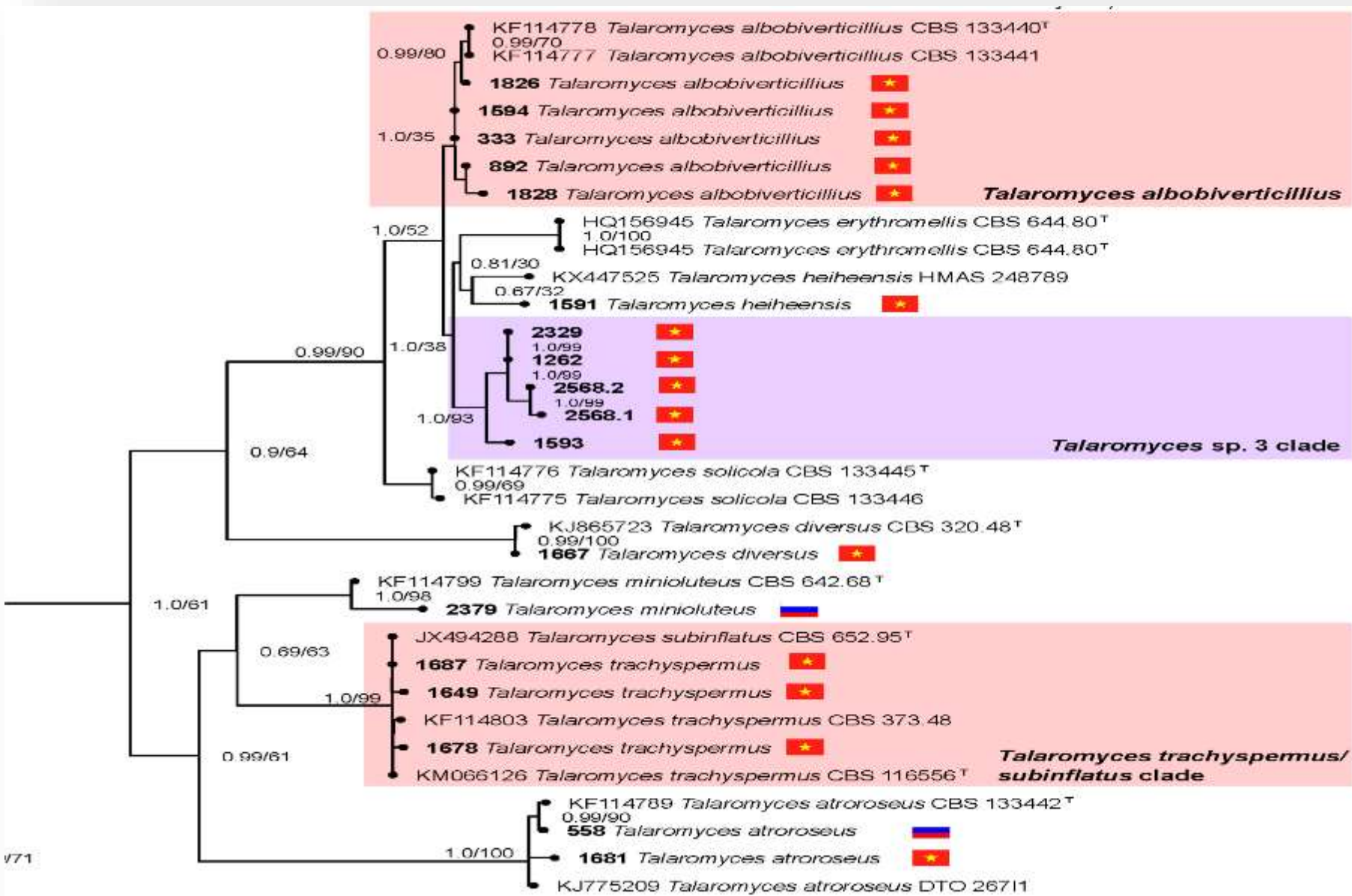
10 штаммов не имеют
сходн. нукл. послед.

10 штаммов не имеют сходных
нуклеотидных последовательностей

Результаты. Филогенетический анализ



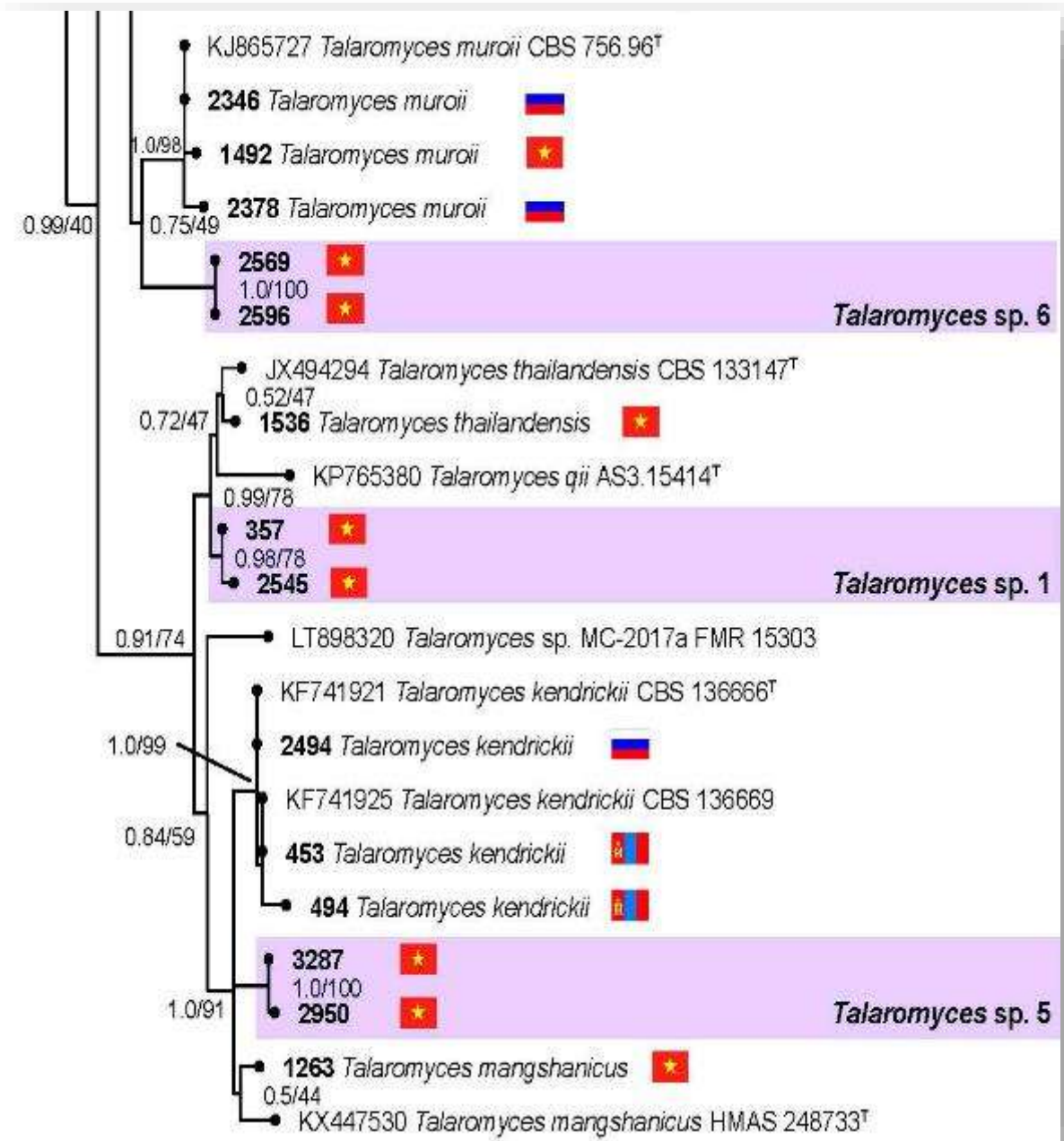
Результаты. Филогенетический анализ



sect. *Trachyspermi*
5 видов/13 штаммов
5 штаммов не имеют.
сходн нукл. послед

Результаты. Штаммы, не имеющие сходных нуклеотидных последовательностей

<i>Talaromyces</i> sp. 1	357, 2545
<i>Talaromyces</i> sp. 2	969, 971 (ITS - <i>Talaromyces apiculatus</i>)
<i>Talaromyces</i> sp. 3	1262, 1593, 2329, 2568.1, 2568.2
<i>Talaromyces</i> sp. 4	355, 356, 2952
<i>Talaromyces</i> sp. 5	2950, 3287
<i>Talaromyces</i> sp. 6	2569, 2596
<i>Talaromyces</i> sp. 7	1642



Выводы

1. Охарактеризовано 126 штаммов рода *Talaromyces* из коллекции с применением комплексного подхода, включающего описание морфологических признаков и филогенетический анализ, по итогам которого они отнесены к 25 видам из 4 секций.
2. Выявлено 15 штаммов, отнесенных к 6 кладам, для которых не обнаружено сходных нуклеотидных последовательностей, эти штаммы, вероятно, являются новыми видами.
3. Увеличение количества видов произошло за счет разделения видового комплекса *Talaromyces purpureogenus*, разграничения видов-двойников со сходной морфологией, а также за счет видов, которые были описаны в последние годы.
4. Виды *T. purpureogenus* и *T. funiculosus*, считавшиеся очень широко распространёнными, таковыми не являются. Они входят в группы морфологически близких видов.
5. По морфологическим признакам однозначно можно идентифицировать только два вида: *Talaromyces islandicus* и *T. wortmannii*.
6. Для идентификации видов рода *Talaromyces* необходим комплексный подход, включающий в себя инкубацию на двух питательных средах (CYA и MEA) при 25 °C, для характеристики морфолого-культуральных признаков, а также использование последовательности участка гена β -тубулина (BenA) с праймерами Bt2a/Bt2b для молекулярной диагностики штамма.

Спасибо за внимание!



Благодарю

Александрову Алину Витальевну за всестороннюю помощь в работе.

Кокаеву Людмилу Юрьевну и Кутузову Ирину Алексеевну за помощь в освоении молекулярных методов.

Василенко Олега Викторовича за ценные замечания.