

## Видовая идентификация штаммов энтомопатогенных грибов рода *Lecanicillium* с помощью молекулярных маркёров

### Species identification of entomopathogenic fungi of the genus *Lecanicillium* by molecular markers

Г.В. Митина\*, Ю.С. Токарев\*, Т. Ули-Маттила\*\*  
G.V. Mitina\*, Yu.S. Tokarev\*, T. Yli-Mattila\*\*

\* Всероссийский институт защиты растений Россельхозакадемии, шоссе Подбельского 3, Санкт-Петербург, Пушкин 196608 Россия. E-mail: galmit@rambler.ru.

\* All-Russian Institute of Plant Protection, Russian Academy of Agricultural Sciences, Podbelskogo Shosse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 196608 Russia.

\*\* Университет города Турку, Турку FI-20014 Финляндия.

\*\* University of Turku, Turun Yliopisto, Turku FI-20014 Finland.

**Ключевые слова:** систематика, энтомопатогенные грибы, *Lecanicillium* spp., *Verticillium lecanii* s.l., митохондриальная ДНК, nad1, RAPD, внутривидовой полиморфизм.

**Key words:** systematics, entomopathogenic fungi, *Lecanicillium* spp., *Verticillium lecanii* s.l., mitochondrial DNA, nad1, RAPD, intraspecific polymorphism.

**Резюме.** Для видовой идентификации энтомопатогенных анаморфных аскомицетов из рода *Lecanicillium* (бывший комплексный вид *Verticillium lecanii* Zimm. Viegas) отсеквенирован участок митохондриального гена nad1. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей 13 изолятов показал их принадлежность виду *Lecanicillium muscarium* при наличии четырёх молекулярных гаплотипов. Дальнейшая дифференциация штаммов в пределах одного nad1-гаплотипа возможна на основе сравнения паттернов, полученных методами RAPD-PCR и UP-PCR.

**Abstract.** A region of the mitochondrial gene nad1 was sequenced for species identification of entomopathogenic anamorphic ascomycetes of the genus *Lecanicillium* (former complex species *Verticillium lecanii* Zimm. Viegas). The analysis of the sequences obtained for thirteen isolates showed their attribution to the species *Lecanicillium muscarium* and presence of four molecular haplotypes. Further differentiation of the strains within one haplotype is possible basing upon comparison the patterns, produced by RAPD- and UP-PCR.

## Введение

Основные группы патогенов, имеющих важное значение в регуляции численности массовых видов насекомых, представлены вирусами, бактериями, микроспоридиями, грибами и нематодами. Энтомопатогенные грибы рассматриваются как существенный фактор динамики численности насекомых и в качестве продуцентов биопрепаратов для борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства. Одна из фундаментальных проблем совре-

менной микологии состоит в несоответствии традиционных систем филогенетическим отношениям микроскопических грибов, в том числе анаморфных аскомицетов, установленным на основе молекулярно-генетического анализа. Многие виды микроскопических грибов, относящиеся ранее к искусственно объединённой группе «Несовершенные грибы» (*Deuteromycota*), радикально изменили своё систематическое положение. Этим изменениям в значительной мере была подвергнута систематика анаморфных грибов — патогенов насекомых [Zare et al., 1999; Rehner, Buckley, 2005; Sung et al., 2007; Bischoff et al., 2009; Rehner et al., 2011]. В частности, известный в литературе вид *Verticillium lecanii* Zimm. Viegas был определён как комплексный, включающий в себя различные таксоны на уровне рода [Zare, Gams, 2001a]. Их представители широко распространены в природе прежде всего как паразиты насекомых отряда Homoptera (тлей, белокрылок и кокцид [Евлахова, 1939; Hall, 1976, 1981, 1984], но могут встречаться и на насекомых из других отрядов, растительных клещей, фитопатогенных грибах и в почве [Hänssler, Hermanns, 1981; Heintz, Blaich, 1990].

Ревизия рода *Verticillium* (секция Prostrata) привела к описанию новых видов и родов энтомопатогенных грибов. Более 190 видов *Verticillium* были разделены на виды, относящиеся к порядку Phyllochorales (*Verticillium* секция Nigrescentia, в которую вошли только сапрофиты и фитопатогены) и виды, относящиеся к порядку Nurocreales, куда вошли все *Verticillium* из секции Prostrata. Были

образованы новые таксоны *Lecanicillium* и *Simpli-cillium*, содержащие все энтомопатогенные и вертициллиум-подобные анаморфные грибы, а также *Haplocillium* и *Pochonia*, включающие виды-нематофаги [Zare et al., 2000; Gams, Zare 2001; Sung et al., 2001; Zare, Gams 2001a, b; Zare et al., 2001].

В основу ревизии положен комплексный анализ морфологических характеристик, результатов ITS-RFLP рДНК и нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов [Zare et al., 2000, 2001; Gams, Zare 2001; Sung et al., 2007]. В результате анализа нуклеотидных последовательностей рибосомальной ДНК (ITS области), размеров конидий и хозяйинной специфичности были выделены такие виды рода *Lecanicillium*, как *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare et W. Gams, патоген червецов и щитовок, *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare et W. Gams, патоген тлей, *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare et W. Gams, патоген белокрылок и другие виды [Zare, Gams, 2001a]. В ряде случаев было показано, что ITS области могут иметь низкую вариабельность, не позволяющую надёжно разграничить эти близкородственные виды [Sugimoto et al., 2003; Kouvelis et al., 2008]. Для отдельных видов *Lecanicillium* обнаружена половая стадия, например, для *L. lecanii* это *Cordyceps confragosa* (Mains) [Sung et al., 2007], для видов *L. muscarium* и *L. longisporum* телеоморфы пока не найдены.

Разработка более надёжного метода идентификации близкородственных видов рода *Lecanicillium* стала возможной после создания полной функциональной и рестрикционной карты митохондриальной ДНК (мтДНК) *Lecanicillium muscarium* [Kouvelis et al., 2004]. На основе комбинации нуклеотидных последовательностей трёх митохондриальных генов (*rns*, *nad1*, *nad3*) и ITS-регионов рДНК проведена идентификация новых энтомопатогенных видов *Lecanicillium* и неидентифицированных видов *Verticillium*. Среди изученных митохондриальных генов наиболее информативным оказался анализ нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *nad1* [Kouvelis et al., 2008].

Штаммы *Lecanicillium* spp. (бывший комплексный вид *Verticillium lecanii* Zimm. Viegas) длительное время являются объектами изучения в качестве продуцентов экологически безопасных биопрепаратов для защиты растений от сосущих вредителей и биологически активных соединений [Павлюшин, 1983; Павлюшин и др., 1989; Митина и др., 2001; Митина, Павлюшин, 2011]. Более 40 природных изолятов *Lecanicillium* spp. собрано в Государственной коллекции полезных и вредных организмов ВИЗР, с которыми постоянно ведётся работа по изучению их культуральных и патогенных свойств. Штаммы характеризуются высоким уровнем дивергенции: по географическому происхождению и источнику выделения (от членистоногих до ржавчинных грибов), по патогенным и токсигенным свойствам [Митина, 1992; Митина и др., 1997, 2012]. Отселектированные штаммы обладают высокими

показателями вирулентности, продуктивности спор, активности кутикулодеградирующих ферментов, токсигенности [Митина, 1992]. При этом морфологически эти штаммы очень близки; так, по размеру конидий большинство природных изолятов *Lecanicillium* spp. являются среднеспоровыми и не определяются однозначно как виды *L. longisporum* или *L. muscarium*. Использование признака гостальной специфичности для определения видов также часто затруднительно, поскольку в очагах эпизоотий, где выделены эти изоляты, при отсутствии подходящего хозяина происходит их смена: от насекомых до фитопатогенных грибов [Митина et al., 2008]. Определение видов по современной номенклатуре невозможно без использования молекулярных методов.

Таким образом, целью работы было идентифицировать отобранные коллекционные штаммы комплексного вида *Verticillium lecanii* s.l. по современной номенклатуре с помощью молекулярных методов и провести филогенетический анализ для выявления родственных связей этой группы анаморфных аскомицетов.

## Материалы и методы

**Грибные изоляты.** Работа проводилась с 13 природными изолятами энтомопатогенных грибов *Lecanicillium* spp. (= *Verticillium lecanii* s.l.), выделенными из насекомых отряда Homoptera (белокрылки, тли, кокциды), фитопатогенных грибов и почвы, и имеющих различное географическое происхождение, из Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей ВИЗР (WFCC WDCM № 760) (табл. 1).

**Экстракция ДНК.** ДНК выделяли из свежего мицелия моноспоровой грибной колонии, выращенной на среде Чапека с агаром в чашке Петри в течение 7 суток при 28 °С. Экстракцию проводили смесью хлороформ/октанол по методике Raavanen-Huttala с соавторами [Raavanen-Huttala et al., 1999].

**Аmplификация мтДНК.** Для амплификации участка гена *nad1*-дегидрогеназы мтДНК использовали праймеры NAD1A (ATGGCSAGTATGCAA AGA AGA) и NAD1B (GCATGTTCTGTCCATAAASCCA СТААС) [Kouvelis et al., 2004]. Их применение позволяет получить молекулярные гаплотипы, пригодные для дифференциации изолятов энтомопатогенных грибов на видовом уровне.

Для амплификации мтДНК готовили реакционную смесь объёмом 25 мкл, содержащую 200 мкМ каждого из четырёх нуклеотидов, 10 пкмоль прямого и обратного праймеров, 2,5 мкл буфера (Dynazyme reaction buffer) и 0,5 ед. ДНК-полимеразы (Dynazyme polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland)), к которой добавляли 1 мкл образца геномной ДНК.

Использовали следующую программу ПЦР для амплификации *nad1*: денатурация при 94 °С 90 с, 30 циклов а) денатурации ДНК при 92 °С 30 с, б) отжига праймеров при 55 °С 90 с, в) синтеза

Таблица 1. Список природных изолятов энтомопатогенных грибов рода *Lecanicillium*, использованных в настоящей работеTable 1. List of the natural isolates of entomopathogenic fungi from the genus *Lecanicillium*, used in the present work

N	Хозяин	Географическое происхождение	Год выделения
VI 5	Ежевичная белокрылка <i>Pealius setosus</i> (Homoptera: Aleyrodidae)	Юго-Западная Грузия, Аджария	1982
VI 8	Цикадка <i>Evacanthus interruptus</i> (Homoptera: Cicadellidae)	Центральная Россия, Смоленск	1985
VI 18	Оранжевая белокрылка <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Homoptera: Aleyrodidae)	Центральная Россия, Московская область, Раменское	1985
VI 21	Оранжевая белокрылка <i>T. vaporariorum</i> (Homoptera: Aleyrodidae)		1981
VI 22	Большая картофельная тля <i>Aulacorthum solani</i> (Homoptera: Aphididae)		1985
VI 27	Тля (Homoptera: Aphididae)	Центральная Россия, Москва	1983
VVI 56	Урединопустулы возбудителя ржавчины <i>Phragmidium</i> sp. на <i>Salix</i> sp.	Центральная Россия, Московская область, Раменское	2000
VI 72	Белокрылка <i>Aleurodes lonicerae</i> (Homoptera: Aleyrodidae)	Центральная Россия, Московская область, Долгопрудный	1999
VI 49	Оранжевая белокрылка <i>T. vaporariorum</i> (Homoptera: Aleyrodidae)	Центральная Россия, Марий-Эл, Йошкар-Ола	1981
VI 60	Тля (Homoptera: Aphididae)	Юг России, Краснодарский край, Мостовской район	2000
VI 65	Белокрылка (Homoptera: Aleyrodidae)	Юг России, Краснодарский край, Сочи	2000
VI 61	Урединопустулы возбудителя ржавчины <i>Phragmidium</i> sp. на <i>Rubus</i> sp.	Юг России, Краснодарский край, Мостовской район	2000
VI 62	Горная почва	Юг России, Карачаево-Черкесия, Теберда	2000

ДНК при 72 °C 90 с; терминация цепи при 72 °C 3 мин. *nad1* продукты очищали с помощью колонок GFX™ PCR и секвенировали с обоих концов на автоматическом секвенаторе ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Университет г. Турку).

ПЦР со случайными и универсальными праймерами (RAPD-PCR, UP-PCR) проводили по методике Raavanen-Huttala с соавторами [Raavanen-Huttala et al., 2000] с помощью праймеров, используемых для дифференциации штаммов фитопатогенных и энтомопатогенных грибов *V. lecanii* и *B. bassiana* [Mitina, Yli-Mattila, 2002]: Y (5'-CGAGACACAC-3'), 91,299 (5'-CGATTCGGCG-3'), 91373 (5'-CGTAGTGGTG-3'), синтезированными в МТТ [Йокинен, Финляндия]. Для ПЦР с универсальными праймерами (UP-PCR) использовали праймер AA<sub>2</sub>M<sub>2</sub> (5'-GAGCGACCCAGAGCGG-3') и HE45 (5'-GTAAAACGAGGCCAGT-3') по методике Булата с соавт. [Bulat et al., 2000]. ПЦР-продукты разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном геле при напряжении электрического поля 80 V.

**Статистический и филогенетический анализы.** Полученные сиквенсы были отредактированы в приложении BioEdit [Hall, 1999] и проверены на сходство с таковыми, депонированными в Генбанке с помощью встроенной BLAST-утилиты (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с применением алгоритма discontinuous megablast. Для филогенетических построений были подобраны гомологичные референтные сиквенсы, депонированные в Генбанке, для

каждого из видов рода *Lecanicillium* sensu Kouvélis et al. [2008] таким образом, чтобы уровень дивергенции нуклеотидных последовательностей выбранных изолятов был максимальным в пределах каждого вида. В качестве внешней группы был выбран *Metarhizium anisopliae*. Нуклеотидные последовательности были загружены в BioEdit, выравнены методом Clustal X Multiple Alignment; позиции сравнения, содержащие пропуски, были удалены. Матрица данных была конвертирована в файл формата NEX. Филогенетическое построение выполнено методом байесовского заключения (БЗ) в программе MrBayes 3.1.2 [Ronquist, Huelsenbeck, 2003] с использованием стандартных настроек модели GTR+I+G с циклом в 500000 поколений, по истечении которых стандартное отклонение расщеплённых частот достигло 0,008. Полученная филограмма была отформатирована в приложении TreeView [<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>].

Результаты, полученные методами RAPD- и UP-PCR, были проанализированы в виде отдельной и комбинированной матриц с использованием Neighbor-Joining/UPGMA-анализа. Матрица данных была составлена из набора сигналов типа 1 и 0, соответствующих наличию или отсутствию ПЦР-продуктов определённого размера. Только те сигналы, которые отмечены более чем для 1 штамма, были включены в матрицу. Кладограмма была построена с помощью пакета приложений Phylip 3.5 [Felsenstein, 1993].

## Результаты и обсуждение

Аmplификация участка гена *nad1* с помощью праймеров NAD1A/NAD1B была успешной для всех изученных изолятов. Размер продукта находился в пределах 540–680 н.о. для большинства изолятов, для VI 5 он составил 923 н.о., для VI 8–808 н.о. и для VI 18–880 н.о. Для сравнительного анализа нуклеотидные последовательности были отредактированы и выравнены, протяжённость выравнивания составила 441 н.о.

Нуклеотидные последовательности митохондриального гена *nad1* 13 штаммов, проанализированных в настоящей работе, оказались представленными четырьмя уникальными гаплотипами. Распределение штаммов по группам с данными гаплотипами было следующим: (I) VI 5, VI 60, VI 61; (II) VI 8, VI 62; VI 72; (III) VI 18, VI 21, VI 22, VI 27, VI 56, VI 65, (IV) VI 49.

При этом первый гаплотип имел сходство с остальными тремя не выше 97,9 %, а его сходство с референтными сиквенсами было ещё ниже. Данный гаплотип депонирован в Генбанке под номером доступа KF562152. Три остальных гаплотипа, напротив, обладали сходством друг с другом на более высоком уровне, от 99,3 % (между гаплотипами II и IV) до 99,7 % (между гаплотипами III и IV). Их сходство с референтными сиквенсами

штаммов *L. muscarium* (табл. 2) было не ниже 98 %, а в случае со вторым гаплотипом наблюдалось 100 % идентичность нуклеотидной последовательности EF512920 (*L. muscarium*). Гаплотипы III и IV депонированы в Генбанке под номерами KF562153 и KF562154, соответственно. Сходство гаплотипов II–IV с референтными сиквенсами, принадлежащими другим видам рода *Lecanicillium*, было ниже 98 %.

Кладоистическое распределение референтных сиквенсов на филограмме полностью соответствовало топологии филогенетического дерева в работе Kouvelis et al. [2008] с достаточно высокими значениями постериорной вероятности (posterior probability) в качестве поддержки ветвей, соответствующих отдельным видам рода *Lecanicillium* (рис.1). Так, этот показатель составил 1,00 для *Lecanicillium psalliotae* и *Lecanicillium lecanii*, 0,99 для *Lecanicillium longisporum* и 0,86 для *Lecanicillium muscarium*. Для группировок видов *L. longisporum* / *L. nodulosum* / *L. lecanii* / *L. muscarium* и *L. nodulosum* / *L. lecanii* значения поддержки ветвей (0,55–0,65) наблюдались внутри видов, когда число штаммов для данного вида было больше трёх, что объясняется выбором штаммов с максимально дивергентными сиквенсами, а также для сестринских таксонов *L. nodulosum* / *L. lecanii* и *L. muscarium*. Таким образом, все изученные штаммы

Таблица 2. Список референтных штаммов грибов рода *Lecanicillium* и *Metarhizium anisopliae*, сиквенсы гена *nad1* которых, депонированные в Генбанке, использованы в настоящей работе

Table 2. List of the reference strains of fungi from genera *Lecanicillium* and *Metarhizium* with Genbank-accessible *nad1* sequences used in the present work

Вид	Штамм	Хозяин	Географическое происхождение	Номер доступа в Генбанке
<i>Lecanicillium muscarium</i>	CBS 318.70K	Хименоптера: Тентрединиде: <i>Nematus pavidus</i>	Германия	EF512920
	ARSEF 314	Моноспоровый изолят из препарата Vertalec*	Неизвестно	EF512928
	ARSEF 1401	Коллеоптера: Куркулиониде: <i>Hypera postica</i>	Франция	EF512961
	Mycotal (CBS 102071)	Гомоптера: Алейродиде: <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Неизвестно**	EF512913
<i>Lecanicillium lecanii</i>	IMI 304807R	Гомоптера: Кокциде: щитовка на <i>Coffea liberica</i>	Западная Индия	EF512952
	IMI 304806	Гомоптера: Кокциде: щитовка на <i>Citrus</i> sp.	Западная Индия	EF512951
	IMI 331550R	Гомоптера: Кокциде	Индонезия	EF513093
<i>Lecanicillium longisporum</i>	ARSEF 321	Гомоптера: Афиридиде: <i>Rhopaloshiphum nymphaeae</i>	США	EF512916
	KV22	Гомоптера: Афиридиде	Великобритания	EF512915
	Vertalec (CBS 102072)	Гомоптера: Афиридиде: <i>Myzus persicae</i>	Неизвестно**	EF512914
<i>Lecanicillium psalliotae</i>	ARSEF 2234	Гомоптера: Псевдококциде: <i>Rhizococcus</i> sp.	Неизвестно	EF512962
	ARSEF 2332	Гомоптера: Афиридиде: <i>Sitobion avenae</i>	США, Айдахо	EF512963
<i>Lecanicillium nodulosum</i>	IMI 338014R	Гомоптера: Кокциде	Мексика	EF512957
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ME1	Коллеоптера: Куркулиониде	США	AY884128

\* в первоисточнике [Beerman, 1979] штамм ARSEF 314 описан как моноспоровый изолят из препарата Vertalec, хотя последний относится к *L. longisporum*, а штамм ARSEF 314 — типичный представитель *L. muscarium* [Kouvelis et al., 2008]; \*\* штаммы-продуценты биопрепаратов Mycotal и Vertalec, производимых компанией Koppert B.V. (Нидерланды).

\* Initially [Beerman, 1979] strain ARSEF 314 was described as a single spore isolate of the bioformulation Vertalec, though the latter belongs to *L. longisporum* while ARSEF 314 is a typical representative of *L. muscarium* [Kouvelis et al., 2008]; \*\* Strains-producers of pesticide formulations Mycotal and Vertalec by company Koppert B.V. (The Netherlands).

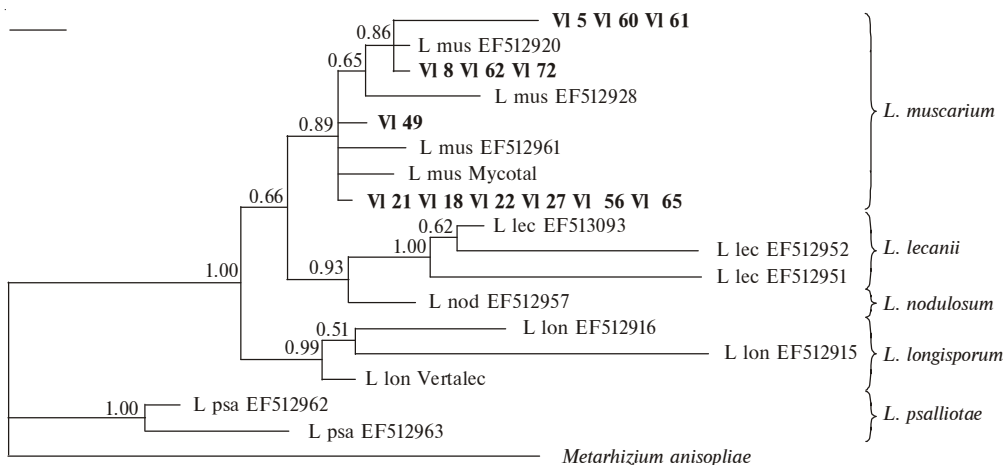


Рис. 1. Филограмма, построенная на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена *nad1* штаммов *Lecanicillium* spp. методом байесовского заключения для 500000 поколений (стандартное отклонение расщеплённых частот 0,008). Штаммы, сиквенсы которых получены в настоящей работе, выделены полужирным шрифтом. Для референтных штаммов приведены сокращенные видовые названия и номера доступа в Генбанке. В качестве внешней группы выбран *Metarhizium anisopliae*.

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed using *nad1* sequences of *Lecanicillium* strains by Bayesian inference for 500000 generations (standart deviation of split frequencies 0.008). Strains under examination in the resent study are shown in bold. Genebank accession numbers and abbreviated species names are given for the reference strains. *Metarhizium anisopliae* was taken as outgroup.

представлены четырьмя уникальными гаплотипами и относятся к виду *L. muscarium*.

Внутривидовой полиморфизм штаммов *L. muscarium*, представленных отдельными молекулярными гаплотипами гена *nad1*, был изучен с помощью ПЦР со случайными и универсальными праймерами

на примере выборки из 7 штаммов, представляющих различные гаплотипы. Случайный праймер Y и универсальный праймер AA<sub>2</sub>M<sub>2</sub> дали наибольшее количество ПЦР-фрагментов (рис. 2). Штаммы, принадлежащие к одному и тому же *nad1*-гаплотипу, проявляли существенные различия в паттернах. В то же время, кладограмма показала чёткое распределение штаммов по группам, в которых оказались штаммы с идентичными нуклеотидными последовательностями *nad1* (рис. 3), в частности, штаммы III гаплотипа VI 56 и VI 65, и I гаплотипа VI 5 и VI 60. При этом наиболее близкими друг к другу оказались штаммы II гаплотипа (VI 62; VI 72). Наибольшей несхожестью с другими штаммами характеризуется штамм VI 61, выделенный из фитопатогенных грибов рода *Phragmidium*. Штаммы, относящиеся к одному гаплотипу (I), были выделе-

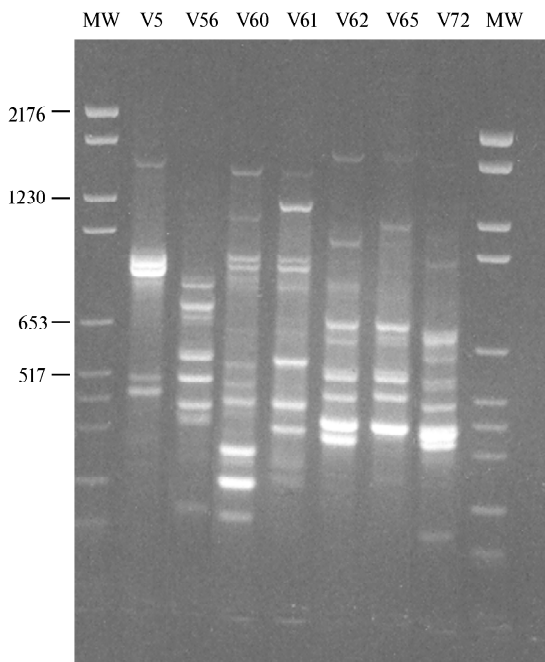


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации геномной ДНК штаммов *L. muscarium* (VL 5 – VL 72) методами RAPD-PCR с праймером Y. MW — маркёр молекулярного веса.

Fig. 2. Electrophoretic profiles of genomic DNA amplification of *L. muscarium* (VL 5 – VL 72) using RAPD-PCR with primer Y. MW — molecular weight marker.

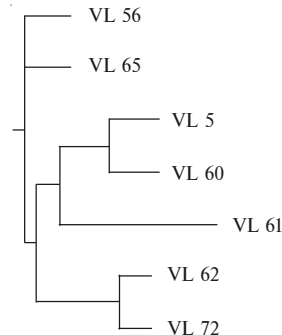


Рис. 3. Кладограмма, построенная методом UPGMA на основе комбинированной матрицы сигналов амплификации ДНК штаммов *L. muscarium* с праймерами Y и AA<sub>2</sub>M<sub>2</sub> (см. Материалы и методы).

Fig. 3. UPGM-tree of combined data matrix of DNA amplification of *L. muscarium* strains with primers Y и AA<sub>2</sub>M<sub>2</sub> (see Materials and methods).

ны как из насекомых разных видов, например, VI 5 (ежевичная белокрылка) и VI 60 (тля), так из фитопатогенных грибов — штамм VI 61. Такое же разнообразие по гостальной специфичности штаммов можно отметить для штаммов II гаплотипа: VI 8 (цикада), VI 62 (почва); VI 72 (белокрылка). В III гаплотипе также представлены штаммы, выделенные из белокрылок (VI 18, VI 21, VI 65), тлей (VI 22, VI 27) и фитопатогенных грибов (VI 56). Таким образом, выявленное разнообразие хозяев изученных штаммов соответствует таковому, известному для *L. muscarium* [Kouvelis et al., 2008]. Причём, все насекомые, из которых были выделены штаммы грибов в настоящей работе, относятся к отряду *Homoptera*.

В результате проведённых исследований показано, что для видовой дифференциации в пределах рода *Lecanicillium* может быть использован участок гена *nad1* мтДНК. В последнее время именно мтДНК всё чаще используется для анализа генетического разнообразия внутри популяции, т.к. она эволюционирует быстрее, чем рибосомальная ДНК [Burger et al., 2003; Paquin et al., 1997]. Изоляты *Verticillium lecanii* s.l. проявляют высокий уровень полиморфизма гена *nad1* [Hegedus, Khachatourians, 1993; Kouvelis et al., 1999; Sugimoto et al., 2003], что подтвердилось нашими исследованиями.

Таким образом, было установлено, что все изученные штаммы могут быть отнесены к виду *L. muscarium*. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей гена *nad1* позволил выявить 4 различных гаплотипа внутри одного вида (*L. muscarium*) на выборке из 13 изолятов. Дальнейшая дифференциация штаммов в пределах одного гаплотипа возможна на основе сравнения паттернов, полученных методами RAPD-PCR и UP-PCR.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность Б.А. Борисову (Москва) и М. Согонову (Beltsville, MD, USA) за предоставленные для исследований изоляты грибов. Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01905 и грантами научного обмена Академии наук Финляндии (№ 252162 в 2011 и в 2012 годах).

## Литература

- Евлахова А.А. 1939. Применение гриба *Cephalosporium lecanii* Zimm. для борьбы с цитрусовой щитовкой // Доклады ВАСХНИЛ. Т.11. С.11–22.
- Митина Г.В. 1992. Энтомоцидные токсины гриба *Verticillium lecanii* (Zimm.) — продуцента биопрепарата вертициллин // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л. 18 с.
- Митина Г.В., Павлюшин В.А. 2011. Повышение эффективности биопрепарата энтомопатогенного гриба *Lecanicillium muscarium* (= *Verticillium lecanii*) против сосущих вредителей путём создания современных препаративных форм // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. Т.42. С.135–137.
- Митина Г.В., Павлюшин В.А., Наумов В.А. 2001. Коллекция энтомопатогенных грибов // Каталог государственных коллекций полезных и вредных организмов. Москва – Санкт-Петербург: РАСХН. С.12–14.

- Митина Г.В., Сергеев Г.Е., Павлюшин В.А. 1997. Влияние биохимических и морфолого-культуральных особенностей природных изолятов *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas на вирулентность в отношении личинок оранжевой белокрылки // Микология и фитопатология. Т.31. Вып.1. С.57–64.
- Митина Г.В., Юзихин О.С., Исангалин Ф.Ш., Якимов А.П. 2012. Выделение и изучение химической структуры токсина с инсектицидной активностью из гриба *Lecanicillium muscarium* // Научное приборостроение. Т.22. Вып.2. С.3–9.
- Павлюшин В.А. 1983. Применение энтомопатогенного гриба *Verticillium lecanii* против оранжевой белокрылки в закрытом грунте // Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями растений в защищённом грунте. Рига. С.75–76.
- Павлюшин В.А., Борисов Б.А., Винокурова Т.П., Ющенко Н.П., Твердюков А.П., Заболотнова Л.А., Вережкина Т.М., 1989. Технологический регламент на производство вертициллина-К. М: Госагропром СССР, ВПНО «Союзсельхозхимия». 21 с.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage // Mycologia. Vol.101. No.4. P.512–530.
- Bulat S.A., Lubeck M., Alekhina I.A., Jensen D.F., Knudsen I.M.B., Lubeck P.S. 2000. Identification of a universally primed-PCR-derived sequence-characterised amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay // Applied and Environmental Microbiology. Vol.66. P.4758–4763.
- Burger G., Gray M.W., Lang B.F. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes // Trends in Genetics. Vol.19. P.709–716.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP — Phylogeny Inference Package (Version 3.5). Department of Genetics: University of Washington. Seattle, USA. <http://cmgm.stanford.edu/phylip/>
- Gams W., Zare R. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification // Nova Hedwigia. 2001. Vol.72. P.329–337.
- Hall R.A. 1976. *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni* // Journal of Invertebrate Pathology. Vol.28. No.3. P.389–391.
- Hall R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales // Burges H.D. (Ed.): Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980. New York: Academic Press. P.483–498.
- Hall R.A. 1984. Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus, *Verticillium lecanii* // Entomophaga. Vol.29. No.3. P.311–321.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. Vol.41. P.95–98.
- Hänssler G., Hermanns M. 1981. *Verticillium lecanii* as a parasite on cysts of *Heterodera schachtii* // Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Vol.88. P.678–681.
- Hegedus D.D., Khachatourians G.G. 1993. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Metarhizium* // Applied and Environmental Microbiology. Vol.59. P.4283–4288.
- Heintz C., Blaich R. 1990. *Verticillium lecanii* as a hyperparasite of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*) // Vitis. Vol.29. P.229–232.
- Kouvelis V.N., Ghikas D.V., Typas M.A. 2004. The analysis of the complete mitochondrial genome of *Lecanicillium muscarium* (synonym *Verticillium lecanii*) suggests a minimum common gene organization in mtDNAs of Sordariomycetes: phylogenetic implications // Fungal Genetics and Biology. Vol.41. P.930–940.
- Kouvelis V.N., Zare R., Bridge P.D., Typas M.A. 1999. Differentiation of mitochondrial subgroups in the *Verticillium lecanii* species complex // Letters in Applied Microbiology. Vol.28. P.263–268.
- Kouvelis V.N., Sialakouma A., Typas M.A. 2008. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecan-*

- icillium species* // Mycological Research. Vol.112. No.7. P.829–844.
- Mitina G., Mikhailova L., Yli-Mattila T. 2008. RAPD-PCR, UP-PCR and rDNA sequence analyses of entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* and its pathogenicity towards insects and phytopathogenic fungi // Archives of Phytopatology and Plant Protection. Vol.41. No.2. P.113–128.
- Mitina G., Yli-Mattila T. 2002. RAPD-PCR, UP-PCR and rDNA sequence analyses of entomopathogenic *Verticillium lecanii* and *Beauveria bassiana* strains // Journal of Russian Phytopathological Society. Vol.3. P.7–17.
- Paavanan-Huhtala S., Avikainen H., Yli-Mattila T. Development of strain-specific primers for *Gliocladium catenulatum* strain used in biological control // European Journal of Plant Pathology. 2000. Vol. 106. P.187–198.
- Paavanan-Huhtala S., Hyvönen J., Bulat S.A., Yli-Mattila T. 1999. RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates // Mycological Research. Vol.103. P.625–634.
- Paquin B., Laforest M.-J., Forget L., Roewer I., Wang Z., Longcore J., Lang B.F. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression // Current Genetics. Vol.31. P.380–395.
- Rehner S.A., Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs // Mycologia. Vol.97. P.84–98.
- Rehner S. A., Minnis A. M., Sung G.-H., Luangsaard J.J., Devotto L., Humber R. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria* // Mycologia. Vol.103. P.1055–1073.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes version 3.0: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. Vol.19. No.12. P.1572–1574.
- Sugimoto M., Koike M., Hiyama N., Nagao H. 2003. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* // Journal of Invertebrate Pathology. Vol.82. P.176–187.
- Sung G.-H., Sung J.-M., Hywel-Jones N.L., Spatafora J.W. 2007. A multigene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol.44. P.1204–1223.
- Zare R., Gams W. 2001a. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. // Nova Hedwigia. Vol.73. P.1–50.
- Zare R., Gams W. A 2001b. revision of *Verticillium* section *Prostrata*. VI. The genus *Haptocillium* // Nova Hedwigia. Vol.73. P.271–292.
- Zare R., Gams W., Culham 2000. A. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. I. Phylogenetic studies using ITS sequences // Nova Hedwigia. Vol.71. P.465–480.
- Zare R., Gams W., Evans H.C. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora* // Nova Hedwigia. Vol.73. P.51–86.
- Zare R., Kouvelis V.N., Bridge P.D., Typas M.A. 1999. Presence of a 20 bp insertion/deletion in the ITS1 region of *Verticillium lecanii* // Letters Applied Microbiology. Vol.28. P.258–262.

Поступила в редакцию 20.09.2013