УДК 604.2:661.722:63.002.8-035.4:582.28:577.152.3 *https://doi.org/10.7124/FEEO.v36.1726*

СИРЧІН С. О.[1]✉, САВЧУК Я. І.[1], ЮР'ЄВА О. М.[1], ПАВЛИЧЕНКО А. К.[1], ГАЙДАЙ А. О.[2], СИПЛИВА Н. О.[2]

[1] *Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,*
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154, ORCID: 0000-0002-3723-4113, 0000-0001-9872-8865, 0000-0002-3785-0055, 0009-0003-0841-1648

[2] *Український інститут експертизи сортів рослин,*
Україна, 03041, м. Київ, вул. Генерала Родимцева, 15, ORCID: 0000-0001-7942-599X, 0000-0003-0921-6361

✉ *syrchin@ukr.net*

ВТОРИННА СТРУКТУРА ITS2 РЕГІОНУ РИБОСОМНОЇ ДНК МІКРОМІЦЕТІВ СЕКЦІЇ *SCLEROTIORUM* ЯК ДОДАТКОВИЙ ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ МАРКЕР

Мета. Філогенія мікроскопічних грибів роду *Penicillium* секції *Sclerotiorum* на сьогодні залишається малодослідженою. Тому метою роботи було на основі репрезентативного виду *Penicillium bilaiae* та близькоспоріднених видів грибів побудувати консенсусну модель вторинної структури ITS2 регіону рДНК і визначити можливість її використання як додаткового філогенетичного маркера. ***Методи.*** У роботі використовувалися методи порівняльного аналізу первинних послідовностей ДНК, побудови їхньої вторинної структури на основі найменшої вільної енергії (MFE RNAfold) та аналізу консервативних структур і точок мутації. ***Результати.*** ITS2 регіон представників секції *Sclerotiorum* серії *Adamentziorum* складається з 150–170 п.н. Вторинна структура за MFE RNAfold утворює три класичні шпильки. Послідовність другої петлі з 5′-кінця структури визнана визначальною для ідентифікації досліджених видів. ***Висновки.*** Вторинна структура ITS2 регіону рДНК може бути використана як додатковий маркер при молекулярній ідентифікації *P. bilaiae* та близькоспоріднених представників секції *Sclerotiorum*.

Ключові слова: *Sclerotiorum*, *Adamentziorum*, рибосомна ДНК, ITS2 регіон, вторинна структура ДНК.

Внутрішня транскрибована спейсерна ділянка рДНК (ITS rDNA) найбільш широко використовується як філогенетичний маркер для мікроскопічних грибів. Ця ділянка складається з міжгенних послідовностей ITS1/ITS2 з висококонсервативною 5.8 рРНК, що розміщується між ними. ITS регіон є основним генетичним маркером для ідентифікації мікроскопічних грибів і стандартизованою ділянкою для штрихкодування ДНК [1]. Оскільки ділянка ITS2 є основним джерелом мутацій у ITS регіоні і за рахунок меншої довжини, легша для секвенування сучасними методами. Проте, використання виключно цієї ділянки не достатньо для ідентифікації грибів роду *Penicillium* секції *Sclerotiorum*, зокрема. Відомо, що за використання цього єдиного локусу можна ідентифікувати не більше 70% видів мікроміцетів [2]. На сьогодні зростає тенденція до збільшення кількості генів, які використовуються для ідентифікації мікроскопічних грибів. Однак, збільшення ділянок секвенування є дорогим і трудомістким процесом, який не гарантує підвищення точності методів ідентифікації таксономічними методами. Тому, одним з можливих шляхів вирішення даної проблеми є отримання додаткової філогенетичної інформації про ITS2 регіон. Раніше філогенетичний аналіз ITS2 регіону проводили за його нуклеотидними послідовностями, але інформація про його вторинну структуру вивчалася недостатньо. Вторинна структура рДНК утворюється внаслідок взаємодії канонічних пар основ (AT, GC), неканонічних стабільних (GT), нестабільних (AC) і рідкісними пар (GA, AA) [3]. Утворені парні і непарні структури типу стебло-петля (stem-loop) містять додаткову філогенетичну інформацію, що може значно покращити філогенетичний аналіз ITS2 регіону [4]. На сьогодні використання вторинної структури ITS2 регіону є актуальним. В даний час вторинну структуру рДНК можна прогнозувати за мінімальною вільною енергією утворення вторинної структури. Наразі розроблено декілька алгоритмів прогнозування, які використовуються в програмних продуктах Mfold і

© СИРЧІН С. О., САВЧУК Я. І., ЮР'ЄВА О. М., ПАВЛИЧЕНКО А. К., ГАЙДАЙ А. О., СИПЛИВА Н. О.

RNAfold. Метою наших досліджень було побудова консенсусної вторинної структури ITS2 регіону близькоспоріднених мікроскопічних грибів роду *Penicillium* секції *Sclerotiorum* серії *Adamentziorum* і перевірка можливості використання елементів цієї структури як додаткового філогенетичного маркеру.

Матеріали і методи

Мікроскопічний гриб *P. bilaiae* F-164 виділено у відділі фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України і зберігається в Український колекції мікроорганізмів (UCM:1203). Послідовності ITS регіону рДНК отримували з бази даних NCBI GenBank. Для побудови вторинної структури ITS рДНК використовували програмний пакет RNAfold (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi) та ITS2 Ribosomal RNA DataBase (https://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/). Для побудови консенсусної моделі ITS2 регіону використовували послідовності верифікованих колекційних штамів *P. bilaiae*: типовий штам NRRL 3391 (GenBank NR_111679.1), ATCC 22348 (JN714935.1), ATCC 20851 (JN714934.1), ізолят A2 (KC862267.1), UCM F-164 (PV034796.1). Для порівняльного аналізу ITS2 рДНК вторинних структур *P. bilaiae* використовували послідовності типових штамів таких близькоспоріднених представників секції *Sclerotiorum* серії *Adamentziorum*: *P. adametzioides* CBS 313.59 (NR_103660.1), *P. adametzii* CBS 209.28 (NR_103661.1), *P. angulare* NRRL 28157 (NR_121272.1), *P. brocae* CBS 116113 (NR_111868.1), *P. lilacinoechinulatum* IHEM:28184 (OU989450.1).

Результати та обговорення

Послідовність ITS регіону рДНК *P. bilaiae* UCM F164 на 100% співпадає з типовим штамом цього виду NRRL 3391. Деякі розбіжності спостерігались з штамами представниками колекції ATCC, але вони не впливали на принципову будову вторинної структури ITS рДНК *P. bilaiae*. ITS2 ділянку з ITS регіону виділяли за описами зазначеними в базі NCBI та ITS2 Ribosomal RNA DataBase. На основі отриманих послідовностей за методом MFE RNAfoid була побудована прогнозована консенсусна вторинна структура ділянки. Як видно з рис. 1, ITS2 *P. bilaiae* складається з трьох класичних структур типу стебло-петля (stem-loop). На наступному етапі нами були виділені ITS2 послідовності близькоспоріднених видів, що належать до секції *Sclerotiorum*. Близькоспоріднені види визначали за результатами філогенетичного аналізу представників секції за генами *ITS, BenA, CaM* та *RPB*2 [4] та сучасної філогенетичної схеми секції *Sclerotiorum* запропонованої Хоубракеном із співавторами [5]. Порівняльний аналіз побудованих структур показав, що при збереженні загальної форми, друга петля з 5′-кінця структури містить вставки основ характерні для кожного виду (рис. 2). Таким чином, цей елемент вторинної структури ITS2 ділянки може бути використано як додатковий маркер при молекулярній ідентифікації *P. bilaiae* та близькоспоріднених представників мікроскопічних грибів роду *Penicillium* секції *Sclerotiorum* серії *Adamentziorum*.

Ідентифікація мікроскопічних грибів має ряд особливостей і відрізняється від ідентифікації прокаріотів. Так, ген 18S рДНК грибів, який є еквівалентом прокаріотичної 16S рДНК, відрізняється занадто консервативною послідовністю і тому не може бути маркером для розрізнення видів. ITS регіон рДНК найчастіше використовується для ідентифікації грибів і є офіційним штрих-кодом грибів. У той же час для багатьох родів грибів ITS рДНК не забезпечує достатньої роздільної здатності. Тому, в сучасній схемі молекулярної ідентифікації грибів разом з ITS використовують вторинні штрих-коди, які включають такі білково-кодуючі ділянки генів, як фактор елонгації трансляції (*tef-1α*), субодиниці *RPB1* і *RPB2* ДНК-спрямованої РНК-полімерази II, β-тубуліну (*tubB*) та калмодуліну (*CaM*) [6]. Використання вторинних маркерів дозволяє практично до 100% підвищити точність ідентифікації, але проблема полягає в недостатній кількості послідовностей, визначених для більшості видів і застосування різних наборів маркерів. Серед регіонів ITS рДНК особливе значення мають ITS1 і ITS2. Як некодуючі ділянки, вони зазнають меншого селективного тиску і демонструють більшу мінливість, забезпечуючи генетичне різноманіття, необхідне для детального філогенетичного аналізу. Нещодавні дослідження показують, що ITS1 і ITS2 часто демонструють різну ефективність для різних груп грибів. ITS2 демонструє вищу ефективність, ширше застосування праймерів і більший фрагмент ампліфікації з вищим вмістом GC пар,

порівняно з ITS1. Отже, послідовність ITS2 регіону може мати значні переваги при секвенуванні грибів, підвищуючи як видову роздільну здатність, так і точність ідентифікації грибів. Показано, що використання ITS2 забезпечило кращу роздільну здатність для ідентифікації видів грибів роду *Fusarium*, що вказує на перспективи секвенування саме ITS2 ділянок для виявлення більш патогенних таксонів [7].

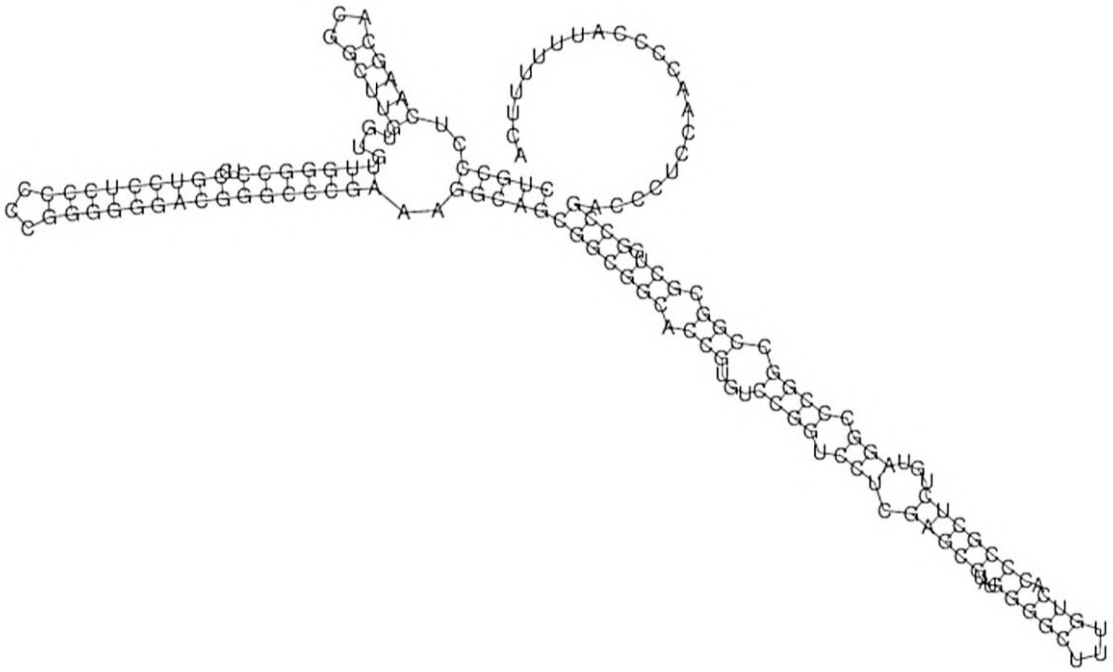

Рис. 1. Консенсунсна модель вторинної структури ITS2 ділянки ITS регіону рДНК *P. bilaiae* побудована за методом мінімальної вільної енергії (MFE RNAfold).

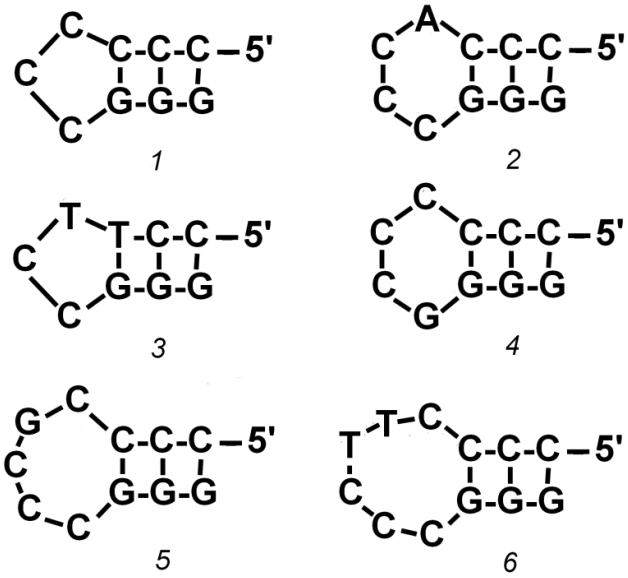

Рис. 2. Структура другої петлі з 5′-кінця структури: 1 – *P. bilaiae*, 2 – *P. adamatzii*, 3 – *P. angulare*, 4 – *P. adametzioides*, 5 – *P. lilacinoechinulatum*, 6 – *P. brocae*.

Висновки

На основі аналізу вторинної структури ITS2 регіону рДНК побудованої за методом MFE RNAfold, встановлено, що друга петля з 5′-кінця структури може бути використана як додатковий маркер при молекулярній ідентифікації *P. bilaiae* та близькоспоріднених представників мікроскопічних грибів роду *Penicillium* секції *Sclerotiorum*.

References

1. Wang X. C., Chen K., Zeng Z. Q., Zhuang W. Y. Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section *Sclerotiora* (Fungi) lead to the discovery of five new species. *Sci Rep*. 2017. 7. P. 8233 https://doi.org/10.1038/s41598-017-08697-1.
2. Bengtsson-Palme J., Ryberg M., Hartmann M., Branco S., Wang Z., Godhe A., De Wit P., Sánchez-García M., Ebersberger I., de Sousa F. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution*. 2013. Vol. 4 (10). P. 914–919. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073.
3. Lücking R., Aime M. C., Robbertse B., Miller A.N., Aoki T., Ariyawansa H. A. et al. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nat Microbiol*. 2021. 6. P. 540–548. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00888-x.
4. Yang R. H., Su J .H., Shang J. J., Wu Y. Y., Li Y., Bao D. P., Yao Y. J. Evaluation of the Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS), Specifically ITS1 and ITS2, for the Analysis of Fungal Diversity by Deep Sequencing. *PLoS ONE*. 2018. 13. e0206428. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206428.
5. Houbraken J., Kocsubé S., Visagie C. M., Yilmaz N., Wang X.-C., Meijer M., Kraak B., Hubka V., Bensch K., Samson R. A., Frisvad J. C. Classification of Aspergillus, Penicillium, Talaromyces and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*. 2020. Vol. 95 (1). P. 5–169. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002.
6. Ramos S. M. S., Cruz R., Barbosa R. d. N., Houbraken J., Machado A. R., de Souza-Motta C. M., de Oliveira N. T. Two new *Penicillium* section *Sclerotiorum* species from sugarcane soil in Brazil. *Mycol Progress*. 2020. 20. P. 823–835. https://doi.org/10.1007/s11557-021-01705-9.
7. Pieczul K., Świerczyńska I., Wójtowicz A. Advanced rDNA-Based Detection of Wheat Pathogens in Grain Samples Using Next-Generation Sequencing (NGS). *Pathogens*. 2025. 14 (2). P. 164. https://doi.org/10.3390/pathogens14020164.

SYRCHIN S. O.[1], SAVCHUK Ya. I.[1], YURIEVA O. M.[1], PAVLYCHENKO A. K.[1], GAIDAI A. O.[2], SYPLYVA N. O.[2]

[1] D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 154
[2] Ukrainian Institute for Plant Variety Examination,
Ukraine, 03041, Kyiv, Henerala Rodymtseva str., 15

SECONDARY STRUCTURE OF THE ITS2 REGION OF THE RIBOSOMAL DNA OF MICROMYCETES SECTION *SCLEROTIORUM* AS AN ADDITIONAL PHYLOGENETIC MARKER

Aim. The phylogeny of microscopic fungi of the genus *Penicillium* of the section *Sclerotiorum* is still poorly understood. Therefore, the aim of the study was to build a consensus model of the secondary structure of the ITS2 rDNA region based on a representative species of *P. bilaiae* and closely related fungal species and to determine the possibility of its use as an additional phylogenetic marker. ***Methods***. The methods used in the study were comparative analysis of primary DNA sequences, construction of their secondary structure based on the least free energy (MFE RNAfold) and analysis of conserved structures and mutation points. ***Results***. The ITS2 region of the *Sclerotiorum* серії *Adamentziorum* section consists of 150–170 bp. The secondary structure according to MFE RNAfold forms three classical hairpins. The sequence of the second loop from the 5′-end of the structure was recognized as crucial for the identification of the studied species. ***Conclusions***. The secondary structure of the ITS2 region of rDNA can be used as an additional marker for the molecular identification of *P. bilaiae* and closely related representatives of the section *Sclerotiorum*.

Keywords: *Sclerotiorum*, *Adamentziorum*, ribosomal DNA, ITS2 region, secondary structure of DNA.