

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВИДІВ КОМПЛЕКСУ *CLADOSPORIUM SPHAEROSPERMUM* ЗА МОРФОЛОГІЄЮ ТА МОЛЕКУЛЯРНОЮ ФІЛОГЕНІЄЮ

Т.О. Кондратюк<sup>1</sup>, М.-Х. Джеонг<sup>2</sup>, Дж.-С. Хо<sup>2</sup>, С.Я. Кондратюк<sup>3</sup>

**Анотація.** Встановлено, що шість ізолятів грибів роду *Cladosporium*, морфологічно подібних до *C. sphaerospermum*, за результатами філогенетичного аналізу за секвенсами ділянки ITS1/ITS2 ядерної ДНК належать до трьох видів комплексу *C. sphaerospermum*. Два види (*C. halotolerans* та *C. psychrotolerans*) вперше наводяться для України.

**Ключові слова:** *Cladosporium*, морфологія, філогенетичний аналіз, ядерна ДНК, ITS1/ITS2

<sup>1</sup> ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна; takbiofak@ukr.net

<sup>2</sup> Корейський інститут вивчення лишайників, Сунчонський національний університет, Сунчон, Корея

<sup>3</sup> Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

### Вступ

Серед темнопігментованих мікроміцетів особливої уваги дослідників заслуговують види роду *Cladosporium* Link, більшість з яких є звичайними сапротрофними, широко розповсюдженими грибами, хоча трапляються також фітопатогенні, ендоефітні, фунгіфільні гриби, патогени людини та тварин (CROUS *et al.* 2007). Види роду *Cladosporium* також постійно або часто присутні у пробах повітря, ґрунту, харчових продуктів, різних фарб, текстилю та інших матеріалів. Види *C. sphaerospermum* Penzig та *C. cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries є визнаними домінантами в грибних комплексах, що руйнують мармурові пам'ятки культури, будівельні матеріали. Представники роду можуть викликати алергічні захворювання, є звичайними забруднювачами в клінічних лабораторіях.

Протягом останніх років рід *Cladosporium*, який включає понад 770 назв (DUGAN *et al.* 2004), зазнав інтенсивної таксономічної ревізії як за морфологічними, так і молекулярними даними (BRAUN *et al.* 2003; SCHUBERT *et al.* 2006, 2007; BENSCH *et al.* 2010; CROUS *et al.* 2011; CROUS & GROENEWALD 2011). Рід *Cladosporium* був описаний Лінком в 1916 році. Він включав чотири види, серед них – *C. herbarum* (Pers.) Link, що є типовим видом роду.

Для таксономії комплексу видів *C. sphaerospermum* (зокрема для розмежування окремих видів) найважливішою ознакою визнано рамоконідії (ZALAR *et al.* 2007). З огляду на певні

складності в їх отриманні, для дослідження рамоконідій, за даними вказаних авторів, необхідно використовувати семидобові культури (колонії) *C. sphaerospermum* на синтетичному поживному середовищі. Переважна більшість видів, подібних до *C. sphaerospermum*, виявляють стійкість до засолення. Характерною ознакою виду *C. sphaerospermum* є майже кулясті дрібні конідії. На основі філогенетичного аналізу та прихованих (cryptic) морфологічних та фізіологічних ознак, останнім часом описано шість нових видів комплексу *C. sphaerospermum*, зокрема *C. halotolerans* Zalar, de Hoog et Gunde-Cim. та *C. psychrotolerans* Zalar, de Hoog et Gunde-Cim. (ZALAR *et al.* 2007).

Метою даних досліджень було залучити молекулярні ознаки для ідентифікації ізолятів роду *Cladosporium*, що були попередньо віднесені нами за морфологічними ознаками до групи *C. sphaerospermum*.

### Матеріали і методи досліджень

Матеріалом для досліджень слугували чисті культури грибів роду *Cladosporium*, які підтримуються в колекції мікроскопічних грибів кафедри ботаніки ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, та ізольовані нами із різноманітних субстратів: синтетичного клею (клей-олівець) – три ізоляти (Т2–314КУКБ, Т5–313КУКБ, Т7–318КУКБ), акрилового та силіконового герметиків у ванній кімнаті та в душовій кабіні – два ізоляти (відповідно

Назва виду	Номер послідовності в ГеноБанку	Робота, в якій опубліковані результати визначення зразків	Країна походження
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	GU248326	GUIMARAES 2007	
<i>Cladosporium fusiforme</i>	DG780388	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium fusiforme</i>	DG780389	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium fusiforme</i>	DG780390	ZALAR 2007	Канада
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780363	ZALAR 2007	Намібія
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780364	ZALAR 2007	Намібія
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780365	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780366	ZALAR 2007	Іспанія
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780367	ZALAR 2007	Домініканська республіка
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780368	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780371	ZALAR 2007	Бразилія
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780372	ZALAR 2007	Туреччина
<i>Cladosporium halotolerans</i>	DG780373	ZALAR 2007	Ізраїль
<i>Cladosporium halotolerans</i>	new, T3	THIS PAPER	Україна
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	lignic3709	ZALAR 2007	
<i>Cladosporium langeronii</i>	DG780377	ZALAR 2007	Італія
<i>Cladosporium langeronii</i>	DG780378	ZALAR 2007	Бразилія
<i>Cladosporium langeronii</i>	DG780379	ZALAR 2007	Бразилія
<i>Cladosporium langeronii</i>	DG780380	ZALAR 2007	Бельгія
<i>Cladosporium langeronii</i>	DG780381	ZALAR 2007	Антарктика
<i>Cladosporium langeronii</i>	DG780382	ZALAR 2007	Німеччина
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	new, T6	THIS PAPER	Україна
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	DG780384	ZALAR 2007	Домініканська республіка
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	DG780386	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	DG780387	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780343	ZALAR 2007	Нідерланди
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780344	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780345	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780346	ZALAR 2007	Ізраїль
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780347	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780348	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780349	ZALAR 2007	Словенія
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780350	ZALAR 2007	Росія
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	DG780351	ZALAR 2007	Іспанія
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EU570254	DUGAN 2008	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EU570255	DUGAN 2008	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EU570256	DUGAN 2008	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EU570257	DUGAN 2008	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EU570258	DUGAN 2008	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	AY361990	ZALAR 2007	Нідерланди
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	AY361992	ZALAR 2007	Нідерланди
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	new, T2	THIS PAPER	Україна
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	new, T5	THIS PAPER	Україна
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	new, T7	THIS PAPER	Україна
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	new, T8	THIS PAPER	Україна

◀ **Табл. 1.** Перелік послідовностей, що були використані в ході філогенетичного аналізу.

◀ **Table 1.** The list of sequences, which were used in phylogenetic analysis.

T3–315КУКБ та T8–414КУКБ), синтетичного середовища Болда (контамінант культури водоростей *Chlorococcum vacuolatum* Star 1955 (№ 544) з колекції мікрободоростей (АСКУ) кафедри ботаніки ННЦ «Інститут біології») – один ізолят (T6–362КУКБ) (надалі ізоляти позначено T2 – T8).

Ядерну ДНК ізолювали з грибного міцелію, отриманого із колоній грибів, що культивувалися на картопляно-глюкозному агарі (КГА) з використанням відповідного UltraClean™ Microbial DNA isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., Solana Beach, CA, USA) згідно з протоколами виробника. Для секвенування ITS1/ITS2 ділянки застосовували праймери ITS та ITS4 (FEDORENKO *et al.* 2009). Вирівнювання отриманих послідовностей проводилося з використанням відповідних програм (CLUSTAL і MAFFT) та вручну. Отримані нуклеотидні послідовності порівнювались з послідовностями, наявними в базі даних Генобанку (NCBI GenBank nucleotide (nr) database) з використанням МЕГАБЛАСТ пошуку (megablast search). Під час проведення філогенетичного аналізу *C. fusiforme* Zalar, de Hoog & Gunde-Cim. використаний як зовнішня група для досліджених нами таксонів. Для порівняння, перевага надавалась послідовностям, що були виділені зі зразків, ідентифікованих монографіями даної групи грибів (р. *Cladosporium*) та, відповідно, передані ними до ГеноБанку (Табл. 1).

### Результати та їх обговорення

За морфологічними ознаками використані в дослідженнях ізоляти роду *Cladosporium* були раніше віднесені нами до видів *C. sphaerospermum* (T2, T6) та *C. cf. sphaerospermum* (T3, T5, T7, T8). Всі вони формували щільні оксамитові колонії темно-оливкового кольору з оливково-чорним зворотнім боком, кулькоподібні дрібні конідії. Вказані ізоляти різнилися за кольором гіфів та конідій (від світло- до темно-коричневих), а також за розмірами та за кількістю септ рамоконідій. В результаті філогенетичного аналізу за послідовностями ділянок ITS1 та ITS2, а також ділянки 5.8 S (скорочено ITS1/ITS2 ділянки) ядерної ДНК, нами виявлено три види роду *Cladosporium*: *C. sphaerospermum* (ізоляти

T2, T5, T7, T8), *Cladosporium halotolerans* (T3) та *C. cf. psychrotolerans* (T6) (рис. 1). Останні два види наведені для України вперше.

***Cladosporium halotolerans*** Zalar, de Hoog & Gunde-Cimerman

*C. halotolerans* (ізолят T3) отриманий нами з проб, відібраних у ванній кімнаті житлового приміщення (м. Київ) із темних (майже чорних) плям-нашарувань на акриловому герметіку (на стику ванни та стіни). Необхідно зазначити, що мешканці квартири, в якій було відібрано проби, не менше 2–3-х разів на тиждень використовують ванни із застосуванням морської солі.

***Cladosporium psychrotolerans*** Zalar, de Hoog & Gunde-Cimerman

В наших дослідженнях *C. cf. psychrotolerans* (ізолят T6) є контамінантом культури водоростей *Chlorococcum vacuolatum*, які підтримуються у колекції мікрободоростей АСКУ кафедри ботаніки ННЦ «Інститут біології» на синтетичному середовищі Болда в холодильнику при температурі + (9–12)°C.

Результати проведеного нами філогенетичного аналізу підтверджують дані П. Залар з колегами (ZALAR *et al.* 2007) про близькість *C. psychrotolerans* та *C. langeronii* (Fonseca, Leão & Nogueira) Vuill. за ділянками ITS1/ITS2 ядерної ДНК. Вид *C. langeronii* характеризується найнижчою стійкістю до засолення серед всіх видів, подібних до *C. sphaerospermum*. Розмежування видів *C. psychrotolerans* та *C. langeronii* потребує проведення відповідних досліджень.

***Cladosporium sphaerospermum*** Penzig

В наших дослідженнях *C. sphaerospermum* (T2, T5, T7) ізолюваний із проб, відібраних із чорних наскрізних плям та розростань на синтетичному клеї (клей-олівець, який не був у використанні) двох торгових марок українського виробництва. Вказані плями були сформовані монокультурою *C. sphaerospermum*. Окрім цього *C. sphaerospermum* (T8) ізолюваний також з проб, відібраних з чорних нашарувань на силіконовому герметіку в душовій кабіні приватного житлового будинку (м. Київ).

Результати проведеного нами філогенетичного аналізу підтверджують також дані Ф. Дугана з колегами (DUGAN *et al.* 2008)

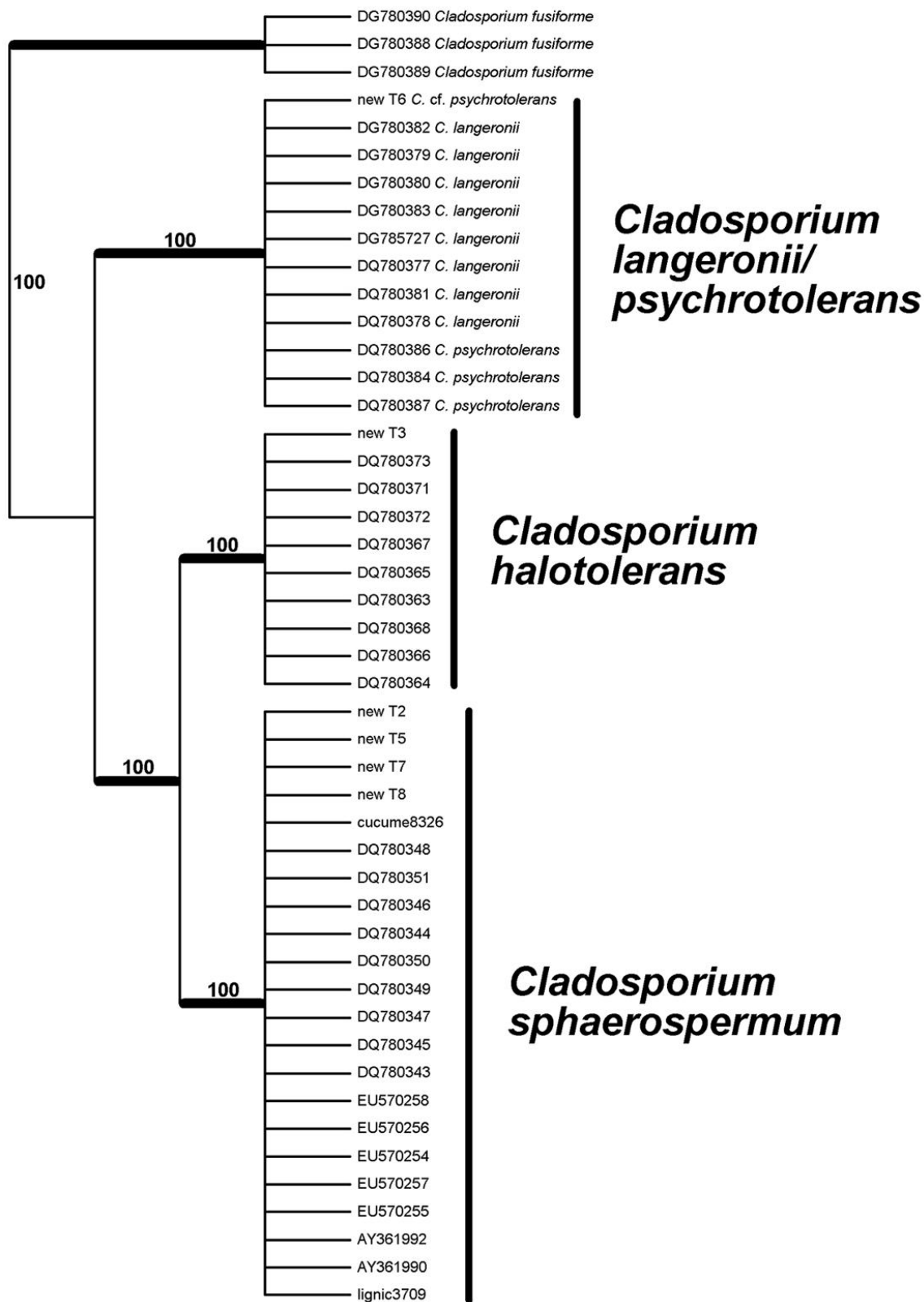


Рис. 1. Філогенетичне дерево представників роду *Cladosporium* на основі послідовностей ITS1/ITS2 ділянки ядерної ДНК.

Fig. 1. Phylogenetic tree of the members of the genus *Cladosporium* after ITS1/ITS2 gene of nuclear DNA.

про те, що *C. lignicola* Link є синонімом до *C. sphaerospermum*.

### Висновки

В результаті проведеного філогенетичного аналізу за послідовностями ITS1/ITS2 ядерної ДНК досліджені ізоляти мікроскопічних грибів, які за морфологічними ознаками раніше ідентифіковано як види *Cladosporium sphaerospermum* та *C. cf. sphaerospermum*, було віднесено до трьох таксонів: *C. sphaerospermum*, *C. halotolerans* та *C. cf. psychrotolerans*.

*C. halotolerans* та *C. psychrotolerans* наведені для України вперше.

Результати проведеного філогенетичного аналізу підтверджують дані попередніх дослідників про близькість *C. psychrotolerans* та *C. langeronii* за ділянками ITS1/ITS2 ядерної ДНК (ZALAR *et al.* 2007) та про те, що *C. lignicola* є синонімом до *C. sphaerospermum* (DUGAN *et al.* 2008).

В подальшому доцільним було б провести комбінований філогенетичний аналіз досліджуваних нами ізолятів грибів за генами актину та 1-альфа гену фактору подовження зчитування, який є найнадійнішим при молекулярній ідентифікації видів роду *Cladosporium* (CROUS & GROENEWALD 2011).

Автори висловлюють вдячність М.В. Пірогову (Львів) за ініціювання проведення вивчення молекулярних ознак представників роду *Cladosporium* та М.А. Березовській за надання культури водоростей *Chlorococcut vasciolatum*. Кондратюк С.Я. висловлює вдячність Державному Агентству з науки, інновацій та інформатизації України за фінансову підтримку окремих етапів даного дослідження (проект 317-2011-409).

### Використані джерела

- BENSCH K., GROENEWALD J.Z., DJUKSTERHUIS J. *et al.* 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnoides). *Studies in Mycology* 67: 1–94.
- BRAUN U., CROUS P.W., GROENEWALD J.Z., DE HOOG G.S. 2003. Phylogeny and taxonomy of cladosporium-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycological progress* 2: 3–18.
- CROUS P.W., BRAUN U., SCHUBERT K., GROENEWALD J.Z. 2007. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* 58: 33–46.
- CROUS P.W. & GROENEWALD J.Z. 2011. Why everlastings don't last. *Persoonia* 26: 70–84.
- CROUS P.W., TANAKA K., SUMMERELL B.A., GROENEWALD J.Z. 2011. Additions to the *Mycosphaerella* complex. *IMA Fungus* 2 (1): 49–64.
- DUGAN F.M., SCHUBERT K., BRAUN U. 2004. Check-list of *Cladosporium* names. *Schlechtendalia* 11: 1–103.
- DUGAN F.M., BRAUN U., GROENEWALD J.Z., CROUS P.W. 2008. Morphological plasticity in *Cladosporium sphaerospermum*. *Persoonia* 21: 9–16.
- FEDORENKO N.M., STENROOS S., THELL A., KARNEFELT I., KONDRATYUK S. 2009. A phylogenetic analysis of xanthorioid lichens (Teloschistaceae, Ascomycota) based on ITS and mtSSU sequences. In: THELL A., SEAWARD M.R.D., FEUERER T. (eds). Diversity of Lichenology – anniversary volume. *Bibliotheca Lichenologica* 100: 49–84. J. Cramer, Berlin, Stuttgart.
- SCHUBERT K., BRAUN U., MULENKO W. 2006. Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 5. Validation and description of new species. *Schlechtendalia* 14: 55–83.
- SCHUBERT K., GROENEWALD J.Z., BRAUN U. *et al.* 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnoidales) with standartisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology* 58: 235–245.
- ZALAR P., DE HOOG G.S., SCHROERS H.-J., CROUS P.W., GROENEWALD J.Z., GUNDE-CIMERMAN N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology* 58: 157–183.

### IDENTIFICATION OF CLADOSPORIUM SPHEROSPERMUM SPECIES COMPLEX AFTER MORPHOLOGY AND MOLECULAR PHYLOGENY

T.O. KONDRATYUK<sup>1</sup>, M.-H. JEONG<sup>2</sup>, J.-S. HUR<sup>2</sup>, S.Y. KONDRATYUK<sup>3</sup>

**Abstract.** *Cladosporium* isolates, which are morphologically similar to *C. sphaerospermum* were phylogenetically analyzed on the basis of DNA sequences and of the ribosomal RNA (the internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS 2, the 5.8 S rDNA (ITS)). Six analyzed isolates have found to represent three species of *C. sphaerospermum* complex. *Cladosporium halotolerans* and *C. psychrotolerans* are for the first time recorded for Ukraine.

**Key words:** *Cladosporium*, morphology, phylogenetic analysis, ITS1/ITS2, Ukraine

<sup>1</sup> «Educational and Scientific Centre» «Institute of Biology», Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrs'ka Str., 64, Kyiv, 10601, Ukraine; takbiofak@ukr.net

<sup>2</sup> Korean Lichen Research Institute, Suncheon National University, Suncheon, Korea

<sup>3</sup> M.H. Kholodny Institute of Botany, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv, 01601, Ukraine