

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННОЙ РНК ИЗ МИЦЕЛИЯ ТОКСИГЕННЫХ ГРИБОВ *Fusarium* sp.

© 2025 г. А. А. Стахеев*, Д. Ю. Рязанцев, Н. Г. Габриелян, А. В. Полубояринова, М. Э. Тальянский, С. К. Завриев

Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: stakheev.aa@gmail.com

Поступила в редакцию 24.09.2024 г.

После доработки 24.09.2024 г.

Принята к публикации 11.10.2024 г.

Разработан быстрый и относительно недорогостоящий метод выделения и очистки РНК из мицелия двух видов фитопатогенных грибов рода *Fusarium*: *F. graminearum* и *F. coffeatum*, — обладающих различными морфологическими и биохимическими характеристиками. Метод включает использование буфера на основе гуанидин гидрохлорида и спин-колонок, входящих в состав коммерческого набора для выделения плазмидной ДНК, и применим при работе как с мицелиями, выращенными на агаризованных питательных средах, так и с жидкими культурами грибов. Выход РНК, полученной с использованием предложенного протокола, составил 4–14 мкг/100 мг веса мицелия при значениях индекса целостности РНК (RIN) до 8.4. В процессе оптимизации метода рекомендована предварительная лиофилизация образцов при работе с жидкими культурами, а также использование ингибитора РНКаз при выделении из культур на поздних этапах роста.

Ключевые слова: РНК, *Fusarium*, мицелий, гуанидин гидрохлорид, лиофилизация, электрофорез, RIN

DOI: 10.31857/S0026898425020138, **EDN:** GFUSAT

ВВЕДЕНИЕ

Проблема присутствия плесневых грибов и вырабатываемых ими микотоксинов в растительном сырье и продуктах питания имеет международное значение и пристально изучается специалистами различного профиля [1]. К ключевым продуцентам токсических соединений относятся представители рода *Fusarium*, распространенные в различных регионах мира и поражающие широкий спектр растений-хозяев, в том числе важнейших сельскохозяйственных культур [2, 3]. К основным группам микотоксинов, синтезируемых грибами рода *Fusarium*, относятся трихотецены, фумонизины и зеараленон. Эти соединения ингибируют биосинтез белка у эукариот и оказывают негативное влияние на функционирование пищеварительной, иммунной и репродуктивной систем [4–6]. Кроме того, трихотецены, в особенности дезоксиниваленон, относятся к факторам агрессивности, играющим важную роль в распространении гриба по тканям растения-хозяина [7]. Генетические механизмы биосинтеза сходны для разных таксономических групп грибов: гены, кодирующие биосинтетические ферменты, сгруппированы в кластеры, находящиеся под контролем одного

или нескольких факторов транскрипции, которые, в свою очередь, регулируются транскрипционными факторами более широкого спектра действия, регулирующими, помимо вторичного метаболизма, также процессы роста и развития гриба [8–11]. Важно отметить, что, несмотря на универсальность этой схемы, многие факторы и механизмы регуляции биосинтеза до сих пор не изучены.

Одним из ключевых подходов в исследовании механизмов биосинтеза токсинов, роста и развития гриба, его взаимодействия с растением-хозяином, а также в разработке методов снижения и предотвращения заражения считается анализ дифференциальной экспрессии генов, в том числе с использованием современных методов высокопроизводительного секвенирования. Однако для их эффективного применения необходимо получение образцов тотальной РНК высокого качества. При работе с плесневыми грибами выделение РНК затруднено из-за сложной структуры клеточной стенки, прежде всего наличия большого количества полисахаридов, а также способности грибов секретировать рибонуклеазы, играющие важную роль

в процессах патогенеза [12–14]. На сегодняшний день для выделения РНК используют либо дорогостоящие коммерческие наборы, либо методы, включающие применение токсичных соединений, таких как фенол и хлороформ [15, 16]. В 2012 году Н. Yaffe с соавт. [17] предложили метод выделения РНК с применением лизирующего буфера на основе 8 М гуанидин гидрохлорида, названный LogSpin, и продемонстрировали его высокую эффективность при работе с растительной тканью и мицелиями грибов родов *Botrytis* и *Alternaria*. Однако возможность применения LogSpin для токсигенных грибов, в особенности в условиях роста мицелия в жидкой культуре, оставалась неизвестной.

Мы модифицировали описанный ранее протокол и адаптировали его для работы с культурами двух видов грибов рода *Fusarium*, которые синтезируют различные группы микотоксинов и поражают широкий круг растений-хозяев. Помимо оптимизации процедуры выделения, сделаны предложения относительно предварительной пробоподготовки для повышения качества полученных препаратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы грибов, условия культивирования.

В работе использовали 2 штамма грибов рода *Fusarium* из коллекции ФГБУН “Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии” (ФИЦПБ): *F. graminearum* ION-17-9/8 (2017 г., Ставропольский край, пшеница) и *F. coffeatum* ION-3/4 (2014 г., Тульская область, пшеница). ION-3/4 представляет собой первый обнаруженный в России штамм *F. coffeatum*, подробно описанный ранее в совместной работе сотрудников ИБХ РАН и ФИЦПБ [18]. Рост культур проводили в течение 7 сут при 25°C на картофельно-сахарозном агаре (КСА). Для выделения РНК мицелий собирали с помощью микробиологической петли. Для роста в жидкой культуре использовали среду MYRO [19], 10 мл которой инокулировали 100 мкл суспензии конидий грибов. Культуру растили в пробирках типа Фалькон объемом 50 мл при 25°C с приоткрытыми крышками. Отбор проб проводили на 4 и 7 сутки роста.

Предварительная пробоподготовка. Часть образцов предварительно лиофилизировали перед процедурой выделения. Пробирки с жидкими средами центрифугировали в течение 10 мин при 4 400 g, после чего отбирали надосадочную жидкость. Фрагмент мицелия грибов массой 200–250 мг высушивали в течение 1.5 ч с использованием лиофилизатора VirTis BenchTop 2K XL (“SP Scientific”, США).

Реагенты и растворы. Для выделения РНК использовали следующие растворы:

1) лизирующий раствор: 8 М гуанидин гидрохлорид, 20 мМ MES, 20 мМ ЭДТА;

2) промывочный раствор 1: 3 М ацетат натрия (рН 5.5);

3) промывочный раствор 2: 40% изопропанол, 10 мМ Трис-НСI (рН 6.2).

Также использована высокоочищенная вода, обработанная диэтилпирикарбонатом (DEPC), не содержащая нуклеаз.

Протоколы выделения РНК. Мицелий (150–200 мг свежего или 50–100 мг лиофилизованного) растирали до состояния порошка в жидком азоте с добавлением корунда, вносили 1 мл лизирующего раствора и 10 мкл β-меркаптоэтанола, после чего гомогенат инкубировали в течение 15 мин при 65°C. Затем образцы центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 g, надосадочную жидкость переносили в новые пробирки, добавляли равный (~600 мкл) объем изопропанол и перемешивали на вортексе Microspin FV-2400 (“BioSan”, Латвия). Полученную смесь наносили на спин-колонки для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep 2.0 (“Евроген”, Россия), которые центрифугировали в течение 1 мин при 12 000 g и удаляли “проскок”. На мембрану спин-колонки наносили 600 мкл промывочного раствора-1, центрифугировали 30 с при 12 000 g и удаляли “проскок”. Затем на мембрану спин-колонки наносили 600 мкл промывочного раствора-2, центрифугировали в тех же условиях, удаляли “проскок”, после чего повторяли процедуру с увеличением времени центрифугирования до 3 мин. После удаления “проскока” колонку помещали в чистую пробирку объемом 1.5 мл, на мембрану колонки наносили 100 мкл воды, не содержащей нуклеаз. Пробирки инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 12 000 g. Для некоторых образцов на этапе элюирования добавляли 1 ед. ингибитора РНКаз RiboCare (“Евроген”).

Для сравнения эффективности протоколов выделения РНК проводили также с использованием коммерческого набора RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Для каждого из вариантов выделения проводили в трех независимых повторах.

Концентрацию РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoVue (“GE HealthCare”, США) и флуориметре Qubit (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Анализ количественных и качественных характеристик препаратов РНК. Анализ качества выделенной РНК проводили четырьмя способами: (1) электрофорез в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия; (2) оценка чистоты препаратов по соотношению значений оптической плотности раствора при длинах волн 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280}) и 260 и 230 нм (A_{260}/A_{230}) на спектрофотометре NanoVue; (3) контроль качества РНК с помощью биоанализатора Agilent 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies”, США); (4) оценка эффективности ПЦР-амплификации кДНК, полученной из образцов РНК, выделенных из жидких культур на 4 сутки роста.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLV RT kit (“Евроген”) по протоколу производителя с использованием случайного праймера. В качестве мишени для ПЦР-амплификации был выбран ген фактора элонгации трансляции-1 α (*TEF1 α*). Для анализа эффективности ПЦР в качестве матриц использовали последовательные 10-кратные разведения кДНК в диапазоне от 10⁻¹ до 10⁻⁸. Структуры олигонуклеотидов, используемых для амплификации кДНК *F. graminearum*, опубликованы ранее [20]. Олигонуклеотиды для амплификации кДНК *F. coffeatum* были разработаны в ходе исследования (прямой праймер: 5'-ССАСТАССГГТСАСТТГАТСТА-3'; обратный праймер: 5'-СТСГГСГГСТТССТТСТС-3'; зонд: 5'-(ВНQ1)-САГТГСГГТГГТА-(FAMdT)-СГАСААГСГААССАТ-3'). ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 (“ДНК-технология”, Россия) в соответствии со следующей программой амплификации: 90 с при 93°C (1 цикл); 10 с при 93°C, 15 с при 60°C, 10 с при 72°C (40 циклов). Анализ полученных данных проводили по алгоритмам, описанным Bustin и др. [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особенности пробоподготовки

Культуры грибов *F. graminearum* и *F. coffeatum*, использованные в исследовании, отличались по морфологическим и физиологическим характеристикам. Так, *F. graminearum* формировал обильный пушистый воздушный мицелий при росте на агаризованной питательной среде и быстро рос в жидкой культуре, в то время как *F. coffeatum* формировал плотный необильный мицелий на агаризованной среде и рыхлые хлопьевидные структуры при культивировании в жидкой. В последнем случае мицелиальные структуры *F. coffeatum* были окружены желеобразной массой, которую не удавалось удалить после центрифугирования и отбора культуральной жидкости. Подобная структура присутство-

вала и вокруг мицелиев *F. graminearum*, однако ее объем был значительно меньше. Желеобразные структуры, по-видимому, содержали значительное количество жидкости, так как масса мицелия *F. coffeatum* после лиофильной сушки снижалась на 50–65%, в то время как *F. graminearum* всего на 20–30%.

Модификация исходного протокола

Первоначальный протокол LogSpin [17] в ходе оптимизации методики был модифицирован в соответствии со спецификой исследуемых образцов. Модификации протокола включали:

1) увеличение объема лизирующего буфера, добавляемого к образцу, до 1 мл (вместо 500 мкл согласно протоколу LogSpin);

2) добавление к лизирующему буферу β -меркаптоэтанола в соотношении 100 : 1. Введение этого этапа обусловлено возможным наличием в клетках грибов фенольных соединений, способных окисляться и связываться с РНК, затрудняя ее выделение, а β -меркаптоэтанол как восстановитель предотвращает окислительный процесс;

3) введение этапа инкубации гомогената в течение 15 мин при 65°C для более полного лизиса клеток;

4) изменение состава промывочного раствора-2: в предлагаемой методике он включает 40% изопропанола и 10 мМ Трис-НСI (в оригинальном протоколе это 70%-ный изопропанол), так как буферный раствор позволяет поддерживать оптимальные значения рН, тем самым стабилизируя РНК;

5) при выделении РНК из жидких культур на более поздних этапах роста (7 сутки) вводили ингибитор РНКаз на этапе элюирования (для предотвращения деградации РНК).

Анализ концентрации и качества полученных препаратов РНК

Основные характеристики препаратов РНК, полученных в различных вариантах выделения, приведены в табл. 1. Как при выделении из мицелиев, выросших на агаризованных питательных средах, так при работе с жидкими культурами концентрации РНК, выделяемых из мицелия *F. graminearum*, были выше, чем для *F. coffeatum*; при этом предварительная лиофилизация образцов практически не оказывала влияния на выход и чистоту РНК, выделяемой из мицелиев, культивируемых на твердых средах. Интересно отметить, что использование

Таблица 1. Оценка качества выделенных образцов РНК^а

№	Субстрат ^б	Время ^с , сут	Метод выделения ^д	Лиофилизация	Ингибитор РНКаз	[РНК], мкг/100 мг мицелия	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RIN
<i>F. graminearum</i>									
1	АС	7	1	+	–	5.1 ± 0.7	1.81 ± 0.02	2.01 ± 0.01	8.1
2	АС	7	2	+	–	7.2 ± 0.5	1.67 ± 0.03	1.81 ± 0.00	7.3
3	АС	7	1	–	–	5.8 ± 0.4	1.96 ± 0.04	2.0 ± 0.02	7.4
4	АС	7	2	–	–	7.7 ± 0.2	1.85 ± 0.06	1.94 ± 0.02	7.2
5	ЖК	4	1	+	–	14.0 ± 0.3	2.1 ± 0.02	2.0 ± 0.02	8.4
6	ЖК	4	2	+	–	16.2 ± 0.5	1.8 ± 0.02	1.92 ± 0.04	7.9
7	ЖК	4	1	–	–	11.1 ± 0.7	1.57 ± 0.05	2.02 ± 0.02	6.6
8	ЖК	4	2	–	–	11.8 ± 0.4	1.42 ± 0.08	1.8 ± 0.04	6.0
9	ЖК	7	1	+	–	4.2 ± 0.6	1.9 ± 0.06	2.0 ± 0.04	5.2
10	ЖК	7	2	+	–	1.8 ± 0.5	1.65 ± 0.01	1.78 ± 0.02	4.2
11	ЖК	7	1	–	–	2.2 ± 0.1	0.96 ± 0.09	1.81 ± 0.03	5.1
12	ЖК	7	2	–	–	0.9 ± 0.09	0.76 ± 0.03	1.31 ± 0.08	2.9
13	ЖК	7	1	+	+	9.2 ± 0.3	1.99 ± 0.02	1.8 ± 0.03	8.0
14	ЖК	7	2	+	+	14.9 ± 0.8	1.71 ± 0.02	1.7 ± 0.04	6.4
<i>F. coffeatum</i>									
15	АС	7	1	+	–	4.4 ± 0.4	1.7 ± 0.04	1.9 ± 0.03	7.2
16	АС	7	2	+	–	6.8 ± 1.0	1.42 ± 0.05	1.92 ± 0.02	6.9
17	АС	7	1	–	–	2.9 ± 0.2	1.66 ± 0.02	2.0 ± 0.03	6.0
18	АС	7	2	–	–	4.1 ± 0.1	1.29 ± 0.02	1.85 ± 0.02	5.8
19	ЖК	4	1	+	–	10.7 ± 0.2	2.1 ± 0.01	2.2 ± 0.02	7.5
20	ЖК	4	2	+	–	11.2 ± 0.1	2.0 ± 0.01	1.96 ± 0.02	7.2
21	ЖК	4	1	–	–	3.4 ± 0.5	0.9 ± 0.02	1.72 ± 0.01	5.9
22	ЖК	4	2	–	–	4.2 ± 0.3	1.3 ± 0.03	1.68 ± 0.04	4.9
23	ЖК	7	1	+	–	0.8 ± 0.7	0.3 ± 0.09	1.2 ± 0.03	н/о ^е
24	ЖК	7	2	+	–	1.5 ± 0.4	0.4 ± 0.06	1.4 ± 0.07	н/о
25	ЖК	7	1	–	–	0.3 ± 0.4	0.4 ± 0.04	1.0 ± 0.02	н/о
26	ЖК	7	2	–	–	0.5 ± 0.6	0.6 ± 0.03	1.4 ± 0.02	н/о
27	ЖК	7	1	+	+	8.4 ± 0.3	2.0 ± 0.01	1.7 ± 0.02	7.8
28	ЖК	7	2	+	+	11.0 ± 0.2	1.61 ± 0.02	1.65 ± 0.03	7.2

^аРезультаты представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD) на основании трех независимых экспериментов; ^бАС – агаризованная среда, ЖК – жидкая культура; ^суказано время культивирования до момента отбора материала; ^д1 – предложенный протокол, 2 – RNeasy Plant Mini Kit; ^еRIN не определяли.

коммерческого набора RNeasy Plant Mini Kit позволяло получать в среднем более высокие количества РНК. Так, выход РНК, полученной при выделении из мицелия *F. graminearum* с твердой питательной среды, составил 7.2 ± 0.5 мкг/100 мг мицелия при использова-

нии набора против 5.1 ± 0.7 мкг/100 мг мицелия по предложенному протоколу. Однако образцы РНК, выделенные с применением предложенной методики, по степени очистки от белковых примесей (A₂₆₀/A₂₈₀), а также от полисахаридов и вторичных метаболитов (A₂₆₀/A₂₃₀) превосходи-

ли полученные с использованием RNeasy Plant Mini Kit. Кроме того, индексы целостности РНК (RIN) для образцов, полученных с использованием коммерческого набора, были ниже (7.3 против 8.1 и 6.9 против 7.2 для лиофилизированных мицелиев *F. graminearum* и *F. coffeatum* соответственно).

При работе с жидкими культурами влияние предварительной лиофилизации на качество и количество выделяемой РНК было более существенным. Так, концентрации РНК *F. graminearum*, выделенной из лиофилизованного мицелия на 4 сутки роста, были выше в среднем в 1.3 (предложенный здесь протокол) и в 1.4 (набор) раза. Еще более существенными были отличия для *F. coffeatum*. При выделении РНК из лиофилизированных мицелиев выход превосходил аналогичные показатели для нелиофилизированных образцов в 3.1 (протокол) и 2.7 (набор) раз. Кроме того, препараты РНК, выделенные из образцов, не подвергнутых лиофилизации, содержали органические примеси. Так, значения A_{260}/A_{230} для образцов РНК, выделенной из *F. coffeatum* на 4 сутки роста по разработанному протоколу, составили 0.9 (значительное загрязнение) и 2.1 (чистый образец) соответственно для нелиофилизованного и лиофилизованного мицелия. Также использование лиофилизированных образцов позволило добиться более высоких показателей целостности РНК. Наиболее высокие количественные и качественные показатели были достигнуты при выделении РНК из предварительно лиофилизированных мицелиев на 4 сутки роста в жидкой среде. На рис. 1 представлены данные контроля качества РНК *F. graminearum* (RIN 8.4) и *F. coffeatum* (RIN 7.5), выделенных с использованием предложенной в работе методики. На обеих электрофореграммах видны пики, соответствующие 18S и 28S рРНК. Необходимо отметить, что при анализе образца РНК, выделенной из *F. coffeatum*, по сравнению с *F. graminearum*, присутствовал более выраженный пик, соответствующий 5S рРНК, а содержание деградированной РНК было выше.

Наиболее сложными с точки зрения выделения были образцы мицелия, выращиваемые в жидких средах, на поздних этапах роста (7 сутки). Вероятно, проблемы обусловлены значительным содержанием в клетках грибов РНКаз, которые не удавалось полностью инактивировать с помощью гуанидин гидрохлорида как хаотропного агента. Так, в образцах, выделенных как из лиофилизированных, так и из нелиофилизированных мицелиев *F. coffeatum*, РНК была деградирована до неопределяемого значения RIN. Эффективным решением стало внесение ингибитора РНКаз RiboCare на этапе элюирования РНК с колонки. На рис. 2 приведена электрофореграмма образцов РНК, выделенных

с использованием набора RNeasy Plant Mini Kit и предложенной здесь методике. Введение стадии дополнительной обработки ингибитором позволило получить высокоочищенную недеградированную РНК. Так, при выделении РНК по описанному протоколу и с использованием коммерческого набора значения RIN составили соответственно 8.0 и 6.4 для *F. graminearum* и 7.8 и 7.2 для *F. coffeatum*.

Количественная ПЦР

Для оценки возможности использования РНК, выделенной по предложенной методике, в исследованиях дифференциальной экспрессии генов проведена количественная ПЦР. Ген *TEF1 α* , выбранный в качестве мишени, относится к конститутивно экспрессирующимся и ранее использован в качестве референсного в работах по анализу дифференциальной экспрессии генов у грибов рода *Fusarium* [20, 22]. кДНК, использованные в работе, синтезированы на матрице РНК, выделенной из мицелиев *F. graminearum* и *F. coffeatum* на 4 сутки роста в жидкой среде. На рис. 3 приведены графики зависимости пороговых циклов от разведения кДНК. Для кДНК *F. graminearum* предел чувствительности соответствовал разведению 10^{-6} (пороговый цикл 34.2), для кДНК *F. coffeatum* — 10^{-5} (пороговый цикл 35.0). Эффективность амплификации составила 93% для *F. graminearum* и 86% для *F. coffeatum*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представители царства Грибы (Fungi) относятся к тем объектам, из которых сложно выделять большие количества РНК высокого качества. Это обусловлено рядом факторов, в числе которых наличие прочной клеточной стенки и высокое содержание полисахаридов, таких как хитин, (1–3)- β -D-глюкан и (1–6)- β -D-глюкан, которые сосаждаются в процессе выделения вместе с РНК, а также конкурируют с ней за связывание с сорбентами [23]. На сегодняшний день опубликован ряд работ, посвященных разработке и оптимизации протоколов выделения РНК из различных видов грибов [23–25], однако они практически не коснулись представителей рода *Fusarium*, несмотря на высокую хозяйственную и экономическую значимость этих организмов. В исследованиях, связанных с анализом экспрессии генов как методом количественной ПЦР, так и с использованием высокопроизводительного секвенирования, для выделения РНК из культур грибов рода *Fusarium*, как правило, используют коммерческие наборы, предназначенные для выделения РНК из растений и других организмов, клетки которых

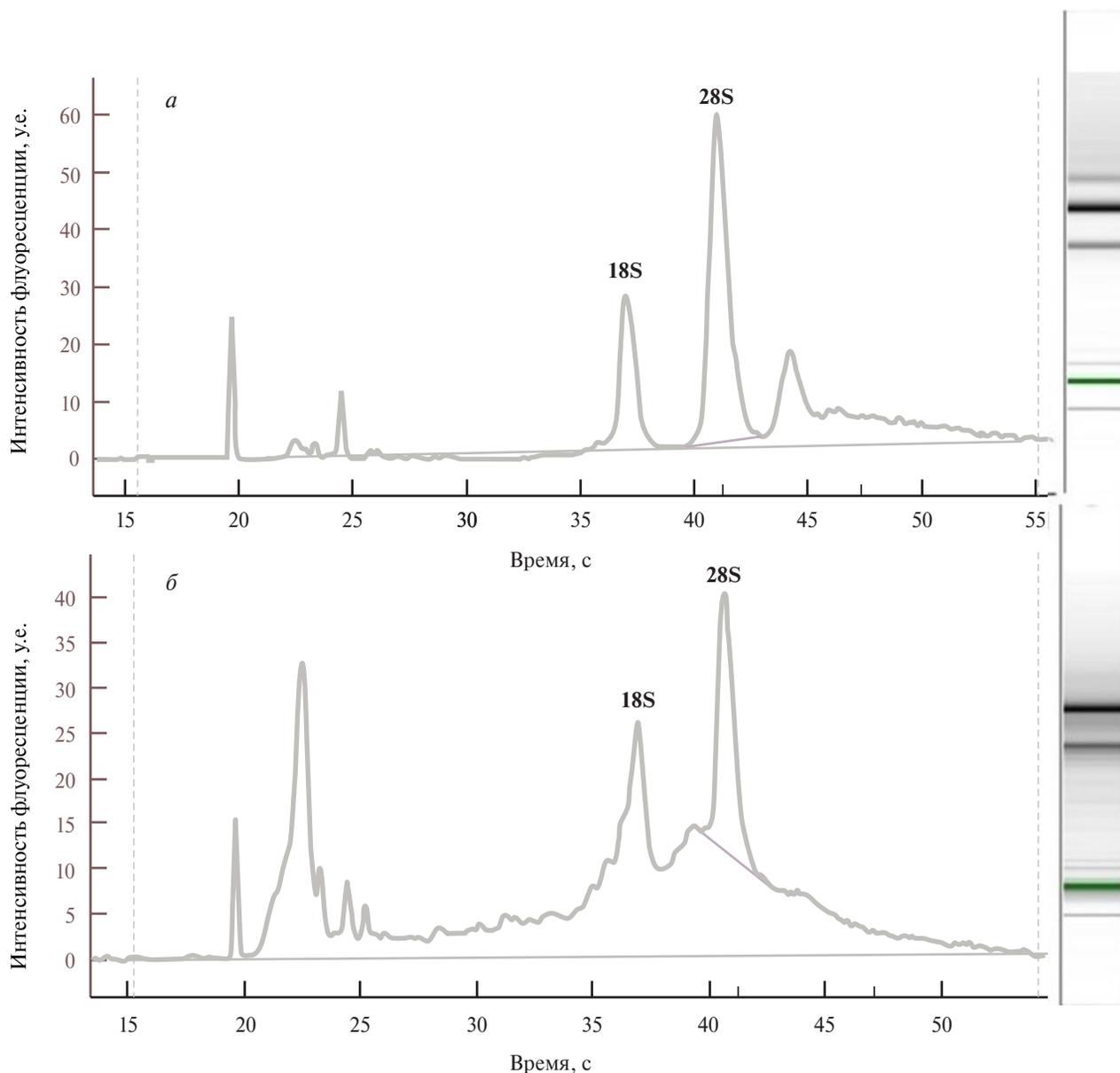


Рис. 1. Результаты анализа целостности РНК *F. graminearum* (а) и *F. coffeatum* (б), выполненного на биоанализаторе Agilent 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies”, США). РНК выделена из мицелиев грибов на 4 сутки роста на жидкой питательной среде.

оказаны плотной клеточной стенкой [26–28]. К недостаткам этих наборов можно отнести их высокую стоимость, а также тот факт, что для российских исследователей приобретение наборов зарубежного производства на сегодняшний день затруднено в связи со сложной политико-экономической ситуацией. Кроме того, выделение РНК из нитчатых грибов имеет свои особенности, с которыми исследователи могут не сталкиваться при работе с растениями, поэтому наборы реагентов, адаптированные для работы с растительной тканью, в этом случае могут быть малоэффективными. Необходимо также отме-

тить, что в ряде работ [29, 30] РНК выделяли из мицелия, культивируемого на твердых питательных средах, в то время как исследования метаболических профилей грибов и генетического аппарата, регулирующего метаболизм, требуют культивирования в жидких средах специального состава, индуцирующих синтез анализируемых соединений.

Метод выделения РНК, в котором использован буфер на основе 8 М гуанидин гидрохлорида, впервые был описан в 1987 году Logemann с соавт. [31] и включал удаление белков смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт в соот-

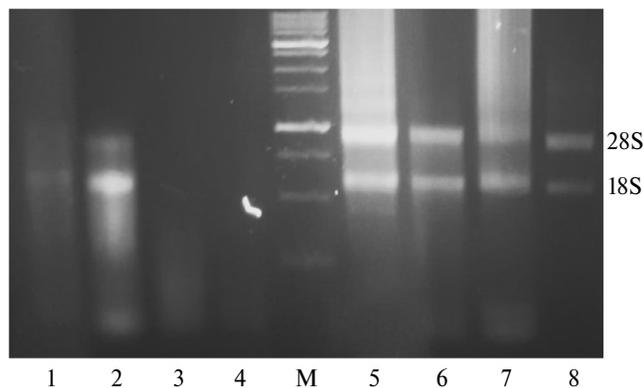


Рис. 2. Электрофореграмма образцов РНК, выделенных из мицелиев грибов на 7 сутки роста на жидких питательных средах. Слева от маркера (М) — образцы, выделенные без ингибитора РНКаз RiboCare, справа — с добавлением ингибитора. 1, 5 — *F. graminearum*, набор RNeasy Plant Mini Kit; 2, 6 — *F. graminearum*, метод с использованием 8 М гуанидин гидрохлорида; 3, 7 — *F. coffeatum*, набор RNeasy Plant Mini Kit; 4, 8 — *F. coffeatum*, метод с использованием 8 М гуанидин гидрохлорида.

ношении 25 : 24 : 1 с последующими промывками 3-молярным ацетатом натрия и 70%-ным этанолом. Модифицированная версия этого протокола, позволяющая сократить время выделения и избежать применения токсичных реагентов, была описана Н. Yaffe с соавт. [17] и названа LogSpin. В проведенном нами исследовании эта методика адаптирована для выделения РНК из грибов рода *Fusarium*, прежде всего при росте в жидких средах, а также из культур видов, не формирующих обильного мицелия, таких как *F. coffeatum*.

В ходе исследования установлена важность предварительной пробоподготовки — лиофилизации перед процедурой выделения РНК. Это позволяет увеличить выход и повысить качество целевого продукта. Необходимо отметить, что использование лиофилизации для улучшения качества и количества выделяемой РНК ранее было описано при работе с бурыми водорослями [32] и бутонами винограда [33]. Также было показано, что лиофилизованные образцы могут выдерживать транспортировку и длительное хранение — без изменения качества препарата РНК [34].

Другим важным результатом проведенного нами исследования стала демонстрация возможности использования колонок, предназначенных для выделения плазмидной ДНК, для выделения РНК из мицелия грибов. Это обусловлено универсальным строением колонок, содержащих сорбенты на основе силикагеля и селективно связывающих ДНК/РНК в зависимости от солевого состава и рН используемых

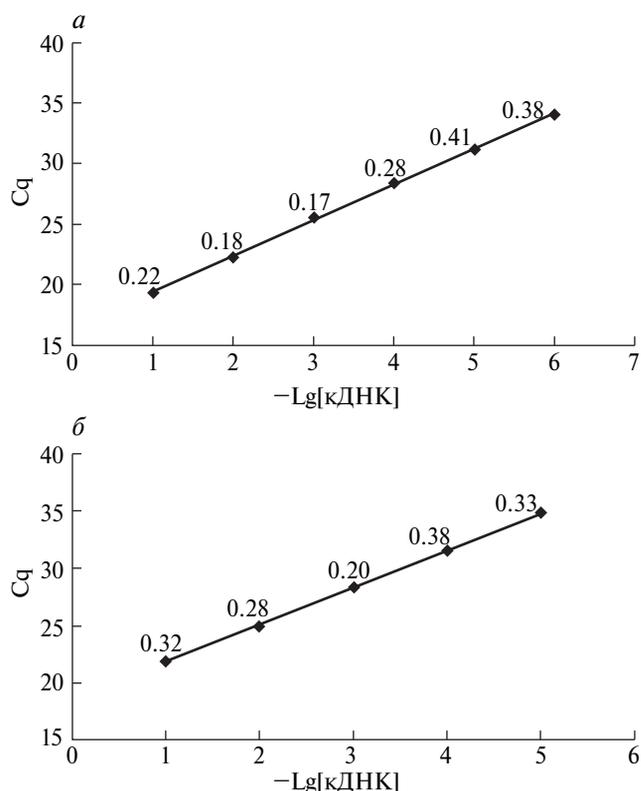


Рис. 3. Графики зависимости пороговых циклов ПЦР от степени разведения кДНК *F. graminearum* (а) и *F. coffeatum* (б). Рядом с каждой точкой указана величина SD.

буферов. Экспериментально подобраны и оптимизированы условия связывания выделяемой РНК с сорбентом, включая использование буфера Трис-НСI. Заметим, что стоимость наборов для выделения плазмидной ДНК существенно ниже, чем наборов для выделения РНК из растений и грибов, поэтому разработанный нами протокол не только упрощает, но и значительно удешевляет процесс выделения РНК грибов.

Таким образом, нами предложен быстрый и рентабельный метод выделения РНК из мицелия токсигенных грибов рода *Fusarium*, культивируемых как на твердых питательных средах, так и в жидких культурах. Описанный протокол может быть модифицирован — в зависимости как от исследуемого объекта, так и доступной материально-технической базы. Например, лиофилизация может быть заменена замораживанием препарата при -80°C , а вместо растирания в жидком азоте могут быть использованы гомогенизаторы. Относительно высокие показатели RIN свидетельствуют о возможности использования выделенной РНК для анализа дифференциальной экспрессии генов не только методом количественной ПЦР, но и высокопроизводительного секвенирования.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-30003).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fones H.N., Bebbler D.P., Chaloner T.M., Kay W.T., Steinberg G., Gurr S.J. (2020) Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. *Nat. Food*. **1**(6), 332–342.
2. Summerell B.A., Laurence M.H., Liew E.C.Y., Leslie J.F. (2010) Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers.* **44**, 3–13.
3. Ekwomadu T.I., Mwanza M. (2023) *Fusarium* fungi pathogens, identification, adverse effects, disease management, and global food security: a review of the latest research. *Agriculture*. **13**(9), 1810.
4. Kamle M., Mahato D.K., Gupta A., Pandhi S., Sharma B., Dhawan K., Vasundhara, Mishra S., Kumar M., Tripathi A.D., Rasane P., Selvakumar R., Kumar A., Gamlath S., Kumar P. (2022) Deoxynivalenol: an overview on occurrence, chemistry, biosynthesis, health effects and its detection, management and control strategies in food and feed. *Microbiol. Res.* **13**, 292–314.
5. Ropejko K., Twarużek M. (2021) Zearalenone and its metabolites – general overview, occurrence and toxicity. *Toxins*. **13**, 35.
6. Qu L., Wang L., Ji H., Fang Y., Lei P., Zhang X., Jin L., Sun D., Dong H. (2022) Toxic mechanism and biological detoxification of fumonisins. *Toxins*. **14**, 182.
7. Langevin F., Eudes F., Comaeu A. (2004) Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal samples. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**(7), 735–746.
8. Merhej J., Richard-Forget F., Barreau C. (2011) Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**(3), 519–528.
9. Woloshuk C.P., Shim W.-B. (2013) Aflatoxins, fumonisins and trichothecenes: a convergence of knowledge. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**(1), 94–109.
10. Gil-Serna J., Vázquez C., Patiño B. (2020) Genetic regulation of aflatoxin, ochratoxin A, trichothecene, and fumonisin biosynthesis: a review. *Int. Microbiol.* **23**(1), 89–96.
11. Kolawole O., Meneely J., Petchkongkaew A., Elliott C. (2021) A review of mycotoxin biosynthetic pathways: associated genes and their expressions under the influence of climatic factors. *Fungal Biol. Rev.* **37**(1), 8–26.
12. Yang B., Wang Y., Tian M., Dai K., Zheng W., Liu Z., Yang S., Liu X., Shi D., Zhang H., Wang Y., Ye W., Wang Y. (2021) Fg12 ribonuclease secretion contributes to *Fusarium graminearum* virulence and induces plant cell death. *J. Integr. Plant Biol.* **63**(2), 365–377.
13. Qian H., Wang L., Wang B., Liang W. (2022) The secreted ribonuclease T2 protein FoRnt2 contributes to *Fusarium oxysporum* virulence. *Mol. Plant Pathol.* **23**(9), 1346–1360.
14. Ульянова В.В., Ваньков П.Ю., Зеленихин П.В., Шах Махмуд Р., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. (2020) Секретируемые щелочные рибонуклеазы микромицетов. *Ученые записки Казанского университета. Серия: естественные науки*. **162**(3), 335–349.
15. Hansch C., McKarns S.C., Smith C.J., Doolittle D.J. (2000) Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **127**(1), 61–72.
16. Sridar N., Krishnakishore C., Sandeep Y., Sriramaveen P., Manjusha Y., Sivakumar V. (2011) Chloroform poisoning – a case report. *Ren. Fail.* **33**(10), 1037–1039.
17. Yaffe H., Buxdorf K., Shapira I., Ein-Gedi S., Moyal-Ben Zvi M., Fridman E., Moshelion M., Levi M. (2012) LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC Res. Notes*. **5**, 45.
18. Минаева Л.П., Самохвалова Л.В., Завриев С.К., Стахеев А.А. (2022) Первое выявление гриба *Fusarium coffeatum* на территории Российской Федерации. *Сельскохозяйственная биология*. **57**(1), 131–140.
19. Farber J.M., Sanders G.W. (1986) Fusarin C production by North American isolates of *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**(2), 381–384.
20. Stakheev A.A., Erokhin D.V., Meleshchuk E.A., Mikityuk O.D., Statsyuk N.V. (2022) Effect of compactin on the mycotoxin production and expression of related biosynthetic and regulatory genes in toxigenic *Fusarium culmorum*. *Microorganisms*. **10**, 1347.
21. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Witter C.T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR. *Clin. Chem.* **55**(4), 611–622.
22. Shcherbakova L., Mikityuk O., Arslanova L., Stakheev A., Erokhin D., Zavriev S., Dzhavakhiya V. (2021) Studying the ability of thymol to improve fungicidal effects of tebuconazole and difenoconazole against some plant pathogenic fungi in seed or foliar treatments. *Front. Microbiol.* **12**, 629429.
23. Sánchez-Rodríguez A., Portal O., Rojas L.E., Ocaña B., Mendoza M., Acosta M., Jiménez E., Höfte M. (2008) An efficient method of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. interaction. *Mol. Biotechnol.* **40**(3), 299–305.

24. Delira-Argumedo R., González-Mendoza D., Alarcón A. (2008) A rapid and versatile method for the isolation of total RNA from the filamentous fungus *Trichoderma* sp. *Ann. Microbiol.* **58**(4), 761–763.
25. Bernáldez V., Rodríguez A., Rodríguez M., Sánchez-Montero L., Córdoba J.J. (2017) Evaluation of different RNA extraction methods of filamentous fungi in various food matrices. *LWT.* **78**(6), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.018>
26. Tu Q., Wang L., An Q., Shuai J., Xia X., Dong Y., Zhang X., Li G., He Y. (2023) Comparative transcriptomics identifies the key in planta-expressed genes *Fusarium graminearum* during infection of wheat varieties. *Front. Genet.* **14**, 1166832.
27. Miguel-Rojas C., Cavinder B., Townsend J.P., Trail F. (2023) Comparative transcriptomics of *Fusarium graminearum* and *Magnaporthe oryzae* spore germination leading up to infection. *mBio.* **14**(1), e0244222.
28. Zhang L., Zhou X., Li P., Wang Y., Hu Q., Shang Y., Chen Y., Zhu X., Feng H., Zhang C. (2023) Transcriptome profile of *Fusarium graminearum* treated by putrescine. *J. Fungi.* **9**, 60.
29. Schumann U., Smith N.A., Wang M.-B. (2013) A fast and efficient method for preparation of high-quality RNA from fungal mycelia. *BMC Res. Notes.* **6**, 71.
30. Shu C., Sun S., Chen J., Chen J., Zhou E. (2014) Comparison of different methods for total RNA extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani*. *Electron. J. Biotechnol.* **17**(1), 50–54.
31. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**(1), 16–20.
32. Pearson G., Lago-Leston A., Valente M., Serrão E. (2006) Simple and rapid RNA extraction from freeze-dried tissue of brown algae and seagrasses. *Eur. J. Phycol.* **41**(1), 97–104.
33. García-Baldenegro C.V., Vargas-Arispuro I., Islas-Osuna M., Rivera-Domínguez M., Aispuro-Hernández E., Martínez-Téllez M.A. (2015) Total RNA quality of lyophilized and cryopreserved dormant grapevine buds. *Electron. J. Biotechnol.* **18**, 50–54.
34. Damsteegt E.L., McHugh N., Lokman P.M. (2016) Storage by lyophilization – resulting RNA quality is tissue dependent. *Anal. Biochem.* **511**, 92–96.

An Efficient Method for Isolation of High-Quality RNA from Mycelium of Toxigenic Fungi *Fusarium* sp.

© 2025 A. A. Stakheev*, D. Yu. Ryazantsev, N. G. Gabrielyan, A. V. Poluboyarinova, M. E. Taliansky, S. K. Zavriev

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: stakheev.aa@gmail.com

Here, we describe a rapid and relatively cost-efficient method for the isolation and purification of RNA from mycelium of two species of plant-pathogenic fungi of *Fusarium* genus with different morphological and biochemical properties, *F. graminearum* and *F. coffeatum*. The method involves the use of guanidine hydrochloride-based buffer and spin columns from a commercial plasmid DNA extraction kit, and can be applied to both mycelia grown on nutrient agar media and liquid cultures of fungi. The yield of RNA isolated using the proposed protocol was 4–14 µg/100 mg of mycelium dry weight with RIN values up to 8.4. When optimizing the method, we propose to carry out a pre-lyophilization procedure, as well as the use of an RNase inhibitor when isolating from cultures at late growth stages.

Keywords: RNA, *Fusarium*, mycelium, guanidine hydrochloride, lyophilization, electrophoresis, RIN