

УДК 575.2.084

doi: 10.26907/2542-064X.2019.1.66-76

ИЗМЕНЕНИЯ В КОЛИЧЕСТВЕ ТРАНСПОЗОНОВ II КЛАССА У ШТАММА *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* V03-2g И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ МУТАНТАХ С РАСШИРЕННОЙ ФИТОПАТОГЕННОСТЬЮ

Д.М. Афордоань¹, А. Тоасенич¹, Ш.З. Валидов^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Казанский государственный аграрный университет, г. Казань, 420015, Россия

Аннотация

Фитопатогенные представители *Fusarium oxysporum* могут поражать более 120 видов культурных растений и представляют серьезную опасность для мирового сельского хозяйства. Большое количество специальных форм, патогенных к разным видам растений, указывает на быструю адаптацию *F. oxysporum* к новым хозяевам. Основой такой адаптивности может являться пластичность геномов штаммов этого вида, возникающая, в том числе, из-за активности транспозибельных элементов. Исследованы изменения в количестве транспозибельных элементов II класса у штамма *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* V03-2g. Показано, что при многократных пассажах количество всех изученных транспозибельных элементов увеличилось, тогда как у исходного штамма, хранившегося в замороженном виде, количество транспозонов было сравнимо с таковым у томатного патогена *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ZUM2407. Кроме того, у мутантных вариантов штамма V03-2g с расширенным кругом хозяев наблюдались разнонаправленные изменения в количестве транспозибельных элементов, что указывает на возможность перестроек генома *F. oxysporum* в течение относительно короткого периода.

Ключевые слова: *Fusarium oxysporum*, специальная форма, транспозоны, IGS, количественная ПЦР

Введение

Представители вида *Fusarium oxysporum* (*Fox*) часто являются возбудителями заболеваний растений [1, 2], снижая урожайность культур и ухудшая качество растительной продукции за счет выделения токсинов, опасных для человека, животных и растений [3]. Фитопатогенные штаммы *Fox* делят на специальные формы (*forma specialis*) в зависимости от растения-хозяина и симптомов заболевания: корневые гнили или поражение сосудов; в настоящее время описано около 150 специальных форм [2, 4]. Наличие большого количества специальных форм может свидетельствовать о быстрой адаптации фитопатогенных штаммов *Fox* к новым хозяевам. Поскольку половой процесс, который является причиной изменчивости у многих высших организмов, для этого вида не был описан ни в природных ни в лабораторных условиях [5], изменчивость у *Fox* может быть обусловлена мобильными элементами [6]. Так, у штаммов *Fox* обнаружены хромосомы патогенности, при переносе которых непатогенные штаммы

становятся фитопатогенами [5]. На данных хромосомах располагаются гены, обуславливающие патогенность к тем или иным растениям, кроме того, эти дополнительные хромосомы несут в себе большое количество транспозибельных элементов [7], которые могут являться причиной геномных перестроек [6].

Целью настоящего исследования являлось изучение изменения в количестве транспозибельных элементов штамма *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* V03-2g и его производных мутантов с расширенной патогенностью.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования. В работе были использованы штаммы *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Forc) V03-2g и *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) ZUM2407 [8], патогенные к растениям огурцов и томатов соответственно. Кроме того, были исследованы мутанты штамма V03-2g с расширенной фитопатогенностью: SB1, SB2 и SB3, которые способны поражать растения как огурцов, так и томатов.

Штаммы *Fusarium oxysporum* хранили замороженными в 30%-ном глицерине при -80°C . При необходимости штаммы культивировали на агаризованной среде Чапека (Difco, США) при 28°C с добавлением цефтриаксона (ОАО «Синтез», г. Курган, РФ) в концентрации 100 мкг/мл для предотвращения бактериального загрязнения.

Выделение ДНК. Для выделения ДНК биомассу микромицетов выращивали на стерильной фильтровальной бумаге, выложенной на поверхность агара Чапека. После того, как гифы гриба полностью покрывали фильтровальную бумагу и выходили за ее пределы, фильтровальную бумагу с гифами снимали с поверхности чашки Петри и переносили в ступку с жидким азотом, после чего перемалывали пестиком до состояния гомогенного порошка, постоянно приливая жидкий азот для охлаждения. Порцию перемолотой массы весом 100 мг переносили в пробирку типа эппендорф объемом 2 мл, содержащую 1 мл 2%-ного бромида гексадекатриметиламмония, 100 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1.4М NaCl и 20 мМ EDTA, поставленные ООО «Компания Хеликон» (г. Москва, РФ), и инкубировали при 60°C в течение 20 мин. К смеси приливали 500 мкл хлороформа (ЗАО «База № 1 Химреактивов», г. Москва, РФ) и перемешивали переворачиванием в течение 1 мин. Для разделения фаз пробирку центрифугировали при 13000 об./мин в течение 5 мин. Верхнюю фазу объемом 500 мкл отбирали в новую пробирку и приливали к ней 300 мкл (0.6 объема) изопропилового спирта. После перемешивания пробирку центрифугировали при 13000 об./мин в течение 5 мин. Осадки дважды промывали 70%-ным этанолом и высушивали. Далее осадки растворяли в 100 мкл буфера STE pH 8.0 с добавлением РНКазы (Thermo, США) в концентрации 2 мг/мл при 60°C в течение 20 мин. Для дальнейшей очистки использовали набор Cleanup mini (ООО «Евроген», г. Москва, РФ) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию и чистоту ДНК определяли с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo, США) при длине волны 260 и 280 нм.

Разработка праймеров. Для разработки праймеров использовали программный пакет Clone Manager 9 (Scientific and Educational Software, США) и нуклеотидные последовательности транспозибельных элементов из базы данных GenBank. При создании пары праймеров учитывали размер амплифицируемого фрагмента и температуру отжига праймеров (табл. 1).

Количественная ПЦР. Для определения представленности транспозонов в геноме изучаемых штаммов использовали метод количественной ПЦР. В качестве матрицы использовали геномную ДНК микромицетов. Каждый препарат амплифицировали в трех повторах. Смесь для амплификации объемом 25 мкл представляла собой смесь qPCRMix-HS SYBR (ООО «Евроген», г. Москва, РФ) с добавлением 10 пМ каждого из праймеров (табл. 1) и 50 нг матричной ДНК, выделенной из исследуемых штаммов. Режим амплификации состоял из предварительной денатурации при 95 °С в течение 5 мин, за которой следовало 40 циклов в режиме 95 °С в течение 10 с и отжиг/элонгация 20 с с последующим измерением флуоресценции при длине волны для красителя SYBR Green. Для построения кривой плавления флуоресценция измерялась в интервале температур 65 °С до 95 °С с шагом 0.5 °С. Сравнение производили только в образцах, демонстрировавших сходные пики в кривых плавления. Для построения калибровочной кривой использовали разведения очищенного фрагмента гена 5.8S рРНК – 5 нг, 500 пг, 50 пг, 5 пг, 500 фг, 50 фг, 5 фг, которые амплифицировали также в трех повторах. Таким образом, получаемые данные являются количеством гена 5.8S рРНК в 10 нг тотальной ДНК микромицета. (табл. 1).

Результаты и их обсуждения

Вид *Fox* является космополитом, и его представители могут обитать в различных почвах как сапрофиты, минерализуя органические соединения [5]. Некоторые штаммы являются фитопатогенами, которые по способу паразитирования и растению-хозяину делят на специальные формы. В настоящее время известно более 150 различных специальных форм, которые паразитируют на более чем 120 культурах сельскохозяйственных и декоративных растений [4]. Большой охват видов может свидетельствовать о быстрой специализации штаммов к растению-хозяину, и, следовательно, о изменчивости штаммов данного вида. При анализе штаммов *Fox* была выявлена значительная гетерогенность внутри специальных форм в в межгенной области рибосомального оперона – IGS – и структурных генах факторов элонгации трансляции [9]. Это свидетельствует о том, что штаммы в одной специальной форме могут быть неродственными, а патогенность к тому или иному растению может развиваться на основе разных генотипов. Это демонстрирует возможность переноса хромосом патогенности и получения фитопатогенных вариантов изначально непатогенных штаммов [5]. Изучение дополнительных хромосом показало присутствие большого количества транспозибельных элементов [7].

Транспозибельные элементы часто встречаются в геномах мицелиальных грибов [10]. В настоящее время показано, что активность транспозонов может возрастать в стрессовых для микромицета условиях: транспозон *impala* в геноме

Табл. 1

Примеры, разработанные для определения копияности транспозонов

Транспозон – номер в базе GenBank	Название и последовательность праймера	T_m , °C	Размер амплифицируемого фрагмента, п.о.
Mimp1 – AF076624	Mimp1 3'-Rev (CCTGCTTCTAAGGAAGGAGCTC) Mimp1 5'-for (GGGATGCAATAAGTTTGAGTACCCGGG)	59.5 59.5	95
Mimp2 – AF076625	Mimp2 3'-Rev(CACATTCACCTGACTAACCCGGGTAAAAC) Mimp2 5'-for(GGCTGAAAGTACCCGCTGTGTAATC)	59.9 59.9	96
Hornet1 – AF076626	Hornet1 3'-Rev(CAAAAAGAAATATAAAATGGCCTCAAGACGAGAG) Hornet1 5'-for qPCR(GATAATGCTCAAGAAGGTACAGGCTGTC)	59.1 59.7	106
Hornet2 – AF076627	Hornet2 3'-Rev(CACTTTGGGATCGTATTGGATGTCATATCG) Hornet2 5'-for qPCR(GGCTTTGCTTCCAAAGCTTGGATATTTCG)	60,0 59.9	112
Hornet3 – AF076628	Hornet3 3'-Rev(GCTTGAACGATGAGGTTTCATGATGTGG) Hornet3 5'-qPCR(GGAAAGGTCGGCTACTTTACGATGG)	59.3 59.3	91
Han – AF076629	Han 3'-Rev(CTTGATCCTCTCGCAATCGAAGGAC) Han 5'-for(GGATTAAGGTTTCAGGATTAAGTTTGAAGTCC)	59.3 59.3	85
Marsu – AF076630	Marsu 3'-Rev qPCR(CCACAAAGATGTGCGACTTGCCAAAC) Marsu 5'-for(CACGCTCGCTTGTTCGGCACC)	59.3 59.3	92
Fot3 – AF076631	Fot3 3'-Rev qPCR(CTCTTGGCGAAGTATCCATGCGAC) Fot3 5'-for(CTCTTCGCAGAACAAATCCGCC)	59.1 60.6	115
Fot4 – AF076632	Fot4 3'-Rev qPCR(CTTGCAACCAAGGAATAAACCGTTCAAGTCC) Fot4 5'-for(GGAGCTTCTACTGAACCTTATCAAGGCC)	60.1 59.7	90

Aspergillus fumigatus активировался при понижении температуры [11], а активность hAT-подобного транспозона у *Fox* повышалась в условиях голодания штамма [12]. Считается, что транспозоны II класса могут отвечать за пластичность геномов штаммов *Fox* [10]. Для отдельных транспозибельных элементов доказано участие в формировании нового биотипа у расы 2 *Fox* f. sp. *lycopersici* из-за инсерции в последовательность гена вирулентности AVR1 [7, 13].

В исследовании мы использовали метод количественной ПЦР (qPCR) для анализа изменений транспозибельных элементов II класса – Hornet1, Hornet2, Hornet3, mimp1, mimp2, Fot3, Fot4, Nan и marsu [10] – в вариантах штамма V03-2g, которые приобрели патогенность по отношению к томатам по сравнению с исходным штаммом, а также для оценки представленности транспозибельных элементов у фитопатогенного штамма For1 ZUM2407, вызывающего корневые гнили у томатов.

При сравнении исходного варианта штамма, обозначенного M-Forc V03-2g, который хранился в виде замороженной культуры при -80°C , и варианта штамма (далее Forc V03-2g), который поддерживался в течение одного года в виде пассажей на агаризованной среде Чапека, было показано, что копийность всех исследованных транспозонов в 4.1–8.5 раз выше у последнего (рис. 1), что может свидетельствовать о размножении транспозибельных элементов при постоянных пассажах штамма на лабораторных средах.

При количественном сравнении транспозонов в исходном штамме Forc V03-2g и его мутантных формах с расширенным кругом хозяев Forc SB1 и SB2 наблюдалось статистически достоверное снижение копийности транспозонов mimp1, mimp2, Nan и marsu более чем в два раза. Кроме того, у штамма SB2 снизилось количество Hornet1. У штамма SB3 показано увеличение копийности транспозона Hornet2, копийность остальных транспозонов элементов достоверно не отличалась от таковой у исходного штамма (рис. 1)

При сравнении транспозонов в штаммах ZUM2407 и исходного M-Forc V03-2g было показано, что копийность транспозонов Fot4, mimp1 и Nan в 3, 11 и 13 раз выше соответственно, тогда как копийность Hornet1 была выше у штамма ZUM2407. Копийность всех транспозонов была выше у Forc V03-2g, в более чем 80 раз превышает таковую у штамма ZUM2407 для mimp1 и Nan (рис. 1).

Для построения калибровочной кривой для всех транспозонов использовали разведения очищенного фрагмента гена 5.8S рРНК и праймеры комплементарные последовательности гена 5.8S рРНК, который является частью рибосомального оперона. Кроме того, было определено соотношение рибосомального оперона к геномной ДНК (геному) у исследованных штаммов с использованием фрагмента гена 5.8S рРНК и фрагмента последовательности IGS. Соотношение копий гена 5.8S рРНК к геному у штамма For1 ZUM2407 была в два раза ниже, чем у M-Forc V03-2g. При сравнении вариантов Forc V03-2g было показано, что копийность рибосомального оперона увеличилась у Forc V03-2g по сравнению с M-Forc V03-2g в 2.5 раза. Штаммы Forc V03-2g, Forc SB1 и SB2 статистически не отличались по копийности гена 5.8S рРНК. Это свидетельствует о том, что в геномах этих мутантов не произошло значительных изменений. Копийность гена 5.8S рРНК была значительно выше у мутанта Forc SB3 по сравнению с исходным штаммом. Для того чтобы подтвердить данные, полученные

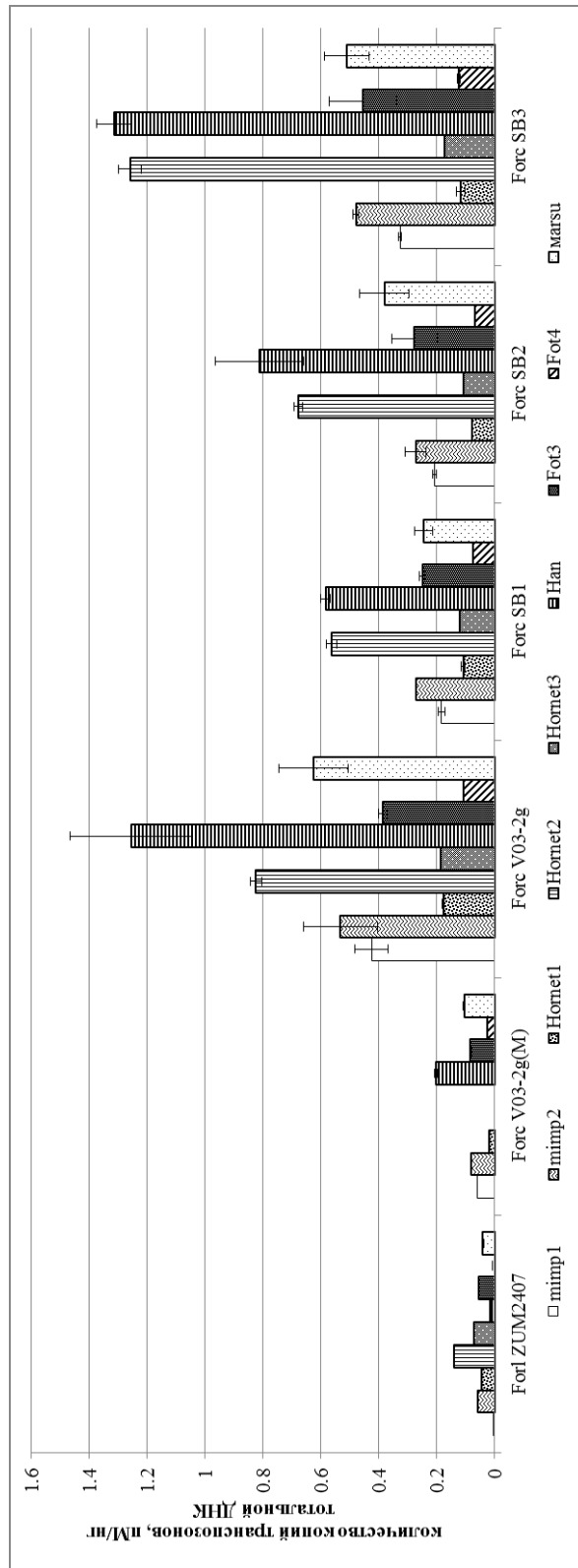


Рис. 1. Содержание транспозонов II класса в штаммах *Fusarium oxysporum* (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 3$)

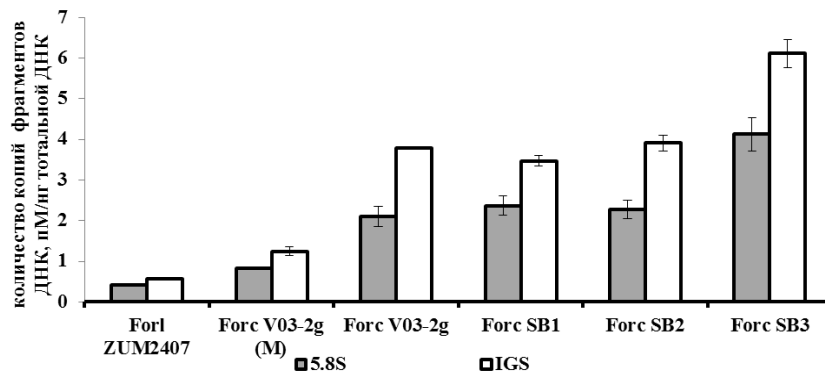


Рис. 2. Количество копий гена 5.8S и IGS-региона рибосомального оперона в геноме штаммов *F. oxysporum* (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 3$)

при анализе копийности гена 5.8S рРНК, был проанализирован другой фрагмент рибосомального оперона – межгенная последовательность IGS (Intergenic Spacer), который должен содержаться в геноме в эквимолярных количествах с геном 5.8S рРНК. Результаты количественного определения фрагментов IGS показали тот же тренд: копийность IGS была больше у Forc V03-2g в 3 раза, чем у M-Forc V03-2g, между исходным штаммом и мутантами SB1 и SB2 статистических различий не было, копийность IGS у мутанта SB3 превышала таковую у исходного штамма в два раза (рис. 2). Различия в данных, полученных с помощью количественного определения фрагментов одного и того же оперона, можно отнести на счет эффективности реакции амплификации этих двух фрагментов.

Широкий круг растений-хозяев у вида *Fox* демонстрирует приспособляемость, обусловленную, очевидно, пластичностью их геномов [5]. Транспозибельные элементы могут быть движущей силой этой пластичности, осуществляя значительные перестройки в геномах представителей вида *Fox* [6]. На примере ряда микроорганизмов было показано, как культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях может влиять на строение их геномов. В проведенных исследованиях мы выявили значительное увеличение количества транспозонов при регулярных пассажах штамма на лабораторных средах; разница в копийности транспозонов была в большинстве случаев больше, чем таковая у неродственных штаммов. При сравнении исходного варианта штамма Forc V03-2g и варианта, который поддерживался в течение одного года в виде пассажей, было показано увеличение копийности рибосомального оперона, такого рода изменения происходят у штаммов, клетки которых активно делятся.

У мутантов Forc V03-2g SB, SB2 и SB3 наблюдались разнонаправленные изменения копийности транспозонов, а в случае мутанта SB6 увеличение копийности рибосомального оперона, что свидетельствует о быстрых изменениях в геномах *Fox*, которые сопровождают смену растения-хозяина, вероятно, может происходить также и в естественных условиях.

Благодарности. Работы проводятся при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России. Соглашение о предоставлении субсидии №14.610.21.0017. Уникальный идентификатор проекта RFMEFI61017X0017.

Литература

1. Mazzeo M.F., Cacace G., Ferriello F., Puopolo G., Zoina A., Ercolano M.R., Siciliano R.A. Proteomic investigation of response to forl infection in tomato roots // Plant Physiol. Biochem. – 2014 – V. 74. – P. 42–49. – doi: 10.1016/j.plaphy.2013.10.031.
2. Michielse C.B., Rep M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum* // Mol. Plant Pathol. – 2009. – V. 10, No 3. – P. 311–324. –doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x.
3. Bani M., Rispaill N., Evidente A., Rubiales D., Cimmino A. Identification of the main toxins isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 and their relation with isolates' pathogenicity // J. Agric. Food Chem. – 2014. – V. 62, No 12. – P. 2574–2580. – doi: 10.1021/jf405530g.
4. Fourie G., Steenkamp E.T., Ploetz R.C., Gordon T.R., Viljoen A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex // Infect., Genet. Evol. – 2011. – V. 11, No 3. – P. 533–542. – doi: 10.1016/j.meegid.2011.01.012.
5. Ma L.J., Geiser D.M., Proctor R.H., Rooney A.P., O'Donnell K., Trail F., Gardiner D.M., Manners J.M., Kazan K. *Fusarium* pathogenomics // Annu. Rev. Microbiol. – 2013. – V. 67. – P. 399–416. – doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155650.
6. Davière J.M., Langin T., Daboussi M.J. Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome // Fungal Genet. Biol. – 2001. – V. 34, No 3. – P. 177–192. – doi: 10.1006/fgbi.2001.1296.
7. Kashiwa T., Suzuki T., Sato A., Akai K., Teraoka T., Komatsu K., Arie T. A new biotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 emerged by a transposon-driven mutation of avirulence gene AVR1 // FEMS Microbiol. Lett. – 2016. – V. 363, No 14. – Art. fnw132, P. 1–6. – doi: 10.1093/femsle/fnw132.
8. Validov S.Z., Kamilova F.D., Lugtenberg B.J. Monitoring of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strains during tomato plant infection // Microb. Biotechnol. – 2011. – V. 4, No 1. – P. 82–88. – doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00214.x.
9. Lievens B., van Baarlen P., Verreth C., van Kerckhove S., Rep M., Thomma B.P. Evolutionary relationships between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates inferred from mating type, elongation factor-1alpha and exopolysaccharuronase sequences // Mycol. Res. – 2009. – V. 113, No 10. – P. 1181–1191. – doi: 10.1016/j.mycres.2009.07.019.
10. Hua-Van A., Davière J.M., Kaper F., Langin T., Daboussi M.J. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: Clusters of class II transposons // Curr. Genet. – 2000. – V. 37, No 5. – P. 339–347. – doi: 10.1007/s002940050537.
11. Carr P.D., Tuckwell D., Hey P.M., Simon L., d'Enfert C., Birch M., Oliver J.D., Bromley M.J. The transposon *impala* is activated by low temperatures: Use of a controlled transposition system to identify genes critical for viability of *Aspergillus fumigatus* // Eukaryotic Cell. – 2010. – V. 9, No 3. – P. 438–448. – doi: 10.1128/EC.00324-09.
12. Rep M., van der Does H.C., Cornelissen B.J. Drifter, a novel, low copy hAT-like transposon in *Fusarium oxysporum* is activated during starvation // Fungal Genet. Biol. – 2005. – V. 42, No 6. – P. 546–553. – doi: 10.1016/j.fgb.2005.03.007.

13. Inami K., Yoshioka-Akiyama C., Morita Y., Yamasaki M., Teraoka T., Arie T. A genetic mechanism for emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Inactivation of avirulence gene AVR1 by transposon insertion // PLoS One. – 2012. – V. 7, No 8. – Art. e44101, P. 1–10. – doi: 10.1371/journal.pone.0044101.

Поступила в редакцию
29.05.18

Афордоаны Даниэль Мавуена, аспирант, младший научный сотрудник НИЛ «Структурная биология»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: dafordoan@gmail.com

Тоасенитч Алексис, студент Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: toales6@gmail.com

Валидов Шамиль Завдатович, PhD, старший научный сотрудник НИЛ «Структурная биология», старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Казанский государственный аграрный университет
ул. К. Маркса, д. 65, г. Казань, 420015, Россия
E-mail: szvalidov@kpfu.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2019, vol. 161, no. 1, pp. 66–76

doi: 10.26907/2542-064X.2019.1.66-76

**Changes in the Copy Number of Class II Transposons
in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* Strain V03-2g
and Its Derivatives with Broadened Phytopathogenicity**

D.M. Afordoanyi^{a*}, A. Toacegnitche^{a**}, S.Z. Validov^{a,b***}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bKazan State Agricultural University, Kazan, 420015 Russia

E-mail: ^{*}dafordoan@gmail.com, ^{**}toales6@gmail.com, ^{***}szvalidov@kpfu.ru

Received May 29, 2018

Abstract

Phytopathogenic strains of *Fusarium oxysporum* can parasitize on more than 120 species of crops and ornamental plants posing a serious danger to world agriculture. The wide range of hosts can be evidence of fast changes in the genomes of *F. oxysporum* strains, thereby allowing them to invade new plant species. Since the sexual reproduction has not been shown yet for *F. oxysporum*, in both natural and laboratory conditions, the activity of transposable elements can be responsible for the fast evolution of host specificity in this species. This paper describes the changes in the number of class II transposons in the *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) strain V03-2g, pathogenic to cucumber and its derivatives, which developed pathogenicity towards tomato. Nine transposons of class II (Mimp1, Mimp2,

Hornet1, Hornet2, Hornet3, Han, Marsu, Fot3, and Fot4) were followed using qPCR in the wild-type strain V03-2g and its derivatives. The results of the study demonstrate an increase in the copy number of all the studied transposons in the strain V03-2g maintained by the regular plating on laboratory media in a period of one year in comparison with the same strain kept frozen at -80°C . A decrease of the transposon copy number has been observed in two isolates, SB1 and SB2. In the SB3 isolates, the copy number of transposons increased. The data obtained demonstrate that changes in the transposon copy number can occur under different conditions relatively in a short time and can be the basis for the variability of *F. oxysporum* strains.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, forma specialis, transposons, IGS, qPCR

Acknowledgments. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. Subsidy agreement no. 14.610.21.0017. Project no. RFMEFI61017X0017.

Figure Captions

Fig. 1. Concentration of class II transposons in *Fusarium oxysporum* strains (mean value \pm standard deviation, $n = 3$).

Fig. 2. Copy number of the 5.8S gene and IGS region of the ribosomal operon in the genome of *Fusarium oxysporum* strains (mean value \pm standard deviation, $n = 3$).

References

1. Mazzeo M.F., Cacace G., Ferriello F., Puopolo G., Zoina A., Ercolano M.R., Siciliano R.A. Proteomic investigation of response to forl infection in tomato roots. *Plant Physiol. Biochem.*, 2014, vol. 74, pp. 42–49. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.10.031.
2. Michiels C.B., Rep M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.*, 2009, vol. 10, no. 3, pp. 311–324. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x.
3. Bani M., Rispail N., Evidente A., Rubiales D., Cimmino A. Identification of the main toxins isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 and their relation with isolates' pathogenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, vol. 62, no. 12, pp. 2574–2580. doi: 10.1021/jf405530g.
4. Fourie G., Steenkamp E.T., Ploetz R.C., Gordon T.R., Viljoen A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect. Genet. Evol.*, 2011, vol. 11, no. 3, pp. 533–542. doi: 10.1016/j.meegid.2011.01.012.
5. Ma L.J., Geiser D.M., Proctor R.H., Rooney A.P., O'Donnell K., Trail F., Gardiner D.M., Manners J.M., Kazan K. *Fusarium* pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2013, vol. 67, pp. 399–416. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155650.
6. Davière J.M., Langin T., Daboussi M.J. Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. *Fungal Genet. Biol.*, 2001, vol. 34, no. 3, pp. 177–192. doi: 10.1006/fgbi.2001.1296.
7. Kashiwa T., Suzuki T., Sato A., Akai K., Teraoka T., Komatsu K., Arie T. A new biotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 emerged by a transposon-driven mutation of avirulence gene AVR1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2016, vol. 363, no. 14, art. fnw132, pp. 1–6. doi: 10.1093/femsle/fnw132.
8. Validov S.Z., Kamilova F.D., Lugtenberg B.J. Monitoring of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strains during tomato plant infection. *Microb. Biotechnol.*, 2011, vol. 4, no. 1, pp. 82–88. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00214.x.
9. Lievens B., van Baarlen P., Verreth C., van Kerckhove S., Rep M., Thomma B.P. Evolutionary relationships between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates inferred from mating type, elongation factor-1 α and exopolysaccharuronase sequences. *Mycol. Res.*, 2009, vol. 113, no. 10, pp. 1181–1191. doi: 10.1016/j.mycres.2009.07.019.
10. Hua-Van A., Davière J.M., Kaper F., Langin T., Daboussi M.J. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: Clusters of class II transposons. *Curr. Genet.*, 2000, vol. 37, no. 5, pp. 339–347. doi: 10.1007/s002940050537.
11. Carr P.D., Tuckwell D., Hey P.M., Simon L., d'Enfert C., Birch M., Oliver J.D., Bromley M.J. The transposon *impala* is activated by low temperatures: Use of a controlled transposition system

- to identify genes critical for viability of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 2010, vol. 9, no. 3, pp. 438–448. doi: 10.1128/EC.00324-09.
12. Rep M., van der Does H.C., Cornelissen B.J. Drifter, a novel, low copy hAT-like transposon in *Fusarium oxysporum* is activated during starvation. *Fungal Genet. Biol.*, 2005, vol. 42, no. 6, pp. 546–553. doi: 10.1016/j.fgb.2005.03.007.
 13. Inami K., Yoshioka-Akiyama C., Morita Y., Yamasaki M., Teraoka T., Arie T. A genetic mechanism for emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Inactivation of avirulence gene AVR1 by transposon insertion. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 8, art. e44101, pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0044101.

Для цитирования: Афордоаныи Д.М., Тоасенитч А., Валидов Ш.З. Изменения в количестве транспозонов II класса у штамма *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* V03-2g и его производных мутантах с расширенной фитопатогенностью // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 1. – С. 66–76. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.1.66-76.

For citation: Afordoanyi D.M., Toacegnitche A., Validov S.Z. Changes in the copy number of class II transposons in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* strain V03-2g and its derivatives with broadened phytopathogenicity. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 1, pp. 66–76. doi: 10.26907/2542-064X.2019.1.66-76. (In Russian)