

## ПОИСК И ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕНОВ ПРИРОДНО-ТРАНСГЕННОГО ВИДА *LINARIA VULGARIS*

© С.В. Сокорнова<sup>1,2</sup>, Е.Л. Гасич<sup>1</sup>, В.Д. Бемова<sup>2</sup>, Т.В. Матвеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Сокорнова С.В., Гасич Е.Л., Бемова В.Д., Матвеева Т.В. Поиск и видовая идентификация патогенов природно-трансгенного вида *Linaria vulgaris* // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – № 1. – С. 27–34. doi: 10.17816/ecogen16127-34.

Поступила в редакцию: 20.10.2017

Принята к печати: 29.01.2018

✿ В природе встречаются виды, содержащие в геномах гомологи генов Т-ДНК агробактерий (клТ-ДНК). Их называют природно-трансгенными. Среди возможных функций клТ-ДНК в литературе обсуждают ее влияние на микробиоту растений. Для изучения возможной экологической роли Т-ДНК больше других подходят представители рода *Linaria* (например, *L. vulgaris*), поскольку они широко встречаются в различных экологических нишах. Первым этапом оценки растительно-микробных взаимодействий с участием этих растений является описание изолятов с контрастной вирулентностью в отношении льнянок. Поиск и ДНК-штрихкодирование таких изолятов фомоидных грибов стало целью данной работы. Для видоидентификации 14 штаммов, выделенных с растений семейств *Plantaginaceae* и *Scrophulariaceae*, использовали мультилокусный анализ по участкам внутренних транскрибируемых спейсеров, большой субъединицы РНК, гена тубулина. Вирулентность оценивали на отрезках листьев. К виду *Boeremia exigua*, имеющему обширный ареал обитания и широкую специализацию, были отнесены 9 штаммов. Штаммы этого вида были вирулентны в отношении *L. vulgaris*, но различались по агрессивности в отношении этого растения. Таким образом, была охарактеризована коллекция штаммов, которая в дальнейшем может быть использована для более детального изучения иммунного ответа природно-трансгенного растения *L. vulgaris* в ответ на инокуляцию фитопатогеном *B. exigua*. Итогом выполнения работы стала идентификация узкоспециализированного вида *Heterophoma novae-verbascicola* и широко специализированных видов *Plectosphaerella cucumerina*, *Phoma herbarum* и *Trichothecium roseum*, среди которых только *P. cucumerina* был слабым патогеном льнянок. Результаты подтверждают ранее полученные данные об обедненной микобиоте *L. vulgaris*.

✿ **Ключевые слова:** природно-трансгенные растения; *Linaria vulgaris*; *Boeremia exigua*; идентификация фомоидных микромицетов.

## CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF NATURALLY TRANSGENIC SPECIES *LINARIA VULGARIS* PATHOGENIC MYCROMYCETES

© S.V. Sokornova<sup>1,2</sup>, E.L. Gasich<sup>1</sup>, V.D. Bemova<sup>2</sup>, T.V. Matveeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Institute of Plant Protection, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Sokornova SV, Gasich EL, Bemova VD, Matveeva TV. Characterization and identification of naturally transgenic species *Linaria vulgaris* pathogenic mycromycetes. *Ecological genetics*. 2018;16(1):27-34. doi: 10.17816/ecogen16127-34.

Received: 20.10.2017

Accepted: 29.01.2018

✿ In nature there are species containing homologs of T-DNA genes of agrobacteria (cT-DNA) in their genomes. Such plants are called naturally transgenic ones. Interaction with the microbiota is one of the possible functions of cT-DNA, discussed in the literature. *Linaria* plants are the most suitable for the investigation of the probable ecological role of T-DNA, since they widely spread. The first stage in the evaluation of plant-microbial interactions involving these plants is the description of isolates with contrasting virulence for toadflax. The search and DNA-barcoding of such isolates of Phoma-like fungi was the goal of this work. 14 strains isolated from the plants of the families *Plantaginaceae* and *Scrophulariaceae* were analyzed. The of multilocus analysis included amplification and sequencing of internal transcribed spacers, a large subunit of RNA, a tubulin gene. Based on molecular data, 9 strains were assigned to the species *Boeremia exigua*, which has a wide range of habitats and a wide specialization. Strains of this species were virulent against *L. vulgaris*, but differed in aggressiveness with respect to this plant. Thus, a collection of strains was characterized, which can later be used for a more detailed study of the immune response of the naturally-transgenic *L. vulgaris* plant in response to inoculation with the *B. exigua* phytopathogen. As a result of the work, we

identified the narrow host range fungi *Heterophoma novae-verbascicola*, and broad host range pathogens *Plectosphaerella cucumerina*, *Phoma herbarum* and *Trichothecium roseum*. Among them, only *P. cucumerina* was a weak pathogen of *L. vulgaris*. These results confirm the early data on the depleted mycobiota of *L. vulgaris*.

✿ **Keywords:** naturally transgenic plants; *Linaria vulgaris*; *Boeremia exigua*; identification of Phoma-like fungi.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящий момент известно три рода растений *Nicotiana*, *Ipomoea* и *Linaria*, в пределах которых выявлены представители, содержащие в геноме участки ДНК, гомологичной Т-ДНК агробактерий, как результат горизонтального переноса генов. Многочисленные исследования показывают, что у природно-трансгенных растений, относящихся к родам *Nicotiana* и *Ipomoea*, экспрессируются гены Т-ДНК [1, 2]. Недавно была продемонстрирована экспрессия гена *rolC* и у льнянок [3]. Это свидетельствует о том, что клТ-ДНК функциональна. На каллусных культурах показано влияние онкогенов *rolA*, *rolB* и *rolC* *Agrobacterium rhizogenes* на повышение стресс-устойчивости, в том числе за счет повышения уровня вторичных метаболитов, образования активных форм кислорода, экспрессии PR-белков и изменения путей метаболизма сахарозы [4–7]. Ряд этих механизмов растения реализуют при защите от патогенных микромицетов, но на данный момент не изучена устойчивость к болезням у видов, экспрессирующих гены *rolA*, *rolB* и *rolC*. Из природно-трансгенных растений только льнянки широко распространены в дикой природе [8]. Поэтому они могут служить моделью для изучения возможной экологической роли горизонтально перенесенных в их геномы последовательностей ДНК. Для этого требуется проведение большой подготовительной работы в разных направлениях, в том числе необходимы детальные исследования возможных межвидовых взаимодействий с участием льнянок. Частным случаем таких взаимодействий являются отношения растение — фитопатоген. На начальных этапах данного исследования необходимо выявить наиболее распространенных и агрессивных в отношении льнянок патогенов. Обедненный состав микобиоты природно-трансгенного вида *Linaria vulgaris*, преимущественно состоящий из фомоидного микромицета *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley (= *Phoma exigua* var. *exigua*), а также представителей родов *Ramularia* и *Phomopsis* может служить косвенным доказательством возможной роли *rolC* в регуляции устойчивости к патогенам [9]. Идентификация фомоидных патогенов затруднена из-за схожести морфолого-культуральных признаков, так как у представителей близкородственных секций размер конидий, характер роста на агаре и другие признаки могут быть неразличимы [10]. В то же время даже у близкородственных видов паразито-хозяйинные отношения имеют свои особенности как со стороны микромицета, так и со стороны ответа растения. Поэтому точная видоидентификация патогенов

природно-трансгенных льнянок представляет особый интерес. Эта работа важна для обнаружения и паспортизации изолятов, характеризующихся контрастными проявлениями вирулентности, так как это позволит в дальнейшем создать коллекцию для определения особенности иммунного ответа трансгенных растений при заражении. Ранее было показано, что патогенами льнянок являются преимущественно фомоидные микромицеты [9]. Филогенетическая специализация этих патогенов различна. Есть как узкоспециализированные виды, приуроченные к растениям, лежащим в пределах одного семейства, так и виды, способные заражать представителей более 10 семейств [10]. Для расширения коллекции фитопатогенных микромицетов с различной агрессивностью в отношении льнянок был проведен дополнительный скрининг среди фитопатогенов семейства *Plantaginaceae*, а также родственного ему семейства *Scrophulariaceae* (куда ранее относили льнянку). Поэтому в данную работу вошел материал, собранный не только на растениях *L. vulgaris*, но и на видах *Plantago major*, *Veronica* sp. (*Plantaginaceae*), *Verbascum* sp., *Verbascum thapsus* (*Scrophulariaceae*). Для видоидентификации фомоидных грибов на практике широко используются молекулярные методы, в частности мультилокусный анализ по участкам внутренних транскрибируемых спейсеров, большой субъединицы РНК, гена тубулина [11, 12]. Таким образом, целью данной работы стала уточняющая идентификация видов, встречающихся на растениях семейств *Plantaginaceae* и *Scrophulariaceae*, оценка их вирулентности в отношении природно-трансгенного растения *L. vulgaris*, создание коллекции штаммов для изучения влияния генов клТ-ДНК на взаимодействие растений льнянки с фомоидными микромицетами.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы из коллекции лабораторий микологии и фитопатологии и токсикологии и биотехнологии ФГБНУ ВИЗР, хранящиеся при 5 °С в пробирках на скошенном картофельно-глюкозном агаре (КГА) (табл. 1).

Патогенность штаммов оценивали методом заражения листовых дисков [9].

Для получения препарата ДНК фрагменты мицелия гриба объемом около 10 мкл помещали в микроцентрифужную пробирку, содержащую 500 мкл буфера TE. Далее пробирку инкубировали в течение 10 минут на кипящей водяной бане, затем центрифугировали 3 минуты при 8000 g, далее 1 мкл надосадочной

Таблица 1

## Штаммы микромицетов, использованных в работе

Table 1

## Strains of micromycetes used in the researchwork

№	Маркировка	Семейство	Вид	Место
1	12_18	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Verbascum sp.</i>	Липецк
2	17_39	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i>	Лен. обл., Гатчинский р-н
3	17_82	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i>	Лен. обл., Ломоносовский р-н, п. Горелово
4	17_87	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i>	Лен. обл., Ломоносовский р-н, п. Горелово
5	32_11	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i>	Лен. обл., Кировский р-н, п. Назия
6	32_13	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i>	Московская обл., Голицыно
7	32_25	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i>	Ростовская обл., Славский р-н
8	32_36	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Verbascum nigrum</i>	Ставрополь
9	32_150	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Verbascum thapsus</i>	Адыгея, Майкопский район, п. Подгорный
10	32_151	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Veronica sp.</i>	Иркутская обл.
11	32_226	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i>	Сев. Осетия, Даргавс
12	Ph 6	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Linaria vulgaris</i>	Тульская обл.
13	263_Ph6	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Linaria vulgaris</i>	Тульская обл.
14	263_Ph6_2	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Linaria vulgaris</i>	Тульская обл.

Таблица 2

## Праймеры, использованные в работе

Table 2

## Primers, used in the researchwork

№	Название	Последовательность 5'–3'	Ссылка
1	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	14
2	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG	
3	LROR	GTACCCGCTGAACTTAAGC	15
4	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	16
5	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	17
6	T2	TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG	
7	Btub2Fd	GTBCACCTYCARACCGGYCARTG	18
8	Btub4Rd	CCRGAYTGRCRAARACRAAGTTGTC	

Таблица 3

## Референсные последовательности

Table 3

## Reference sequences

№	Номер GenBank	Растение-хозяин	Семейство	Место обнаружения
1	LT158235.1	<i>Glycine max</i>	<i>Fabaceae</i>	Китай, Цзилинь
2	KT309446.1	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Fabaceae</i>	Новая Зеландия
3	KT309407.1	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Asteraceae</i>	Новая Зеландия
4	KT309519.1	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Asteraceae</i>	Новая Зеландия
5	GU237495.1	<i>Cichorium intybus</i>	<i>Asteraceae</i>	Нидерланды
6	KT309512.1	<i>Fragaria ananassa</i>	<i>Rosaceae</i>	Новая Зеландия

Окончание табл. 3 (Table 3 (continued))

№	Номер GenBank	Растение-хозяин	Семейство	Место обнаружения
7	KT309489.1	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Linaceae</i>	Венгрия
8	GU237499.1	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Linaceae</i>	Нидерланды
9	GU237500.1	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Linaceae</i>	Нидерланды
10	KT389784.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Solanaceae</i>	Китай, Пекин
11	KT309500.1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Solanaceae</i>	Новая Зеландия
12	KR653202.1	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Solanaceae</i>	Китай, Ханчжоу
13	KR653203.1	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Solanaceae</i>	Китай, Ханчжоу
14	KR653201.1	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Solanaceae</i>	Китай, Ханчжоу
15	KT309617.1	<i>Cyphomandra betacea</i>	<i>Solanaceae</i>	Новая Зеландия
16	FJ427112.1	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Solanaceae</i>	Нидерланды
17	KT309470.1	<i>Actinidia chinensis</i>	<i>Actinidiaceae</i>	Новая Зеландия
18	GU237493.1	<i>Forsythia sp.</i>	<i>Oleaceae</i>	Нидерланды
19	GU237494.1	<i>Forsythia sp.</i>	<i>Oleaceae</i>	Нидерланды
20	GU237498.1	<i>Syringa vulgaris</i>	<i>Oleaceae</i>	Нидерланды
21	GU237503.1	<i>Syringa vulgaris</i>	<i>Oleaceae</i>	Нидерланды
22	GU237504.1	<i>Coffea arabica</i>	<i>Rubiaceae</i>	Бразилия
23	GU237505.1	<i>Coffea arabica</i>	<i>Rubiaceae</i>	Камерун

жидкости брали в реакционную смесь для проведения ПЦР.

ПЦР проводили в объеме 20 мкл. В состав смеси входили: DreamTaq™ Green Master Mix (2X) (Thermo-Scientific), по 5 пикомолей каждого праймера и 1 мкл препарата ДНК. Последовательности праймеров представлены в таблице 2. Праймеры синтезированы компанией «Евроген».

Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли при помощи программы MEGA 7.0.21 [13]. Референсные последовательности представлены в таблице 3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетический анализ 14 штаммов, 11 из которых были выделены в чистую культуру из некротических пятен на листьях растений семейства *Plantaginaceae* и 3 из семейства *Scrophulariaceae*, показал, что 9 штаммов относятся к виду *B. exigua* (табл. 4). В описании этого вида, данном Van der Aa et al. [19], говорится, что в Евразии вид *B. exigua* имеет обширный ареал обитания [20] и широкую специализацию, то есть один и тот же штамм может поражать растения нескольких семейств [10, 19]. Любопытно, что среди проанализированных штаммов *B. exigua* восемь исходно были выделены из растений семейства *Plantaginaceae*. Также в пределах этого семейства были найдены штаммы *Phoma herbarum* Westend. и *Trichothecium roseum* (Pers.) (см. табл. 4).

Патогены, выявленные на растениях семейства *Scrophulariaceae*, относились к различным видам: *Heterophoma novae-verbascicola* (Aveskamp, Gruyter & Verkley) Q. Chen & L. Cai, *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams и *B. exigua*. Из них патоген *H. novae-verbascicola* имеет узкую специализацию и приурочен к семейству *Scrophulariaceae*. Фитопатогены *P. cucumerina*, *P. herbarum* и *T. roseum* имеют широкую специализацию, встречаются на растениях *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Solanaceae*, *Asteraceae* и т. д. Интересно, что патоген *P. cucumerina* (штамм WST1, KU640393) был обнаружен на заразице, среди вторичных метаболитов которой есть антиририд [20]. Антиририд — редко встречающийся иридоидный гликозид с фунгицидной активностью, который является мажорным компонентом конститутивной защиты льнянок [21]. Патоген *P. herbarum* хорошо изучен, встречается в различных географических точках как на однодольных, так и на двудольных растениях. В базе NCBI имеется полногеномный сиквенс *P. herbarum* штамма JCM 15942 (GenBank: BCGR000000000.1).

Оценка вирулентности анализируемых штаммов показала, что среди изученных штаммов наиболее агрессивные в отношении льнянок формы найдены в пределах вида *B. exigua*. Кроме штаммов из микобиоты льнянок, *L. vulgaris* заражал штамм *B. exigua* 32\_36, выделенный из *Verbascum nigrum* (*Scrophulariaceae*). Менее агрессивными, но все же вызывающими достоверные некротические пятна на отрезках листьев

Таблица 4

Суммарные данные по видоидентификации и вирулентности штаммов

Table

## Species identification and virulence

№	Штамм	Номер последовательности маркера			Вид	Вирулентность
		ITS	LSU	beta-tubulin		
1	12_18	KY234213.1	KY234154	MG029466	<i>Heterophoma novae-verbascicola</i>	— — —
2	17_39	MF599110	MF599105	MG029470	<i>Boeremia exigua</i>	+ — —
3	17_82	KY234205	KY234146	KY273917	<i>Boeremia exigua</i>	+ — —
4	17_87	KY234206	KY234147	KY273918	<i>Boeremia exigua</i>	+ — —
5	32_11	KY234207	KY234148	KY273919	<i>Boeremia exigua</i>	+ — —
6	32_13	KY234209	KY234150	MG029464	<i>Boeremia exigua</i>	+ — —
7	32_25	MF599106	MF599101	MG029469	<i>Phoma herbarum</i>	— — —
8	32_36	MF599107	MF599102	MG029468	<i>Boeremia exigua</i>	+ + —
9	32_150	KY234211	KY234152	MG029465	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	+ — —
10	32_151	KY234208	KY234149	KY273920	<i>Phoma sp.</i>	— — —
11	32_226	KY234212	KY234153	KY273922	<i>Boeremia exigua</i>	+ + —
12	263 Ph6	MF599109	MF599104	MG029467	<i>Boeremia exigua</i>	+ + +
13	263 Ph6 2	MF599108	MF599103	MG029471	<i>Boeremia exigua</i>	+ + +
14	Ph6	KY234210	KY234151	KY273921	<i>Trichothecium roseum</i>	— — —

Примечание: + + + — площадь некрозов отрезков листьев 75–100 %; + + — — площадь некрозов 45–75 %; + — — — площадь некрозов 20–45 %; — — — — площадь некрозов менее 20 %

*L. vulgaris* на 3-и сутки после заражения были штаммы *B. exigua* 32\_226 и 32\_11, выделенные из *Plantago major* (*Plantaginaceae*) (см. табл. 4). Крайне слабую агрессивность в отношении *L. vulgaris* проявляли выделенные из того же растения-хозяина штаммы *B. exigua* 17\_82, 17\_87, 32\_11, 32\_13. Среди других видов можно выделить штамм *P. cucumerina* 32\_150, вызвавший слабое заражение льнянки.

Среди изученных фрагментов таксономически значимых районов ДНК наиболее вариабельным оказался фрагмент гена *tub2*. На его основе было построено филогенетическое дерево, отражающее родство изолятов *B. exigua* (рис. 1). При его построении были использованы также последовательности данного маркера из базы NCBI (см. табл. 3). Они относятся к изолятам, выделенным с разных растений-хозяев и из различных географических точек. Хотя для фомоидных микромицетов принято считать, что взаимосвязи между растением-хозяином и родством его заражающих патогенов не существует [25], на нашем древе обнаружены некоторые моменты, которые трудно считать случайными. Так, несмотря на то, что изоляты, выделенные с *Plantaginaceae*, распределены по всему древу, тем не менее есть группа наиболее вирулентных в отношении льнянки патогенов, которая образует общую ветвь на древе. Аналогично обстоит дело с изолятами, выделен-

ными с батата. То есть, несмотря на широкий спектр хозяев, можно говорить о склонности отдельных рас заражать преимущественно родственные виды из одного или близких семейств. При поиске таких рас имеет смысл обращать внимание на несколько факторов, по крайней мере таких, как растение-хозяин и география сбора. Хотя для более ясной картины требуются дополнительные исследования.

Вирулентные в отношении льнянок штаммы *B. exigua* были выделены из растений, чей конститутивный иммунитет против болезней основан на синтезе таких вторичных метаболитов, как иридоидные гликозиды и флавоноиды. Одна из возможных функций гена *rolC* заключается в увеличении синтеза мажорных вторичных метаболитов, что в свою очередь могло дать преимущество предковым формам, в чьих геномах закреплялась и передавалась по наследству Т-ДНК, гомологичная агробактериальной [21]. Выявленная, благодаря проведенному исследованию, система *L. vulgaris/B. exigua* предоставляет уникальную возможность для изучения особенностей защиты таких природно-трансгенных растений. Хорошо известно, что паразито-хозяинные отношения претерпевают ряд изменений в процессе эволюции. Превалирование среди патогенов льнянок *B. exigua* указывает на то, что патогенез у природно-трансгенных растений может иметь ряд индивидуальных



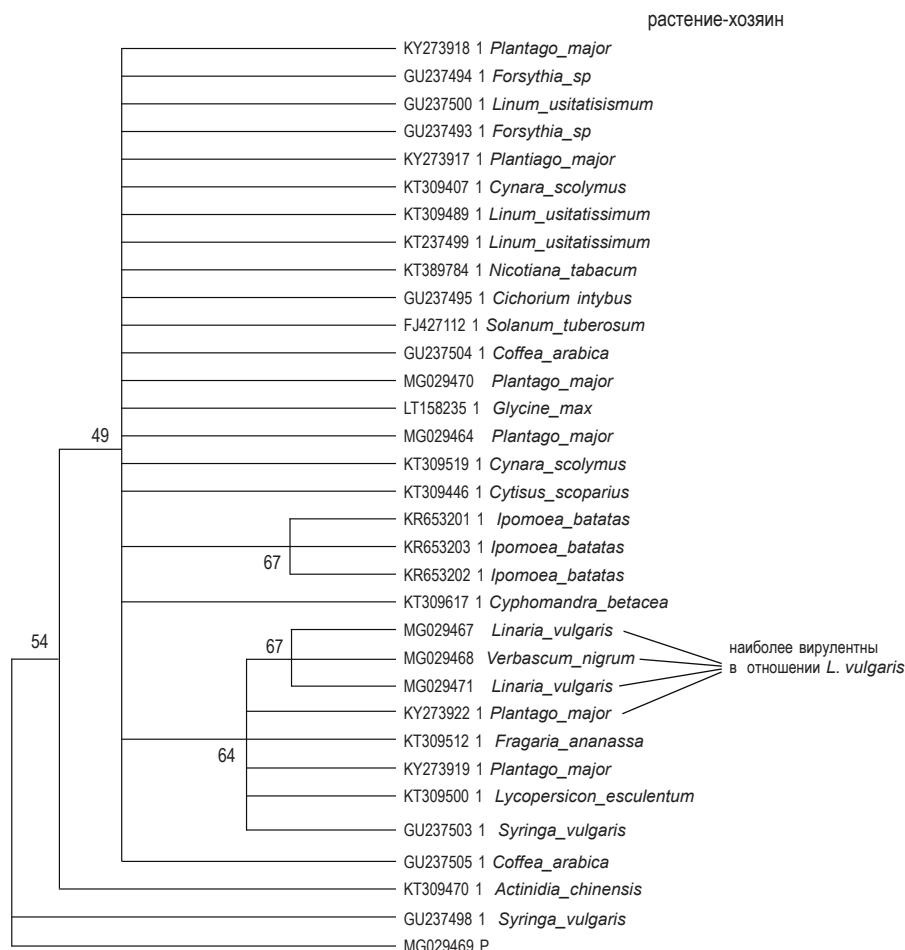


Рис. 1. Филогенетическое древо изолятов *Boeremia exigua* с указанием растений-хозяев. Древо построено с применением метода максимального правдоподобия. Консенсусное древо построено на основе 500 реплик бутстрэпа. Начальное древо для эвристического поиска было получено автоматически, путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием модели JTT, а затем выбора топологии с более высоким значением логарифма правдоподобия [22–24]

Fig. 1. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model [22]. The bootstrap consensus tree inferred from 500 replicates [24] is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed [24]. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 40% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches [24]. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The analysis involved 21 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 295 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [23]. *Disclaimer:* Although utmost care has been taken to ensure the correctness of the caption, the caption text is provided “as is” without any warranty of any kind. Authors advise the user to carefully check the caption prior to its use for any purpose and report any errors or problems to the authors immediately (www.megasoftware.net). In no event shall the authors and their employers be liable for any damages, including but not limited to special, consequential, or other damages. Authors specifically disclaim all other warranties expressed or implied, including but not limited to the determination of suitability of this caption text for a specific purpose, use, or application

особенностей. На наш взгляд, в дальнейшем необходимо более тонкое изучение патогенеза, в частности, инокуляция целых растений *L. vulgaris* различающимися по агрессивности штаммами *B. exigua* и анализ развития болезни на организменном и клеточном уров-

нях. Кроме того, целесообразно оценить внутривидовую изменчивость штаммов *B. exigua* при помощи микросателлитных маркеров.

Таким образом, нами охарактеризовано 14 изолятов микромицетов. Больше всего вирулентных к льнян-

ке образцов выявлено среди представителей вида *B. exigua*. На основе изолятов этого вида создана коллекция, которая в дальнейшем может быть использована для более детального изучения иммунного ответа природно-трансгенного растения *L. vulgaris* в ответ на инокуляцию данным фитопатогеном. Итогом выполнения работы стала идентификация узкоспециализированного вида *H. novae-verbascicola* и широко специализированных видов *P. cucumerina*, *P. herbarum* и *T. roseum*, среди которых только *P. cucumerina* был слабым патогеном льнянок. Результаты подтверждают раннее полученные данные об обедненной микробиоте *L. vulgaris*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 16-16-10010. Авторы благодарят РЦ СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и лично Е.Ю. Городилову и А.Э. Машарского за содействие в проведении секвенирования ДНК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kyndt T, Quispe D, Zhai H, et al. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(18):5844-5849. doi: 10.1073/pnas.1419685112.
2. Chen K, Otten L. Natural *Agrobacterium* Transformants: Recent Results and Some Theoretical Considerations. *Front Plant Sci*. 2017;8:1600. doi: 10.3389/fpls.2017.01600.
3. Матвеева Т.В., Богомаз О.Д., Голованова Л.А., и др. Гомологи гена *rolC* природно-трансгенных льнянок *Linaria vulgaris* и *Linaria cretica* экспрессируются *in vitro* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):273-278. [Matveeva TV, Bogomaz OD, Golovanova LA et al. Homologs of the *rolC* gene of naturally transgenic toadflaxes *Linaria vulgaris* and *Linaria cretica* are expressed *in vitro*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2018;22(2):273-278 (In Russ.)]. doi: 10.18699/VJ18.359.
4. Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, et al. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *J Biotechnol*. 2002;97(3):213-221. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00067-6.
5. Понтер Е.А., Попейко О.В., Шкрыль Ю.Н., и др. Влияние агробактериальных генов *rol* на содержание, строение пектиновых веществ и активность гликаназ в культурах трансгенных клеток *Rubia cordifolia* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2013. — Т. 49. — № 4. — С. 409–416. [Gunter EA, Popeyko OV, Shkryl YN, et al. Effect of the *rol* Genes from *Agrobacterium rhizogenes* on the Content and Structure of Pectic Substances and Glycanase Activity in *Rubia cordifolia* Transgenic Cell Cultures. *Applied biochemistry and microbiology*. 2013;49(4):409-416. (In Russ.)]. doi: 1134/S0003683813040066.
6. Veremeichik GN, Shkryl YN, Bulgakov VP, et al. Molecular cloning and characterization of seven class III peroxidases induced by overexpression of the agrobacterial *rolB* gene in *Rubia cordifolia* transgenic callus cultures. *Plant Cell Rep*. 2012;31(6):1009-1019. doi: 10.1007/s00299-011-1219-3.
7. Bulgakov VP, Shkryl YN, Veremeichik GN, et al. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013;134:1-22. doi: 10.1007/10\_2013\_179.
8. plantarium.ru [интернет]. Определитель растений on-line [доступ от 01.10.2017]. Доступ по ссылке <http://www.plantarium.ru/>. [Plantarium.ru [Internet]. Identification guide for plants [cited 2017 October 1]. Available from: <http://www.plantarium.ru/>. (In Russ.)]
9. Сокорнова С.В., Гасич Е.Л., Матвеева Т.В., Афонин А.Н. Микромицеты растений рода *Linaria*, содержащих в геноме т-ДНК // Микология и фитопатология. — 2015. — Т. 49. — № 3. — С. 188–193. [Sokornova SV, Gasich EL, Matveeva TV, Afonin AN. Micromycetes of plants *Linaria* containing DNA sequences of agrobacterial origin in their genomes. *Mikol Fitopatol*. 2015;49(3):188-193. (In Russ.)]
10. Boerema GH, de Gruyter J, Noordeloos ME, Hamers MEC *Phoma identification Manual: differentiation of Specific and Infra-specific Taxa in Culture*. Wallingford: CABI Publishing; 2004.
11. Aveskamp MM, de Gruyter J, Crous PW. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Divers*. 2008;31:1-18.
12. Chen Q, Jiang JR, Zhang GZ, et al. Resolving the *Phoma* enigma. *Stud Mycol*. 2015;82:137-217. doi: 10.1016/j.simyco.2015.10.003.
13. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
14. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1990. P. 315-322.
15. Rehner SA, Samuels GJ. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol Res*. 1994;98(6):625-34. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80409-7.
16. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal

- DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol.* 1990;172(8):4238-4246. doi: 10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990.
17. O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol.* 1997;7(1):103-116. doi: 10.1006/mpev.1996.0376.
  18. Woudenberg JH, Aveskamp MM, de Gruyter J, et al. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma* clematidina morphotype. *Persoonia.* 2009;22:56-62. doi: 10.3767/003158509X427808.
  19. Van der Aa HA, Boerema GH, de Gruyter J Contributions towards monograph of *Phoma* (Coelomycetes) VI-1. Section *Phyllostictoides*: Characteristics and nomenclature of its type species *Phoma exigua*. *Persoonia.* 2000;17(Pt 1): 435-456.
  20. Tsuchiya Y, McCourt P. Strigolactones: a new hormone with a past. *Curr Opin Plant Biol.* 2009;12(5):556-61. doi: 10.1016/j.pbi.2009.07.018.
  21. Matveeva TV, Sokornova SV, Lutova LA. Influence of *Agrobacterium* oncogenes on secondary metabolism of plants. *Phytochem Rev.* 2015;14(3):541-554. doi: 10.1007/s11101-015-9409-1.
  22. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution.* 1993;10:512-526.
  23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution.* 1993;33:1870-1874.
  24. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39:783-791.
  25. Rai MK, Tiwari VV, Irinyi L, Kövics GJ. Advances in Taxonomy of Genus *Phoma*: Polyphyletic Nature and Role of Phenotypic Traits and Molecular Systematics. *Indian J Microbiol.* 2013;54(2):123-128. doi: 10.1007/s12088-013-0442-8.

#### ✉ Информация об авторах

**Софья Валерьевна Сокорнова** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории токсикологии и биотехнологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Пушкин, Санкт-Петербург. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет». Санкт-Петербург. ORCID: 0000-0001-6718-4818, SPIN: 3223-0513. E-mail: mymryk@gmail.com.

**Елена Леонидовна Гасич** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории микологии и фитопатологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Пушкин, Санкт-Петербург. SPIN: 1101-5323. E-mail: elena\_gasich@mail.ru.

**Виктория Дмитриевна Бемова** — магистрант кафедры генетики и биотехнологии. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: viktoriam.bemova@yandex.ru.

**Татьяна Валерьевна Матвеева** — д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. SPIN: 3877-6598. E-mail: radishlet@gmail.com.

#### ✉ Information about the authors

**Sofia V. Sokornova** — Senior Researcher, All-Russia Institute of Plant Protection, Pushkin, Saint Petersburg. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg. ORCID: 0000-0001-6718-4818, SPIN: 3223-0513. E-mail: mymryk@gmail.com.

**Elena L. Gasich** — Senior Researcher, All-Russia Institute of Plant Protection, Pushkin, Saint Petersburg. SPIN: 1101-5323. E-mail: elena\_gasich@mail.ru.

**Victoria D. Bemova** — Master Student. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg. E-mail: viktoriam.bemova@yandex.ru.

**Tatiana V. Matveeva** — Professor. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg. SPIN: 3877-6598. E-mail: radishlet@gmail.com.