

## Эколого-генетическая характеристика фомоидного микромицета *Calophoma complanata*

С. В. СОКОРНОВА<sup>1, 2</sup>, Е. Л. ГАСИЧ<sup>1</sup>, Л. Б. ХЛОПУНОВА<sup>1</sup>, А. Н. АЛЕКСЕЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений  
196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, 3

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

Статья поступила 14.02.2023

После доработки 26.02.2023

Принята к печати 01.03.2023

### АННОТАЦИЯ

Дана эколого-генетическая характеристика фомоидного гриба *Calophoma complanata* – потенциального биогербицида гигантских борщевиков. Анализ экологических параметров мест сбора коллекционных образцов *C. complanata* показал, что этот патоген обнаруживается в местах с повышенной влажностью и более низкой, чем у других фомоидных микромицетов, температурой. Сумма активных температур >10 °С в пограничных точках распространения этого вида составляет от 106,0 (Шетландские острова) до 911,5 (Люблин (Польша)), при крайне невысоком среднем значении – 570. Наибольшее и наименьшее значения гидротермического коэффициента Селянинова наблюдаются в тех же точках и составляют 3,26 и 1,31 соответственно при среднем значении 1,9. Ареал распространения этого вида характеризуется длительным фотопериодом. Идентификация до вида и локализация *C. complanata* MF-32.121 в растениях проведены классическими морфологическими, гистохимическими и молекулярными методами. Сделано предположение о том, что данный вид в зависимости от окружающих условий может как вызывать заболевание у гигантских борщевиков, так и переходить в эндофитное состояние. Мы считаем, что это один из механизмов, позволяющих выживать патогену в суровых природных условиях. Полученные данные позволяют прогнозировать эффективность микогербицидов на основе этого гриба в зависимости от экологических условий, оценивать долгосрочные риски, связанные с их применением, раскрывают спектр нецелевых биологических активностей этого вида.

**Ключевые слова:** *Calophoma complanata*, гигантские борщевики, микогербициды, гидротермический коэффициент Селянинова, сумма активных температур >10 °С, элиситоры, ростостимуляторы, эндофиты.

### ВВЕДЕНИЕ

Средства борьбы против сорной и инвазивной растительности на основе патогенных микромицетов составляют малую часть биологических препаратов [Cordeau et al., 2016]. Преимущественно их применяют в тех случаях, когда классические способы борь-

бы недостаточно эффективны и необходимы комплексные меры по защите растений, например, для борьбы с инвазивными видами. Успешность их распространения определяется не только физиологическими особенностями растений и плотностью растительного покрова, но и способностями этих растений оказы-

вать существенное влияние как на фитобиоту, так и на почвенную и ризосферную микробиоты [Glushakova et al., 2011, 2015; Sokornova et al., 2022]. Поэтому для ограничения их распространения необходимо уделять особое внимание восстановлению нативного растительного и микробного сообществ. Применение микогербицидов в этом случае дает ряд преимуществ, так как их можно сочетать с другими препаратами и агротехническими мерами защиты растений [Berestetskiy, Sokornova, 2018]. В свою очередь фомоидные микромицеты способны синтезировать разнообразные по химической структуре специализированные метаболиты, обладающие гербицидной, антибиотической и фунгистатической активностями, что может оказывать опосредованное воздействие на экосистему [Rai et al., 2009]. Исследования в этой области в основном опираются на данные по мониторингу патогенов в почве и/или растительных остатках в модельных и полевых опытах. Они проводились на таких видах потенциальных микогербицидов, как *Sclerotinia sclerotiorum* [de Jong et al., 2002; Bourdot et al., 2006; Abu-Dieyeh, Watson, 2007], *Sclerotinia minor* [Li et al., 2010], *Colletotrichum coccodes* [Dauch et al., 2003], *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* [Zimmermann et al., 2015], *Stagonospora cirsii* [Gasich, Berestetskiy, 2006], *Phoma macrostoma* [Hubbard et al., 2015; Bailey et al., 2011, 2013].

Микромицет *Calophoma complanata* (Tode) Q. Chen & L. Cai может вызывать у растений семейства Ариасеае, в том числе борщевика

Сосновского *Heracleum sosnowskyi*, заболевание пятнистости листьев и стеблей. На настоящий момент молекулярными и классическими морфолого-культуральными методами в мире идентифицировано несколько сотен изолятов этого вида, в том числе четыре штамма этого вида хранятся в коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР (табл. 1). На основе мицелия штамма *Calophoma complanata* MF-32.121 (= *Phoma complanata* (Tode) Desm. 1.40 (ВИЗР)) разрабатывается препарат для ограничения распространения инвазивного вида борщевика Сосновского [Гасич и др., 2013; Gasich et al., 2016]. Патогенность мицелия этого штамма во многом определяется составом питательной среды, на которой он был получен, условиями ферментации и препаративной формой, в которой он был применен. В зависимости от этих факторов период критической зависимости жизнеспособности глубинного мицелия от температурно-влажностных условий достигает 12 часов после инокуляции. При выращивании в стандартных условиях специализированных метаболитов, обладающих фитотоксичностью для борщевика, у этого штамма выявлено не было [Gasich et al., 2016]. В то же время предварительные опыты показали, что переменное освещение при культивировании приводит к изменению метаболитного профиля [Сокорнова, Доморацкая, 2019]. Для специализированных метаболитов других видов фомоидных микромицетов, например, гербаруминов *P. herbarum*, стагонолидов *S. cirsii*,

Т а б л и ц а 1

**Эколого-географические характеристики штаммов из коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР**

Название штамма	Растение-хозяин	Место	Сумма активных $T > 10\text{ }^{\circ}\text{C}$	ГТК	Максимальная продолжительность дня, ч	Автор
MF-32.121	Листья <i>Heracleum Sosnowskyi</i>	Ленинградская область, Разметелево	623,507	1,83	18,83	Гасич Е. Л.
MF-32.127	Листья <i>Heracleum sphondylium</i> subsp. <i>sibiricum</i>	Ленинградская область, Разметелево	623,507	1,83	18,83	Гасич Е. Л.
MF-32.133	Листья <i>Heracleum sibiricum</i>	Ленинградская область, Разметелево	623,507	1,83	18,83	Гасич Е. Л.
MF-32.139	Листья <i>Heracleum sibiricum</i>	Иркутск	540,428	1,79	16,68	Гасич Е. Л.
MF-32.228	Листья <i>Heracleum Sosnowskyi</i>	Адыгея, плато Лаго-Наки	452,393	2,93	15,45	Гасич Е. Л.

феосферида *A Paraphoma* sp. и т. д., стимулирующего влияния освещения на их синтез не выявлялось [Rai et al., 2009; Poluektova et al., 2018; Xu et al., 2021].

Штамм может успешно зимовать в условиях Санкт-Петербурга и области на растительных остатках и давать патогенные конидии [Sokornova et al., 2020]. Последнее особенно важно, так как при выращивании на синтетических питательных средах конидии оказываются авирулентными [Gasich et al., 2016]. Возможно, длина светового дня является ключевым фактором для развития этого вида. В полевых условиях эффективность препаратов на основе мицелия *S. complanata* MF-32.121 при применении без дополнительных средств защиты растений нестабильна.

Разработка эколого-генетической характеристики *S. complanata* стало целью нашей работы. Полученные данные являются предпосылками для прогнозирования эффективности препаратов на основе *S. complanata* в зависимости от экологических условий, разработки подходов к препаративным формам, позволяющим стабилизировать эффективность препарата в полевых условиях, оценки дополнительного потенциала и долгосрочных экологических рисков, связанных с его применением.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы *S. complanata* MF-32.121, *S. complanata* MF-32.124, *S. complanata* MF-32.127 и *S. complanata* MF-32.133 из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР, хранящиеся при 5 °С в пробирках на скошенном картофельно-глюкозном агаре (КГА) (см. табл. 1).

Культура клеток табака *Nicotiana tabacum* Vu-2 поддерживалась на агаризованной питательной среде Линсмайера – Скуга с добавлением 0,2 мг/л фитогормона 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) согласно протоколу [[https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell\\_line/web\\_documents/cell\\_lines/rpc00001.html](https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell_line/web_documents/cell_lines/rpc00001.html)].

Выделение и очистка ДНК проводились из 10-дневного мицелия грибов, выращенного на агаризованной картофельно-глюкозной среде из некротических пятен на листьях зараженных растений и из наземной части растений, обработанных фрагментами мицелия гриба без симптомов заболевания, стандарт-

ным СТАВ-хлороформ методом [Doyle, Doyle, 1987; Sambrook et al., 1989]. Качество выделения ДНК контролировали при помощи электрофореза в 1%-м агарозном геле с SYBR Green I в 0,5%-м трисборатном буфере. Концентрацию полученной ДНК определяли по маркеру MassRuler™ Express HR Forward DNA Ladder.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 20 мкл со стандартными параметрами амплификации. В состав смеси входили DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Scientific™) по 5 пикомолей прямого и обратного праймеров и 1 мкл препарата ДНК. Использовались праймеры ITS1 и ITS4 для амплификации области внутренних транскрибируемых спейсеров, включая 5.8S регион рДНК [White et al., 1990]; праймеры LROR и LR5 [Vilgalys, Hester, 1990] для амплификации части гена 28S рДНК; праймеры T1 и T2 [O'Donnell, Cigelnik, 1997] для амплификации части гена бета-тубулина. Для выявления гриба в тканях растения по амплификации части гена хитин-синтазы I (*chs-1*) использовались праймеры CHS-79F и CHS-354R [Carbone, Kohn, 1999]. Праймеры синтезированы компанией “Евроген”.

Секвенирование ДНК-последовательностей по Сэнгеру проводили на базе РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” СПбГУ.

ДНК-последовательности анализировали с помощью BioEdit software [Hall, 1999] и редактировали вручную. Характеристики штаммов и изолятов, а также GenBank номера ДНК-последовательностей, на основе которых проводился филогенетический анализ, приведены в табл. 2.

Построение филогенетических моделей осуществлялось как с помощью байесовского подхода, так и на основе принципа наибольшего правдоподобия (LB). В первом случае филогенетические деревья строились с применением программного обеспечения MrBayes 3.2 [Ronquist et al., 2012] и настройками, предложенными Mesquite (burn-in=0.25, nst=6 (GTR + I + G), два пуска по 10 000 000 генераций с четырьмя марковскими цепями (одна холодная и три горячие цепи)) [Maddison, Maddison, 2015]. Консенсусные деревья были визуализированы с помощью программы Fig-Tree 1.3.1 [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/fig->

## ДНК-последовательности, используемые для филогенетического анализа

Штамм и изолят	Номер ДНК-последовательности в GenBank			Растение-хозяин	Место обнаружения
	LSU	ITS	Tub		
<i>C. complanata</i> MF-32.124	–	–	MH665690.1	Листья <i>Heracleum sibiricum</i>	Ленинградская область, Разметелево
<i>C. complanata</i> MF-32.121	MH634681.1	–	MH665689.1	Листья <i>Heracleum Sosnowskyi</i>	Ленинградская область, Разметелево
<i>C. complanata</i> MF-32.133	–	–	MH665692.1	Листья <i>Heracleum sibiricum</i>	Ленинградская область, Разметелево
<i>C. complanata</i> MF-32.127	–	MH635154.1	MH665691.1	Листья <i>Heracleum sibiricum</i>	Ленинградская область, Разметелево
<i>C. complanata</i> CBS 100311	EU754181.1	GU237709.1	GU237594.1	Стебель <i>Heracleum sibiricum</i>	Нидерланды
<i>C. complanata</i> CBS 268.92	EU754180	GU237815	GU237595	<i>Angelica sylvestris</i>	Нидерланды
<i>C. clematidina</i> CBS 108.79	FJ515632	FJ426989	FJ427100	<i>Clematis</i> sp.	Нидерланды
<i>C. parvula</i> CBS 620.68*	MN943783.1	NR_170792.1	MT005683.1	Пятна на листьях <i>Aegorodidium podagraria</i>	Нидерланды
<i>Calophoma complanata</i> A233	–	MF062525	–	Листья <i>Archangelica officinalis</i> Hoffm	Польша, Люблин 51,2392 с. ш., 22,3794 в. д.
<i>Calophoma complanata</i> A235	–	MF062526.1	–	Листья <i>Archangelica officinalis</i> Hoffm	Польша, Люблин 51,2392 с. ш., 22,3794 в. д.
<i>Calophoma complanata</i> A103	–	MF062524.1	–	Листья <i>Archangelica officinalis</i> Hoffm	Польша, Люблин 51,2392 с. ш., 22,3794 в. д.
<i>Phoma bellidis</i> SAUCC 1308	–	KR818908.1	KR818909.1	<i>Angelica dahurica</i>	Китай, Шэньян
<i>Calophoma vincetoxici</i> CBS 186.55	MH868979.1	MN973578.1	MT005684	<i>Ononis</i> sp.	Швейцария
<i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i> CBS:120.94	–	MN973097.2	MN983736.1	Семена <i>Anethum graveolens</i>	Нидерланды, Вагенинген
<i>Calophoma vodakii</i> CBS 173.53	MH868686.1	NR_136127.1	KT389791.1	<i>Hepatica triloba</i>	Швейцария, Бриг, кантон Валлис
<i>Calophoma hydei</i> SQUCC 13750	MW077153.1	MW077144.1	MW075776.1	Мертвые корни <i>Avicennia marina</i>	Оман
<i>Calophoma</i> sp. RM-2020a	–	–	MN099024.1	<i>Euphorbia soongarica</i>	Китай, Синьцзян
<i>Calophoma rosae</i> LC:5169	KY742203.1	NR_158255.1	KY742291.1	<i>Rosa</i> sp.	Китай
<i>Calophoma glaucii</i> CBS 136.96	–	–	MN983838.1	Rapaveraceae	–
<i>Calophoma aquilegiicola</i> CBS 107.96	GU238041.1	GU237735	GU237581.1	<i>Aconitum pyramidale</i>	Нидерланды
<i>Nothophoma quercina</i> MF-32.228	–	MH635156.1	MH665694.1	<i>Heracleum sosnowskyi</i>	Адыгея
<i>Calophoma clematidis-rectae</i> CBS 507.63	MH869956.1	NR_158230.1	FJ515624.1	<i>Clematis</i> sp.	Нидерланды
<i>Calophoma humuli</i> MFLU 17-2205	MK446318.1	MK446317.1	MK492666.1	Мертвые стебли	Россия
<i>Calophoma humulicola</i> MFLU 17-2130	MN796329	MN796328.1	–	Мертвые стебли <i>Humulus lupulus</i>	Россия
<i>Calophoma petasitis</i> MFLUCC:15-0076	KY496729	KY496749	–	Лесная почва	Италия
<i>Calophoma sandfjordenica</i> CBS 145571	MK876417.1	NR_165553	–	Кусок древесины в расщелине скалы	Норвегия

\* Собрана 7 июля 1968 г. H.A. van der Aa.

tree/]. Во втором случае – с помощью программы Mega 7.0 [Kumar et al., 2018]. Исходные деревья для LB получены автоматически на основе матрицы попарных расстояний путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ [Tamura, Nei, 1993]. Бутстрэп-поддержка основывалась на 500 репликах [Felsenstein, 1985].

Глубинный мицелий получали на сахарозоевой среде согласно С. В. Сокольниковой и А. О. Берестецкому [2018]. Получение экстрактов и фракций из глубинного мицелия осуществляли последовательной экстракцией 80 % метанолом и хлороформом согласно [Sokornova et al., 2020].

Ростостимулирующую активность экстрактов в процентном соотношении относительно контроля оценивали по формированию побегов и корней пшеницы методом рулонов [Семена..., 1991]. Контролем служил 1 % метанол. Учет проводили на 4-е сутки по длине проростков и корней пшеницы сорта China spring.

Растения *Heraclеum sosnowskyi* и *Petroselinum crispum* выращивали из семян по три растения на пластиковый сосуд диаметром 9 см с универсальным грунтом при переменном освещении (12/12 ч) до фазы образования 4–5 настоящих листьев. Для оценки патогенности растения опрыскивали объемом 2 мл/растение суспензией в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл, после чего размещали на 24 ч во влажной камере без освещения для обеспечения периода повышенного увлажнения листьев и затем вновь выращивали в стандартных условиях. Патогенность мицелия *S. complanata* оценивали по площади некрозов, образующихся на листьях растений на 7-е сутки после инокуляции.

Для перехода *S. complanata* в эндофитное состояние 2 мл суспензии на основе мицелия гриба в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл вносили в почву, в которой произрастали растения, и продолжали выращивать без периода повышенного увлажнения листьев, как описано выше.

Оценку развития гриба проводили микроскопически. Для этого высечки из листьев обработанных растений фиксировали раствором Карнуа и окрашивали 1 % анилиновым синим. Корни заключали в криосреду Leica FSC22 clear, замораживали, на криотоме Leica CM1850UV получали срезы толщиной 20 мкм, окрашивали 1 % анилиновым синим и анализировали при увеличении 400–1000х на световом микроскопе Leica DMRXA.

Оценка элиситорной активности осуществлялась по интенсивности накопления активных форм кислорода (АФК) через 4 часа после добавления в 3-дневную культуру клеток *N. tabacum* Ву2, растущую на питательной среде Линсмайера–Скуга на орбитальной качалке при 110 об/мин и температуре 27 °С, экстрактов гриба в конечной концентрации 0,025 %. Выявление АФК проводилось путем прижизненной окраски 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетатом в концентрации 1 мкМ, согласно протоколу производителя (<https://ru.lumiprobe.com/p/h2dcfda>) и визуализации при 330 нм на микроскопе Leica DMRXA в режиме флуоресценции с зеленым фильтром.

Экологические параметры среды определяли с помощью Web-приложения O-GIS [Afonin et al., 2016].

Биологические тесты проводились дважды в четырех повторностях. Статистическую обработку выполняли стандартными методами с помощью надстройки XLSTAT для программного обеспечения Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ экологических параметров обитания *S. complanata*

Фомоидные микромицеты имеют широкий ареал обитания [<https://data.nbn.org.uk/Taxa>]. Анализ экологических параметров мест сбора коллекционных образцов *S. complanata* показал, что этот патоген встречается в местах с более низкой, чем у других фомоидных патогенов, температурой. Для этого вида сумма активных температур  $>10$  °С (САТ $>10$  °С) составляет от 106,0 (Шетландские острова) до 911,5 (Люблин (Польша)) при крайне невысоком среднем значении – 570 [Machowicz-Stefaniak et al., 2014] (табл. 3). Территории, на которых распространен патоген *S. complanata*, отличаются повышенной влажностью. Наибольшее и наименьшее значения гидротермического коэффициента Селянинова (ГТК) наблюдаются в пограничных для температуры точках и составляют 3,26 и 1,31 соответственно при среднем значении 1,9. Таким образом, в точках максимальных значений наблюдается своеобразная компенсация лимита по одному из климатических параметров, что повыша-

Экологические характеристики в местах сбора гербарных образцов *Calophoma complanata* коллекции Westerdijk Institute ([https://wiknaw.nl/fungal\\_table](https://wiknaw.nl/fungal_table)) и United States National Fungus Collections (BPI) (<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/specimens/specimens.cfm>)

Штамм	Растение-хозяин	Место обнаружения	Сумма активных температур выше 10 °C	ГТК	Автор
A 235	Листья <i>Archangelica officinalis</i>	Люблин, Польша	911,521	1,31	Zimowska B.
СAB 100311	Стебель <i>Heracleum spondylium</i>	Утрехт, Нидерланды	754,132	1,57	Boerema G. H.
BPI 356423	<i>Rhinanthus</i> sp. ( <i>Orobanchaceae</i> )	Россия, Смоленская обл., Рыльково (Гжатск)	675,43	1,72	Jaczewski
BPI 875672	<i>Angelica sylvestris</i>	Финляндия, Вихти	581,8	1,43	Lehtola V., Roivainen H.
BPI 356399	<i>Angelica sylvestris</i>	Дания	596,69	1,9	Lind J.
BPI 356400	<i>Angelica sylvestris</i>	Германия, Кирнич (Песчани- ковые горы, берег Эльбы)	745,66	1,35	Krieger W.
BPI 356398	<i>Angelica sylvestris</i>	Германия, Вестфалия, Бургхольдингхаузер	692,64	1,35	Ludwig A.
BPI 356393	<i>Apiaceae</i>	Германия, Гессен, Эстрих-Винкель	756,47	1,26	Fuckel
BPI 356395; BPI 356401	<i>Anethum graveolens</i> , <i>Angelica sylvestris</i>	Германия, Бавария, Герольцхофен	816,785	2,25	Vill A.
BPI 356401	<i>Angelica sylvestris</i>	Великобритания, Брум	285,18	1,46	Vill A.
BPI 356418; BPI 356421	<i>Heracleum sphondylium</i>	Франция, Форбак	586,48	1,43	Ludwig A.
BPI 356402	<i>Angelica sylvestris</i>	Эстония, Сааремаа	634,35	1,4	Vestergren Tycho
BPI 356394	<i>Aegopodium podagraria</i>	Латвия, Видземе, Огре	661,85	1,59	Kirulis Art.
BPI 356396	<i>Angelica archangelica</i>	Латвия, Земгале (побережье)	661,85	1,59	Bondarzew A.
BPI 326420	<i>Heracleum sphondylium</i>	Шотландия, Эдинбург	303,55	2,96	Dennis R. W. G.
BPI 356404	<i>Angelica archangelica</i>	Италия, Кастельфондо	564,32	2,91	Bresadola G.
BPI 356403	<i>Angelica archangelica</i>	Северная Исландия	191,59	2,23	Rostrup E.
BPI 356407; BPI 356406	<i>Chaerophyllum hirsutum</i>	Чехия, Богемия, Либерец (Рокитнице-над-Йизероу)	594,22	1,51	Matonschek
BPI 356424	<i>Torilis anthriscus</i>	Чехия, Богемия, Табор	644,04	1,51	Bubak F
BPI 356405	<i>Anthriscus sylvestris</i>	Чехия, Прага, Цибулька	745,66	1,35	Bubak F

П р и м е ч а н и е. Экологические параметры получены с помощью баз данных и программного обеспечения Открытой Географической Информационной Сети О-ГИС (<http://app.o-gis.org/o-gis/web/app.php/>).

ет вероятность возникновения благоприятных для развития и заражения растений грибом условий. При минимальном количестве дней, оптимальных для развития патогена температур, наблюдается максимальный по продолжительности благоприятный для патогена период повышенной влажности, и наоборот. Растение-хозяин, на котором встречается *C. complanata*, – гигантский борщевик *Heracleum sosnowskyi*, также толерантен к малым суммам тепла за вегетацию и предпочитает области с повышенной влажностью. Лимитирует распространение этого гигантского борщевика сухой климат. Значение ГТК в местах максимальной встречаемости этого инвазивного растения составляет от 1,66 до 1,79.

Нижняя граница ГТК близка к минимальному значению, наблюдаемому для *C. complanata*, и достигает значения 1,25 [Afonin et al., 2017].

Данные по толерантности вида к низким температурам согласуются с определениями по оптимальным для развития штамма *Calohoma complanata* MF-32.121 условиям. Например, для этого штамма при 20 °C наблюдалась максимальная скорость роста на картофельно-сахарозном агаре [Гасич и др., 2012] и наибольшее количество прорастающих конидий [Gasich et al., 2016].

Филогенетически близкий к *C. complanata* вид *Phoma herbarum* Westend. является космополитом с гораздо более широкой амплитудой параметра активных температур, хотя он

также устойчив к низким температурам. Например, этот вид преобладает в образцах почв антарктической станции “Прогресс” [Marfenina et al., 2016] и встречается в горных районах Индии.

В отдельную группу по экологическим параметрам выделяются гербарные образцы преимущественно зараженных стеблей *Heracleum lanatum*, собранные в конце XIX – начале XX в. на стеблях в различных областях Северной Америки. Ввиду отсутствия данных о молекулярной идентификации этих образцов и более поздних упоминаний об обнаружении этого вида в тех же пределах в данной работе при определении экологических параметров они не учитывались.

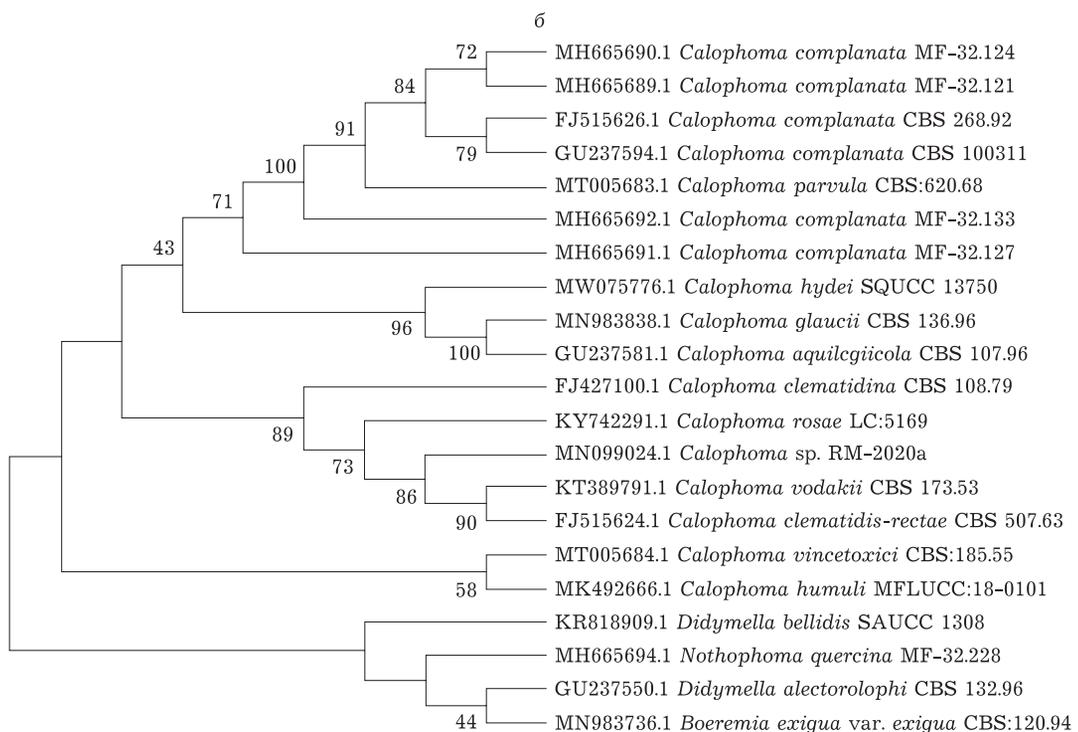
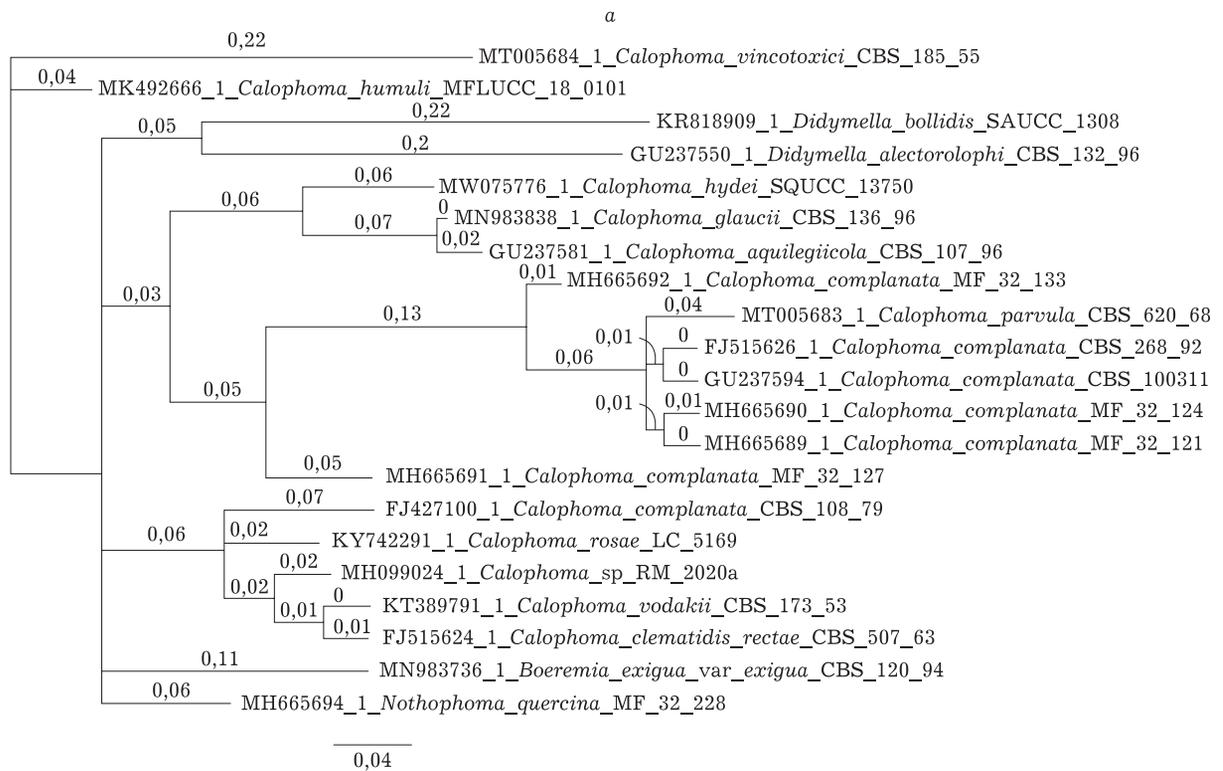
#### **Молекулярно-генетическая характеристика вида *S. complanata***

По предложенной Q. Chen с соавторами [Chen et al., 2015] систематике наиболее близкими к секции *Calophoma* являются секция 10 *Phomatodes* и секция 12 *Phoma*. Типичными представителями этих секций являются *Phomatodes aubrietiae* (Moesz) Q. Chen & L. Cai и *Phoma herbarum*. Надо отметить существенные различия между этими видами. Первый – мало изученный, приуроченный к сем. *Brassicaceae* вид фитопатогенов, в то время как второй имеет повсеместное распространение, в том числе в северных широтах, и широкую специализацию.

При идентификации видов семейства Didymellaceae наряду с классическими микологическими подходами довольно широко используется молекулярный мультилокусный анализ, базирующийся на комбинации локусов, кодирующих внутренние транскрибируемые спейсеры, большую субъединицу РНК, частично ген бета-тубулин и, в некоторых случаях, субъединицы РНК-полимеразы II (ITS-LSU-tub2-rpb2) [Chen et al., 2015; Hou et al., 2020]. Четыре штамма из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР по морфолого-культуральным признакам (размеру конидий и пикнид, характеру формирующихся на картофельно-глюкозном и овсяном агаре колоний) и на основании анализа локусов ITS-LSU-tub2 отнесены к виду *S. complanata* (рис. 1). Проанализированные изоляты при построении филогенетических деревь-

ев на основе принципа максимального правдоподобия (ML) образуют монофилетическую группу. В то же время топология деревьев, построенных на основе различных локусов, существенно различается. Филогенетические деревья, построенные на базе ДНК-последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров и большой субъединицы РНК, позволяют проводить идентификацию фомоидных микромицетов до рода. При дополнении данных ДНК-последовательностями по локусу бета-тубулина, согласно Chen et al. [2015], и локусу субъединицы РНК-полимеразы II, согласно Hou et al. [2020], происходит идентификация до вида. Надо отметить, что в работе Hou et al. [2020] наряду с мультилокусным анализом для идентификации представителей рода *Calophoma* учитывались и морфологические особенности анализируемых образцов. С точки зрения выявления экологических особенностей вида *S. complanata* наиболее интересен анализ по локусу гена бета-тубулина. Такой анализ, проведенный как на основе принципа наибольшего правдоподобия, так и с помощью байесовского подхода, по локусу гена бета-тубулина демонстрирует внутривидовой полиморфизм штаммов при высоком сходстве топологии построенных на основании этих подходов деревьев (рис. 1, а, в). При молекулярном анализе по локусу бета-тубулина изоляты, приуроченные к растениям семейства *Apiacea* (*Heracleum sosnowskyi*, *H. sibiricum*, *H. sphondylium* subsp. *sibiricum* и *Angelica sylvestris*), формируют кладу (см. рис. 1, табл. 1). Наряду с видом *S. complanata* в эту кладу входит вид *S. parvula* L. W. Hou, L. Cai & Crous. Этот вид, выявленный в 1968 г. на гербарных образцах листьев сныти *Aegopodium podagraria*, ранее также относился к виду *S. complanata*. Однако в 2020 г. Hou et al. по результатам мультилокусного анализа и более мелким, чем у других изолятов, конидиям и пикнидам, отнес его к новому виду. Для некоторых видов микромицетов внутривидовой полиморфизм по локусу гена бета-тубулина может быть сопряжен с экологическими параметрами [Сокорнова и др., 2016].

Вид *S. complanata* интересен тем, что имеет узкую специализацию и приурочен преимущественно к растениям семейства *Apiaceae*. Наиболее часто поражение этим грибом выявляли на проростках, стеблях и листьях



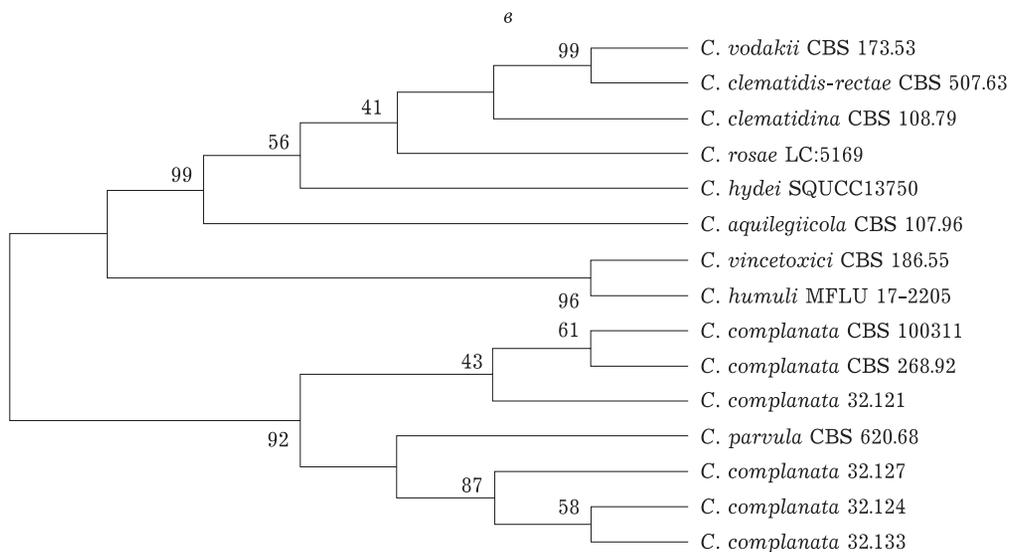


Рис. 1. Филогенетические деревья для анализируемых по месту сбора и растению-хозяину образцов фомоидных грибов (см. табл. 2).

*a* – байесовское дерево по локусу гена бета-тубулина (324 н. п.), построенное с помощью программы MrBayes 3.2 [Ronquist et al., 2012]. Настройки: burn-in=0,25, nst=6 (GTR + I + G), два пуска по 10 000 000 генераций с четырьмя марковскими цепями (одна холодная и три горячих). Значения в узлах указывают байесовскую апостериорную вероятность. *б* – филогенетическое дерево по локусу гена бета-тубулина (324 н. п.), построенное на основе принципа наибольшего правдоподобия с помощью программы Mega 7.0 [Kumar et al., 2018]. Исходные деревья для LB получены автоматически на основе матрицы попарных расстояний путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ [Tamura, Nei, 1993]. Значения бутстрэп-поддержки в узлах основываются на 500 репликах [Felsenstein, 1985]. *в* – консенсусное дерево, построенное по локусам ITS-LSU-tub2 (1668 н. п.) на основе принципа наибольшего правдоподобия с помощью программы Mega 7.0. Исходные деревья для LB получены автоматически на основе матрицы попарных расстояний путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ. Значения бутстрэп-поддержки в узлах основываются на 500 репликах

видов дудников и борщевиков. Также он встречается на пастернаке, петрушке, укропе, моркови, лазурнике, сныти, купyre, бутене и пупырнике [Farr et al., 1995; Voerema et al., 2004]. Трехлетний мониторинг заболеваний дягеля лекарственного (*Archangelica officinalis*) показал, что в 24 % случаев патогеном является *C. complanata* [Zalewska et al., 2013]. В результате анализа описаний гербарных образцов и штаммов выявлены следующие исключения: образец ВРІ 356423, обнаруженный в 1824 г. на растениях *Rhinanthus* sp. семейства Orobanchaceae, и штамм, выявленный на растении *Vincetoxicum officinale* семейства Аросупасеае. В первом случае мы полагаем, что речь идет о близком по морфологическим признакам фомоидном микромицете с широкой специализацией *Phoma herbarum*, который подробно охарактеризован только в 1852 г. [Westendorp, 1852]. Штамм CBS:186.55 в начале был идентифицирован как *Phoma* sp., затем в результате мультилокусного анализа отнесен к *C. complanata*. На филогенетическом дереве, построенном методом максимального правдо-

подобия на основе локусов большой субъединицы (LSU), внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS), субъединицы РНК-полимеразы II (*gpb2*) и гена бета-тубулина (*tub2*), штамм CBS:186.55 относится к секции 11 *Calophoma*, включающей также штаммы *C. complanata* CBS100311 и CBS 268.92 [Chen et al., 2015]. Однако в дальнейшем по совокупности морфолого-культуральных признаков и мультилокусного анализа по четырем локусам ITS, LSU, *gpb2* и *tub2* этот штамм CBS 186.55 был отнесен к виду *Calophoma vincetoxici* (De Not.) L. W. Hou, L. Cai & Crous. [Hou et al., 2020]. Важно отметить, что этот штамм был выделен из стальника семейства Fabaceae, в отличие от выделенного этой же группой авторов вида *C. parvula*, который, так же как *C. complanata*, приурочен к Ариасеае.

#### Паразитический и эндофитный образы жизни *Calophoma complanata*

Четырехлетние наблюдения показали, что *C. complanata* MF-32.121 сохраняет жизне-

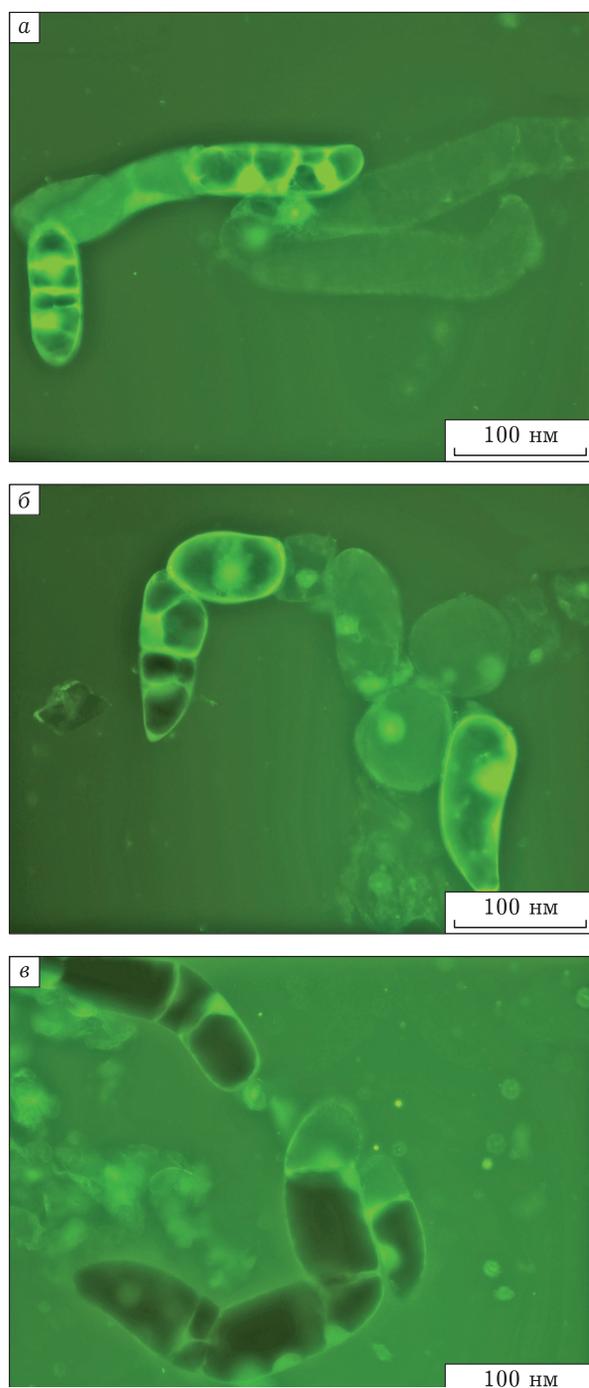


Рис. 2. Микрофотографии прижизненной окраски клеток *Nicotiana tabacum* Ву-2  $H_2DCFDA$  при 533 нм. а – 0,025 % хлороформная фракция; б – 0,025 % метанольный экстракт *C. complanata* 32,121; в – контроль

способность после зимовки на растительных останках, но достоверные симптомы развития заболевания пятнистости листьев весной на молодых растениях борщевика Сосновского не наблюдаются [Sokornova et al., 2020]. Нами

была проведена оценка спектра биологической активности экстрактов на основе глубинного мицелия *C. complanata* MF-32.121, которая показала, что экстракты в концентрациях 0,025 % сдерживают развитие заболеваний пшеницы [Pavlova et al., 2021]. При отсутствии выявленных соединений с фунгистатической активностью этот факт позволил нам предположить, что экстракты оказывают иммуномодулирующее действие на растения. Одним из ранних признаков иммунного ответа растений в ответ на инокуляцию патогеном является образование активных форм кислорода (АФК). Для оценки образования АФК в ответ на инокуляцию патогеном культура каллусных клеток табака *N. tabacum* Ву2 была обработана экстрактами из глубинного мицелия *C. complanata* MF-32.121, что привело к существенно более интенсивному образованию АФК в клетках по сравнению с контролем (рис. 2). Таким образом, показанный ранее эффект сдерживания заболеваний бурой ржавчины и темно-бурой пятнистости листьев пшеницы определялся элиситорным воздействием компонентов мицелия *C. complanata* MF-32.121.

Оценка влияния на рост проростков пшеницы этих экстрактов также показала достоверный положительный эффект по сравнению с контролем, который составил  $16 \pm 3\%$  для корней и  $17 \pm 2\%$  для проростков.

Полученные результаты, а именно отсутствие массовых симптомов развития заболевания пятнистости стеблей и листьев на обработанных растениях после перезимовки, а также элиситорный и ростостимулирующий эффекты метаболитов гриба позволили нам предположить, что вид *C. complanata* под воздействием определенных климатических факторов способен к эндофитному образу жизни. Для проверки этой гипотезы нами было проведено искусственное заражение растений петрушки мицелием *C. complanata* MF-32.121 в контрастных по повышенному увлажнению воздуха в 24-часовой период после инокуляции условиях. В оптимальных для развития заболевания условиях, в первые 18 часов после инокуляции наблюдался обильный эпифитный рост мицелия на поверхности листа, затем происходили многочисленные проникновения инфекционных гиф на стыке эпидермальных клеток листа, на 4-е сутки начинали формироваться некротические

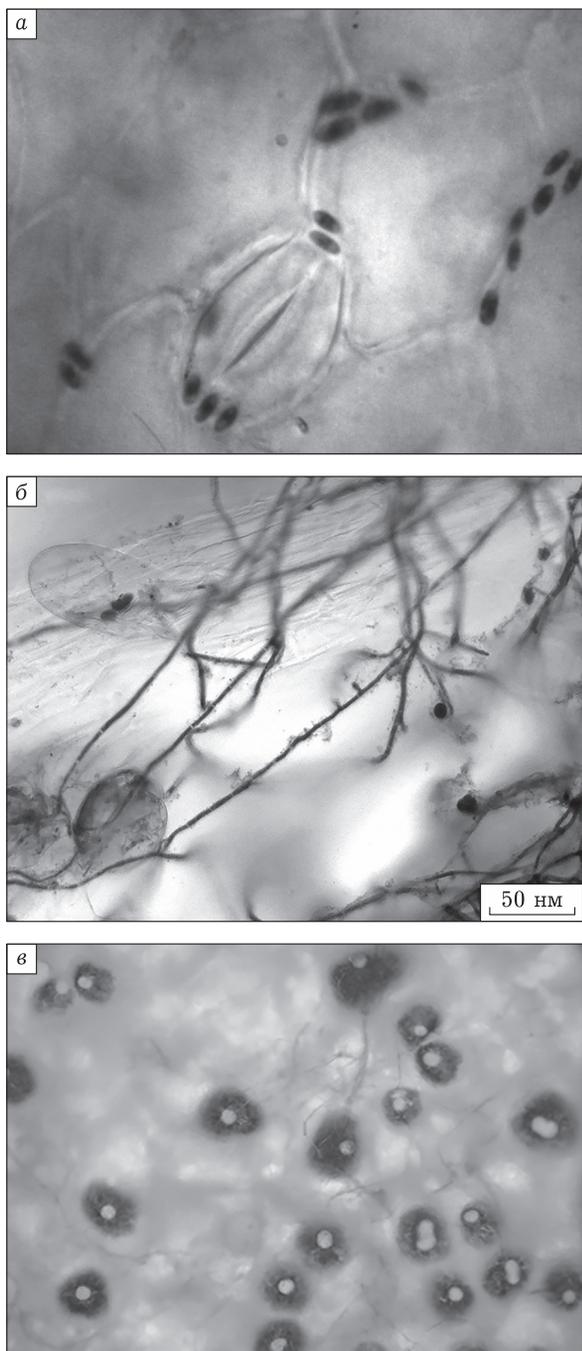


Рис. 3. Конидии *C. complanata* 32,121 на КСА (а: длина конидий 6,3 мкм в диапазоне от 5 до 7,5 мкм; ширина конидий 2,7 мкм в диапазоне от 1,8 до 3,5 мкм); б – процесс инфицирования листьев борщевика Сосновского *C. complanata* 32,121 через 18 ч после инокуляции; в – пикниды, образующиеся на поверхности листа на 7-е сутки после инокуляции

пятна (рис. 3). Площадь некрозов листьев на 7-е сутки после инокуляции составляла  $72 \pm 12\%$ . В более жестких условиях, без периода повышенного увлажнения листьев по-



Рис. 4. Вид растений петрушки через 14 дней после инокуляции растений суспензией на основе фрагментов мицелия *C. complanata* 32,121 без периода повышенного увлажнения листьев

сле инокуляции, отсутствие признаков заболевания наблюдалось у около 25 % растений. Эти растения существенно быстрее росли и развивались (рис. 4). Микроскопический анализ срезов корней, стеблей и листьев также выявил структуры, сходные по морфологии с *C. complanata*, несмотря на отсутствие симптомов развития заболевания растений.

Для подтверждения эндофитного образа жизни штамма *C. complanata* MF-32.121 для суммарной ДНК, выделенной из корней инокулированных в контрастных условиях растений, а также из *C. complanata* MF-32.121, был наработан ПЦР продукт по локусу хитинсинтазы I. Он подтвердил наличие грибной ДНК в корнях растений петрушки, инокулированных без периода повышенного увлажнения листьев. Наиболее чувствительным был анализ по локусу хитинсинтазы I, так как в жестких условиях проведения полимеразной цепной реакции (температура отжига 60 °C)

происходит накопление продукта только в результате взаимодействия с ДНК гриба. Данные по этому локусу в NCBI (National Center for Biotechnology Information) для фомоидных грибов отсутствуют, поэтому для филогенетических исследований он на данный момент неприменим. Для подтверждения вида микромицета гриб был выделен в чистую культуру и идентифицирован путем наработки ДНК-последовательностей по локусу бета-тубулина, секвенированию по Сэнгеру и сравнению с ДНК-последовательностью исходного штамма *C. complanata* 32,121. Гомология по данному локусу на участке 320 н. п. составила 100 %. В целом использование оценки накопления продуктов по локусу бета-тубулина как доказательство эндофитного существования микромицетов, к сожалению, менее информативна, так как концентрация ДНК-последовательностей растительного происхождения по этому локусу намного выше, чем грибного. В свою очередь применение способа вложенной ПЦР увеличивает вероятность контаминации. Для дальнейшей количественной оценки грибных структур в растении методами ПЦР в реальном времени, на наш взгляд, целесообразна разработка ДНК-зонда на основе локуса хитин-синтазы I.

На основе результатов проведенных биохимических, гистологических и молекулярных исследований можно предположить, что при неблагоприятных условиях *C. complanata* MF-32.121 может переходить к эндофитному образу жизни. Факторы, способствующие этому переходу, и оценка этой способности у других представителей вида *C. complanata* требуют дальнейшего анализа. О том, какие именно факторы наиболее существенны (освещение (продолжительность, диапазон, интенсивность), перепады температур, относительная влажность, физиологическое состояние растения-хозяина и др.) для перехода микромицетов в эндофитное состояние, по литературным данным известно мало. Для растений, произрастающих в экстремальных условиях, например произрастающей в пустыне ларреи трехзубчатой, выявлены фомоидные микромицеты, которые выступают и как эндофиты, и как патогены [Strobel et al., 2011]. Также близкородственный *C. complanata* вид *Calophoma sandfjordnica* Crous & Rämä был выявлен на древесине в эндофитном состо-

янии в Баренцевом море [Crous et al., 2019]. В связи с распространением вида в широких, для которых характерен длинный световой день, можно предположить, что это один из факторов регуляции процесса. Микромицеты рода *Phoma* доминируют в верхних слоях почв в высокоширотных арктических регионах [Кирциделли и др., 2014], а наиболее близкородственный *C. complanata* вид *P. herbarum* устойчив к избыточным ультрафиолетовым (УФ) дозам из-за повышенной меланизации [Tosi et al., 2005]. У представителей *C. complanata* сильная меланиновая пигментация отсутствует, что позволяет предположить другие механизмы устойчивости к избыточным дозам УФ. На наш взгляд, переход от паразитического к эндофитному существованию для распространенного в зонах с длинным световым днем вида *C. complanata* может быть одним из таких механизмов защиты.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фомоидный микромицет *C. complanata* отличается от близкородственных видов тем, что обладает узкой специализацией в отношении растений семейства Asteraceae, устойчив к низким температурам и распространен в зонах с повышенной продолжительностью светового дня. Благодаря этим уникальным свойствам он может быть рекомендован к применению в условиях Северо-Запада. Однако для разработки эффективного и безопасного микогербицида для борьбы с инвазивными видами гигантских борщевиков необходимы дальнейшие исследования по уточнению факторов, влияющих на образ жизни данного вида, а именно, будет ли он выступать как патоген в отношении борщевиков или перейдет в эндофитное состояние.

Полученные данные позволяют прогнозировать эффективность микогербицидов на основе этого гриба в зависимости от экологических условий, оценивать долгосрочные риски, связанные с их применением, раскрывают спектр нецелевых биологических активностей этого вида.

Работа выполнена на базе ресурсных центров “Хромас” и “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ. Авторы выражают благодарность М. М. Гомжиной за помощь.

## ЛИТЕРАТУРА

- Гасич Е. Л., Берестецкий А. О., Хлопунова Л. Б. Видовой состав микромицетов *Heracleum sosnowskyi* в Северо-Западном регионе России и микромицеты, перспективные для его контроля // Современная микология в России: материалы 3-го Съезда микологов России. 2012. С. 276.
- Гасич Е. Л., Берестецкий А. О., Хлопунова Л. Б. Микробиота видов *Heracleum* на территории северо-западного региона Российской Федерации и микромицеты, перспективные для контроля *Heracleum Sosnowskyi* // Микология и фитопатология. 2013. № 5. С. 333–342. [Gasich E. L., Berestetskiy A. O., Khlopunova L. B. Mycobiota of *Heracleum sosnowskyi* species in North-West region of Russia and perspective mycomycetes // Mikologiya i fitopatologiya. 2013. Vol. 5, N 47. P. 333–342.]
- Кирцидेलли И. Ю., Власов Д. Ю., Баранцевич Е. П., Крыленков В. А., Соколов В. Т. Комплексы микроскопических грибов в почвах и грунтах полярного острова известий цик (Карское море) // Микология и фитопатология. 2014. № 6. С. 365–371. [Kirtsidelli I. Yu., Vlasov D. Yu., Barantsevich E. P., Krylenkov V. A., Sokolov V. T. Microfungi from soil of polar island Izvestia TSIK (Kara sea) // Mikologiya i fitopatologiya. 2014. Vol. 6, N 48. P. 365–371.]
- Семена сельскохозяйственных культур: Методы определения качества. М.: Стандарт, 1991. Ч. 2. 415 с.
- Сокорнова С. В., Берестецкий А. О. Получение вирулентного глубинного мицелия *Stagonospora cirsii* C-163 – потенциального микогербицида для борьбы с бодяком полевым *Cirsium arvense* // С.-х. биология. 2018. № 5. С. 1054–1061. [Sokornova S. V., Berestetskiy A. O. Liquid fermentation of *Stagonospora cirsii* C-163, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* (L.) Scop. // Agricultural Biology (Sel'skokhozyaistvennaya biologiya). 2018. Vol. 53, N 5. P. 1054–1061.]
- Сокорнова С. В., Доморацкая Д. А. Эколого-генетическая характеристика фомоидного микромицета *Calophoma complanata*, потенциального микогербицида гигантских борщевиков. М.: Изд-во МАКС Пресс, 2019. 152 с.
- Сокорнова С. В., Ярославцева О. Н., Александрова А. В., Леднев Г. Р., Борисов Б. А. Эколого-генетическая характеристика изолята *Metarhizium* sp. ММВ // Вестн. защиты растений. 2016. № 3. С. 155–156. [Sokornova S. V., Yaroslavtseva O. N., Aleksandrova A. V., Lednev G. R., Borisov B. A. Ecology-genetic characteristics of *Metarhizium* sp. isolate ММВ // Plant Protection News. 2016. Vol. 89, N 3. P. 155–156.]
- Abu-Dieyeh M. H., Watson A. K. Population dynamics of broadleaf weeds in turf grass as influenced by chemical and biological control methods' // Weed Sci. 2007. N 55. P. 371–380.
- Afonin A. N., Luneva N. N., Li Yu S. Ecological-geographical analysis of distribution pattern and occurrence of cow-parasit ( *Heracleum sosnowskyi* Manden) with respect to area aridity and its mapping in European Russia // Russ. J. Ecol. 2017. Vol. 1, N 48. P. 56–59.
- Afonin A. N., Sevrakov S. Y., Soloviev P. A., Luneva N. N. Web GIS for the solution of tasks of the ecological-geographical analysis and modeling: new opportunities // Vestnik St. Petersburg Univ. 2016. Series 7 (4): Geol Geogr. P. 97–111.
- Bailey K. L., Falk S., Derby J., Melzer M., Boland G. J. The effect of fertilizers on the efficacy of the bioherbicide *Phoma macrostoma* to control dandelions in turf-grass // Biol. Control. 2013. N 65. P. 147–151.
- Bailey K. L., Pitt W. M., Leggett F., Sheedy C., Derby J. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds // Biol. Control. 2011. N 59. P. 268–276.
- Berestetskiy A., Sokornova S. Chapter 6. Production and stabilization of mycoherbicides // Biological Approach Controlling Weeds. InTechOpen. 2018. P. 63–88. doi: 10.5772/intechopen.76936
- Boerema G. H., de Gruyter J., Noordeloos M. E., Hamers M. E. C. *Phoma* identification Manual. The Netherlands: CABI Publishing, 2004.
- Bourdote G. W., Hurrell G. A., Saville D. J., Leathwick D. M. Impacts of applied *Sclerotinia sclerotiorum* on the dynamics of a *Cirsium arvense* population // Weed Res. 2006. Vol. 1, N 46. P. 61–72.
- Carbone I., Kohn L. M. A method for designing sets for speciation studies in filamentous ascomycetes // Mycologia. 1999. Vol. 91. P. 553–556.
- Chen Q., Jiang J. R., Zhang G. Z., Cai L., Crous P. W. Resolving the *Phoma* enigma // Stud. Mycol. 2015. N 82. P. 137–217.
- Cordeau S., Triolet M., Wayman S., Steinberg C., Guillemin J. P. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management // Crop. Prot. 2016. N 87. P. 44–49.
- Crous P. V., Carnegie A. J., Wingfield M. J., Sharma R., Mughini G., Noordeloos M. E., Santini A., Shouche Y. S., Bezerra J. D. P., Dima B., Guarnaccia V., Imrefi I., Jurjević Ž., Knapp D. G., Kovács G. M., Magistà D., Perrone G., Rämä T., Rebriev Y. A., Shivas R. G., Bransgrove K. Fungal planet description sheets: 868–950 // Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. 2019. Vol. 42. P. 291–473.
- Dauch A. L., Watson A. K., Jabaji-Hare S. H. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers // J. Microbiol. Methods. 2003. N 55. P. 51–64.
- de Jong M. D., Bourdot G. W., Powell J. A. Model of the escape of *Sclerotinia sclerotiorum* ascospores from pasture // Ecol. Model. 2002. Vol. 1-2, N 150. P. 83–105.
- Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. N 19. P. 11–15.
- Farr D. F., Bills G. F., Chamuris G. P., Rossman A. Y. Fungi on plants products in the United States // St. Paul. Minnesota USA, 1995.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. P. 783–791.
- Gasich E. L., Berestetskiy A. O. Studies on soil application of *Stagonospora cirsii*, a candidate for biological control of *Cirsium arvense* // Agron. Res. 2006. N 4. P. 171–175.
- Gasich E. L., Khlopunova L. B., Berestetskiy A. O. Effect of temperature on mycelium growth, conidia germination and pathogenicity of *Phoma complanata*, causal agent of *Heracleum sosnowskyi* phomosis // The 14th Int. Symp. of biocontrol and biotechnology abstract. Saint-Petersburg, 2016.
- Glushakova A. M., Kachalkin A. V., Chernov I. Y. Soil yeast communities under the aggressive invasion of

- Sosnowskys hogweed (*Heracleum Sosnowskyi*) // Eurasian Soil Sci. 2015. Vol. 2, N 48. P. 201–207.
- Glushakova A. M., Kachalkin A. V., Chernov I. Y. Specific features of the dynamics of epiphytic and soil yeast communities in the thickets of Indian balsam on mucky gley soil // Eurasian Soil Sci. 2011. Vol. 80, N 44. P. 886–892.
- Hall T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. Ser. 1999. Vol. 41. P. 95–98.
- Hou L. W., Groenewald J. Z., Pfenning L. H., Yarden O., Crous P. W., Cai L. The phoma-like dilemma // Stud. Mycol. 2020. Vol. 21, N 96. P. 309–396.
- Hubbard M., Hynes R., Bailey K. L. Impact of macrocicidins, produced by *Phoma macrostoma*, on carotenoid profiles of plants // Biol. Control. 2015. N 89. P. 11–22.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evolut. 2018. Vol. 35. P. 1547–1549.
- Li P., Ash G. J., Ahn B., Watson A. K. Development of strain specific molecular markers for the *Sclerotinia minor* bioherbicide strain IMI 344141 // Biocontrol Sci. Technol. 2010. Vol. 9, N 20. P. 939–959.
- Machowicz-Stefaniak Z., Zalewska E. D., Zimowska B., Król E. D. Pathogenicity of *Phoma complanata* (Tode) Desm. towards angelica (*Archangelica officinalis* Hoffm.) // Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus. 2014. Vol. 13. P. 45–58.
- Maddison W. P., Maddison D. R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. 2015. Version 3.04. URL: <http://mesquiteproject.org> (naudota 2015-09-17).
- Marfenina O. E., Nikitin D. A., Ivanova A. E. The structure of fungal biomass and diversity of cultivated micromycetes in Antarctic soils (Progress and Russkaya Stations) // Eurasian Soil Sci. 2016. Vol. 8, N 49. P. 934–941.
- 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. Vol. 1, N 7. P. 103–116.
- Pavlova N., Malygin D., Sokornova S. Plant diseases containment and growth stimulators of fungal origin // IOP Conference Series: Earth and Environ. Sci. 2021. Vol. 720, N 1. P. 012026.
- Poluektova E., Tokarev Y., Sokornova S., Chisty L., Evidente A., Berestetskiy A. Curvulin and Phaeosphaeride A from *Paraphoma* sp. VIZR 1.46 isolated from *Cirsium arvense* as potential herbicides // Molecules. 2018. Vol. 23, N 11. P. 2795.
- Rai M. K., Deshmukh P., Gade A., Ingle A., Kövics G. J., Irinyi L. *Phoma* Saccardo: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications // Crit. Rev. Microbiol. 2009. Vol. 3, N 35. P. 182–196.
- Ronquist F., Klopfstein S., Vilhelmsen L., Schulmeister S., Murray D. L., Rasnitsyn A. P. Forthcoming A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera // Syst. Biol. 2012. Vol. 61, N 6. P. 973–999.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sokornova S., Gomzhina M., Gasich E., Merkoulov I., Aman D., Frolova G., Radaev A., Berestetskiy A. Wintering ability of *Calophoma complanata* under the conditions of Saint Petersburg area // BIO Web Conf. 2020. Vol. 18. P. 00027
- Sokornova S., Malygin D., Terentev A., Dolzhenko V. Arbuscular mycorrhiza symbiosis as a factor of *Asteraceae* species invasion // Agronomy. 2022. Vol. 12, N 12. P. 3214.
- Strobel G., Singh S. K., Riyaz-Ul-Hassan S., Mitchell A. M., Geary B., Sears J. An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential // FEMS Microbiol. Lett. 2011. Vol. 320. Issue 2. P. 87–94.
- Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evolut. 1993. Vol. 10. P. 512–526.
- Tosi S., Onofri S., Brusoni M., Zucconi L., Vishniac H. Response of Antarctic soil fungal assemblages to experimental warming and reduction of UV radiation // Polar Biol. 2005. N 28. P. 470–482.
- Vilgalys R., Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species // J. Bacteriol. 1990. Vol. 8, N 172. P. 4238–4246.
- Westendorp G. D. Nouvelle notice sur quelque cryptogames récemment découvertes en Belgique // Bull. Cl. Sci. Acad. R. Belg. 1852. N 19. P. 110–132.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications / Eds. M. A. Innis, D. H. Gelgard, J. J. Sninsky, T. J. White. N. Y.: Academic Press, 1990. P. 315–322.
- Xu D., Xue M., Shen Z., Jia X., Hou X., Lai D., Zhou L. Phytotoxic secondary metabolites from fungi // Toxins (Basel). 2021. Vol. 6, N 13 (4). P. 261.
- Zalewska E., Machowicz-Stefaniak Z., Król E. Occurrence of fungi on the plants of angelica (*Archangelica officinalis* Hoffm.) // Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 2013. Vol. 2, N 12. P. 107–121.
- Zimmermann J., de Klerk M., Musyoki M. K., Viljoen A., Watson A. K., Beed F., Gorfer M., Cadisch G., Rasch F. An explicit AFLP-based marker for monitoring *Fusarium oxysporum* f.sp. *strigae* in tropical soils // Biological Control. 2015. Vol. 89. P. 42–45.

# Ecological and genetic characteristics of the phoma-like micromycete *Calophoma complanata*

S. V. SOKORNOVA<sup>1,2</sup>, E. L. GASICH<sup>1</sup>, L. B. KHLOPUNOVA<sup>1</sup>, A. N. ALEKSEEVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Institute of Plant Protection  
196608, St. Petersburg, Shosse Podbelskogo, 3  
E-mail: svsokornova@vizr.spb.ru

<sup>2</sup>St. Petersburg University  
199034, St. Petersburg, Universitetskaya Emb, 7-9

Ecological and genetic characteristics of the phoma-like fungus *Calophoma complanata* were defined. *C. complanata* is a potential bioherbicide of the giant hogweed. An ecological analysis of the *C. complanata* sample collection sites showed this pathogen is found where the humidity is high, and the temperature is a lower than at other sites of phoma-like micromycetes. The growing degree days >10 °C (GDD) of the distribution of the species varies between 106.0 (Shetland) and 911.5 (Lublin, Poland) with rather low average of 570. The minimum and maximum Selyaninov hydrothermal coefficient on the boundary of the species area are 3.26 and 1.31, respectively, with the average of 1.9. The species area is characterized by long photoperiods. Classical morphological, histochemical, and molecular methods for founding *C. complanata* MF-32.121 in plants were carried out. It is shown that this species, depending on the conditions, can be able to cause the Sosnowsky's hogweed disease, or turns to the endophytic lifestyle. We believe that this is one of the mechanisms that allow the pathogen to survive in harsh natural conditions. The obtained data allow to predict the effectiveness of mycoherbicides depending on environmental conditions, to assess the long-term risks associated with its application and to reveal the spectrum of non-target biological activities.

**Key words:** *Calophoma complanata*, the giant hogweeds, mycoherbicides, Selyaninov hydrothermal coefficient, Growing degree days >10 °C, elicitors, multilocus sequence analysis, endophytes.