

На правах рукописи

Гомжина Мария Михайловна

**ФОМОИДНЫЕ ГРИБЫ НА ПОДСОЛНЕЧНИКЕ
И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ СЛОЖНОЦВЕТНЫХ
РАСТЕНИЯХ В РОССИИ**

Шифр и наименование специальности
03.02.12 – Микология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, Пушкин – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР), г. Санкт-Петербург

Научный руководитель:

Ганнибал Филипп Борисович кандидат биологических наук, директор ФГБНУ ВИЗР

Официальные оппоненты:

Еланский Сергей Николаевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микологии и альгологии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Кирицели Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории систематики и географии грибов ФГБУН Ботанический институт имени В.Л. Комарова

Ведущее учреждение:

ФГБУН Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина Российской академии наук

Защита диссертации состоится 19.12.2019 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.015.01 на базе Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений по адресу: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, тел./факс: (812)470-51-10; e-mail: info@vizr.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЗР и на сайте Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений **vizr.spb.ru**.

Автореферат разослан « » _____ 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Гусева Ольга Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фомоидные грибы – это крупная таксономически сложная и противоречивая группа анаморфных аскомицетов, которые распространены по всему миру, в том числе и в России. Многие виды фомоидных грибов являются патогенами важных сельскохозяйственных культур.

Наиболее вредоносными заболеваниями подсолнечника, вызываемыми фомоидными грибами, являются фомоз и фомопсис. Поражают и индуцируют пятнистость стеблей подсолнечника виды *Plenodomus lindquistii* (возбудитель фомоза) и 12 видов рода *Diaporthe* (возбудители фомопсиса), из которых вид *D. helianthi* является карантинным объектом (Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза). Потери урожая от фомоза могут составлять от 10 до 70% (Неделько, 1973; Smolik et al., 1983; Maric et al., 1987). Наиболее опасно заболевание для проростков подсолнечника, развитие которых может остановиться, не дойдя до фазы цветения (Арасланова и др., 2018). Потери урожая от фомопсиса могут колебаться от 10 до 100% и зависят от вида возбудителя (Maric et al., 1987; Masirevic, Gulyae, 1992; Lesovoy, 1993; Якуткин, 2001; Thompson et al., 2011; Thompson et al., 2015).

Близкородственные подсолнечнику культурные и дикорастущие растения могут являться резерваторами возбудителей фомоза и фомопсиса.

Идентификация грибов, как правило, основана на их связи с питающим растением, вызываемым симптомам и морфологическим признакам возбудителей заболевания. Из-за трудностей морфологической идентификации и постоянных изменений в таксономии грибов в микофлористических списках фомоидные грибы зачастую определены только до таксонов родового уровня. В настоящее время в России информация о биоразнообразии и распространении фомоидных грибов, ассоциированных с подсолнечником и сорными сложноцветными, отрывочна, содержит немало неточностей и не систематизирована.

Степень разработанности темы. Ранее полагали, что на территории России повсеместно распространено только два вида фомоидных грибов: *P. lindquistii* и *D. helianthi* (Бородин, Котлярова, 2006; Якуткин 1998; Афонин и др., 2008; Саукова и др., 2014; 2018). Эти

данные были основаны исключительно на результатах идентификации видов грибов по морфологическим признакам и симптомам поражения растений. Однако для достоверной и корректной диагностики видов, относящихся к родам *Diaporthe*, *Plenodomus* и другим фомоидным грибам, необходимо использовать молекулярно-генетические методы, например, секвенирование филогенетически информативных локусов ДНК.

В России исследований биоразнообразия ассоциированных со сложноцветными растениями фомоидных грибов, с применением методов молекулярной филогении, до настоящего времени не проводилось. Информация о распространении на территории страны этих грибов, особенно обладающих экономической значимостью, требует уточнения. Кроме того, необходимо определить субстратную специализацию и патогенность разных видов фомоидных грибов, ассоциированных с подсолнечником и другими сложноцветными, так как вредоносные для подсолнечника виды могут сохраняться на близкородственных дикорастущих и культурных растениях.

Цель работы: провести инвентаризацию видового состава фомоидных грибов, распространённых на подсолнечнике и близкородственных культурных и дикорастущих растениях в России, установить их таксономическое положение и охарактеризовать специализацию к растению-хозяину.

Задачи:

1. Создать коллекцию чистых культур фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника.
2. Усовершенствовать основанные на ПЦР методы идентификации фомоидных грибов.
3. Установить видовую принадлежность изолятов фомоидных грибов, хранящихся в коллекции чистых культур ФГБНУ ВИЗР, выделенных из подсолнечника и близкородственных культурных и дикорастущих растений с использованием микологических и молекулярно-генетических методов.
4. Идентифицировать фомоидные грибы из образцов дикорастущих сложноцветных растений, хранящихся в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (LEP) с использованием микологических и молекулярно-генетических методов.

5. Реконструировать молекулярную филогению фомоидных грибов, ассоциированных с подсолнечником и близкородственными дикорастущими сложноцветными растениями.

6. Уточнить специализацию к растению-хозяину доминирующих видов фомоидных грибов.

Научная новизна исследований. Впервые на территории России с применением методов молекулярной филогении достоверно определено видовое разнообразие фомоидных грибов – патогенов подсолнечника и дикорастущих сложноцветных растений. Впервые в России обнаружены на подсолнечнике виды *Diaporthe gulyae*, *D. phaseolorum*, *D. eres*, *Didymella glomerata*, а на амброзии полыннолистной – *Stagonosporopsis heliopsidis*. Уточнено географическое распространение возбудителей фомоза (*Plenodomus lindquistii*) и фомопсиса (*Diaporthe* spp.) подсолнечника.

Впервые образцы сложноцветных растений с симптомами поражения фомоидными грибами, хранящиеся в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (ЛЕР) в течение 124-60 лет, были исследованы с применением молекулярно-генетических методов.

Впервые проанализирована субстратная специализация достоверно идентифицированных изолятов фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника и близкородственных сорных сложноцветных растений в отношении подсолнечника, топинамбура, дурнишника и амброзии полыннолистной.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследований представляют ценность, являясь реконструкцией молекулярной филогении сложной и таксономически противоречивой группы фомоидных грибов, которая позволяет более детально судить о биоразнообразии этих грибов, ассоциированных не только с подсолнечником, но и с дикорастущими сложноцветными – потенциальными резерватами для сохранения этих грибов.

Сконструированная пара молекулярных праймеров Lep1F2/Lep1R2, специфично амплифицирующие ITS-локус рДНК вида *P. lindquistii*, могут быть использованы для корректной идентификации этого вида – основного возбудителя фомоза подсолнечника. Другие праймеры – Did2F/Did2R, специфичные для ДНК представителей семейства *Didymellaceae*, созданы для избирательной амплификации и последующего секвенирования ITS-локуса рДНК фомоидных грибов в

тотальной ДНК, выделенной из гербарных образцов поражённых растений. Использование этих специфических праймеров позволяет избегать амплификации рДНК других грибов и растений.

Показано, что такое проявление заболевания, как пятнистость стеблей подсолнечника, может быть вызвано не только разными видами, но и разными родами фомоидных грибов. Симптомы, вызываемые видами *Diaporthe* spp. и *P. lindquistii*, являются сходными, поэтому проводить определение этих видов только по внешним признакам заболевания не рекомендуется.

Методология и методы исследований. Методы, которые были использованы в ходе проведения работы, включают как классические микологические методы изоляции фитопатогенных грибов из тканей растения, исследования грибов в чистой культуре, так и традиционные фитопатологические методы оценки патогенности и субстратной специализации изолятов грибов. В работе также широко использованы молекулярно-генетические методы. Полученные данные были обработаны с применением методов биоинформатики в целях реконструкции молекулярной филогении.

Положения, выносимые на защиту.

1. Предложены оптимизированные методики гомогенизации пикнид и последующего выделения ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых сложноцветных растений с использованием цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) и хлороформа. Разработаны олигонуклеотидные праймеры Did2F/Did2R специфичные для ДНК представителей семейства *Didymellaceae*, и Lep1F2/Lep1R2 – специфичные для ДНК *Plenodomus lindquistii*.

2. Пятнистость стеблей подсолнечника – повсеместно распространённое в Европейской части России заболевание. В подавляющем большинстве случаев оно вызвано видом *Plenodomus lindquistii*. Виды *Diaporthe gulyae*, *D. phaseolorum*, *D. eres*, *Didymella glomerata* представляют собой единичные находки.

3. Фомоидные грибы в микобиоте дикорастущих сложноцветных растений России представлены не менее, чем 14 видами шести родов из семейства *Didymellaceae*: *Ascochyta rabiei*, *Boeremia exigua*, *Didymella glomerata*, *D. americana*, *D. pomorum*, *D. macrophylla*, *D. pinodella*, *D. rosea*, *Epicoccum nigrum*, *Neascochyta paspali*, *N. desmazieri*, *Nothophoma quercina*, *Stagonosporopsis heliopsisidis*, *S. inoxydabilis*. Вид *Didymella*

glomerata ассоциирован с подсолнечником и дикорастущими сложноцветными.

4. Виды *Plenodomus lindquistii*, *Diaporthe gulyae*, *D. eres*, *Didymella americana*, *Stagonosporopsis* sp. и *S. heliopsisidis* патогенны для подсолнечника и близкородственных ему растений: топинамбура, амброзии полыннолистной и дурнишника. Виды *Diaporthe phaseolorum*, *Didymella glomerata* и *Diaporthe* sp. патогенны для всех перечисленных растений, кроме амброзии полыннолистной.

Степень достоверности и апробация результатов. Работа выполнена в лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ «Всероссийский НИИ защиты растений» (Санкт-Петербург, Пушкин). Исследования проводили в рамках государственных заданий ФГБНУ ВИЗР (2015-2018 гг.), проектов, поддержанных Российским научным фондом (№ 14-26-00067, 2014-2018 гг.) и Комитетом по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга (2017 г). Достоверность всех полученных результатов подтверждена биоинформатической обработкой данных.

Основные результаты работы были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, в том числе Международной конференции «Эколого-генетические основы современных агротехнологий» (Санкт-Петербург, 27-29 апреля 2016 г.), Международном саммите молодых учёных «Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства» (Краснодар, 26-30 июля 2016 г.), 4 съезде микологов России (Москва, 12-14 апреля 2017 г.), 12th European Foundation for Plant Pathology Conference «Deepen knowledge in plant pathology for innovate agro-ecology» (Дюнкерк, Франция 29 мая – 2 июня 2017 г.), XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 9-13 апреля 2018 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Микология и альгология в России. XX-XXI век: смена парадигм» (Москва, 17-19 ноября 2018 г.), 10-й всероссийской конференции с международным участием молодых учёных и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки масличных и других технических культур» (Краснодар, 26-28 февраля 2019 г.), IV-м Всероссийском съезде по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении

независимости и конкурентоспособности АПК России» (Санкт-Петербург, 9-11 сентября, 2019 г.).

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом четырёхлетних исследований (2015-2018 гг.), выполненных лично автором. Автор принимал участие на всех этапах работы, от постановки цели и задач, сбора материала, проведения экспериментов до интерпретации полученных результатов.

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 4 – в журналах, входящих в перечень международных реферативных баз данных и в список ВАК, 3 – в других журналах, 7 – материалы конференций.

Структура и объём диссертации. Работа изложена на 121 странице, содержит 45 рисунков, 14 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, 5 разделов экспериментального материала, содержащих описание материала и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения, 3 приложений. Список цитированной литературы включает 177 источников, в том числе 139 иностранных работ.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю Ганнибалу Ф.Б. за всестороннюю помощь на всех этапах проведённой работы. Особая благодарность академику РАН Левитину М.М., доктору биологических наук Мироненко Н.В. за ценные замечания и рекомендации при подготовке рукописи диссертации. Глубокая признательность всему коллективу лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР. Автор выражает благодарность сотрудникам центра биологической регламентации использования пестицидов и Белгородского филиала ФГБНУ ВИЗР за предоставленные образцы семян подсолнечника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы исследования. Представлены цель и задачи, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследований, степень достоверности и апробация результатов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представлен аналитический обзор основных этапов изучения фомоидных грибов, с момента описания рода *Phoma* в 1821 г. Проанализирована эволюция взглядов на систематику и таксономию фомоидных грибов, начиная с первых морфологических концепций и заканчивая современными представлениями, основанными на реконструкции молекулярной филогении.

Анализ опубликованной в научных источниках информации, позволил установить, что морфологическая концепция рода и видов фомоидных грибов признана несостоятельной. Приоритетной, в настоящее время, является молекулярно-генетическая концепция, согласно которой фомоидные грибы, в широком понимании, занимают своё место в составе двух классов сумчатых грибов, шести порядков, 20 семейств и более чем 60 родов.

Также в главе приведены данные о биоразнообразии, распространении и вредоносности фомоидных грибов – патогенов подсолнечника: возбудителе фомоза *P. lindquistii* и 12 видах рода *Diaporthe*, являющихся возбудителями фомопсиса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы. Материалом для исследований служили 187 изолятов фомоидных грибов, выделенных автором из вегетативных частей и семян подсолнечника, собранных в 2015-2018 гг. на территории 15 субъектов России. Также, в работу были включены 29 изолятов фомоидных грибов, ассоциированных с дикорастущими сорными растениями семейства *Asteraceae*, собранными в разные годы на территории России и в странах бывшего СССР. Коллекция всех чистых культур хранится и постоянно пополняется сотрудниками лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР. Дополнительно были исследованы 28 образцов растений, поражёнными фомоидными грибами, из Микологического гербария ФГБНУ ВИЗР (LEP).

2.2. Выделение грибов в чистую культуру. Поверхностно стерилизованные части подсолнечника и дикорастущих сложноцветных с симптомами поражения фомоидными грибами были разложены на картофельно-сахарозный агар (КСА) с добавлением антибиотиков и вещества, ограничивающего рост грибов (Triton X-100). Чашки Петри инкубировали при 24 °С в темноте до момента образования грибами типичных структур. Монопикнидиальные изоляты сохраняли в пластиковых микропробирках на косяках КСА при 4 °С. Все изоляты

хранятся в коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР.

2.3. Изучение морфологических признаков. Для изучения морфологических признаков фомоидных грибов, изоляты выращивали на двух питательных средах: КСА и овсяном агаре (ОА). Чашки Петри инкубировали сначала в течение 7 суток в темноте, затем дополнительно 7 суток, облучая 13 ч. в сутки эритемными лампами (ЛЭ-30, максимум излучения 310-320 нм), при 20-22 °С. Учёт признаков проводили на 7 и 14 сутки роста колоний грибов.

2.4. Молекулярно-генетические методы.

2.4.1. Экстракция ДНК. Выделение ДНК из чистых культур фомоидных грибов осуществляли согласно стандартному методу с использованием ЦТАБ и хлороформа. Метод был оптимизирован для выделения ДНК грибов из гербарных образцов (см. гл. 3).

2.4.2. Амплификация ДНК. Метод ПЦР использовали для амплификации следующих таксономически информативных локусов ДНК: областей внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-локус) и большой субъединицы (LSU) рДНК, генов β -тубулина и фактора элонгации трансляции 1α (EF-1 α) с соответствующими парами праймеров: ITS1 или ITS1F/ITS4; LR0R/LR5; β tub2Fw/ β tub4Rd или T1/T2; EF1-728F/EF1-986R.

Оптимизирован протокол амплификации ITS-локуса для ДНК фомоидных грибов в тотальной ДНК, выделенной из гербарных образцов поражённых растений (см. гл. 3).

2.4.3. Визуализация продуктов амплификации. Визуализацию продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием.

2.4.4. Секвенирование ДНК. Очищенные, согласно стандартному протоколу, амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали по методу Сэнгера на секвенаторе ABIPrism 3500 с использованием набора реактивов, содержащем флуоресцентно меченные дезоксинуклеозидтрифосфаты «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (США) по протоколам производителя.

2.4.5. Анализ нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalX 1.8, при необходимости выравнивание корректировали вручную. Дендрограммы сходств были построены методом максимального

правдоподобия (maximum likelihood – ML) с использованием программного обеспечения RAxML (randomized accelerated maximum likelihood) v. 7.2.8. Надёжность топологии дендрограммы была оценена с помощью бутстреп-анализа с 1000 повторностей.

2.5. Искусственная инокуляция растений.

2.5.1. Изучение специализации фомоидных грибов к растению-хозяину. Оценку субстратной специализации 19 изолятов 9 видов фомоидных грибов, выделенных из поражённых растений подсолнечника и близкородственных видов сложноцветных растений из трибы *Heliantheae* – дурнишника, топинамбура и амброзии полыннолистной, проводили в отношении подсолнечника гибрида F1 Тунка и близкородственных растений.

Инокуляцию растений проводили по методике, традиционно применяемой для подсолнечника при изучении патогенности фомоидных грибов (Miric et al., 1999).

Растения инокулировали на стадии развития 6-8 пар настоящих листьев, начала бутонизации в трёхкратной повторности. В качестве инокулюма использовали агаровые блоки размером 5 мм, высеченные из 10-суточной чистой культуры гриба, выращенной на КСА. При инокуляции подсолнечника агаровые блоки помещали на предварительно повреждённые и интактные листья и стебли, и закрепляли с помощью плёнки Парафильм. При исследовании близкородственных видов (дурнишник, топинамбур, амброзия полыннолистная) осуществляли инокуляцию только предварительно повреждённых растений.

Отрицательным контролем служили растения, инокулированные блоками, высеченными из чистой питательной среды. Учёт размеров некрозов растительной ткани, появившихся в результате заражения грибами, производили на 4-5 сутки после инокуляции. Впоследствии, для завершения триады Коха, отрезки заражённых растений поверхностно стерилизовали, переносили на КСА для выделения возбудителя и его последующей идентификации.

2.5.2. Изучение органотропной специализации *Plenodomus lindquistii*. Для уточнения особенностей инфицирования подсолнечника грибом *P. lindquistii* растения, выращенные в лабораторных условиях, на стадии R1-R2 (6-8 пар настоящих листьев, начало бутонизации) с предварительным ранением и без него инокулировали агаровыми блоками с культурой гриба (см. 2.5.1), а также суспензией пророщенных

в 1% растворе сахарозы спор с концентрацией 10^5 на мл. Блоки (5 мм) или капли суспензии спор (5 мкл) помещали на черешок, влагалище листа, листовую пластину и стебель. Инокулированные растения инкубировали в климатической камере при температуре 24 °С, влажности 75%, в режиме день/ночь (12/12 часов).

Учёт размеров некрозов растительной ткани проводили на 4-5 сутки после инокуляции, для оценки динамики распространения некрозов, наблюдения продолжали через сутки в течение 32 суток.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ИДЕНТИФИКАЦИИ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ

3.1. Оптимизация методики выделения ДНК из гербарных образцов фомоидных грибов. Оптимизация методики выделения ДНК была проведена в нескольких направлениях: необходимое количество пикнид в пробе, способ гомогенизации материала, выбор протокола экстракции, исходный объём лизирующего буфера в пробе.

Было установлено, что минимальным количеством для экстракции ДНК методом ЦТАБ/хлороформ является 5-10 пикнид.

Проведена оценка разных способов гомогенизации материала: термического (80-90 °С в течение часа) и механического с помощью пестика или с использованием шаровой мельницы, металлических и стеклянных шариков разного диаметра. Показано, что наилучшим вариантом является размол с использованием шаровой мельницы и стерильных стеклянных шариков диаметром 0,3-0,5 мм.

Из трёх опробованных методик экстракции ДНК: стандартный метод с применением ЦТАБ и хлороформа, модифицированный протокол со ЦТАБ и хлороформом, экстракция с использованием мочевины, результативным оказался только первый метод. В дальнейшем производилась оптимизация именно этого способа экстракции ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых растений.

Оптимальный объём предварительно добавленного в каждую пробу лизирующего ЦТАБ буфера (из вариантов 10, 25, 50 мкл, итоговый объём смеси 100 мкл) находился в диапазоне 10-25 мкл.

3.2. Оптимизация протокола амплификации для качественной оценки результатов экстракции ДНК и последующего секвенирования.

Оптимизация происходила в нескольких направлениях: использование специфичных для аскомицетов пар праймеров (ITS1F/ITS4), двойная амплификация, переамплификация целевых фрагментов. При двойной амплификации ПЦР проводили последовательно два раза, причём во второй раз в качестве матрицы для синтеза ДНК использовали продукт, полученный в ходе первой амплификации. Методика переамплификации заключалась в том, что согласно стандартному протоколу проводили очистку полученного в результате ПЦР целевого фрагмента и осуществляли следующий этап амплификации, используя в качестве матрицы очищенный продукт.

При амплификации ITS-локусов в тотальной ДНК, выделенной из гербарных образцов поражённых растений, амплифицировались ITS-локусы как грибов, так и растений. Использование специфичных для аскомицетов праймеров, двойной амплификации и переамплификации целевых фрагментов позволило минимизировать в пробе количество амплифицированной растительной ДНК и увеличить количество грибной.

3.3. Конструирование и тестирование специфичных праймеров.

При экстракции ДНК из гербарных образцов поражённых растений, наряду с ДНК фомоидных грибов выделяется ДНК нецелевых объектов – других грибов, которые развивались на этом же растении сапротрофно, эндофитно или же заселили субстрат уже после его помещения в коллекцию. Для того, чтобы избежать амплификации ДНК других грибов, с помощью программы Primer3plus была сконструирована пара праймеров Did2F/Did2R, потенциально специфично амплифицирующих ITS-локус рДНК наиболее распространённых фомоидных грибов, входящих в состав семейства *Didymellaceae*. В результате оценки специфичности этих праймеров было показано, что, они амплифицируют ITS-область рДНК только представителей семейства *Didymellaceae*, которое включает в свой состав наибольшее количество родов и видов фомоидных грибов. Предложенные праймеры могут быть использованы для амплификации и последующего секвенирования ITS-локусов грибов данного таксона.

3.4. Идентификация изолятов *Plenodomus lindquistii* по молекулярно-генетическим признакам.

До настоящего времени не существовало праймеров, специфично амплифицирующих ДНК вида *P. lindquistii* – возбудителя фомоза подсолнечника. С помощью программы Primer3plus были сконструированы три пары праймеров, потенциально

специфично амплифицирующих ITS-локус рДНК этого вида. В результате оценки их специфичности установлено, что стабильная амплификация ITS-области ДНК *P. lindquistii* происходила при использовании праймеров LepIIF2 и LepIIR2, которые могут быть рекомендованы для идентификации этого патогена.

ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОДСОЛНЕЧНИКА

4.1. Идентификация по морфологическим признакам. За период 2015-2018 гг. в результате обследования 77 образцов стеблей и 20 образцов семян подсолнечника в чистую культуру выделены 187 изолятов фомоидных грибов (183 – из стеблей и 4 – из семян).

По морфологическим признакам 177 изолятов были идентифицированы как *P. lindquistii*, восемь изолятов – как виды рода *Diaporthe*, остальные два были идентифицированы до семейства *Didymellaceae*.

Изоляты, отнесённые к виду *P. lindquistii*, были сходными по микроморфологическим и макроморфологическим признакам.

Изоляты *Diaporthe* в чистой культуре на КСА формировали колонии 4 морфотипов, различающихся характером воздушного мицелия, расположением пикнид и способностью к формированию трёх типов конидий (α , β , γ).

Анализ морфологических признаков всех изолятов фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника, позволил предварительно разделить изоляты на 6 морфологических групп, потенциально соответствующих 6 таксонам фомоидных грибов. Из них одна группа была идентифицирована до вида (*P. lindquistii*), 4 – до рода *Diaporthe*, 1 – до семейства *Didymellaceae*.

4.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам. Молекулярно-генетический анализ позволил выделить шесть видов фомоидных грибов, которые соответствовали шести морфологическим группам, из которых пять были определены до уровня вида: *P. lindquistii*, *Diaporthe gulyae*, *D. phaseolorum*, *D. eres*, *Didymella glomerata* и одна – до рода *Diaporthe* sp.

4.2.1. Идентификация изолятов *Plenodomus lindquistii*. Результаты, полученные при идентификации изолятов как по морфологическим, так и молекулярно-генетическим признакам, согласовывались только для одного вида – *P. lindquistii*.

В результате амплификации ДНК всех выделенных 187 изолятов фомоидных грибов с разработанными нами видоспецифичными праймерами LepIIF2/LepIIR2, была показана принадлежность 177 изолятов к виду *P. lindquistii*, что совпадает с результатами анализа морфологических признаков.

Таким образом, вид *P. lindquistii*, являющийся возбудителем фомоза подсолнечника, широко распространён на территории России, и в период 2015-2018 годы вызывал пятнистость стеблей подсолнечника в Алтайском, Краснодарском, Ставропольском краях, Белгородской, Липецкой, Пензенской, Ростовской, Тульской, Челябинской областях.

4.2.2. Идентификация изолятов *Diaporthe*. В результате проведённого филогенетического анализа, согласно генеалогиям генов β -тубулина и EF-1 α , было показано, что все 8 изолятов относятся к трём видам рода *Diaporthe*: *D. gulyae*, *D. phaseolorum* и *D. eres*, а два сходных изолята *Diaporthe* sp. формировали отдельную кладу, близкородственную виду *D. gulyae* (рис. 1).

Виды *D. gulyae*, *D. eres*, *D. phaseolorum* являются первыми находками на территории России на подсолнечнике, подтверждёнными молекулярно-генетическими исследованиями. Среди анализируемой коллекции изолятов вид *D. helianthi*, который в России длительное время считался единственным распространённым повсеместно возбудителем фомопсиса подсолнечника, нами не был обнаружен.

Полученные результаты подтверждают, что в России с подсолнечником ассоциированы несколько видов рода *Diaporthe*. Вероятно, виды *D. gulyae*, *D. phaseolorum* и *D. eres* присутствовали на территории страны и ранее, но не были корректно идентифицированы.

Показано, что симптомы, вызываемые разными видами *Diaporthe* на подсолнечнике, могут быть более разнообразными, чем описанные в литературе классические симптомы фомопсиса: ярко-бурые пятна на стеблях с чётким ободком по краям, маслянистые, становящиеся впоследствии пепельно-серыми, при прикосновении некротизированная ткань вдавливается (Якуткин 1998), размер пятен 15-20 см (Harveson et al., 2012).

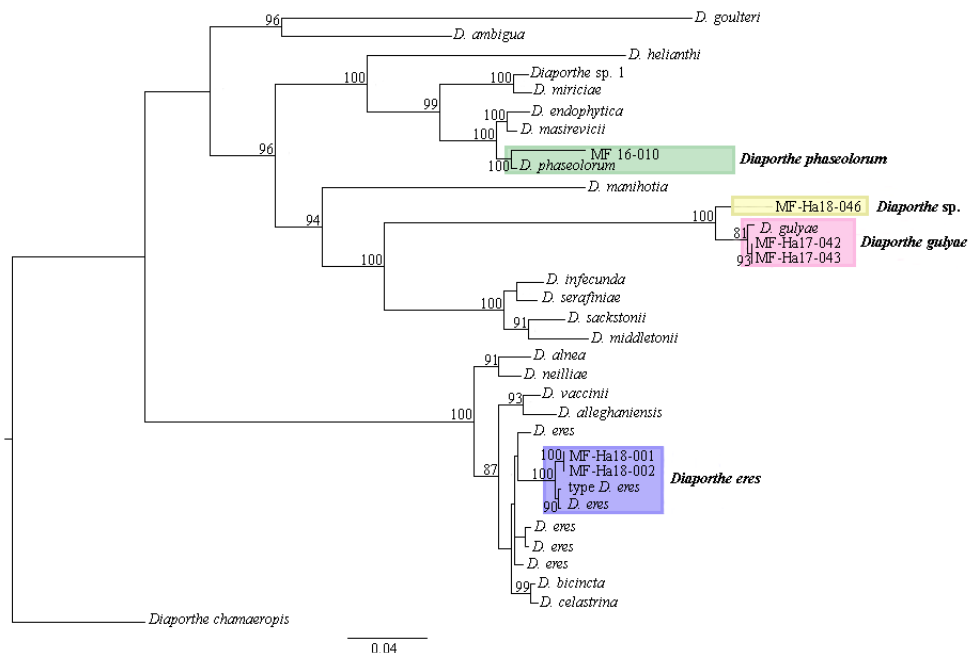


Рисунок 1 – Комбинированное филогенетическое дерево, полученное с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood), на основе последовательностей генов β -тубулина и фактора элонгации трансляции 1- α для изолятов *Diaporthe*

Так, выявленные нами в России виды *Diaporthe* были изолированы из подсолнечника с симптомами поражения характерными для фомоза: иссиня-чёрные пятна на стеблях с чёткой границей, отмершая ткань не вдавливается при нажатии, размер пятен 4-5 см (Harveson et al., 2012). Таким образом, разные виды *Diaporthe* и *P. lindquistii* при развитии на подсолнечнике могут вызывать сходные симптомы. По наличию характерной пятнистости на стеблях можно сделать лишь предварительный диагноз, который следует подтвердить изучением морфологических признаков выделенных изолятов в чистой культуре, при этом надёжная идентификация патогена возможна лишь до уровня рода. Для корректной идентификации вида возбудителя пятнистости необходимо изучение молекулярно-генетических признаков выделенных изолятов.

4.2.3. Идентификация изолятов *Phoma* sp. В результате проведённого филогенетического анализа, согласно генеалогиям ITS-локуса рДНК и гена β-тубулина, два изолята *Phoma* sp. оказались близкородственными виду *Didymella glomerata*, несмотря на то, что в чистой культуре эти изоляты не формировали характерных для этого вида морфологических признаков (цепочки многоклеточных хламидоспор). Вид *Didymella glomerata* был впервые обнаружен в Ростовской области на подсолнечнике.

ГЛАВА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДИКОРАСТУЩИМИ РАСТЕНИЯМИ СЕМЕЙСТВА *ASTERACEAE*

5.1. Идентификация фомоидных грибов из Микологического гербария ФГБНУ ВИЗР (LEP). Микологический гербарий ФГБНУ ВИЗР (LEP) является крупнейшей в России коллекцией фитопатогенных микромицетов, используемой для изучения биоразнообразия грибов. В результате длительного хранения морфологические структуры грибов неизбежно разрушаются и образцы уже не могут быть полноценно использованы для традиционных микологических исследований. Поскольку ДНК грибов способна сохраняться длительное время, то гербарные образцы могут быть использованы для молекулярно-генетического анализа. Таким образом, секвенирование гербарных образцов позволит судить не только о разнообразии, но и о географическом распространении грибов, в том числе в историческом аспекте.

5.1.1. Идентификация по морфологическим признакам. Из гербария ФГБНУ ВИЗР (LEP) были выбраны 28 образцов сложноцветных растений, по информации на этикетках, поражённых 20 видами фомоидных грибов. Растения были собраны на территории России в период 1895-1960 гг. Вероятнее всего, 12 видов грибов были определены исключительно по питающему растению (виды *Phoma achilleae*, *Ph. erigerontis*, *Ph. leonuri* и др.). По морфологическим признакам сохранившихся для изучения структур грибов микромицеты из 6 образцов растений нами были определены до уровня вида, из 7 – до уровня рода и из 15 – до секции (группы родов). Из них, определение грибов из 4 образцов совпало с видовой идентификацией грибов, проведённой при помещении образцов в гербарий.

5.1.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам. Для экстракции ДНК из 28 гербарных образцов поражённых фомоидными грибами растений был использован оптимизированный протокол, описанный ранее в главе 3, благодаря которому ДНК фомоидных грибов, была успешно выделена только из 18 образцов.

Таксономически информативный ITS-локус рДНК грибов был амплифицирован и в последующем секвенирован. Нуклеотидные последовательности 14 образцов были получены в результате ПЦР с разработанными специфичными праймерами Did2F/Did2R, а четырёх – с праймерами ITS1F/ITS4.

Результаты идентификации фомоидных грибов в гербарных образцах по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам и данные, представленные на этикетках, полностью не согласовывались ни для одного исследованного образца. Молекулярные данные и наблюдаемые нами морфологические признаки согласовались только для образца LEP 129311 возрастом 124 года. По морфологическим признакам он был признан представителем бывшей секции *Phyllostictoides* (Voerema et al., 2004). Молекулярные признаки позволили идентифицировать этот образец, как *Boeremia exigua* – типовой вид данной секции.

Всего с помощью молекулярно-генетических признаков видовая принадлежность была определена для 9 гербарных образцов фомоидных грибов, из них *B. exigua* – 5 образцов, *Ascochyta rabiei* – 2, *Didymella pomorum* – 1, *Epicoccum nigrum* – 1. До таксона уровня рода было определено 9 образцов: 5 – *Ascochyta* sp., 2 – *Didymella* sp., 2 – *Stagonosporopsis* sp.

5.2. Идентификация коллекции изолятов фомоидных грибов, выделенных из поражённых дикорастущих растений семейства Asteraceae.

5.2.1. Идентификация по морфологическим признакам. По морфологическим признакам, исследованные 29 изолятов были отнесены к 21 виду из 6 секций рода *Phoma* в бывшем широком понимании концепции данного таксона (Voerema et al., 2004).

5.2.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам. В результате проведённого филогенетического анализа, согласно генеалогиям ITS-локуса, LSU-области рДНК и гена β-тубулина, исследованные изоляты относились к 13 видам из 6 родов семейства *Didymellaceae* порядка *Pleosporales*: *Ascochyta* sp., *Stagonosporopsis* sp., *S.*

inoxydabilis, *S. heliopsidis*, *B. exigua*, *Didymella americana*, *D. glomerata*, *D. macrophylla*, *D. pinodella*, *D. rosea*, *Neoscochyta desmazieri*, *N. paspali* и *Nothophoma quercina* (рис. 2).

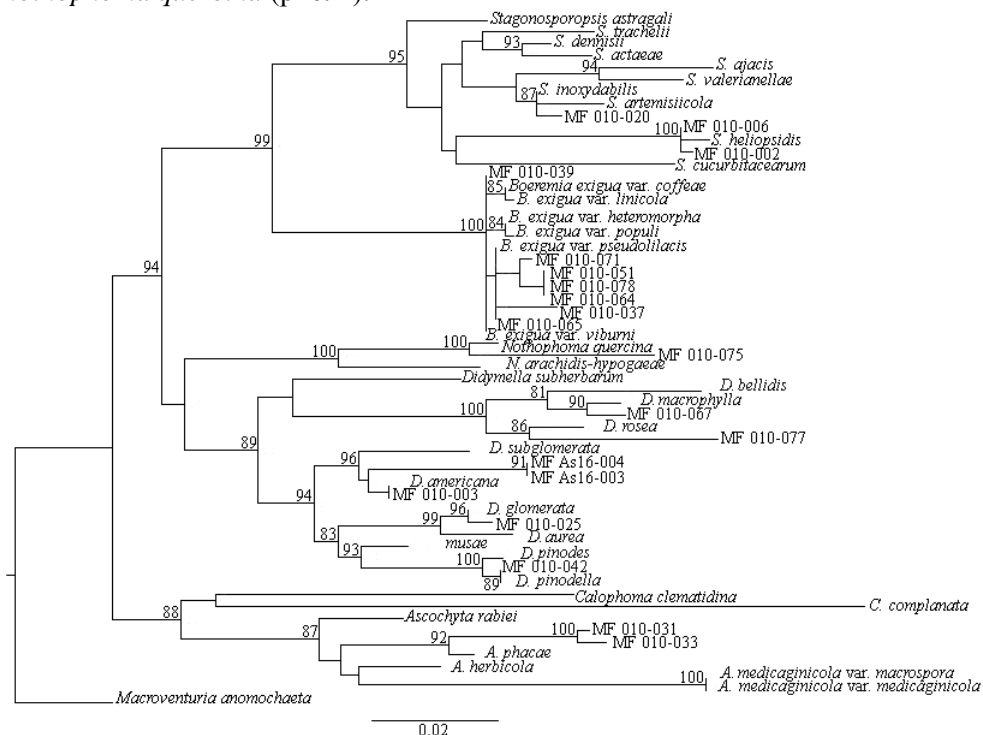


Рисунок 2 – Комбинированное филогенетическое дерево, полученное с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood), на основе последовательности ITS-локуса рДНК и гена β-тубулина для изолятов фомиидных грибов

По филогенетической информативности ITS и LSU-локусы рДНК являлись сравнительно сходными. Включение в молекулярно-генетический анализ помимо локусов рДНК гена β-тубулина, позволило сконструировать филограммы с более дробной топологией, чем филограммы, построенные на основании сиквенсов только рибосомальных локусов или только гена β-тубулина (рис.2). Комбинированные филогенетические деревья, построенные на основании

последовательностей ITS-локуса и гена β -тубулина или LSU-области и гена β -тубулина, были информативными в равной степени. Таким образом, для реконструкции молекулярной филогении фомоидных грибов предпочтительнее в филогенетический анализ включать ITS-локус рДНК, как наиболее популярный и широко представленный в Генбанке и других базах данных, и часть гена, ответственного за синтез белка β -тубулина.

Только для трёх изолятов MF 010-020, MF 010-025, MF 010-065 идентификация по морфологическим признакам согласовывалась с данными, полученными в результате молекулярно-генетического анализа.

Виды *D. macrophylla* и *S. heliopsisidis* были обнаружены на территории России впервые. Вид *D. pinodella* впервые был обнаружен на бодяке полевом.

ГЛАВА 6. СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОДСОЛНЕЧНИКА И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ СЛОЖНОЦВЕТНЫХ

6.1. Изучение органотропной специализации *Plenodomus lindquistii*. В результате проведённых экспериментов показано, что изоляты *P. lindquistii* заражают как лист, так и стебель подсолнечника, вызывая некрозы. Вектор распространения инфекции выявлен только в направлении от стебля на лист.

6.2. Оценка субстратной специализации фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника и близкородственных дикорастущих сложноцветных растений. В лабораторных условиях было впервые показано, что изоляты грибов *P. lindquistii* и *Diaporthe* spp. способны заражать не только подсолнечник, но и близкородственные ему дикорастущие растения. Изоляты *P. lindquistii*, *D. gulyae*, *D. eres* и *Diaporthe* sp. были патогенны для топинамбура, дурнишника и амброзии полыннолистной, вызывая хорошо заметные некрозы ткани растений. Изолят *D. phaseolorum* был патогенен для всех перечисленных растений, но не заражал амброзию полыннолистную. Результаты экспериментов демонстрируют, что сорные близкородственные подсолнечнику растения являются потенциальными источниками сохранения и распространения заболеваний, вызываемых этими видами грибов.

Впервые была показана патогенность изолятов видов *Didymella americana* для подсолнечника, дурнишника, топинамбура и амброзии полыннолистной, а также вида *D. glomerata* для всех изученных растений,

кроме амброзии полыннолистной. Изоляты вида *Stagonosporopsis heliopsisidis*, считавшегося специализированным для амброзии полыннолистной, были патогенными также для подсолнечника, дурнишника и топинамбура.

Отмечена существенная разница патогенных свойств разных изолятов одного вида. Так из двух изолятов *Diaporthe gulyae*, один вызывал некрозы стеблей всех инокулированных растений, в то время, как другой – только подсолнечника и топинамбура. Выделенные из дурнишника изоляты *Didymella americana* были патогенными для всех изученных растений, в то время как изолят этого же вида, выделенный из амброзии полыннолистной, не являлся патогенным для подсолнечника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Оптимизированы методики гомогенизации пикнид и выделения ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых сложноцветных растений. Для гербарных образцов фомоидных грибов, сохранявшихся в течение 60-124 лет, усовершенствованная методика с использованием ЦТАБ и хлороформа оказалась наилучшей.

2. Впервые разработаны праймеры для ПЦР (*Did2F/Did2R*) специфичные для грибов семейства *Didymellaceae*. Их использование целесообразно для амплификации и последующего секвенирования таксономически информативных локусов ITS рДНК фомоидных грибов в тотальной ДНК, выделенной из гербарных образцов поражённых растений. Использование этих специфичных праймеров позволяет избегать амплификации рДНК других грибов и растений.

3. Впервые разработаны видоспецифичные праймеры (*Lep1F2/Lep1R2*), которые могут использоваться для проведения молекулярно-генетической идентификации гриба *Plenodomus lindquistii* – возбудителя фомоза подсолнечника.

4. Пятнистость стеблей подсолнечника на территории 14 регионов России в 2015-2018 гг. вызывалась пятью видами фомоидных грибов из трёх семейств. Повсеместно и часто встречался *Plenodomus lindquistii* (*Leptosphaeriaceae*). Единичными находками представлены семейства *Diaporthaceae* (*Diaporthe gulyae*, Белгородская область; *D. eres*, Ленинградская область; *D. phaseolorum*, Краснодарский край) и *Didymellaceae* (*Didymella glomerata*, Ростовская область).

5. На дикорастущих растениях семейства *Asteraceae* обнаружено 14 видов из шести родов семейства *Didymellaceae*: *Ascochyta rabiei*, *Boeremia*

exigua, *Didymella glomerata*, *D. americana*, *D. pomorum*, *D. macrophylla*, *D. pinodella*, *D. rosea*, *Epicoccum nigrum*, *Neoascochyta paspali*, *N. desmazieri*, *Nothophoma quercina*, *Stagonosporopsis heliopsisidis*, *S. inoxydabilis*. Установлено, что вид *Didymella glomerata* может быть ассоциирован как с подсолнечником, так и с дикорастущими сложноцветными.

6. Виды грибов *Diaporthe gulyae*, *D. phaseolorum* и *Stagonosporopsis heliopsisidis* выявлены на территории России впервые.

7. Показано, что изоляты видов *Plenodomus lindquistii*, *Diaporthe gulyae*, *D. eres*, *Didymella americana*, *Stagonosporopsis* sp. и *S. heliopsisidis* в лабораторных условиях являются патогенными для подсолнечника и близкородственных культурных и дикорастущих сорных растений: топинамбура, амброзии полыннолистной и дурнишника. Изоляты видов *Diaporthe phaseolorum*, *Didymella glomerata* и *Diaporthe* sp. заражали те же растения, кроме амброзии полыннолистной. Близкородственные подсолнечнику культурные и дикорастущие сложноцветные могут способствовать сохранению и распространению перечисленных видов грибов – патогенов подсолнечника.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, входящих в перечень международных реферативных баз данных и список ВАК РФ

1. **Гомжина М.М.** Современная систематика грибов рода *Phoma* sensu lato / М.М. Гомжина, Ф. Б. Ганнибал // Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51 (5). – С. 268-275.

2. Гасич Е.Л. Микромицеты сорных и дикорастущих травянистых растений Смоленской области / Е.Л. Гасич, Т.Ю. Гагкаева, Л.Б. Хлопунова, **М.М. Гомжина**, Е.Л. Шайдаюк, Ф.Б. Ганнибал // Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51 (5). – С. 276-282.

3. Берестецкий А.О. Физиолого-биохимические свойства и биологическая активность фомоидных грибов, выделенных из филлосферы сорных и дикорастущих травянистых растений / А.О. Берестецкий, А.С. Пантелеева, Ф.Б. Ганнибал, **М.М. Гомжина**, Е.Л. Гасич, С.В. Сокорнова // Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51 (5). – С. 283-291.

4. Гасич Е.Л. Первая находка *Stagonosporopsis heliopsisidis* (*Pleosporales*) на территории России и перспективы его применения против амброзии полыннолистной / Е.Л. Гасич, **М.М. Гомжина**, Л.Б.

Хлопунова, Ф.Б. Ганнибал // Микология и фитопатология. – 2018.– Т. 52 (4). – С. 277-290.

Статьи в других журналах

5. **Гомжина М.М.** Проблемы идентификации грибов рода *Phoma* sensu lato в условиях чистой культуры / М.М. Гомжина // Вестник защиты растений. – 2016. – В. 3 (89). – С. 52–53.

6. **Gomzhina M.M.** First report of the fungus *Diaporthe phaseolorum* / M.M. Gomzhina, Ph.B. Gannibal // Microbiology independent research journal. – 2018. – V. 5. – P. 65–70.

7. **Гомжина М.М.** Виды *Diaporthe*, вызывающие фомопсис подсолнечника в России / М.М. Гомжина, Ф.Б. Ганнибал, В.В. Букреев // Защита и карантин растений. – 2019. – №8. – С. 36–38.

Материалы конференций

8. **Гомжина М.М.** Выделение ДНК пикнидиальных грибов – патогенов растений из гербарного материала / М.М. Гомжина, Ф.Б. Ганнибал // Материалы международного саммита молодых учёных «Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства». – Краснодар: ФГБНУ ВНИИ риса. – 2016. – С. 24–27.

9. **Гомжина М.М.** Запутанная история таксономии фомоидных грибов (Упрямый *Phoma*) / М.М. Гомжина, Ф.Б. Ганнибал // Современная микология в России. Т. 6. Материалы 4-го съезда микологов России. Москва: Национальная академия микологии. – 2017. – С. 6–9.

10. **Gomzhina M.M.** DNA extraction and PCR amplification method suitable for herbarium-stored specimens of *Phoma*-like fungi / M.M. Gomzhina, Ph.B. Gannibal // Book of abstracts 12th European Foundation for Plant Pathology (EFPP) Conference «Deepen knowledge in plant pathology for innovate agro-ecology». – Dunkerque, France. – 2017. – P. 108.

11. **Гомжина М.М.** Идентификация фомоидных грибов из Микологического гербария ВИЗР (LEP) с помощью молекулярно-генетических методов / М.М. Гомжина // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». – Москва: МГУ. – 2018.

12. **Гомжина М.М.** Первое обнаружение в России *Diaporthe phaseolorum* на подсолнечнике / М.М. Гомжина, Ф.Б. Ганнибал // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Микология и альгология в России. XX-XXI век: смена парадигм». – Москва: МГУ. – 2018. – С. 146.

13. **Гомжина М.М.** Первая находка гриба *Diaporthe gulyae* на подсолнечнике в России / М.М. Гомжина, Ф.Б. Ганнибал // Материалы 10-ой всероссийской конференции с международным участием молодых учёных и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки масличных и других технических культур». – Краснодар. – 2019. – С. 46–51.

14. **Гомжина М.М.** Виды рода *Diaporthe* на подсолнечнике в России // М.М. Гомжина, Ф.Б. Ганнибал // IV Всероссийский съезд по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России». Сборник тезисов докладов. СПб: ФГБНУ ВИЗР. – 2019.