## Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

# «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ»

На правах рукописи

# ГОМЖИНА МАРИЯ МИХАЙЛОВНА

# ФОМОИДНЫЕ ГРИБЫ НА ПОДСОЛНЕЧНИКЕ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ СЛОЖНОЦВЕТНЫХ РАСТЕНИЯХ В РОССИИ

Шифр и наименование специальности 03.02.12. Микология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: Ганнибал Филипп Борисович кандидат биологических наук

# Оглавление

введение	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Таксономия фомоидных грибов	9
1.2. Морфологическая концепция	9
1.3. Новая морфологическая концепция	11
1.4. Молекулярная филогения	12
1.5. Методы исследования фомоидных грибов	17
1.6. Фомоидные грибы – патогены подсолнечника	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1. Материал	27
2.2. Выделение грибов в чистую культуру	30
2.3. Изучение морфологических признаков	34
2.4. Молекулярно-генетические методы	34
2.4.1. Экстракция ДНК	34
2.4.2. Амплификация ДНК	34
2.4.3. Визуализация продуктов амплификации	35
2.4.4. Секвенирование ДНК	35
2.4.5. Анализ нуклеотидных последовательностей	35
2.5. Искусственная инокуляция растений	36
2.5.1. Изучение субстратной специализации изолятов фомоидных грибов	
2.5.2. Изучение органотропной специализации Plenodomus lindquistii	37
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТО ИДЕНТИФИКАЦИИ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ	
3.1. Оптимизация методики выделения ДНК из гербарных образцов фомоидных грибов	38
3.2. Оптимизация протокола амплификации для качественной оценки результатов экстра ДНК и последующего секвенирования	
3.3. Конструирование и тестирование специфичных праймеров	47
3.4. Идентификация изолятов <i>Plenodomus lindquistii</i> по молекулярно-генетическим призн	
ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ И ПОДСОЛНЕЧНИКА	
4.1. Идентификация по морфологическим признакам	52
4.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам	56
4.2.1. Идентификация изолятов Plenodomus lindquistii	56
4.2.2. Идентификация изолятов <i>Diaporthe</i>	57

4.2.3. Идентификация изолятов <i>Phoma</i> sp
ГЛАВА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДИКОРАСТУЩИМИ РАСТЕНИЯМИ СЕМЕЙСТВА <i>ASTERACEAE</i>
5.1. Идентификация фомоидных грибов из Микологического гербария ФГБНУ ВИЗР (LEP) 62
5.1.1. Идентификация по морфологическим признакам
5.1.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам
5.2. Идентификация коллекции изолятов фомоидных грибов, выделенных из поражённых
растений семейства Asteraceae
5.2.1. Идентификация по морфологическим признакам
5.2.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам
ГЛАВА 6. СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
ПОДСОЛНЕЧНИКА И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ СЛОЖНОЦВЕТНЫХ
6.1. Изучение органотропной специализации <i>Plenodomus lindquistii</i>
6.2. Оценка специализации к растению-хозяину изолятов фомоидных грибов, выделенных из
подсолнечника и близкородственных дикорастущих сложноцветных растений
ЗАКЛЮЧЕНИЕ95
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
ПРИЛОЖЕНИЯ112

#### **ВВЕДЕНИЕ**

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

Подсолнечник поражают и вызывают пятнистости его стеблей виды *Plenodomus lindquistii* (возбудитель фомоза) и 13 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 подсолнечника при поражении *Diaporthe* spp., 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).

На настоящий момент в России данные о биоразнообразии и распространении фомоидных грибов, ассоциированных с подсолнечником и сорными сложноцветными, не систематизированы и основаны на результатах идентификации в первую очередь по связи с питающим растением, симптомам и морфологическим признакам. Часто в микофлористических списках фомоидные грибы не идентифицированы до вида или даже до рода.

**Степень разработанности темы.** Считается, что на территории России повсеместно распространены два вида фомоидных грибов: *P. lindquistii* и *D. helianthi* (Бородин, Котлярова, 2006; Якуткин 2001; 2005; 2013; Афонин и др., 2008; Саукова и др., 2014; 2018).

Патогенные для подсолнечника виды фомоидных грибов могут сохраняться на растительных остатках и, вероятно, на близкородственных дикорастущих и культурных растениях (Mihaljčević et al., 1985; Vukojevic et al., 1995; Долженко, 1998; Пивень и др., 2006; Vrandečić et al., 2008; 2010). На настоящий момент в России данные о биоразнообразии и распространении фомоидных грибов, ассоциированных с подсолнечником и дикорастущими сложноцветными, не систематизированы и опираются в первую очередь на спорные результаты идентификации, основанной на связи с питающим растением, симптомах и морфологических признаках.

Известно, что информации о симптомах, связи с питающим растением и морфологических признаках недостаточно для корректной идентификации фомоидных грибов. Диагностику видов *Diaporthe* и *Plenodomus* и других родов этой группы грибов достоверно можно осуществлять только по молекулярно-генетическим признакам (секвенирование

филогенетически информативных локусов ДНК). Изучение биоразнообразия и географии фомоидных грибов, ассоциированных со сложноцветными растениями в России, с применением методов молекулярной филогении не проводилось. Данные о видовом составе и распространении и патогенности отдельных видов, особенно обладающих экономической значимостью, на территории страны требуют уточнения.

**Цель** исследования: 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, выделенных из подсолнечника и близкородственных культурных и дикорастущих растений с использованием традиционных микологических и молекулярногенетических методов.
- 4. Идентифицировать фомоидные грибы из образцов дикорастущих сложноцветных растений, хранящихся в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (LEP) с использованием традиционных 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 достоверно с применением методов молекулярной филогении определено биоразнообразие фомоидных грибов – патогенов подсолнечника и дикорастущих сложноцветных растений. Впервые сделаны находки фитопатогенных видов: *Diaporthe gulyae*, *D. phaseolorum*, *D. eres*, *Didymella glomerata* на подсолнечнике, *Stagonosporopsis heliopsidis* на амброзии полыннолистной. Уточнено географическое распространение возбудителей фомоза (*Plenodomus lindquistii*) и фомопсиса (*Diaporthe* spp.) подсолнечника и фомоидных грибов, ассоциированных с сорными сложноцветными.

Ценнейшие образцы сложноцветных растений, поражённых фомоидными грибами, хранящиеся в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (LEP), были исследованы с применением методов молекулярной филогении. Впервые в России были получены нуклеотидные последовательности ITS-локуса рДНК для образцов, хранящихся несколько десятков лет (60-124). Самый старый исследованный образец имеет возраст 124 года.

Впервые проанализирована специализация к растению-хозяину достоверно идентифицированных изолятов фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника и близкородственных 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 достоверно судить о биоразнообразии этих грибов, ассоциированных не только с подсолнечником, но и с дикорастущими сложноцветными – потенциальными резерватами для сохранения этих грибов.

Предложены праймеры LepliF2/LepliR2, специфично амплифицирующие ITS-локус рДНК вида *Plenodomus lindquistii*, которые могут быть использовании для проведения экспрессидентификации этого вида — возбудителя фомоза подсолнечника. Также предложены праймеры Did2F/Did2R специфичные для представителей семейства *Didymellaceae*, которые могут быть использованы для избирательной амплификации и последующего секвенирования ITS-локуса рДНК фомоидных грибов в тотальной ДНК, выделенной из гербарных образцов поражённых растений. Использование таких специфичных праймеров позволяет избегать амплификации рДНК других грибов и растений. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что симптомы, вызываемые разными видами *Diaporthe* на подсолнечнике, не отличаются не только друг от друга, но и таковых, вызываемымх *Plenodomus lindquistii*, поэтому проводить диагностику этих видов только по симптомам на питающем растении не рекомендуется. Для корректной идентификации фомоидных грибов, ассоциированных с подсолнечником и близкородственными сложноцветными растениями, рекомендуется использовать методы молекулярной филогении.

Методология и методы исследований. Методы, которые были использованы в ходе проведения работы, включают, как классические микологические методики изоляции фитопатогенных грибов из тканей растения, исследования грибов в чистой культуре и микроскопирования их вегетативных и спороносных структур, так и классические фитопатологические методы оценки патогенности и субстратной специализации изолятов грибов. В работе также широко использованы молекулярно-генетические методы, полученные данные были обработаны с применением методов 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 LepliF2/LepliR2 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, Neoascochyta paspali, N. desmazieri, Nothophoma quercina, Stagonosporopsis heliopsidis, 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. heliopsidis 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 проводена в лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ Всероссиского НИИ защиты растений. Исследования были выполнены по Государственным заданиям ФГБНУ ВИЗР, в рамках проекта РНФ №14-26-00067 и в рамках индивидуального проекта, поддержанного Комитетом по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга (конкурс грантов 2017). Достоверность полученных результатов подтверждается биоинформатической обработкой данных, обсуждением их на научных мероприятиях и экспертизой в ходе рецензирования рукописей статей.

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), Международном саммите молодых учёных «Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства» (Краснодар, 26-30 июля 2016), 4 Съезде микологов России (Москва, 12-14 апреля 2017), 12<sup>th</sup> European Foundation for Plant Pathology

Сопference «Deepen knowledge in plant pathology for innovate agro-ecology» (Дюнкерк, Франция, 29 мая — 2 июня 2017), XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 9-13 апреля 2018), Всероссийской конференции с международным участием «Микология и альгология в России. XX-XXI век: смена парадигм» (Москва, 17-19 ноября 2018), 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, 26-28 февраля 2019 г.).

#### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Таксономия фомоидных грибов

Фомоидные грибы (грибы рода *Phoma* sensu lato) — крупная группа анаморфных аскомицетов, которые широко распространены по всему Земному шару и могут быть обнаружены в самых разнообразных экологических нишах (Aveskamp et al., 2008). Среди них есть как космополиты, так и эндемичные виды (Boerema et al., 2004). Многие виды являются сапротрофами, развивающимися на широком круге субстратов как растительного, так животного происхождения, как на органических, так и на неорганических материалах. Значительная часть видов представлена фитопатогенами, поражающими сельскохозяйственные растения, вызывая листовые пятнистости и корневые гнили (Aveskamp et al., 2008). Есть среди них и паразиты человека и животных (Rai et al., 2013), энтомопатогенные виды (Sutton, 1980), паразиты других грибов, лишайников и оомицетов, в т.ч. есть и гиперпаразиты (von Brackel, 2008) и микоризообразователи (Vaz et al., 2012).

Род *Phoma* в широком понимании по количеству входящих в него видов является одним из самых обширных - около 4901 видов (Мусоbank). В то же время, несмотря на большой интерес микологов и фитопатологов к представителям этой группы, она недостаточно изучена. До сих пор нет стабильного чёткого мнения о границах родов фомоидных грибов, о положении в системе сумчатых грибов и филогенетических связях с морфологически сходными родами. Так, спустя почти 200 лет с момента описания, эта поистине удивительная группа грибов остаётся проблематичной для восприятия и трактовки. Ниже представлены основные вехи изучения фомоидных грибов и наиболее свежие представления об их филогении и систематике.

## 1.2. Морфологическая концепция

Первое описание гриба, который впоследствии был определен, как *Phoma*, датируется 1821 годом (Sutton, 1980). Однако прошло ещё 60 лет, прежде чем Саккардо описал род *Phoma* (Saccardo, 1880). Согласно предложенной им системе, к роду *Phoma* sensu Saccardo относились все грибы, развивающиеся на стеблях травянистых растений и которые способны образовывать пикниды, содержащие одноклеточные бесцветные конидии. В результате к роду *Phoma* было сразу отнесено более тысячи нестроматических пикнидиальных грибов (Saccardo, 1884). Наряду с *Phoma*, в начале 19 века были описаны ещё 3 рода морфологически сходных грибов. В 1818 году был описан род *Phyllosticta* (Persoon, 1818), в 1830 — *Ascochyta* (Libert, 1830) и в 1857 — *Diplodina* (Westendorp, 1857). Акценты при разграничении этих родов между собой были сделаны на основе наличия/отсутствия перегородок у конидий (Saccardo, 1884). К роду

*Phyllosticta* было отнесено порядка 400 видов, формирующих также одноклеточные бесцветные конидии (Аксель, 1956), к родам *Ascochyta* и *Diplodina* – виды, образующие бесцветные и зеленоватые конидии с одной перегородкой (Мельник, 1977).

В последующем, из-за попарного морфологического сходства представителей этих четырёх родов разграничивали ещё и на основании характера питания (паразитического или сапротрофного). Например, к роду *Phoma* были отнесены виды, развивающиеся преимущественно сапротрофно и поселяющиеся на стеблях, черешках и листьях уже увядших растений. Род *Phyllosticta* включал виды, заражающие изначально живые листья (Аксель, 1956).

В качестве основного диагностического признака для разграничения родов Аллешер в 1901 году предложил использовать такой признак, как приуроченность к определённой части питающего растения. Согласно предложенной им концепции, виды *Phoma* и *Diplodina* развиваются только на стеблях, виды *Phyllosticta* и *Ascochyta* — на листьях (Allesher, 1901). Такой формальный подход, как показала практика, не может служить для непротиворечивого разграничения родов. К примеру, трудно дифференцировать *Phyllosticta* от *Phoma*, так как один и тот же вид, поражая листья, может переходить на стебли, и наоборот. Так, вид *Neocamarosporium betae* (ранее *Phoma betae*) относили и к *Phoma* (*Ph. betae*; Grove, 1935; Аксель, 1956), и к *Phyllosticta* (*Ph. tabacifera* Ячевский, 1917) в зависимости от его расположения на растении.

Пары родов *Phoma/Phyllosticta* и *Ascochyta/Diplodina*, казалось бы, успешно отличали друг от друга по наличию/отсутствию в жизненном цикле септированных конидий, пока не было отмечено, что у некоторых представителей *Ascochyta* часть конидий одноклеточные. Для разрешения этой проблемы, было предложено любопытное объяснение. Согласно гипотезе, представители родов, для которых характерны одноклеточные конидии (*Phoma, Phyllosticta*), являются стадиями жизненного цикла тех родов, которые формируют септированные конидии (*Ascochyta, Diplodina*) (Grove, 1935).

Закономерность такой концепции вскоре была поставлена под сомнение, поскольку было установлено, что конидии *Phyllosticta* имеют слизистую оболочку и придатки на апикальном конце, что совершенно не характерно для видов *Ascochyta* (van der Aa, 1973), а одноклеточные конидии *Ascochyta* являются просто незрелыми, а перегородка в них формируется только после отделения конидии от конидиогенной клетки (Brever, Boerema, 1965).

Морфологическая концепция родов в первой половине 20 века преобразилась с началом изучения этих грибов in vitro. В 1953 году Хью в качестве основных диагностических признаков для разграничения групп анаморфных грибов предложил использовать особенности конидиогенеза (Hughes, 1953). В этот период именно характер конидиогенеза на долгое время стал определяющим при разграничении родов (Успенская, 1981). Считалось, что для

представителей рода *Phoma* характерен фиалидный конидиогенез, а для рода *Ascochyta* — фиалидный и аннелидный. Однако, разнообразие типов конидиогенеза наблюдалось и в пределах одного рода (Успенская, 1981; Успенская, Эль-Шанауани, 1983). Более того, на разных стадиях развития некоторых видов *Phoma*, могут формироваться разные типы конидиогенных клеток, которые могут давать начало как холобластическим конидиям, так и энтеробластическим (Sutton, 1964; Boerema, Bollen, 1975; Эль-Шанауани, 1976; Punithalingam, 1979). Полученные данные о гетерогенности конидиогенеза у особей одного и того же вида, о незакреплённости его в онтогенезе свидетельствовали о том, что признак не является достаточно информативным для использования его в качестве таксономического критерия для разграничения родов и установления филогенетических связей среди анаморфных грибов (Успенская, 1981; Успенская, Эль-Шанауани, 1983).

Исследование рода *Phoma* in vitro продолжилось изучением ростовых характеристик этих грибов на искусственных средах (Wollenweber, Hochapfel, 1936). Дэннис в 1946 году запустил череду исследований морфологических характеристик, физиологических и биохимических особенностей (Dennis, 1946).

На этом, этап господствования морфологической концепции для этих четырёх родов закончился. Изучение фомоидных грибов in vitro, поиск связей с родами аскомицетов, обращение к ультраструктурным, биохимическим и физиологическим признакам, интеграция анаморфных грибов в систему аскомицетов, подготовило почву для дальнейшего более детального и обоснованного переописания фомоидных грибов. Это с 60-ых годов 20 века начали осуществлять Боерема, Морган-Джонс и их коллеги, создав в итоге новую морфологическую концепцию грибов рода *Phoma* в широком понимании, ориентируясь и учитывая все вышеперечисленные особенности.

#### 1.3. Новая морфологическая концепция

В 1960 году Боерема с коллегами приступили к всестороннему изучению грибов рода *Phoma*, расширив список изучаемых таксонов и список потенциальных субстратов (Воегета et al., 2004). Было показано, что типовой вид рода — *Ph. herbarum*, который согласно системе Саккардо считался патогеном, поражающим преимущественно стебли травянистых растений, оказался широко распространённым сапротрофом. Этот вид и многие другие виды роды *Phoma* могут развиваться не только на отмерших или ослабленных травянистых и древесных растениях, но и на достаточно обширном круге других субстратов, таких как, почва, вода, молоко, масло, краска, бумага и т.д.

Была разработана новая система признаков, позволяющая отличать грибы рода *Phoma* от других морфологически сходных родов. Предложенная концепция была основана на морфологических признаках, однако учитывала не каждый признак в отдельности, но их

совокупность. В качестве таксономически значимых было предложено использовать характеристики конидий, конидиогенеза, тип связи гриба с субстратом, кроме того, добавлены и учтены особенности хламидоспор и склероциев. Важной была признана и оценка разницы в скорости роста на разных питательных средах, способность к продукции кристаллов, вторичных метаболитов и пигментов, а также связь с телеоморфными родами аскомицетов.

В результате проведенных исследований, были предложены две новые морфологические таксономические концепции рода *Phoma*: в узком понимании, sensu stricto (s. str.) и в широком — sensu lato (s. l.). Согласно им, фомоидные грибы следовало определить, как анаморфные аскомицеты, формирующие пикниды, содержащие как одноклеточные, так и септированные конидии, как бесцветные, так и окрашенные. Конидиогенез фиалидный. В жизненном цикле могут формировать телеоморфы из родов *Pleospora*, *Leptosphaeria* и *Didymella*.

В узком понимании в пределах рода *Phoma* оказались 223 вида, на основании морфологических признаков разделённых на 9 секций: *Phoma, Phyllostictoides, Heterospora, Macrospora, Peyronellaea, Sclerophomella, Plenodomus, Pilosa, Paraphoma*. При этом, многие виды *Ascochyta, Phyllosticta, Diplodina* были интегрированы в состав соответствующих секций под новыми названиями.

В род *Phoma* в широком понимании попали не входящие в упомянутые выше секции виды *Phyllosticta* и *Ascochyta*, а также другие морфологически сходные роды анаморфных аскомицетов, такие как, *Pleurophoma*, *Asteromella*, *Pyrenochaeta*, *Microsphaeropsis*, *Stagonospora*, *Phomopsis* (Boerema et al., 2004).

На этом этапе систематическое положение грибов рода *Phoma* s. l. можно было записать так: отдел *Deuteromycota*, класс *Coelomycetes*, порядок *Sphaeropsidales*, семейство *Sphaerioidaceae* (Успенская, 1976).

#### 1.4. Молекулярная филогения

Использование молекулярно-генетических методов для целей систематики грибов было начато с 80-х годов 20 века и положило начало новому этапу в развитии систематики (Bruns et al., 1991). Третья веха изучения грибов рода *Phoma* s. l. затрагивает период с начала 21 века и по сей день. Формирование новой молекулярно-генетической концепции связано с глобальными переменами в систематике грибов в целом, в первую очередь, с ликвидацией отдела *Deuteromycota* (Lutzoni et al., 2004; James et al., 2006). Оказалось, что морфологическая концепция рода не отражает филогенетических отношений, и с этого периода для данной группы организмов и возник термин фомоидные грибы (*Phoma*-like fungi).

На настоящий момент, фомоидные грибы могут быть определены, как анаморфные аскомицеты, которые формируют пикниды с одноклеточными или септированными, окрашенными или бесцветными конидиями. При этом конидии, сформированные in vivo и in

vitro, могут морфологически существенно различаться. Для жизненного цикла этих грибов характерны телеоморфы из класса *Dothideomycetes* из родов *Didymella, Leptosphaeria, Pleospora, Mycosphaerella, Belizeana, Fenestella, Cucurbitaria, Preussia, Westerdykella, Macroventuria, Leptosphaerulina* (Aveskamp et al., 2010; Chen et al., 2015; Chen et al., 2017).

морфологии Примеров несоответствия И филогенеза достаточно. Из всех морфологических секций, описанных Боеремой (Boerema et al., 2004), одной из самых противоречивых была секция Peyronellaea. Для представителей этой секции характерно то, что в чистой культуре они образую многоклеточные хламидоспоры, внешне напоминающие Alternaria Epicoccum. По конидии или результатам проведённого молекулярнофилогенетического анализа оказалось, что виды, формирующие такие структуры на филогенетическом древе, располагаются в пределах разных клад. Более того, типовой вид рода непикнидиальных грибов *Epicoccum* — *E. nigrum* вошёл в состав одной из этих клад. Так, неожиданным образом по молекулярно-генетическим признакам род Ерісоссит был включён в состав фомоидных грибов (Aveskamp et al., 2010).

По сравнению с морфологической концепцией стало очевидно, что формирующаяся молекулярно-генетическая концепция должна быть более дробной. Так, представители секции Peyronellaea распределились по 5 родам фомоидных грибов (Ascochyta, Calophoma, Didymella, Epicoccum, Neodidymelliopsis). А представители секций Phyllostictoides и Heterospora по 8 родам: Ascochyta, Boeremia, Calophoma, Heterophoma, Neoascochyta, Neodidymelliopsis, Stagonosporopsis, Xenodidymella (Chen et al., 2015).

На филогенетическом древе грибы рода *Phoma* s. l. располагались среди сумчатых грибов в двух классах пототдела *Pezizomycotina*: класс *Dothideomycetes*, порядки *Pleosporales*, *Botryosphaeriales*, *Dothideales*, *Capnodiales*, *Helotiales* и класс *Sordariomycetes*, порядок *Diaporthales* (Spatafora et al., 2006; de Gruyter et al., 2009; Schoch et al., 2009). При этом, все виды, ранее понимаемые как *Phoma* s. str., расположились в пределах порядка *Pleosporales*, но в составе разных семейств.

Первое применение методов молекулярной филогении для изучения конкретно фомоидных грибов было осуществлено в 2007 г. Были реконструированы филогенетические отношения для 7 видов рода *Phoma* с помощью анализа гена α-субъединицы фактора элонгации трансляции – EF-1α (Irinyi et al., 2007). Результаты разрушили только что предложенную Боеремой с коллегами (Воегета et al., 2004) стройную морфологическую концепцию рода. Оказалось, что виды, по морфологическим признакам входящие в состав разных секций, на филогенетическом древе формировали совершенно иные клады, без явной закономерности с точки зрения морфологии. Таким образом, была выявлена необходимость получения более

обширных молекулярно-филогенетических данных и построения новой таксономической концепции.

В поисках филогенетически информативных маркеров для фомоидных грибов использовали секвенирование большого перечня локусов генома. В первую очередь это были участки ядерной рДНК: область внутренних транскрибируемых спейсеров ITS, последовательности малой (SSU) и большой (LSU) субъединиц рибосом. Также использовали гены EF-1α, β-тубулина, актина, кальмодулина, хитин-синтетазы, второй субъединицы РНК-полимеразы II (грь2) (Irinyi et al., 2007; Irinyi, 2009; Irinyi et al., 2009a; 2009b; de Gruyter 2009; 2010; 2012; Aveskamp et al., 2009; 2010; Aveskamp, 2014; Chen et al., 2015; Chen et al., 2017; Ariyawansa et al., 2015a; 2015b; Quaedvliveg et al., 2013; Kodsueb et al., 2006; Wijayawardene et al., 2016; Valenzuela-Lopez et al., 2018).

Использование последовательности какого-либо одного локуса может недвусмысленно показать распределение изучаемых видов и штаммов лишь на уровне семейства и в некоторых случаях — родов. Для представителей, например, семейства *Didymellaceae*, комбинация трёх локусов — ITS, LSU и актин позволяет разграничивать виды, для которых характерно формирование хламидоспор, а комбинация ITS, LSU, β-тубулина и грb2 обеспечивает исследователя информацией для достоверного разграничения родов и большинства близкородственных видов фомоидных грибов из этого семейства (Chen et al., 2015).

В результате проведенных исследований, было показано, что почти все фомоидные грибы в бывшем узком понимании (9 секций) располагаются в пределах порядка Pleosporales в составе семейств: Leptosphaeriaceae (секции Heterospora, Plenodomus), Phaeosphaeriaceae (секция Paraphoma), Pleosporaceae (секция Pilosa) (de Gruyter et al., 2009; de Gruyter et al., 2012), Didymellaceae (представители бывших секций Phoma, Phyllostictoides, Macrospora, Peyronellaea и Sclerophomella) (de Gruyter et al., 2009; Chen et al., 2015; Chen et al., 2017), Neopyrenochaetaceae (представители секций Phoma, Paraphoma). При этом, большая часть видов рода в привычном узком понимании оказалась в пределах семейства Didymellaceae, меньшая — в семействах Leptosphaeriaceae, Phaeosphaeriaceae и единичные виды в Pleosporaceae (табл. 1). При ревизии многим видам были присвоены новые родовые названия и видовые эпитеты. Родовое название Phoma сохранилось только для части представителей семейства Didymellaceae.

Фомоидные грибы в бывшем широком понимании и отдельные виды *Phoma* s. str. нашли свое место в порядках *Pleosporales, Botryosphaeriales, Capnodiales, Diaporthales, Dothideales, Helotiales* (de Gruyter et al., 2009). В порядке *Pleosporales* в состав семейства *Didymellaceae* был включен род *Ascochyta, Leptosphaeriaceae* — роды *Asteromella, Paraconiothyrium* и *Phialophorophoma, Phaeosphaeriaceae* — род *Stagonospora*. В семействе *Cucurbitariaceae* располагаются роды *Pleurophoma* и *Pyrenochaeta*, в *Coniothyriaceae* — представители рода

Сопіотнутіит. Представители родов Phyllosticta и Diplodina, вместе с которыми традиционно рассматривались виды рода Phoma, были перенесены в порядки Botryosphaeriales и Diaporthales соответственно. В порядке Diaporthales также оказывается род Phomopsis. Род Mycosphaerella — в порядке Capnodiales, Coleophoma и Selenophoma — в Dothideales, а род Allantophoma — в Helotiales (табл. 1).

После помещения видов *Phoma* в прежнем узком понимании в разные роды и семейства, актуальными стали филогенетические и таксономические исследования, рассматривающие не всю группу, а отдельные её части. Для многих родов и видов фомоидных грибов присвоенные им морфологические критерии остаются неоднозначными, что сильно затрудняет оформление морфологической части таксономических концепций и идентификацию видов с помощью традиционных немолекулярных подходов. Безусловно, объём семейств и родов фомоидных грибов ещё требует своего уточнения. Тем не менее, рассмотрим родовое разнообразие и распределение фомоидных грибов по семействам немного подробнее.

В составе семейства Didymellaceae на основании молекулярно-филогенетического анализа последовательностей ITS-области рДНК, LSU, rpb2 и гена β-тубулина, в пределах предложено выделить 28 родов: Allophoma, Ascochyta, Boeremia, семейства было Briansuttonmyces, Calophoma, Cumuliphoma, Didymella, Didymellocamarosporum, Ectophoma, Heterophoma, Juxtiphoma, Leptosphaerulina, Macroventuria, Epicoccum, Neoascochyta, Neodidymella, Neodidymellopsis, Neomicrosphaeropsis, Notophoma, Paraboeremia, Phoma, Phomatodes, Pseudoascochyta, Remotididymella, Similiphoma, Stagonosporopsis, Vaculiphoma, Xenodidymella (Chen et al., 2015; Crous, Groenewald, 2016; Valenzuela-Lopez et al., 2018). Примечательно, что только это семейство обнаруживает в своём составе исключительно фомоидные грибы. В пределах же других семейств, наряду с фомоидными грибами, обнаруживаются и иные представители аскомицетов, в том числе образующие конидиомы не пикнидиального типа.

В семействе *Phaeosphaeriaceae* на основании последовательностей ITS-областей рДНК, LSU, SSU, rpb2 и EF-1α оказались роды *Paraphoma* и описанные в 2010 году роды *Setophoma* и *Neosetophoma* (de Gruyter et al., 2010; Phookamsak et al., 2014; Quaedvlieg et al., 2013).

В составе семейства Leptosphaeriaceae на основании последовательностей ITS-области рДНК, LSU, SSU, генов актина, β-тубулина и хитин-синтетазы для некоторых фомоидных грибов были «восстановлены» роды Plenodomus, Subplenodomus и Heterospora, а также описан новый род Paraleptosphaeria (de Gruyter et al., 2012). Впоследствии молекулярно-генетические данные о последовательностях ITS-областей рДНК, LSU, SSU, грb2 и EF-1α, позволили в составе семейства описать ещё два новых рода Neoleptosphaeria и Pseudoleptosphaeria, также включающие фомоидные грибы (Ariyawansa et al., 2015а).

В семействе *Pleosporaceae* на основании данных о последовательностях рДНК и грb2 фомоидные грибы могут быть обнаружены в составе родов *Pleospora* и недавно описанном роде *Neocamarosporium* (Crous et al., 2014; Ariyawansa et al., 2015b).

Для некоторых родов и видов были описаны новые семейства: Pseudopyrenochaetaceae (роды Pyrenochaeta, Pseudopyrenochaeta), Neopyrenochaetaceae (Neopyrenochaeta), Pyrenochaetopsidaceae (Pyrenochaetopsis), Parapyrenochaetaceae (Parapyrenochaeta) (Valenzuela-Lopez et al., 2018).

С использованием методов молекулярной филогении для целей систематики, многие вопросы о родственных связях и положении отдельных видов и родов на филогенетическом дереве аскомицетов, прояснились. Тем не менее, очевидно, что существующая на данный момент более-менее имеющая рамки молекулярно-генетическая концепция для фомоидных грибов, ещё будет претерпевать изменения. Это связано с тем, что не все роды, как оказалось, являются монофилетичными. Например, разные представители *Didymella, Ascochyta, Epicoccum* и *Notophoma* могут быть обнаружены на филогенетическом древе в пределах нескольких клад (родов), что явственно указывает на полифилетичность этих родов. Очевидно, в дальнейшем будет происходить уточнение филогении и изменение объёма этих родов.

Фомоидные грибы — патогены важных сельскохозяйственных культур есть среди представителей всех вышеперечисленных семейств и родов. Весьма полезным было бы располагать списком всех фомоидных грибов — патогенов растений, включающим современные названия и синонимику и учитывающим географическое распространение этих видов. По ряду причин эта задача является трудновыполнимой. После проведённых молекулярно-генетических исследований, виды фомоидных грибов в широком понимании присутствуют в составе примерно 60 родов и 20 семейств. В будущем при осуществлении филогенетических, таксономических и микофлористических исследований целесообразнее брать в качестве объекта не род *Phoma* или фомоидные грибы, а отдельные роды или семейства, соответствующие актуальной системе.

На настоящий момент информация о фомоидных грибах, распространенных на территории России, является фрагментарной и несистематизированной. Существуют отдельные работы, посвященные микобиоте конкретных территорий и растений-хозяев. Но, во-первых, представленная там информация требует очень кропотливого анализа для приведения ее в соответствие современной таксономии. Во-вторых, из-за того, что исследователям подчас сложно определить фомоидные грибы во флористических списках часто приходится сталкиваться с малозначимой записью *Phoma* sp.

Резюмируя все имеющиеся на данный момент знания о фомоидных грибах, можно сделать следующие выводы и заключения.

Фомоидные грибы можно обнаружить в двух классах и во многих порядках и семействах в пределах подкласса *Pezizomycotina*. Морфологическая концепция рода оказывается несостоятельной для данной группы организмов и не отражает филогенетических закономерностей.

Для реконструкции молекулярной филогении наиболее часто используют последовательности рДНК (ITS-области, LSU, SSU, гены актина, β-тубулина, грb2, хитин синтетазы, EF-1a. Считается при этом, что по одиночке последовательности этих локусов могут обеспечивать информацией о распределении изучаемых видов и штаммов лишь по семействам и в некоторой степени по родам. Для достоверного разграничения близкородственных видов фомоидных грибов для представителей разных семейств, предлагаются разные варианты комбинаций таксономически инфомативных локусов ДНК. Например, для видов из семейства Didymellaceae комбинация ITS и актин — позволяет разграничивать виды, для которых характерно формирование хламидоспор, а комбинация ITS, β-тубулин и rpb2 обеспечивает наиболее полной информацией ДЛЯ достоверного разграничения даже близкородственных видов фомоидных грибов (Chen et al., 2015; Chen et al., 2017).

По результатам молекулярно-филогенетических анализов, подавляющее большинство видов фомоидных грибов претерпело реклассификацию или переописание. Восстановлены некоторые родовые и видовые эпитеты, описаны новые таксоны. Неясное расположение тех или иных видов и родов на филогенетическом древе, как, например, расположение родов *Ascochyta, Epicoccum, Didymella, Notophoma* в семействе *Didymellaceae*, может свидетельствовать о полифилетичном происхождении группы.

Необходима ревизия имеющихся данных о распространении фомоидных грибов на территории России, а также сбор новой информации, с учётом таксономических новаций.

#### 1.5. Методы исследования фомоидных грибов

Если предложенная Боеремой морфологическая концепция рода критикуется, то описанные им методы изучения фомоидных грибов in vitro являются актуальными и по сей день. Однако, при изучении морфологических признаков фомоидных грибов следует понимать, что оценка этих признаков может позволить заключить лишь предварительный диагноз изучаемого штамма или изолята до морфологической секции (хотя понятием секций в настоящее время в таксономии фомоидных грибов не оперируют, подобная идентификация может быть полезной для составления первичного представления об идентификации изучаемого объекта).

Первым шагом в изучении фомоидных грибов является прижизненное наблюдение структур их бесполого размножения – пикнид и конидий. Наблюдая морфологические признаки in vivo, можно сделать первые выводы о принадлежности наблюдаемого гриба к определённой

секции. Так, например, оценивая структуру стенки пикниды, можно сразу определить принадлежность к секции *Plenodomus* (наличие склеротизированных клеток во внутреннем слое стенки). Оценить клетки стенки пикниды по этому признаку можно, сделав ультратонкий срез и окрасив препарат раствором Люголя, склеротизированные клетки при этом адсорбируют йод и изменят окраску на красный. Иногда такую же реакцию демонстрируют и виды из секции *Sclerophomella* (Boerema et al., 2004).

Чтобы оценить стабильность или вариабельность признаков и проводить корректное изучение фомоидных грибов, очевидно, что необходим сравнительный анализ многих изолятов, как in vivo, так и in vitro.

Выделение грибов рода *Phoma* s. l. в чистую культуру обычно производят с использованием картофельно-сахарозной питательной среды (КСА). Благоприятная для роста рН среды в слабо-кислой зоне, примерно 5,5. Впоследствии для стимуляции спороношения изоляты переносят на овсяную питательную среду (ОА) (Воегета et al., 2004).

В качестве инокулюма обычно используют диск 0,5 мм, взятый с границы колонии, такой метод предпочтительнее, чем создание односпоровой колонии, так как позволяет взять инокулюм содержащий разные варианты конидий, получается «средняя» проба.

Инокулированные чашки Петри инкубируют в темноте при 20-22 °C в течение 7 суток. Следующие 7 суток чашки инкубируют при режиме день-ночь. 13 часов облучения ближним УФ (300-400 нм.) и 11 часов темноты, что стимулирует пигментацию колонии и образование пикнид (Boerema et al., 2004).

При изучении колоний оценивают: диаметр колонии, край колонии, окраску (согласно номенклатуре Райнера) колонии и реверса, матрикса конидии. Вариабельность во внешнем виде и окраске колонии считается нормальной. Наблюдение признаков проводится дважды, второй раз – на 14 сутки инокуляции (Воегета et al., 2004).

Для оценки способности к продукции отдельных метаболитов, на границе активно растущей колонии проводят тест с каплей концентрированного раствора NaOH. Некоторые виды продуцируют бесцветный метаболит Е с антибиотической активностью. При добавлении реактива происходит реакция окисления и метаболит становится пигментированным: α и β. Пигмент α красный при pH<10.5 и сине-зелёный при pH>12.5. Пигмент β жёлтый при pH<3.5 и красный при pH>5.5. При положительной реакции (наличие метаболита) через 10 минут наблюдается зелёная точка или кольцо (пигмент α), которое через час становится красным (пигмент β) (Воегета et al., 2004).

Этот тест также может вызывать изменение окраски других пигментов. Эти пигменты часто выделаются в среду, их окраска может зависеть от рН и они могут изменять окраску при тесте с NaOH. Жёлтый обычно становится красным, красный — фиолетовым или синим. Во

взрослых культурах пигменты часто могут кристаллизоваться в жёлто-зелёные спикулы или красные иглы. Для некоторых видов характерны специфичные кристаллы в форме дендритов. Кроме того, некоторые метаболиты *Phoma* флюоресцируют (Boerema et al., 2004).

При наблюдении пикнид принято оценивать: характер поверхности, особенности их вскрытия, характер стенки пикниды. Пикниды различаются по форме, размеру и цвету. Важными считаются и морфологические признаки конидий форма, размер, характер септированности. Однако эти признаки не стабильны даже в пределах вида и могут широко варьировать.

Некоторые виды в чистой культуре способны формировать покоящиеся структуры, такие как вздутые клетки, хламидоспоры, склероции, микропикниды. Их наличие/отсутствие – важный признак для представителей некоторых секций. Важны их размеры, форма, расположение на мицелии (терминально/интеркалярно) (Воегета et al., 2004).

#### 1.6. Фомоидные грибы – патогены подсолнечника

Фомоидные грибы известны и как фитопатогены, вызывающие заболевания многих экономически значимых сельскохозяйственных культур, в том числе и подсолнечника. Среди этой группы грибов заболевания подсолнечника вызывают вид *Plenodomus lindquistii* – возбудитель фомоза подсолнечника и виды рода *Diaporthe* – возбудители фомопсиса.

Фомоз подсолнечника (чёрная стеблевая пятнистость) — заболевание, которое широко распространено во всех регионах, возделывающих эту культуру (McDonald, 1964; Boerema et al., 1981; Acimovic, 1984; Donald et al., 1987; Maric et al., 1988; Sackston, 1992; Chandreshekar, 1993; Peres, Lefol, 1996; Gulya et al., 1997). В Австралии (Chandrashekar, 1993) и в Китае (Wu et al., 2012) *Plenodomus lindquistii* входит в список карантинных объектов.

Возбудителя заболевания представителя рода *Phoma* выделяли из подсолнечника и определяли его видовую принадлежность по питающему растению. В Канаде *Ph. exigua* Desm. (Miric et al., 1999), в бывшей Югославии – *Ph. herbarum* var. *helianthella* Sacc. (Acimovic, 1984), в Англии – *Ph. oleraceae* var. *helianthi-tuberosi* (Gaudet, Schulz, 1981). Симптомы проявления впервые были описаны на подсолнечнике в Канаде в 1950 году (Miric et al., 1999). В 1970 году Боерема с коллегами (Boerema, 1970) проанализировали и сравнили типовые образцы *Ph. herbarum* и *Ph. oleraceae* var. *helianthi-tuberosi* и сделали заключение, что морфологические признаки *Ph. oleraceae* var. *helianthi-tuberosi* существенно отличаются от таковых у вида *Ph. herbarum* и имеют больше сходства с признаками вида *Ph. lingam* (Tode) Desm. Так, был описан новый вид *Ph. macdonaldii* Воегеma, синонимом к которому стал считаться вид *Ph. oleraceae* var. *helianthi-tuberosi* (Воегеma, 1970). Несколько ранее в 1964 году Фреззи (Frezzi, 1964) установил, что телеоморфной стадией этого вида является вид *Leptosphaeria lindquistii*. В 2012 году в результате изучения молекулярной филогении фомоидных грибов для анаморфной

стадии возбудителя фомоза подсолнечника было предложено новое название – *Plenodomus lidquistii* (Frezzi) Gruyter, Aveskamp & Verkley (de Gruyter et al., 2012). В настоящее время приоритетным родовым эпитетом следует считать *Plenodomus* поскольку это род был описан ранее, чем род *Leptosphaeria*.

Поражение растений подсолнечника фомозом в России впервые зарегистрировано в Краснодарском крае в 1968 году (Алексеева, 1969), и долго считалось ограниченно вредоносным (Якуткин, 2001). Так было показано, что фомоз не вызывал значительного уменьшения урожая и лишь незначительно влиял на масличность семян, поражение растения могло составлять 23-42% (Неделько, 1973). На настоящий момент, считается, что фомоз подсолнечника распространён на территории России повсеместно в регионах, возделывающих эту культуру. В Краснодарском крае (Бородин, Котлярова, 2006; Саукова и др., 2014), в Волгоградской области (Саукова и др., 2018), Тамбовской области (Выприцкая и др., 2010), в Белгородской области, Центрально-чернозёмной зоне и на Северном Кавказе (Якуткин 2001; 2005; 2013).

На настоящий момент по распространённости в России фомоз подсолнечника среди всех болезней занимает лидирующее положение. Повсеместно в Краснодарском крае заболевание было зарегистрировано на вегетирующих растениях в фазе бутонизации в 4,3%, а в фазе физиологической спелости на 83,1% посевов (Бородин, Котлярова, 2006). В Белгородской области в конце вегетации распространение могло составлять до 100% (Якуткин, 2005).

Потери урожая подсолнечника от болезни могли достигать 70% в США (Smolik et al., 1983), 30% в странах Европы (Maric et al., 1987). В России вредоносность фомоза для подсолнечника изучена недостаточно. В основном, она наблюдалась в недоборе урожая у растений с поражёнными стеблями. В модельном эксперименте в тепличных условия, было показано, что наибольший вред растению-хозяину может быть причинён возбудителем заболевания при поражении корневой системы на самых ранних стадиях его развития, когда в результате поражения гибнут всходы или растение не развивается и не переходит в генеративную фазу (Арасланова и др., 2018).

Фомопсис подсолнечника — заболевание, которое также распространено во всех регионах, возделывающих эту культуру (Masirevic, Gulya, 1992; Gulya et al., 1997; Thompson et al., 2011). В перечень карантинных объектов СССР фомопсис подсолнечника был включён в 1986 г. (Якуткин, 1990; Якуткин, Ломовской, 1991; Скрипка 1991). На настоящий момент возбудитель этого заболевания входит в список карантинных объектов, ограниченно распространённых на территории РФ (Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза).

Название болезни – фомопсис подсолнечника, имеет ряд синонимов: серая (Вороненко, Примаковская, 1983; Пономарев, 1989), тёмно-серая (Асітоvіс et al., 1982) и бурая пятнистость, ломкость стеблей (Якуткин, 1993), рак стеблей подсолнечника (Асітоvіс, 1980), ожог фомопсисный (Lamarque, Perny, 1985), гниль фомопсисная (Stoop, 1995).

В России впервые фомопсис подсолнечника был зарегистрирован в 1990 г. в Ставропольском крае (Якуткин, 1991).

В настоящее время государственной службой карантина растений возбудитель фомопсиса подсолнечника зарегистрирован в 11 субъектах Российской Федерации: Белгородской, Волгоградской, Воронежской, Курской, Орловской и Ростовской областях, Краснодарском и Ставропольском краях, а также в республиках: Адыгея, Кабардино-Балкария и Карачаево-Черкесия (Слюсарь, Фираз, 1994; Васютин и др., 2003; Антонова и др., 2006; Андросова, Диденко, 2011; Арасланова и др., 2013).

Возбудитель заболевания был описан как вид *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljc. & M. Petrov, в анаморфной стадии *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljc. & M. Petrov (Muntañola-Cvetković et al., 1985) в бывшей Югославии.

В настоящее время приоритетным родовым эпитетом следует считать *Diaporthe*, поскольку это род был описан ранее, чем род *Phomopsis* (Santos et al., 2010).

Длительное время считалось, что на подсолнечнике развивается единственный вид рода *Diaporthe – D. helianthi*, встречающийся повсеместно в местах возделывания подсолнечника.

Сразу после описания вида возникла гипотеза о том, что не один вид *Diaporthe* может быть задействован в инфекционном процессе и может вызывать фомопсис подсолнечника (Muntañola-Cvetković et al., 1985).

Было показано, что разные изоляты этого вида в чистой культуре могут существенно отличаться по морфолого-культуральным и микроморфологическим признакам, а также соотношению двух типов конидий (α и β) (Maric et al., 1982; Yang, Gulya, 1985; Maric et al., 1987; Lesovoy et al., 1993; Gulya, 1996). Так, например, для одних изолятов было характерно образование в чистой культуре многочисленных пикнид, содержащих как α, так и β конидии, по количеству преобладали первые. Другие изоляты формировали in vitro меньшее количество пикнид, содержащих преимущественно β конидии (Muntañola-Cvetković et al., 1981; Maric et al.,1982).

Отличия между разными изолятами также отмечалась по признаку патогенности. На территории России, например, были идентифицированы две физиологические расы *D. helianthi*, характеризующиеся разной степенью проявления количественного показателя этого признака (Якуткин, 1998). Изоляты из Австралии также имели различия по своим патогенным свойствам (Miric, 2002).

Отмечали также и различия между изолятами разного географического происхождения. Была показана разница в некоторых биологических особенностях между изолятами из США и стран Европы (Gulya et al., 1997).

Тем не менее, несмотря на все наблюдаемые различия между изолятами, был сделан вывод, что все изоляты Diaporthe, выделенные из подсолнечника являются одним видом D. helianthi (Vukojevic et al., 1995).

Традиционно таксономически значимым признаком, использовавшимся ДЛЯ Diaporthe, разграничения видов считались связь c питающим растением микроморфологические признаки спороносных структур. То есть идентификацию, например, вида D. helianthi проводили в первую очередь по симптомам на подсолнечнике и по морфологокультуральным и микроморфологическим признакам in vitro (Якуткин, 1998).

Однако было показано, что микроморфологические признаки нестабильны не только для вида *D. helianthi*, но и для представителей рода в целом, диапазон варьирования этих признаков может перекрываться для представителей разных видов, а связи с питающим растением могут не ограничиваться одним видом.

Идеи о необходимости новой системы признаков, которые позволили бы проводить корректную идентификацию видов *Diaporthe*, начали появляться в начале 2000-х годов. Сначала был сделан вывод о том, что микроморфологические и морфолого-культуральные признаки являются ненадёжными и недостоверными для разграничения видов (van Rensburg et al., 2006). Также было показано, что многочисленные виды рода имеют широкий круг растений-хозяев, а не ограничены одним видом (van Niekerk et al., 2005; Santos, Phillips 2009; Ash et al., 2010). Кроме того одно и то же питающее растение может быть поражено более, чем одним видом *Diaporthe* (Mostert et al., 2001; Santos, Phillips 2009). Так впервые идея отказа от традиционных диагностических признаков как от основных при проведении идентификации видов *Diaporthe* впервые была высказана в 2010 году (Hyde et al., 2010).

Изучение грибов рода *Diaporthe* с помощью методов молекулярной филогении началось в начале 2000-х годов и на настоящий момент рекомендуется осуществлять достоверную идентификацию представителей этого рода до уровня вида именно по молекулярным признакам на основании сравнения нуклеотидных последовательностей филогенетически информативных локусов ДНК: ITS-локус, генов β-тубулина, кальмодулина и EF-1α (Schilder et al., 2005; van Rensburg et al., 2006; Udayanga et al., 2012; Baumgartner et al., 2013; Gomes et al., 2013; Huang et al., 2013; Tan et al., 2013; Gao et al., 2014; Udayanga et al., 2014a; 2014b; Wang et al., 2014). Морфологические, культуральные признаки и связи с питающими растениями рекомендуется использовать в качестве дополнительных признаков при проведении диагностики.

Ревизия рода, проведённая за последние несколько лет, в рамках полифазного подхода к систематике микроорганизмов, основанная на комплексном анализе молекулярно-генетических, микроморфологических, морфолого-культуральных, физиолого-биохимических признаках, позволила в корне изменить взгляды на таксономический статус и границы видов рода *Diaporthe* (Schilder et al., 2005; van Rensburg et al., 2006; Udayanga et al., 2012; Baumgartner et al., 2013; Gomes et al., 2013; Huang et al., 2013; Tan et al., 2013; Gao et al., 2014; Udayanga et al., 2014a; 2014b; Wang et al., 2014). Кроме того, в результате проведенной ревизии рода были уточнены ареалы некоторых фитопатогенных видов, обладающих большим экономическим значением, в том числе существенно изменились взгляды и на фомопсис подсолнечника.

Негласное ощущение того, что подсолнечник в разных регионах планеты могут поражать разные виды *Diaporthe*, со временем становилось всё прочнее и в 2011 году и только подтвердив свои суждения молекулярно-генетическим анализом, исследователи взяли смелость описать три новых для науки вида Diaporthe, которые также наряду с D. helianthi вызывают заболевание подсолнечника (Thompson et al., 2011). Так были описаны три новые для науки вида: D. gulyae R.G. Shivas, S.M. Thompson & A.J. Young, D. kochmanii R.G. Shivas, S.M. Thompson & A.J. Young, D. kongii R.G. Shivas, S.M. Thompson & A.J. Young, которые отличаются друг от друга и от D. helianthi не только по молекулярно-генетическим признакам, но и по морфологическим, а также по агрессивности и патогенности (Thompson et al., 2011). Впоследствии было описано ещё 5 видов: **D. goulteri** R.G. Shivas, S.M. Thomps. & Y.P. Tan, **D.** masirevicii R.G. Shivas, L. Morin, S.M. Thomps. & Y.P. Tan, D. miriciae G. Shivas, S.M. Thomps. & Y.P. Tan, D. sackstonii R.G. Shivas, S.M. Thomps. & Y.P. Tan, D. serafiniae R.G. Shivas, S.M. Thomps. & Y.P. Тап, которые могут поражать подсолнечник (Thompson et al., 2015). Кроме того, в результате ревизии коллекции изолятов Diaporthe, выделенных из поражённых стеблей подсолнечника, было показано, что с этим растением могут быть ассоциированы и другие уже известные науке виды этого рода: D. sojae Lehman (Dissanayake et al., 2017), D. phaseolorum (Cooke & Ellis) Sacc. (Udayanga et al., 2011), D. ambigua Nitschke (Gomes et al., 2013), D. novem J.M. Santos, Vrandečić & A.J.L. Phillips (Santos et al., 2011).

Таким образом, на настоящий момент известно, что с подсолнечником всего могут быть ассоциированы 13 видов рода *Diaporthe*, включая *D. helianthi*. Считается, что разные виды *Diaporthe*, патогенные для подсолнечника, различаются и по агрессивности. Так из возможных 13 видов *Diaporthe*, самым агрессивным на настоящий момент считается вид *D. gulyae* (Thompson et al., 2011). Очевидно, что разные виды требуют как разных профилактических мер, так и разных мер борьбы, однако методических рекомендаций по защите подсолнечника от разных видов *Diaporthe*, на настоящий момент в литературе нет.

Изучение биоразнообразия и географии видов фомоидных грибов в России на подсолнечнике с применением методов молекулярной филогении и с учётом современной систематики **не проводилось**. Данные о видовом составе и распространении отдельных видов, особенно обладающих экономической значимостью, на территории России требуют уточнения. Согласно доступной нам литературе, на территории России, подтверждённые молекулярными исследованиями, из списка фомоидных грибов в настоящий момент известны достоверные находки двух видов *Diaporthe*: *D. eres* на солянке (*Salsola tragus*) (Kolomiets et al., 2009) и *D. phaseolorum* на томате (Гуркина, 2018)

Корректная идентификация фитопатогенных видов грибов, особенно входящих в список карантинных объектов, в том числе и видов фомоидных грибов вызывающих фомоз и фомопсис подсолнечника, обладает несомненной практической значимостью.

Таблица 1. Принадлежность к семействам, порядкам и классам секций рода *Phoma* s. str. и родов фомоидных грибов (*Phoma* s. l.), по Воегета et al., 2004 и их современное таксономическое положение

Таксон по Boerema et al., 2004	Совреме согласно	Ссылка		
	класс	порядок	семейство	
	секция	Phoma s. str.		
Macrospora	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	4
Peyronellaea	_ " _	- " -	_ " _	4
Phoma (частично)	_ " _	- " -	_ " _	4
Phyllostictoides	_ " _	- " -	_ " _	4
Sclerophomella	_ " _	- " -	_ " _	4
Heterospora	- " -	- " -	Leptosphaeriaceae	6
Plenodomus	- " -	- " -	- " -	6
<i>Phoma</i> (частично)	- " -	- " -	- " -	6
Paraphoma	- " -	- " -	Phaeosphaeriaceae	9, 11
Pilosa	- " -	- " -	Pleosporaceae	6, 12
<i>Phoma</i> (частично)	- " -	- " -	Cucurbitariaceae	6
Phoma (частично)	- " -	- " -	Sporomiaceae	6
		род		
Phyllosticta	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	1, 4, 5, 10
		род		
Mycosphaerella	- " -	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	1, 3, 4, 5
Coleophoma (частично)	_ " _	Dothideales	-	4
Coleophoma (частично)	_ " _	Helotiales	-	4
Selenophoma	_ '' _	- " -	-	4
Allantophoma (частично)	_ " _	- " -	-	4
Coniothyrium	- " -	Pleosporales	Coniothyriaceae	9

Продолжение таблицы 1.

Таксон по Boerema et al., 2004	Современное таксономическое положение согласно филогенетическим исследованиям				
	класс	порядок	семейство		
		род			
Pleurophoma	- " -	- " -	Cucurbitariaceae	6	
Pyrenochaeta	- " -	- " -	- " -	6	
Phialophorophoma (частично)	- " -	- " -	- " -	6	
Ascochyta (частично)	- " -	- " -	Didymellaceae	4	
Diplodina (частично)	- " -	- " -	- " -	4	
Microsphaeropsis	- " -	- " -	Microsphaeropsidaceae	6, 13	
Asteromella (частично)	- " -	- " -	Leptosphaeriaceae	6	
Asteromella (частично)	- " -	- " -	Montagnulaceae	8	
Paraconiothyrium	- " -	- " -	Phaeosphaeriaceae	9	
Stagonospora	- " -	- " -	_ " _	9, 11	
Phialophorophoma	- " -	- " -	- " -	6	
		род			
Ascochyta (частично)	_ " _	- " -	Pleosporaceae	8	
Allantophoma (частично)	Sordariomycetes	Diaporthales	-	4	
Coleophoma (частично)	- " -	- " -	-	4	
Diplodina (частично)	- " -	- " -	-	4	
Phomopsis	- " -	- " -	Diaporthaceae	2, 7	

Примечание. Номерами обозначены следующие источники литературы: 1 — Schoch et al., 2006; 2 — Rossman et al., 2007; 3 — Crous et al., 2009; 4 — de Gruyter et al., 2009; 5 — Schoch et al., 2009; 6 — Aveskamp et al., 2010; 7 — Thompson et al., 2011; 8 — de Gruyter et al., 2012; 9 — Quaedvlieg et al., 2013; 10 — Wikee et al., 2013; 11 — Phookamsak et al., 2014; 12 — Ariyawansa et al., 2015b; 13 — Chen et al., 2015.

#### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1. Материал

Исследуемый материал состоял из изолятов фомоидных грибов, полученных автором, коллекции чистых культур и гербарных образцов фомоидных грибов, ассоциированных с дикорастущими сорными растениями семейства *Asteraceae*.

Сбор материала осуществлялся в период с 2015 по 2018 годы. Поражённый фомоидными грибами подсолнечник, был собран на территории 9 субъектов РФ: Санкт-Петербург, Белгородская, Ростовская, Липецкая, Пензенская, Тульская области, Краснодарский, Алтайский и Ставропольский края. Были собраны вегетативные органы подсолнечника с симптомами поражения фомоидными грибами (рис. 1). Собранные образцы хранятся в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (LEP). Также была проанализирована микобиота семян подсолнечника из 9 субъектов РФ: Алтайский, Краснодарский края, Астраханская, Белгородская, Волгоградская, Саратовская, Орловская, Тамбовская, Челябинская области. Семенной материал для обследования, представляющий семена подсолнечника с производственных посевов на опытных полях, был предоставлен сотрудниками центра биологической регламентации пестицидов и сотрудниками Белгородского филиала ФГБНУ ВИЗР.

Коллекция из 29 чистых культур фомоидных грибов, выделенных из поражённых дикорастущих сорных растений семейства *Asteraceae*, собранных в разные годы на территории России и странах бывшего СССР, была создана, поддерживается и хранится старшим научным сотрудником лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР Гасич Е. Л. и дополнена автором (табл. 2).

Материалом для выполнения работы по реидентификации фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых растений семейства *Asteraceae* послужили 28 образцов (Приложение, табл. 1). Образцы были собраны на территории России и стран бывшего СССР с 1895 по 1960 годы. Гербарный материал хранится в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (LEP).



Рисунок 1 — Стебли подсолнечника с пятнистостью, характерной для возбудителя фомоза — гриба *Plenodomus lindquistii* 

Таблица 2. Коллекция фомоидных грибов, выделенная из поражённых дикорастущих растений семейства *Asteraceae* 

№ Изолята	Растение хозяин	Место сбора		
MF 010-002	Ambrosia artemisiifolia	Приморский край, Уссурийский р-н		
MF 010-003	Ambrosia artemisiifolia	Адыгея, Майкопский р-н		
MF 010-006	Ambrosia artemisiifolia	Приморский край, Ханкайский р-н		
MF 010-020	Arctium tomentosum	Хабаровский край, Хабаровский р-н		
MF 010-025	Acroptilon repens	Узбекская ССР, СОС ВИР		
MF 010-026	Taraxacum officinale	Санкт-Петербург, Красносельский р-н		
MF 010-031	Artemisia arctica	Камчатский край, Елизовский р-н		
MF 010-033	Artemisia arctica	Камчатский край, Елизовский р-н		
MF 010-037	Cirsium sp.	Камчатский край, Быстринский р-н		
MF 010-039	Artemisia vulgaris	Санкт-Петербург, Красносельский р-н		
MF 010-042	Cirsium arvense	Ленинградская обл, Гатчинский р-н		
MF 010-049	Cirsium arvense	Ленинградская обл, Ломоносовский р-н		
MF 010-051	Arctium sp.	Пензенская обл, Лунинский р-н		
MF 010-064	Cirsium arvense	Санкт-Петербург, Пушкин		
MF 010-065	Cirsium arvense	Ленинградская обл, Гатчинский р-н		
MF 010-066	Taraxacum officinale	Ленинградская обл, Ломоносовский р-н		
MF 010-067	Taraxacum officinale	Ленинградская обл., Ломоносовский р-н		
MF 010-069	Achillea millefolia	Ленинградская обл, Ломоносовский р-н		
MF 010-071	Taraxacum officinale	Хабаровский край, Хабаровск		
MF 010-075	Artemisia absinthia	Смоленская область, Рыльково		
MF 010-076	Cyclachaena xanthifolia	Адыгея, Майкопский р-н		
MF 010-077	Sonchus arvensis	Ленинградская обл, Гатчинский р-н		
MF 010-078	Sonchus arvensis	Ленинградская обл, Ломоносовский р-н		
MF 010-080	Taraxacum officinale	Санкт-Петербург, Пушкин		
MF 010-081	Phoenix canariensis	Хабаровский край		
MF As16-003	Xanthium sp.	Краснодарский край, Прикубанский р-н		
MF As16-004	Xanthium sp.	Краснодарский край, Прикубанский р-н		
MF As16-005	Xanthium sp.	Краснодарский край, Прикубанский р-н		
MF As16-008	Xanthium sp.	Краснодарский край, Прикубанский р-н		

#### 2.2. Выделение грибов в чистую культуру

Стебли, листья и семена подсолнечника и дикорастущих сложноцветных для последующей изоляции грибов подвергали поверхностной стерилизации. Для этого пробирки с фрагментами растения последовательно промывали 3 минуты в 20 мл раствора, содержащего 2% гипохлорита натрия (NaClO) и 0,1 % натрия додецилсульфата (SDS), далее 5% гипохлоритом натрия, три раза стерильной водой, каждый раз, активно встряхивая в течение 2 мин. и сливая без остатка использованный промывочный раствор. Поверхностно стерилизованные образцы были разложены на картофельно-сахарозную питательную среду (КСА, Samson et al., 2000) с добавлением антибиотиков (ампициллин, стрептомицин, пенициллин) и вещества, ограничивающего рост грибов (Triton X-100). Чашки Петри инкубировали при 24 °C в темноте. Учёт проводили на 7-10 сутки культивирования. Монопикнидиальные изоляты сохраняли в пластиковых микропробирках на косяках КСА при +4 °C. Все изоляты хранятся в коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР (табл. 2, 3).

Таблица 3. Изоляты фомоидных грибов, выделенные из подсолнечника

№ Изолята	Орган	Место сбора	Дата	Симптом
MF Ha15-001, MF Ha15-002, MF Ha15-003	стебли	Липецкая область, Усманский район	10.09.2015	-
MF Ha15-004, MF Ha15-005, MF Ha15-006	стебли	Краснодарский край, Усть-Лабинский район	2015	-
MF Ha15-007	стебли	Белгородская обл, Красно-Яружский район	16.08.2013	-
MF Ha16-001, MF Ha16-002, MF Ha16-054, MF Ha16-075, MF Ha16-076	стебли	Краснодарский край, Славинск-на-Кубани	03.08.2016	чёрные пятна
MF 16-010, MF Ha16-003, MF Ha16-004, MF Ha16-005, MF Ha16-006, MF Ha16-007, MF Ha16-008, MF Ha16-009, MF Ha16-044, MF Ha16-047, MF Ha16-048, MF Ha16-049, MF Ha16-050, MF Ha16-051, MF Ha16-052, MF Ha16-064, MF Ha16-065	стебли	Краснодарский край, Краснодар	02.08.2016	коричневые пятна
MF 16-010, MF Ha16-003, MF Ha16-004, MF Ha16-005, MF Ha16-006, MF Ha16-007, MF Ha16-008, MF Ha16-009, MF Ha16-044, MF Ha16-047, MF Ha16-048, MF Ha16-049, MF Ha16-050, MF Ha16-051, MF Ha16-052, MF Ha16-064, MF Ha16-065	стебли	Краснодарский край, Краснодар	02.08.2016	коричневые пятна
MF Ha16-010, MF Ha16-011, MF Ha16-026, MF Ha16-027, MF Ha16-028, MF Ha16-053	стебли	Ростовская область, Морозовский район	август2016	чёрные пятна
MF Ha16-012	стебли	Алтайский край, Петропавловский район	24.08.2016	коричневые пятна
MF Ha16-013, MF Ha16-045, MF Ha16-046	стебли	Краснодарский край, Павловский район	август2016	чёрные пятна
MF Ha16-014	стебли	-	август2016	чёрные пятна
MF Ha16-015, MF Ha16-016	стебли	Краснодарский край, посёлок Северный	31.07.2016	чёрные пятна
MF Ha16-017, MF Ha16-018, MF Ha16-019, MF Ha16-020, MF Ha16-021, MF Ha16-022, MF Ha16-023, MF Ha16-024, MF Ha16-025	стебли	Краснодарский край, Краснодар	02.08.2016	чёрные пятна

# Продолжение таблицы 3.

№ Изолята	Орган	Место сбора	Дата	Симптом
MF Ha16-029, MF Ha16-030, MF Ha16-031, MF Ha16-032, MF Ha16-033, MF Ha16-034, MF Ha16-037	стебли	Краснодарский край, станица Динская	31.07.2016	чёрные пятна
MF-Ha16-035, MF-Ha16-036	стебли	Краснодарский край, посёлок Октябрьский	31.07.2016	коричневые пятна
MF Ha16-039, MF Ha16-055, MF Ha16-056	стебли	Краснодарский край, станица Новомышастовская	05.08.2016	чёрные пятна
MF Ha16-040, MF Ha16-041, MF Ha16-042, MF Ha16-043, MF Ha16-057, MF Ha16-058	стебли	Краснодарский край, станица Пластуновская	31.07.2016	коричневые пятна
MF Ha16-059, MF Ha16-060, MF Ha16-061, MF Ha16-062, MF Ha16-063	стебли	Краснодарский край, посёлок Октябрьский	31.07.2016	коричневые пятна
MF Ha16-066, MF Ha16-067, MF Ha16-068	стебли	Пензенская область, Белинский район	сентябрь 2016	коричневые пятна
MF Ha16-070, MF Ha16-071, MF Ha17-072, MF Ha17-073, MF Ha17-074	стебли	Пензенская область, Пензенский район	30.09.2016	коричневые пятна
MF Ha17-001, MF Ha17-002, MF Ha17-003, MF Ha17-004, MF Ha17-006, MF Ha17-007, MF Ha17-010, MF Ha17-011, MF Ha17-012, MF Ha17-013, MF Ha17-015	стебли	Ставропольский край, Советский район	август 2017	чёрные пятна
MF Ha17-005, MF Ha17-008, MF Ha17-009, MF Ha17-014, MF Ha17-020, MF Ha17-021, MF Ha17-022, MF Ha17-023, MF Ha17-024, MF Ha17-025, MF Ha17-037, MF Ha17-038, MF Ha17-039	стебли	Ставропольский край	август 2017	чёрные пятна
MF Ha17-016, MF Ha17-017	стебли	Ростовская область	июль 2017	чёрные пятна
MF Ha17-019	стебли	Краснодарский край, Динской район	август 2017	чёрные пятна
MF Ha17-026, MF Ha17-027, MF Ha17-028, MF Ha17-029, MF Ha17-030, MF Ha17-031, MF Ha17-032, MF Ha17-033, MF Ha17-034, MF-Ha17-035, MF-Ha17-036	стебли	Ростовская область, Октябрьский район	август 2017	чёрные пятна

# Продолжение таблицы 3.

№ Изолята	Орган	Место сбора	Дата	Симптом
MF Ha17-041, MF Ha17-042, MF Ha17-043	семена	Белгородская область, Шебекинский район	август 2017	-
MF Ha17-044, MF Ha17-045, MF Ha17-046, MF Ha17-047, MF Ha17-048, MF Ha17-049, MF Ha17-050, MF Ha17-051, MF Ha17-052,	стебли	Белгородская область, Чураево	август 2017	чёрные пятна
MF Ha17-053, MF Ha17-054, MF Ha17-055, MF Ha17-056, MF Ha17-057, MF Ha17-058, MF Ha17-059, MF Ha17-060	стебли	Белгородская область, Чураево	август 2017	чёрные пятна
MF Ha18-001, MF Ha18-002, MF Ha18-003	стебли	Санкт-Петербург, Бухарестская улица	2017	чёрные пятна
MF Ha18-004, MF Ha18-005, MF Ha18-006, MF Ha18-007, MF Ha18-007, MF Ha18-008, MF Ha18-009, MF Ha18-010, MF Ha18-011, MF Ha18-012, MF Ha18-013, MF Ha18-014, MF Ha18-015, MF Ha18-016, MF Ha18-017, MF Ha18-018, MF Ha18-019, MF Ha18-020, MF Ha18-021, MF Ha18-022, MF Ha18-023, MF Ha18-024, MF Ha18-045, MF Ha18-046	стебли	Белгородская область, Чураево	август 2018	чёрные пятна
MF Ha18-025, MF Ha18-026, MF Ha18-027, MF Ha18-028, MF Ha18-029, MF Ha18-030, MF Ha18-031, MF Ha18-032, MF Ha18-033, MF Ha18-034, MF Ha18-035, MF Ha18-036, MF Ha18-037, MF Ha18-038, MF Ha18-040, MF Ha18-041, MF Ha18-042, MF Ha18-043, MF Ha18-044	стебли	Тульская область, Ефремовский район	август 2018	чёрные пятна
MF Ha18-047	семена	Челябинская область, Троицкий район	август 2018	-

#### 2.3. Изучение морфологических признаков

Для изучения морфологии колоний фомоидных грибов, изоляты выращивали на двух питательных средах: КСА и овсяной (ОА) (Dhingra, Sinclair, 1995). Инокулированные чашки Петри инкубировали в темноте при 20-22° С в течение 7 суток. На вторую неделю чашки инкубировали, облучая 13 ч. в сутки УФ (эритемные лампы ЛЭ-30, максимум излучения 310-320 нм) (Воегета et al., 2004). Учёт признаков проводился на 7 и на 14 сутки роста колонии.

Таксономически значимые признаки пикнид и конидий, полученных на ОА, анализировали с помощью методов световой микроскопии. Микроскопирование осуществляли с использованием микроскопа Микромед 3 (Санкт-Петербург) и бинокулярной лупы (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии были сделаны с использованием микроскопа Olympus BX53 и бинокулярной лупы Olympus SZX16 (Olympus, Япония).

Для идентификации изолятов *Phoma* s. str. использовали руководство по определению фомоидных грибов (Boerema et al., 2004), идентификацию изолятов *Diaporthe* spp. осуществляли согласно признакам, указанным в статьях (Gomes et al., 2013; Thompson et al., 2011; 2015; Udayanga et al., 2014a; 2014b). Современные видовые и родовые эпитеты уточнены согласно базе данных Mycobank и данным, представленным в научных статьях (Schoch et al., 2006; Rossman et al., 2007; Crous et al., 2009; de Gruyter et al., 2009; Schoch et al., 2009; Aveskamp et al., 2010; Thompson et al., 2011; 2015; de Gruyter et al., 2012; Quaedvlieg et al., 2013; Wikee et al., 2013; Phookamsak et al., 2014; Ariyawansa et al., 2015a; 2015b; Chen et al., 2017; Udayanga et al., 2014a; 2014b; Wijayawardene et al., 2016; Valenzuela-Lopez et al., 2018).

Приготовление постоянных препаратов, демонстрирующих характерные морфологические структуры и признаки, осуществляли с помощью фиксации временного препарата в 50% растворе молочной кислоты (Дудка и др., 1982).

#### 2.4. Молекулярно-генетические методы

## 2.4.1. Экстракция ДНК

Выделение ДНК из чистых культур фомоидных грибов осуществляли согласно стандартному методу с использованием цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) и хлороформа (Doyle, Doyle, 1990). Выделение ДНК грибов из гербарных образцов осуществляли тем же методом, но с некоторыми изменениями.

#### 2.4.2. Амплификация ДНК

Для секвенирования таксономически информативных локусов и идентификации фомоидных грибов были амплифицированы: область внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS-локус) и большой субъединицы рибосомы (LSU) рДНК, гены β-тубулина и фактора элонгации трансляции 1α (EF-1α) с соответствующими парами праймеров: ITS1 (White et al., 1990) или ITS1F (Gardes, Bruns, 1993), ITS4 (White et al., 1990); LR0R (Rehner, Samuels, 1994),

LR5 (White et al., 1990), βtub2Fw, βtub4Rd (Aveskamp et al., 2009) или T1, T2 (O'Donnell, Cigelink, 1997), EF1-728F, EF1-986R (Carbone, Kohn, 1999).

Реакции были проведены согласно следующему протоколу: каждая ПЦР-смесь (25 мкл) содержала: дезоксинуклеозидтрифосфаты (200 мкМ), каждый праймер (0,5 мкМ), Таq-полимераза (1 ед.), буфер для полимеразы с ионами Mg2+ и NH4+ и анализируемая ДНК (1–10 нг).

ДНК амплифицировали согласно следующему протоколу: преденатурация ДНК при 94 °C, 2 мин.; 92 °C 50 с.; 55 °C, 40 с. (ITS1, ITS1F/ITS4; T1/T2), 52 °C, 50 с. (LR0R/LR5), 52 °C, 40 с. (βtub2Fw/βtub4Rd), 55 °C, 60 с. (EF1-728F/EF1-986R), элонгация 72 °C в течение 75 с.; финальный синтез 3-5 мин. при 72 °C; количество циклов – 30.

#### 2.4.3. Визуализация продуктов амплификации

Визуализацию продуктов ПЦР производили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием и маркером молекулярного веса GeneRuler 100bp, оценку концентрации полученных продуктов – с маркером MassRuler 100bp при 100 V, в течение 40–50 мин.

## 2.4.4. Секвенирование ДНК

Для последующего за амплификацией секвенирования, согласно стандартному протоколу (Boyle, Lew, 1995) производили очистку ДНК. Очищенные фрагменты секвенировали по методу Сэнгера (1977) на секвенаторе ABIPrism 3500 (Applied Biosystems – Hitachi, Япония) в соответствии с протоколами производителя с использованием набора реактивов с флуоресцентно меченными дезоксинуклеозидтрифосфатами BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, CША).

#### 2.4.5. Анализ нуклеотидных последовательностей

Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalX 1.8 (Тhompson et al., 1997), после чего 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 (Stamatakis et al., 2006). Надёжность топологии дендрограммы была оценена с помощью бутстреп-анализа с 1000 повторностей. В качестве референсных были использованы полученные из базы данных GenBank последовательности ITS-области рДНК, генов β-тубулина и EF-1α (Приложение, табл. 2). Все полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных GenBank (Приложение, табл. 3).

#### 2.5. Искусственная инокуляция растений

#### 2.5.1. Изучение субстратной специализации изолятов фомоидных грибов

Оценка патогенности и субстратной специализации 19 изолятов фомоидных грибов, выделенных из поражённых растений подсолнечника и близкородственных видов сложноцветных растений из трибы *Heliantheae* — дурнишника, топинамбура и амброзии полыннолистной (табл. 4) проводилась в отношении подсолнечника гибрида F1 Тунка (селекция компании Limagren, Франция) и дурнишника, топинамбура, амброзии полыннолистной.

Растения выращивали из семян (подсолнечник, амброзия полыннолистная, дурнишник) и клубней (топинамбур) на световой установке.

Таблица 4. Виды и изоляты фомоидных грибов, использованные для инокуляции подсолнечника и близкородственных ему видов сложноцветных растений

Вид гриба	№ Изолята			
растение-хозяин – Helianthus annuus				
Plenodomus lindquistii	MF Ha15-001, MF Ha16-001, MF			
1 tenodomus tinaquistit	Ha16-005			
Diaporthe gulyae	MF Ha17-042, MF Ha17-043			
Diaporthe eres	MF Ha18-001, MF Ha18-002			
Diaporthe phaseolorum	MF 16-010			
Diaporthe sp.	MF Ha18-045, MF Ha18-046			
Didymella glomerata	MF Ha17-016, MF Ha17-017			
Растение-хозяин – Xanthium sp.				
Didymella americana	MF As16-003, MF As16-004			
Stagonosporopsis sp.	MF As16-005, MF As16-008			
Pастение-хозяин – Ambrosia artemisiifolia				
Stagonosporopsis heliopsidis	MF 010-002, MF 010-006			
Didymella americana	MF 010-003			

Инокуляция интактных растений была проведена согласно методу, часто применяемому для подсолнечника при изучении патогенности фомоидных грибов (Miric et al., 1999). Растения были инокулированы на стадии развития R1-R2 (6-8 пар настоящих листьев, начало бутонизации) (Schneiter, Miller, 1981) в трёхкратной повторности.

В качестве инокулуюма использовали агаровые блоки размером 5 мм, высеченные из 10-дневной чистой культуры гриба, выращенной на овсяной питательной среде (ОА). Агаровые

блоки были помещены на листья и стебли в случае подсолнечника, как с предварительным ранением, так и без. При инокуляции близкородственных видов (дурнишник, топинамбур, амброзия полыннолистная) инюкуляцию осуществляли только с предварительным ранением.

В качестве отрицательного контроля были взяты растения, инокулированные блоками, высеченными из чистой питательной среды. Учёт размеров некрозов производили на 4-5 сутки после инокуляции. Впоследствии для подтверждения постулатов Коха, из заражённых растений был выделен возбудитель и произведена его идентификация.

#### 2.5.2. Изучение органотропной специализации Plenodomus lindquistii

Для изучения особенностей инфицирования *P. lindquistii* (на примере изолятов MF Ha15-001, MF Ha16-005), лабораторные растения подсолнечника на стадии R1-R2 с предварительным ранением и без него были инокулированы суспензией пророщенных в 1% растворе сахарозы спор, концентрация 10<sup>5</sup> на мл., а также блоками 5 мм, высеченными из 10-дневной чистой культуры гриба, выращенной на ОА. Блоки и капли суспензии спор (5 мкл) были помещены на лист, черешок листа, влагалище листа, стебель (рис. 2). Инокулированные растения инкубировали в постоянных контролируемых условиях в климатической камере при температуре 24 °C, 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.



Рисунок 2 - Растения подсолнечника, инокулированные дисками, высеченными из чистой культуры *Plenodomus lindquistii* 

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

#### 3.1. Оптимизация методики выделения ДНК из гербарных образцов фомоидных грибов

Материалом для разработки и оптимизации методики выделения ДНК из фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых растений семейства *Asteraceae* послужили пикниды фомоидных грибов из чистых культур и относительно свежего гербарного материала (возраст 1-12 лет).

Оптимизация методики выделения ДНК была проведена в нескольких направлениях: выбор протокола экстракции, способ гомогенизации материала, объём лизирующего буфера, добавляемого до гомогенизации. Эти этапы были осуществлены на пикнидах фомоидных грибов, полученных из чистой культуры. Определение количества пикнид, из которых рекомендуется выделять ДНК, было проведено с использованием в качестве материала пикнид из чистых культур и гербарных образцов.

После проведённых этапов оптимизации методика была опробована на 28 гербарных образцах растений семейства сложноцветные, поражённых фомоидными грибами, возрастом от 60 до 124 лет, хранящихся в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (LEP).

На первом этапе были протестированы три протокола экстракции ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов растений семейства сложноцветные: стандартный метод с применением ЦТАБ и хлороформа, модифицированный протокол со ЦТАБ и хлороформом (Sarkinen et al., 2012) и экстракция с использованием мочевины (Sarkinen et al., 2012), каждый на 4 образцах. После проведения качественной оценки результатов выделения ДНК, было показано, что при использовании стандартного протокола ЦТАБ/хлороформ из 4 в трёх случаях экстракция ДНК прошла успешно (рис. 3). При использовании модифицированного протокола ЦТАБ/хлороформ и метода экстракции с использованием мочевины целевого продукта амплификации не было обнаружено ни в одной пробе (рис. 4).

Поскольку из трёх опробованных методик только стандартный способ экстракции ДНК с применением ЦТАБ и хлороформа был применён успешно, производилась оптимизация именно этого метода экстракции ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых растений.

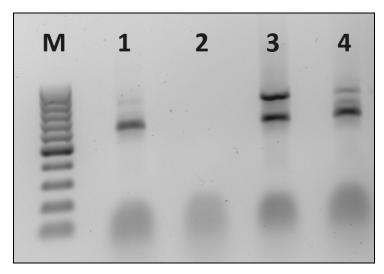


Рисунок 3 – Экстракция ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых растений с использованием ЦТАБ и хлороформа

М – маркер молекулярного веса.

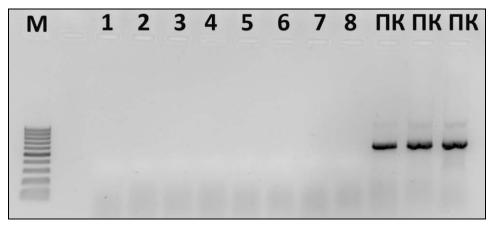


Рисунок 4 — Экстракция ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых растений согласно модифицированному протоколу с использованием ЦТАБ и хлороформа и экстракции с помощью мочевины

М – маркер молекулярного веса;

1-4 экстракция ДНК гриба согласно модифицированному протоколу с использованием ЦТАБ и хлороформа;

5-8 – экстракция ДНК гриба с помощью мочевины;

ПК – положительный контроль.

Для выбора способа гомогенизации материала для последующей экстракции ДНК, лизис клеточных стенок образцов был проведён двумя путями: механическим и воздействием высоких температур. Для разрушения температурой пикниды инкубировали в термостате при

температуре 80-90° С в течение часа. Механически пикниды разрушали вручную с применением пестика с добавлением оксида алюминия в качестве абразива.

Усовершенствование способа механической гомогенизации сухого и предварительно увлажнённого материала осуществлялось с использованием для размола гомогенизатора (шаровая мельница Retsch MM400) и шариков разного материала и диаметра (металлические диаметром 0,5 см, стеклянные 0,5-0,7 и 0,3-0,5 мм).

Было показано, что механический способ эффективнее, чем воздействие высоких температур. Так из 8 образцов, которые были гомогенизированы пестиком, ДНК была успешно выделена и амплифицирована в 5 случаях (рис. 5). Из тех 8 образцов, которые подвергались нагреву - в 3, и в этих случаях количество целевого продукта было незначительным (рис. 5).

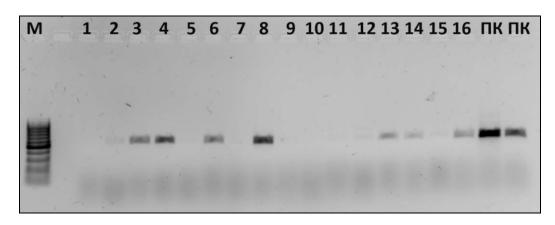


Рисунок 5 – Экстракция ДНК фомоидных грибов из пикнид. Разные способы лизиса клеточной стенки

- М маркер молекулярного веса;
- 1-8 механическая гомогенизация материала;
- 9-16 воздействие высоких температур;
- ПК положительный контроль.

При гомогенизации сухих и предварительно увлажнённых лизирующим буфером пикнид с использованием шаровой мельницы, всего в 13 случаях ДНК была выделена успешно (рис. 6). Было показано, что наибольшее количество ДНК, о чём свидетельствует наибольшее количество целевого продукта, выделилось при гомогенизации смоченных пикнид стеклянными шариками как диаметром 0,3-0,5 мм, так и диаметром 0,5-0,7 мм (рис. 6). В дальнейшем для размола были использованы шарики 0,3-0,5 мм как наиболее эффективные.

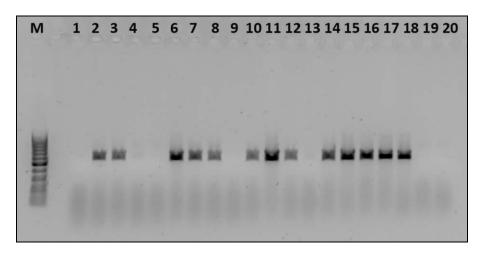


Рисунок 6 – Экстракция ДНК фомоидных из пикнид. Разные способы гомогенизации материала

- М маркер молекулярного веса;
- 1, 9 сухой образец, пестик;
- 5, 13 увлажнённый образец, пестик;
- 2, 3, 10, 11 сухой образец, стеклянные шарики диаметр 0,3-0,5 мм;
- 6, 7, 14, 15 увлажнённый образец, стеклянные шарики диаметр 0,3-0,5 мм;
- 17, 19 сухой образец, стеклянные шарики диаметр 0,5-0,5 мм;
- 18, 20 увлажнённый образец, стеклянные шарики диаметр 0,5-0,5 мм;
- 4, 12 сухой образец, металлические шарики диаметр 0,5 см;
- 8, 16 увлажнённый образец, металлические шарики диаметр 0,5 см;

Одним из шагов в оптимизации методики выделения ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых растений, была оценка того объёма лизирующего буфера, который необходимо добавлять, предваряя этап гомогенизации. Всего было опробовано три варианта объёма буфера, вносимого до гомогенизации: 10, 25 и 50 мкл. После гомогенизации вносили остальную часть буферного раствора для доведения его объёма до 100 мкл.

В результате эксперимента с разным количеством предварительного добавленного лизирующего буфера, успешная экстракция прошла в 3 образцах из 4 (рис. 7) при изначальном количестве лизирующего буфера 10 и 25 мкл и в одном случае — при 50 мкл. Так как оптимальный объём предварительно добавленного ЦТАБ-буфера оказался в диапазоне от 10 до 25 мкл, в дальнейшем экстракцию проводили, пользуясь полученными данными, добавляя в каждую пробу 25 мкл лизирующего буфера.

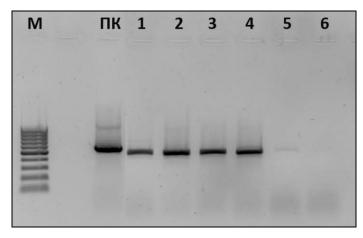


Рисунок 7 – Экстракция ДНК фомоидных грибов из пикнид. Разный исходный объем лизирующего ЦТАБ – буфера

М – маркер молекулярного веса;

- 1, 4 исходный объём лизирующего буфера 10 мкл;
- 2, 5 исходный объём лизирующего буфера 25 мкл;
- 3, 6 исходный объём лизирующего буфера 50 мкл;

ПК – положительный контроль.

Таким образом, в результате проведённой работы по оптимизации гомогенизации материала перед экстракцией ДНК можно сделать следующее заключение: гомогенизацию следует проводить с помощью шаровой мельницы с использованием стерильных стеклянных шариков диаметром 0,3-0,5 мм, предварительно материал следует увлажнить добавлением 10-25 мкл лизирующего ЦТАБ-буфера. Гомогенизацию осуществляют в течение 10 минут при скорости 30 об./сек.

Чтобы понимать из какого числа пикнид гарантированно успешно происходит экстракция ДНК, была совершена попытка выделения ДНК из разного количества пикнид (1, 3, 5 10 шт.). Из одной пикниды экстракция прошла успешно в трёх образцах из восьми (рис. 8). В той или иной степени успешно экстракция была проведена во всех случаях при экстракции из трёх, пяти и десяти пикнид. Таким образом, можно заключить, что ДНК фомоидных грибов из чистых культур можно экстрагировать из одной пикниды, но более стабильно экстракция происходит при наличии в пробе 5–10 пикнид.

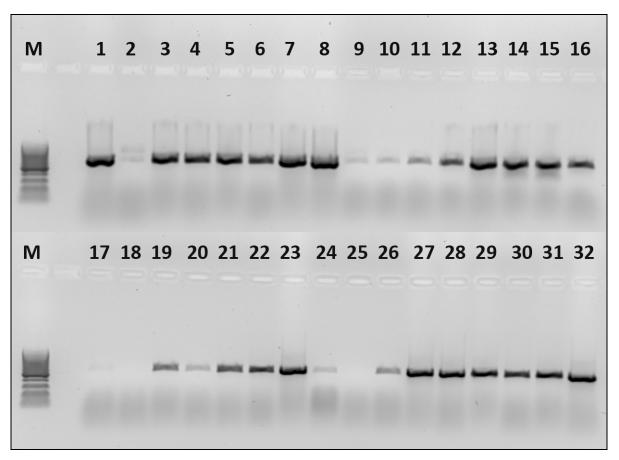


Рисунок 8 – Экстракция ДНК фомоидных грибов из разного количества пикнид

М – маркер молекулярного веса;

1, 2, 9, 10, 17, 18, 25, 26 – одна пикнида;

3, 4, 11, 12, 19, 20, 27, 28 – три пикниды;

5, 6, 13, 14, 21, 22, 29, 30 – пять пикнид;

7, 8, 15, 16, 23, 24, 31, 32 – десять пикнид.

Поскольку качество и сохранность ДНК грибов в свежих пикнидах, полученных в чистой культуре и пикнид из гербарных образцов, очевидно, различаются, была совершена попытка экстракции ДНК из разного количества пикнид (3, 5, 10) из свежих гербарных образцов (продолжительность хранения 1-12 лет).

Успешная экстракция ДНК гриба была отмечена не во всех пробах. Размер продукта, который получается после амплификации ITS-локуса, для грибной ДНК составляет 500-600 п. н. В большинстве проб амплифицировался фрагмент большего размера, который, очевидно, относится к растительной ДНК, которая неизбежно оказалась в пробе (размер фрагмента 900-1000 п. н.) (рис. 9). Из 24 проб целевой фрагмент обнаруживался в 11 случаях (рис. 9).

Из трёх пикнид экстракция прошла в двух пробах из восьми (рис. 9), но количество целевого ампликона визуально было очень низким. Из пяти пикнид ДНК была успешно экстрагирована в 6 пробах (рис. 9), из 10 пикнид – в 4 пробах (рис. 9). При увеличении числа

пикнид в пробе увеличивалось количество ампликона, получаемого в результате проведения ПЦР с тестируемыми экстрактами ДНК. Таким образом, для экстракции ДНК из гербарных образцов необходимо иметь минимум 5-10 пикнид.

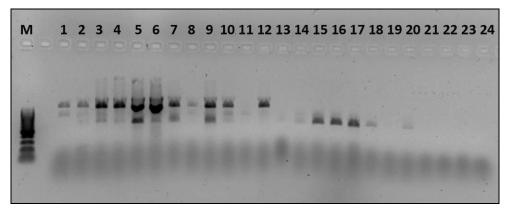


Рисунок 9 – Экстракция ДНК фомоидных грибов из поражённых относительно свежих гербаризованных растений. Разное количество пикнид

М – маркер молекулярного веса;

- 1, 2, 7, 8, 13, 14, 19, 20 три пикниды;
- 3, 4, 9, 10, 15, 16, 21, 22 пять пикнид;
- 5, 6, 11, 12, 17, 18, 23, 24 десять пикнид.

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

Для качественной оценки результатов экстракции ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов проводили амплификацию ITS-локуса рДНК. Оптимизация протокола амплификации грибной ДНК происходила в нескольких направлениях: использование разных специфичных для аскомицетов пар праймеров, использование двойной амплификации, переамплификации целевых фрагментов.

Поскольку в пробу неизбежно попадал помимо грибного и растительный материал, для минимизации количества нецелевого продукта (амплифицировавшейся ДНК растений) амплифицировали последовательность ITS-области с парой праймеров ITS1F/ITS4, в которой праймер ITS1F является специфичным для сумчатых грибов, однако амплификация с ДНК растений в небольших количествах может наблюдаться.

Для того, чтобы увеличить количество целевого амплифицировавшего фрагмента ДНК фомоидного гриба, были применены методики двойной амплификации и переамплификации амплифицировавшихся фрагментов ITS-областей. Суть двойной амплификации заключалась в том, что ПЦР проводили последовательно два раза. Во второй раз в качестве матрицы для синтеза цепей ДНК использовали продукт, полученный в ходе первой амплификации.

Методика переамплификации заключалась в том, что согласно стандартному протоколу проводили очистку амплифицировавшегося целевого фрагмента и осуществляли следующий этап амплификации, используя в качестве матрицы очищенный продукт.

Исходя из рисунка 10, очевидно, что использование двойной амплификации приводило к минимизации количества амплифицированной ДНК растительного происхождения (фрагмент бо́льшего размера 800-900 п. н.) и к увеличению количества амплификата грибной ДНК (фрагмент меньшего размера 500-600 п. н.). Так, в 5 случаях из 9 количество побочного продукта было очевидно меньше (дорожки 1, 2, 5, 7, 8). В двух случаях (дорожки 7 и 9) после второй амплификации был обнаружен целевой продукт, который не амплифицировался в результате первой.

Переамплификация целевых фрагментов – более трудоёмкая и времязатратная методика, но исходя из рисунков 11 и 12, её преимущества также были очевидны: количество нецелового фрагмента было меньше, а количество целевого – больше.

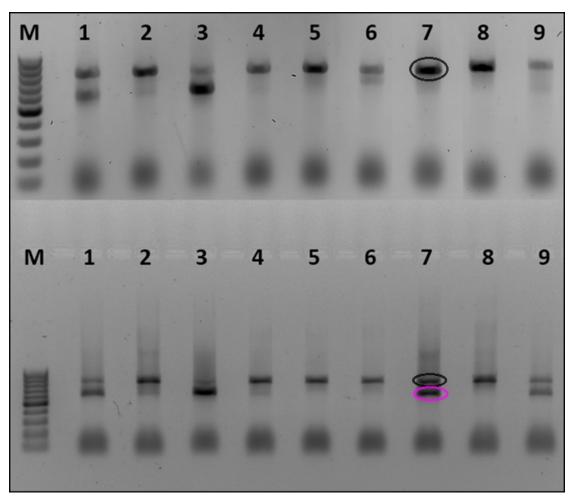


Рисунок 10 – Обычная и двойная амплификации последовательностей ITS-локуса из ДНК гербаризованных образцов

М – маркер молекулярно веса;

Верхняя часть – первая амплификация;

Нижняя часть – вторая амплификация.

Чёрным отмечен продукт амплификации растительной ДНК, розовым – грибной.

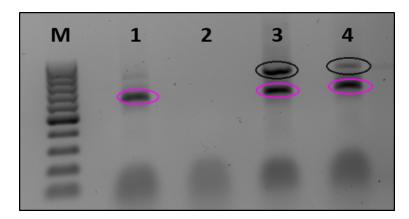


Рисунок 11 – Визуализация результатов первой амплификации

М – маркер молекулярного веса.

Чёрным отмечен продукт амплификации растительной ДНК, розовым – грибной.

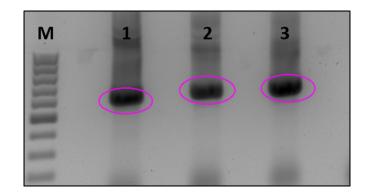


Рисунок 12 — Визуализация результатов второй амплификации после очистки целевых фрагментов

М – маркер молекулярного веса.

Розовым отмечен продукт переамплификации грибной ДНК.

При работе с гербарными образцами возрастом 60-124 года были применены методики, выбранные в ходе описанных выше экспериментов. Оптимизированный протокол экстракции ДНК ЦТАБ/хлороформ методом был следующим: количество пикнид — 10, исходный объём лизирующего буфера в пробе — 25 мкл, гомогенизация стеклянными шариками 0,3-0,5 мм на шаровой мельнице.

Всего была осуществлена попытка выделить ДНК из пикнид 16 образцов поражённых растений. Успешная экстракция ДНК гриба была осуществлена из 11 проб, в то время как во всех 16 пробах после экстракции амплифицировался фрагмент растительной ДНК (рис. 13).

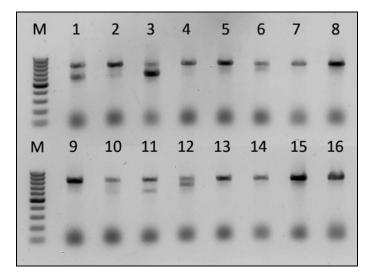


Рисунок 13 – Экстракция ДНК фомоидных грибов из гербарных образцов M – маркер молекулярного веса.

#### 3.3. Конструирование и тестирование специфичных праймеров

Поскольку при экстракции ДНК из гербарных образцов поражённых фомоидными грибами растений поверхностную стерилизацию материала провести не представляется возможным, наряду с ДНК фомоидных грибов, неизбежно 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 этого избежать, необходимо использовать специфичные для фомоидных грибов праймеры для проведения ПЦР и последующего секвенирования. Большая часть наиболее распространённых фомоидных грибов входит в состав семейства *Didymellaceae*, поэтому целесообразной представляется разработка праймеров, ограничив их специфичность этим семейством.

Одним из наиболее информативных и популярных локусов ДНК для таксономических исследований среди фомоидных представителей семейства *Didymellaceae* является ITS область рДНК.

С помощью программы Primer3plus, была сконструирована пара праймеров Did2F/Did2R (atctcttggttctggcatcg, actgcgctccgaaatcaatac). Амплификацию предложенных праймеров осуществляли в формате touchdown согласно следующему протоколу: преденатурация 94 °C, 2 мин.; 92° С 50 с; 69 °C, 40 с (первые 10 циклов) или 64 °C, 40 с (20 циклов), 72 °C, 75 с; финальный синтез 3-5 мин. при 72 °C, ожидаемый размер фрагмента – 250-300 п. н.

Для оценки специфичности этой пары праймеров, была проведена ПЦР с ДНК 4-х представителей разных групп грибов: *Microdochium* sp. (порядок *Xylariales*), *Fusarium* sp. (*Hypocreales*), *Ulocladium* sp. (*Pleosporales*), *Hirsutella* sp. (*Hypocreales*) и ДНК 4-х родов фомоидных грибов из семейства *Didymellaceae*: *Ascochyta* sp., *Stagonosporopsis* sp., *Didymella* sp., *Boeremia* sp.

В результате была подтверждена ожидаемая специфичность праймеров Did2F/Did2R (рис. 14). Целевой фрагмент размером 250-300 п. н. образовывался лишь у грибов из этого семейства и не формировался у представителей других групп аскомицетов.

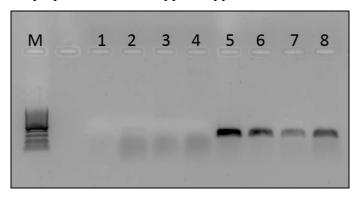


Рисунок 14 — Результаты амплификации ITS-области рДНК представителей разных родов аскомицетов с праймерами, специфичными для родов семейства *Didymellaceae* М — маркер молекулярного веса.

- 1 Microdochium sp.; 2 Fusarium sp.; 3 Ulocladium sp.; 4 Hirsutella sp.;
- 5 Ascochyta sp.; 6 Stagonosporopsis sp.; 7 Didymella sp.; 8 Boeremia sp.

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

Одним из методов для проведения корректной экспресс-диагностики видов фитопатогенных грибов является ПЦР с видоспецифичными праймерами. На настоящий момент не существует праймеров, специфично амплифицирующих ДНК возбудителя фомоза подсолнечника, относящегося к виду *P. lindquistii*.

Из коллекции, насчитывающей 177 изолятов, которые по морфологическим признакам были идентифицированы, как вид *P. lindquistii* для четырёх (МF-Ha15-001, MF-Ha16-001, MF-Ha16-004, MF-Ha16-005), были определены нуклеотидные последовательности ITS-локуса рДНК. Полученные четыре нуклеотидные последовательности были идентичны последовательности ITS-локуса штамма CBS 381.67, который был выделен из типового образца *P. lindquistii*. Было подтверждено, что все наши четыре изолята являются видом *P. lindquistii*.

На основании полученных сиквенсов *P. lindquistii*, с помощью программного обеспечения Primer3plus были сконструированы 3 пары праймеров (табл. 5), потенциально

специфично амплифицирующих ITS-локус рДНК вида *P. lindquistii*. Амплификацию с предложенными праймерами осуществляли согласно следующему протоколу: преденатурация 94 °C, 2 мин.; денатурация 92 °C 50 с; отжиг праймеров 30 с при соответствующей температуре; элонгация 72 °C, 30 с; финальный синтез 3-5 мин. при 72 °C. Количество циклов 30.

Таблица 5. Новые пары праймеров для специфичной амплификации ITS-локусов рДНК Plenodomus lindquistii

Название	Нуклеотидная	Температура	Ожидаемый размер
праймера	последовательность, 5`→3`	отжига, °С	ампликона, п.н.
LepliF	CTGGGTCTTTTGCTCCATGT	60.1	104
LepliR	TTTTGTCCTATCGGCGGG	61.9	101
LepliF2	TGCTCCATGTACCAGCTCA	58.9	178
LepliR2	CGATGCCAGAACCAAGAGAT	60.2	1,0
LepliF3	TCCATGTACCAGCTCACCTC	58.7	250
LepliR3	TGTGCGTTCAAAGATTCGAT	59.3	230

Для оценки специфичности праймеров в качестве положительного контроля использовали ДНК 8 изолятов *P. lindquistii*, в качестве отрицательного контроля – ДНК следующих грибов: *Armillaria* sp., *Ascochyta* sp., *Boeremia exigua*, *Colletotrichum floriniae*, *Diaporthe gulyae*, *D. eres*, *Didymella glomerata*, *D. sinensis*, *Fusarium avenaceum*, *Ganoderma* sp., *Plenodomus biglobosus*, *P. lingam*, *Paraphoma melnikii*, *Pyrenochaeta acicola*, *Stagonosporopsis inoxydabilis*, *Ulocladium atrum*.

В результате оценки специфичности этих пар праймеров была подтверждена ожидаемая специфичность в отношении *P. linduistii* для двух пар праймеров: LepliF2/LepliR2 и LepliF3/LepliR3. Пара LepliF/LepliR не амплифицировала ITS-область штаммов *P. lindquistii*. Целевой фрагмент размером 180 п. н. образовывался в результате амплификации с парой праймеров LepliF2/LepliR2 у 6 целевых изолятов из 8 (рис. 15), а фрагмент размеров 250 п. н. формировался в результате ПЦР с парой праймеров LepliF3/LepliR3 у всех 8 (рис. 15).

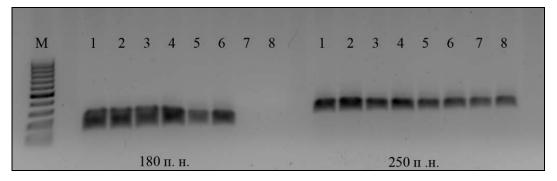


Рисунок 15 — Результаты амплификации ITS-области рДНК 8 изолятов *Plenodomus lindquistii* с праймерами LepliF3/LepliR3 (левая часть) и LepliF2/LepliR2 (правая часть) М — маркер молекулярного веса.

В результате следующей амплификации ДНК с парой праймеров LepliF2/LepliR2 4 –х изолятов *P. lindquistii* и 16 других видов и родов грибов, целевой фрагмент размером 180 п. н. формировался у всех 4-х включённых в анализ изолятов *P. lindquistii* и не формировался у представителей других видов и родов аскомицетов и базидиомицетов (рис. 16).

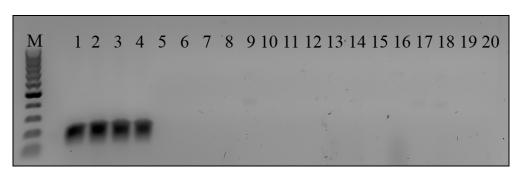


Рисунок 16 – Результаты амплификации ITS-области рДНК у 4-х изолятов *Plenodomus lindquistii* с праймерами LepliF2/LepliR2 и ДНК других родов и видов грибов

M — маркер молекулярного веса. 1-4 изоляты Plenodomus lindquistii, 5 - Plenodomus lingam, 6 — Plenodomus biglobosus, 7 - Diaporthe eres, 8 - Colletotrichum floriniae, 9 - Paraphoma melnikii, 10 - Didymella sinensis, 11 - Boeremia exigua, 12 - Didymella glomerata, 13 - Ascochyta sp., 14 - Stagonosporopsis inoxydabilis, 15 - Pyrenochaeta acicola, 16 - Diaporthe gulyae, 17 - Ulocladium atrum, 18 - Fusarium avenaceum, 19 - Ganoderma sp., 20 - Armillaria sp.

В результате следующей амплификации ДНК 4 изолятов *P. lindquistii* и 16 других видов и родов грибов с парой праймеров LepliF3/LepliR3, целевой фрагмент размером 250 п. н. формировался у 3-х из 4-х включённых в анализ изолятов *P. lindquistii* и не формировался у представителей других видов и родов аскомицетов и базидиомицетов (рис. 17).

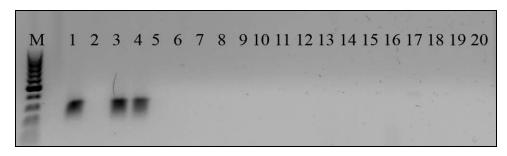


Рисунок 17 — Результаты амплификации ITS-области рДНК 4 изолятов *Plenodomus lindquistii* с праймерами LepliF3/LepliR3 и ДНК других родов и видов грибов

M — маркер молекуялрного веса. 1-4 изоляты Plenodomus lindquistii, 5 - Plenodomus lingam, 6 - Plenodomus biglobosus, 7 - Diaporthe eres, 8 - Colletotrichum floriniae, 9 - Paraphoma melnikii, 10 - Didymella sinensis, 11 - Boeremia exigua, 12 - Didymella glomerata, 13 - Ascochyta sp., 14 - Stagonosporopsis inoxydabilis, 15 - Pyrenochaeta acicola, 16 - Diaporthe gulyae, 17 - Ulocladium atrum, 18 - Fusarium avenaceum, 19 - Ganoderma sp., 20 - Armillaria sp.

Поскольку специфичная и наиболее стабильная амплификация ITS-области *P. lindquistii* происходила при использовании праймеров LepliF2 и LepliR2, то они могут быть рекомендованы для экспресс-диагностики этого патогена.

# ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОДСОЛНЕЧНИКА

### 4.1. Идентификация по морфологическим признакам

В результате исследования собранного в 2015-2018 годах материала, в чистую культуру было выделено 187 изолятов фомоидных грибов. Большая часть изолятов (183) была выделена из стеблей, 4 – из семян (табл. 3).

По морфологическим признакам 177 изолятов были идентифицированы, как вид *Plenodomus lindquistii*, 8 – как виды рода *Diaporthe*, 2 – как представители семейства *Didymellaceae*.

Изоляты, отнесённые к виду *P. lindquistii*, по культуральным признакам отличались друг от друга. На ОА они формировали колонии с обильным или скудным субстратным и воздушным мицелием оливкового и коричневого оттенков, незначительно различающиеся по скорости роста. Полупогружённые или погружённые пикниды многочисленны (рис. 18).



Рисунок 18 – Колонии изолятов *Plenodomus. lindquistii* (MF Ha15-001, MF Ha15-004, MF Ha15-005) на OA, 14 сутки роста

По микроморфологическим признакам пикнид и конидий эти 177 изолятов незначительно отличались друг от друга. Так, пикниды большей части изолятов располагались одиночно и имели довольно крупные размеры (300–400×220–260 мкм), пикниды других располагались конгломератами и имели меньшие размеры (от 140×190 до 250×200 мкм). Одноклеточные конидии в пикнидах имели размеры 5 – 7.5 мкм длиной и 1.3 - 2 мкм шириной (рис. 19).

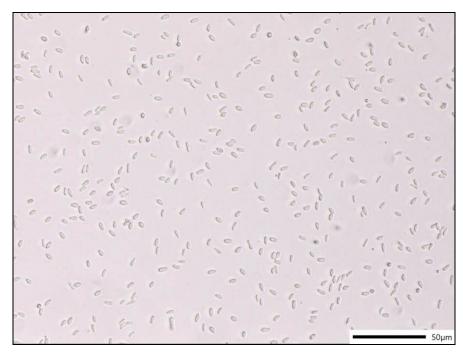


Рисунок 19 – Конидии *Plenodomus lindquistii* изолят MF Ha16-001

Десять изолятов по морфологическим признакам существенно отличались от изолятов, которые были определены как P. lindquistii. Два из них (MF Ha17-016, MF Ha17-017) на КСА формировали быстрорастущие колонии без воздушного и с очень скудным субстратным мицелием, но с обильным количеством мелких пикнид, собранных в агрегаты (рис. 20). В пикнидах формировались многочисленные одно- и двуклеточные конидии с жировыми включениями и слегка заострёнными концами  $6.5 - 9.1 \times 2.4 - 3.9$  мкм (рис. 21).

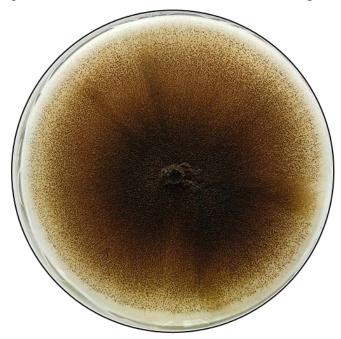


Рисунок 20 – Изолят Didymella glomerata MF Ha17-016 на КСА

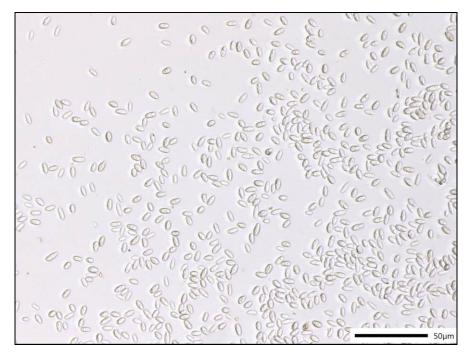


Рисунок 21 – Конидии Didymella glomerata изолят MF Ha17-016

Эти два изолята по морфологическим признакам были определены до семейства Didymellaceae.

Ещё 8 изолятов были идентифицированы по морфологическим признакам, как представители рода *Diaporthe*. В чистой культуре на КСА они имели незначительные различия. Изолят MF 16-010 на КСА формировал быстрорастущие колонии с обильным светлым воздушным мицелием и многочисленными поверхностными одиночными пикнидами размером:  $370-480 \times 340-370$  мкм (рис. 22). В пикнидах конидии трёх типов:  $\alpha$ ,  $\beta$ , и  $\gamma$ . Конидии  $\alpha$ -типа бобовидные  $-6.5-7.6 \times 2.3-2.8$  мкм.,  $\beta$ -конидии удлинённые нитевидные,  $15-20 \times 0.8-1$  мкм. Конидии  $\gamma$  имели промежуточные форму и размеры между конидиями типов  $\alpha$  и  $\beta$  (рис. 22).

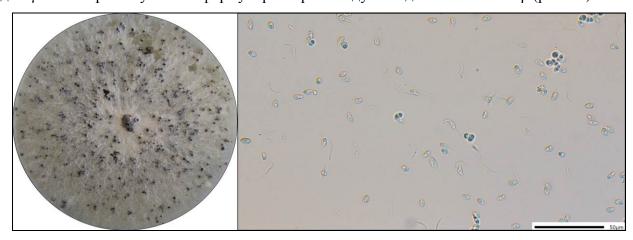


Рисунок 22 — Четырнадцатисуточная чистая культура (слева) и  $\alpha$ -конидии,  $\beta$ -конидии,  $\gamma$ -конидии (справа) изолята *Diaporthe phaseolorum* MF 16-010, КСА

Изоляты MF Ha18-001, MF Ha18-002, MF Ha18-003 на КСА формировали быстрорастущие колонии с обильным белым войлочным мицелием (рис. 23). Многочисленные поверхностные пикниды с длинными шейками собранные в конгломераты содержали только  $\alpha$ -конидии  $6.3-9.0\times2.1-3.1$  мкм (рис. 23).

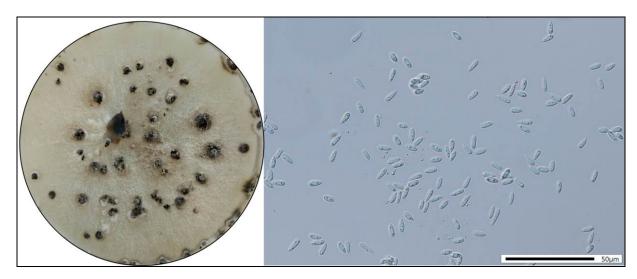


Рисунок 23 – Четырнадцатисуточная чистая культура (слева) и α-конидии (справа) изолята *Diaporthe eres* MF Ha18-001, КСА

Изоляты MF Ha17-042, MF Ha17-043 формировали на КСА быстрорастущие колонии с обильным пушисто-войлочным кремовым воздушным мицелием (рис. 24). Немногочисленные пикниды располагались под мицелием. Пикниды имели следующие размеры:  $244-426 \times 399-190$  мкм. В пикнидах формировались только  $\alpha$ -конидии  $7.1-8.8 \times 2.9-3.6$  мкм (рис. 24).

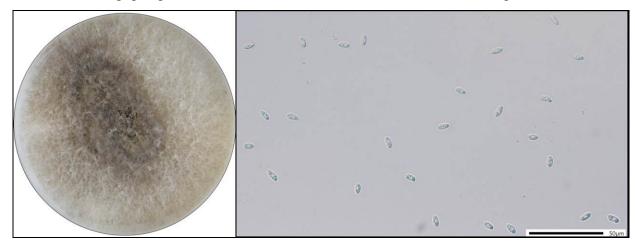


Рисунок 24 — Четырнадцатисуточная чистая культура (слева) и α-конидии (справа) изолята *Diaporthe gulyae* MF Ha17-043, КСА

Изоляты MF Ha18-045, MF Ha18-046 формировали на КСА быстрорастущие колонии с умеренным пушистым светлым мицелием, многочисленные поверхностные пикниды, собранные в конгломераты рассеяны ближе к центру колонии (рис. 25). Пикниды 240-416  $\times$  380–180 мкм. В пикнидах развивались конидии всех трёх типов. Конидии  $\alpha$ : 7–9.3  $\times$  2.1–3.1 мкм,  $\beta$ : 19.5–26.1  $\times$  0.9–1.5 мкм,  $\gamma$ : 10.7–13.2  $\times$  2.1–2.5 мкм (рис. 25).

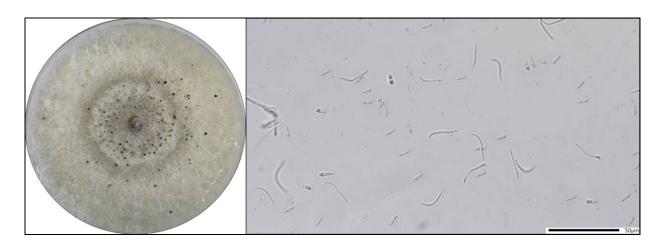


Рисунок 25 – Четырнадцатисуточная чистая культура (слева) и α-конидии, β-конидии, γ-конидии (справа) изолята *Diaporthe* sp. MF Ha18-045, KCA

Таким образом, изучение морфологических признаков 187 изолятов фомоидных грибов, выделенных из подсолнечнка, позволило предварительно разделить изоляты на 6 морфологических групп, потенциально соответствующих 6 видам фомоидных грибов. Из них одна группа была идентифицирована до вида (*Plenodomus lindquistii*), 4 – до рода *Diaporthe*, 1 – до семейства *Didymellaceae*.

#### 4.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам

Результаты молекулярно-генетического анализа позволили выделить шесть видов фомоидных грибов, которые соответствовали шести морфологическим группам. Из которых пять были опрделены до уровня вида и одна – до рода.

### 4.2.1. Идентификация изолятов Plenodomus lindquistii

В результате ПЦР с видоспецифичными праймерами LepliF2/LepliR2 с ДНК всех 187 изолятов фомоидных грибов, выделенных из поражённых стеблей подсолнечника, было показано, что видом *P. lindquistii* являются 177 изолятов, что совпадает с исследованием морфологических признаков.

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

#### 4.2.2. Идентификация изолятов *Diaporthe*

С помощью методов молекулярной филогении были исследованы 8 изолятов грибов рода *Diaporthe*, выделенных из подсолнечника. В результате проведённого анализа, согласно генеалогиям ITS-локуса рДНК и генов β-тубулина и EF-1α, было показано, что эти изоляты относятся к роду *Diaporthe* к трём видам: *D. gulyae*, *D. phaseolorum* и *D. eres*, два изолята не были идентифицированы до вида.

Изоляты MF Ha18-001, MF Ha18-002 на комбинированном филогенетическом древе, построенном на основании последовательностей всех трёх локусов, формировали кладу вместе с референсными изолятами, входящими в комплекс видов D. eres, но вне подклады, D. Ha сформированной типовым изолятом eres. филограмме, основанной последовательностях генов β-тубулина и ЕF-1α (рис. 26), эти два изолята также формировали общую кладу, но уже близкородственную типовому изоляту D. eres. Для ITS-локуса рДНК, считающегося стандартным и чаще других использующимся для целей систематики и разграничения видов грибов, реконструкции филогении и эволюции, в некоторых случаях показана его неэффективность (Schoch et al., 2012; 2014; Udayanga et al., 2014b). Результаты филогенетического анализа, основанные на последовательностях этого локуса, могут свидетельствовать как о переоценке, так и о недооценке биоразнообразия и количества видов грибов. Так, трудности в интерпретации результатов анализа ITS-локуса рДНК были показаны для видов рода Diaporthe (Farr et al., 2002; Murali et al., 2006; Udayanga et al., 2014b). В частности, несоответствие топологий филограмм для ITS-локуса филограммам, построенным на основании последовательностей других локусов, приводило к таксономической путанице в комплексе видов D. eres (Udayanga et al., 2014a). Для идентификации видов в этой группе было предложено использовать только данные секвенирования генов β-тубулина и EF-1α, исключая из анализа данные о нуклеотидных последовательностях ITS-области рДНК (Udayanga et al., 2014a; 2014b). Таким образом, изоляты MF Ha18-001 и MF Ha18-002 из группы видов D. eres, которые имели разную топологию филограмм, следует идентифицировать, как вид D. eres. Видом D. eres следует считать и изолят MF Ha18-003, который обладал морфологическими признаками, идентичными признакам изолятов MF Ha18-001 и MF Ha18-002, и был выделен из того же образца стеблей подсолнечника.

Два изолята MF Ha17-042, MF Ha17-043 на филогенетических деревьях, построенных на основании как ITS-области рДНК, так и гена EF-1α и на комбинированной филограмме, основанной на последовательностях этих двух локусов, с максимальными значениями бутстреп-поддержки (100%) входили в состав клады вместе с референсными типовыми штаммами *D. gulyae* и *D. stewartii*. На деревьях, построенных на основании последовательностей только гена β-тубулина, генов β-тубулина и EF-1α (рис. 26), и ITS-локуса

генов  $\beta$ -тубулина и EF-1 $\alpha$ , оба этих изолята входили в состав клады, сформированной только референсным типовым штаммом D. gulyae. В базе данных GenBank на настоящий момент нет ни одной нуклеотидной последовательности гена β-тубулина для вида D. stewartii, что не позволяет провести полную реконструкцию филогении для изученных изолятов и близкородственных видов Diaporthe. Однако, нуклеотидные последовательности ITS-локусов изолятов MF Ha17-042, MF Ha17-043 были идентичны таковым для типового штамма D. gulyae и отличались двумя и тремя нуклеотидными заменами в частичных сиквенсах генов β-тубулина и EF-1α, соответственно. В то время, как последовательности ITS-локуса и гена EF-1α типового штамма D. stewartii отличались от исследованных изолятов тремя нуклеотидными заменами. Согласно данным, доступным в литературе, вид D. stewartii был выделен из подсолнечника всего два раза (Mathew et al., 2011; Olson et al., 2017) и считается более типичным для космеи (Cosmos bipinnatus), чем для подсолнечника (Harrison, 1935; Mathew et al., 2011). Морфологические признаки α-конидий в чистых культурах изолятов MF Ha17-042, MF Ha17-043 соответствовали признакам, характерным для D. gulyae (Thompson et al., 2011). Так, согласно результатам молекулярно-филогенетического анализа и оценке морфологических признаков, эти два изолята, на наш взгляд, следует определить, как вид D. gulyae.

Изолят MF 16-010 на всех филограммах (рис. 26) формировал единую кладу с референсным штаммом *D. phaseolorum*.

Изолят МF На18-046 на всех филогенетических деревьях формировал отдельную кладу, не включающую референсных последовательностей видов и штаммов *Diaporthe*. Этот изолят, очевидно, являлся близкородственным кладе, включающей типовой штамм *D. gulyae* и изоляты МF На17-042, МF На17-043, но никогда не входил в состав этой клады (рис. 26). По нуклеотидным последовательностям только ITS-локуса рДНК, изоляты МF На18-046 и МF На18-045 были родственны изолятам *Phomopsis lactucae*, но в базе GenBank нет сиквенсов ни ITS-области типового штамма этого вида, ни последовательностей других таксономически информативных локусов. Потенциально изоляты МF На18-046 и идентичный ему по морфологическим признакам и по нуклеотидной последовательности ITS-локуса и выделенный из того же образца МF На18-045, являются представителями нового для науки вида *Diaporthe*. Но для подтверждения этого факта, необходимо большее количество нуклеотидных последовательностей типовых штаммов *Diaporthe* в GenBank. Так, эти изоляты *Diaporthe* не были идентифицированы до уровня вида. И, возможно, список видов *Diaporthe*, которые могут быть ассоциированы с подсолнечником, на данный момент насчитывающий 13 видов, шире.

Виды *D. gulyae, D. eres, D. phaseolorum* являются первыми находками, подтверждённые молекулярно-генетическими исследованиями, на территории России. А вид *D. eres* обнаружен впервые на подсолнечнике. Вид *D. helianthi*, который в России длительное время считался

единственным возбудителем фомопсиса подсолнечника, распространённым повсеместно в местах его возделывания и входящий в список карантинных объектов, ограниченно распространённых на территории РФ, среди изученной коллекции изолятов нами обнаружен не был. Полученные результаты подтверждают, что в России с подсолнечником могут быть ассоциированы несколько видов рода *Diaporthe*. Вероятно, виды *D. gulyae, D. phaseolorum, D. eres* присутствовали на территории России и ранее, но, поскольку диагностика фомопсиса подсолнечника традиционно осуществлялась по симптомам на питающем растении и по морфологическим признакам, они не были корректно идентифицированы. Очевидно, необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение биоразнообразия грибов рода *Diaporthe*, ассоциированных с подсолнечником на территории России, как с помощью традиционных, так и с применением молекулярных методов исследования.

Также было показано, что симптомы, вызываемые разными видами *Diaporthe* на подсолнечнике, могут отличаться от классических описанных в литературе симптомов фомопсиса (маслянистые тёмно-бурые вдавливающиеся пятна на стеблях, становящиеся впоследствии пепельно-серыми, иногда со специфическим запахом). Так, выявленные нами в России виды *Diaporthe*, были изолированы из подсолнечника с симптомами поражения идентичными таковым, вызываемым возбудителем 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, по симптомам на растении разные виды *Diaporthe* не отличаются не только друг от друга, но и от *P. lindquistii*. По наличию характерной пятнистости на стеблях можно сделать лишь предварительный диагноз, который следует подтвердить изучением морфологических признаков полученных изолятов из поражённых растений в чистой культуре, при этом надежная идентификация возбудителя возможна лишь до уровня рода. Для определения вида возбудителя пятнистости необходимо изучение молекулярно-генетических признаков выделенных изолятов.

Выявленные на территории России, ассоциированные с подсолнечником виды *Diaporthe*, согласно данным из литературы, не являются специализированными для подсолнечника, но имеют широкий круг растений-хозяев из разных семейств. Так вид *D. eres* был обнаружен на растениях следующих семейств: *Ericaceae, Juglandaceae, Rosaceae, Sapindaceae, Ulmaceae, Vitaceae, Oleaceae, Rutaceae, Pinaceae, Fabaceae, Cactaceae, Aquifoiaceae, Polygonaceae, Brassicaceae, Rhanmnaceae, Poaceae, Amaryllidaceae, Malvaceae, Magnoliaceae, Cucurbitaceae, Chenopodiaceae (Kolomiets et al., 2009*; Garibaldi et al., 2011; Vrandečić et al., 2010; Anagnostakis, 2007; Thomidis, Michailides, 2009; Baumgartner et al., 2013; Lombard et al., 2014; Gomes et al., 2013; Udayanga et al., 2014).

Вид *D. phaseolorum*, считавшийся специализированным для растений семейства *Fabaceae: Glycine max* (Udayanga et al., 2012), *Phaseolus vulgaris* (Dissanayake et al., 2017), был также выделен и из растений семеств *Euphorbiace: Caperonia palustris* (Udayanga et al., 2012), *Cactaceae: Hylocerus undatus* (Udayanga et al., 2012), *Solanaceae: Lycopersicon esculentum* (Гуркина, 2018), *Asteraceae: Helianthus annuus* (Udayanga et al., 2011), *Olearia* cf. *rani*, *Aster exilis* (Dissanayake et al., 2017). Известно, что этот вид также может вызывать микозы у людей с ослабленным иммунитетом (Mattei at al., 2013). Вид *D. gulyae* также не является специализированным для подсолнечника и был обнаружен и на сое (Mathew et al., 2018).

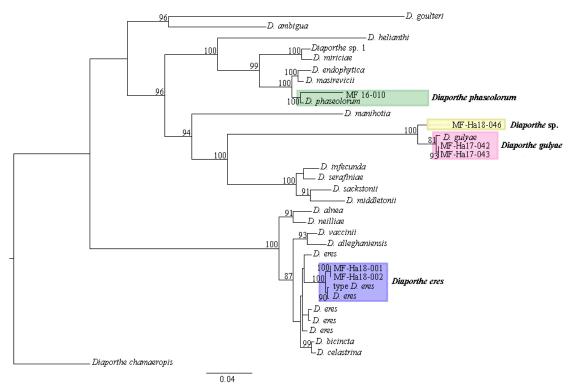


Рисунок 26 – Комбинированное филогенетическое дерево для видов и изолятов Diaporthe, полученное с помощью метода максимального правдоподобия (Maximumlikelihood), на основе последовательностей генов β-тубулина и фактора элонгации трансляции 1-α

#### 4.2.3. Идентификация изолятов *Phoma* sp.

С помощью методов молекулярной филогении были исследованы два изолята *Phoma* sp., выделенные из подсолнечника в Ростовской области – МF На17-016 и МF На17-017. Согласно генеалогиям ITS-локуса рДНК и гена β-тубулина, эти изоляты оказались близкородственными виду Didymella glomerata, несмотря на то, что в чистой культуре эти изоляты не формировали характерных для этого вида морфологических признаков (цепочки многоклеточных Согласно информации хламидоспор). ИЗ литературы, это вид является распространённым сапротрофом и до настоящего момента не был обнаружен в ассоциации с подсолнечником.

Таким образом, в результате идентификации коллекции фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника, можно сделать следующие выводы:

- 1. Вид *Plenodomus lindquistii*, являющийся возбудителем фомоза подсолнечника, широко распространён на территории России и в период 2015-2018 годы вызывал заболевания подсолнечника в Алтайском, Краснодарском, Ставропольском краях, Липецкой, Белгородской, Пензенской, Ростовской, Тульской, Челябинской областях.
- 2. На территории России впервые было зарегистрировано три вида *Diaporthe* с подсолнечника: *D. gulyae* на семенах из Белгородской области, *D. phaseolorum* в Краснодарском крае и *D. eres* в Санкт-Петербурге. Два изолята *Diaporthe* sp. из стеблей подсолнечника, выращенного в Белгородской области, вероятно, являются новым для науки видом. Вид *D. helianthi* на обследованной территории обнаружен не был.
- 3. Симптомы, вызываемые разными видами Diaporthe на подсолнечнике, не отличаются не только друг от друга, но могут быть спутаны с таковыми, вызываемыми P. lindquistii.
- 4. Вид *Didymella glomerata* был впервые обнаружен в ассоциации с подсолнечником в Ростовской области.

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

# 5.1. Идентификация фомоидных грибов из Микологического гербария ФГБНУ ВИЗР (LEP)

#### 5.1.1. Идентификация по морфологическим признакам

Всего в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (LEP) хранится 1328 образцов растений, поражённых грибами, которые были инсерированы как виды рода *Phoma*. Из них 28 образцов – поражённые растения семейства сложноцветные (Приложение, табл. 1). Растения были собраны на территории России в разные годы (1895–1960 гг.). Самый старый образец (LEP 129311) был собран 124 года назад.

Изучаемые образцы согласно этикеточным данным были отнесены к 20 видам фомоидных грибов. Двенадцать видов, очевидно, были определены исключительно по питающему растению (виды *Ph. achilleae, Ph. erigerontis, Ph. filaginis-arvensis, Ph. leonuri, Ph. tausaghyzicola, Ph. kok-saghyz* и др.). В связи с тем, что в современной таксономии фомоидных грибов произошли существенные преобразования, нередко данные о видовой принадлежности, указанные на многих гербарных этикетках устарели и, очевидно, требуют ревизии.

В результате длительного хранения гербарные образцы неизбежно постепенно утрачивают свои первоначальные свойства. Нами при реидентификации были учтены исключительно морфологические признаки пикнид, конидий и плодовых тел in vivo. Единственный на настоящий момент определитель фомоидных грибов (Boerema et al., 2004) построен исключительно на признаках, которые можно наблюдать в условиях чистой культуры. Имея дело с гербарием, использование этой монографии имеет ряд ограничений, поскольку известно, что морфологические признаки изучаемых структур могут существенно различаться in vivo и in vitro (Boerema et al., 2004). Многие таксономически значимые признаки могут быть наблюдаемы исключительно в чистой культуре. Так, например, формирование двух типов конидий или покоящихся структур – явления, которые очень редко могут быть обнаружены при микроскопировании непосредственно поражённого растительного материала. По этим причинам провести корректную реидентификацию гербарных образцов фомоидных грибов исключительно по морфологическим признакам спороносных структур – задача практически невыполнимая. При наличии на поражённых растениях плодовых тел фомоидных грибов становится возможным определить род телеоморфы и семейство, к которому относится объект исследования. Если структур полового размножения не обнаруживается, а есть лишь органы бесполого размножения, то идентификация по определителю осуществима лишь до секции, которые в случае фомоидых грибов являются не таксономическими группами. Идентификация

хотя бы до секции, однако, может быть полезной, поскольку это позволяет в первом приближении понять к кому семейству или группе видов относится изучаемый объект.

В то же время, поскольку in vivo фомоидные грибы формируют часто очень похожие круглые, гладкие пикниды и одноклеточные, бесцветные конидии, по таким признакам возможно идентификация лишь до секции *Phoma*, которая, как известно, является самой крупной и объединяет самые разнообразные неродственные виды. Кроме описанной выше проблемы, из-за большого возраста материала некоторые признаки не поддавались наблюдению. В результате в распоряжении оказывается довольно скудный набор признаков для определения видов фомоидных грибов.

Из 28 гербарных образцов лишь у 6 нами была определена видовая принадлежность (табл. 6). В одном образце были обнаружены хламидоспоры, что позволило сделать некоторые предположения о таксономической принадлежности. Известно, что in vivo это характерно для двух видов: *Didymella pomorum* и *D. glomerata*. Идентификация четырёх образцов нами была признана корректной. Они были определены, как *Ph. herbarum*, морфологически наблюдаемые структуры были схожи с представленными в литературе описаниями, однако, при оценке корректности проведённой реидентификации необходимо учитывать, что данный вид, который является типовым для рода, очень полиморфен.

У 4 образцов были обнаружены плодовые тела, характерные для представителей из рода *Didymella*. У двух – наличие двух разных типов конидий, что в современном понимании характерно большей частью для представителей рода *Stagonosporopsis*. У одного – наличие трёх типов конидий α, β и γ, что характеризует их как представителей рода *Diaporthe*. Ещё у одного – наличие многоклеточных хламидоспор, что свойственно некоторым представителям рода *Didymella*. Исходя из этого, была определена родовая принадлежность 7 образцов. Остальные 15 были определены только до секции, из них 14 до секции *Phoma*, так как наблюдались лишь сходные гладкие круглые пикниды с бесцветными одноклеточными конидиями, один – до секции *Phyllostictoides*, так как в пикнидах содержались конидии двух разных типов.

#### 5.1.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам

В результате применения оптимизированного протокола, с использованием ЦТАБ и хлороформа для экстракции ДНК из гербарных образцов фомоидных грибов, предложенного ранее, из 18 образцов (всего образцов 28) была успешно выделена грибная ДНК.

Для этих 18 образцов была осуществлена амплификация и последующее секвенирование таксономически информативных ITS-локусов. Из них нуклеотидные последовательности четырёх образцов были получены в результате стандартной ПЦР с праймерами ITS1F/ITS4, 14 – ПЦР с разработанными специфичными праймерами Did2F/Did2R (табл. 6).

Таблица 6. Идентификация гербарных образцов сложноцветных растений, поражённых фомоидными грибами из Микологического гербария ФГБНУ ВИЗР (LEP)

Образец	Растение хозяин	Ранее сделанная идентификация		Идентификация по морфологическим	Идентификация по молекулярно- генетическим признакм	
LEP		данные этикетки	современное название	признакам	ITS1F/ITS4	Did2F/Did2R
129310	Achillea millefolium	Phoma achilleae	?	Didymella sp.	-	Stagonosporopsis sp.
129311	Achillea millefolium	Ph. achilleae	?	sect. Phyllostictoides		Boeremia exigua
129816	Anthemis tinctoria	Ph. herbarum	Phoma herbarum	Ph. herbarum	Epicoccum nigrum	-
129642	Arctium tomentosum	Ph. decolorans	?	sect. Phoma		Ascochyta sp.
129435	Artemisia absinthium	Ph. artemisiae	Stagonosporopsis artemisiicola	Stagonosporopsis sp.		-
129801	Artemisia absinthium	Ph. herbarum	Ph. herbarum	Stagonosporopsis sp.		-
129815	Artemisia sp.	Ph. herbarum	Ph. herbarum	sect. Phoma	Boeremia exigua	-
129828	Carduus crispus	Ph. herbarum	Ph. herbarum	Ph. herbarum		Didymella sp.
129532	Chrysanthemum leucanthemum	Ph. chrysanthemi	?	sect. Phoma	-	-
129537	Cichorium sp.	Ph. cichorii	?	sect. Phoma	-	Ascochyta sp.
130273	Cirsium lanceolatum	Ph. pycnocephali	?	sect. Phoma	-	Ascochyta sp.
129744	Cirsium sp.	Ph. fictilis	Didymella pomorum	sect. Phoma	-	-
129535	Crepis tectorium	Ph. cichoracearum	?	Leptosphaeria sp.	-	-
129509	Erigeron acer	Ph. canadensis	?	sect. Phoma	-	B. exigua
129728	Erigeron acer	Ph. erigerontis	?	sect. Phoma	-	B. exigua
129750	Filago arvensis	Ph. filaginis- arvensis	?	Didymella glomerata/ D. pomorum	-	B. exigua
129428	Lappa tomentosum	Ph. arctii	Diaporthe arctii	Didymella sp.	-	Ascochyta sp.

Продолжение таблицы 6

Образец Растение хозяин		Ранее сделанная идентификация		Определение, сделанное в ходе работы	Идентификация по молекулярно- генетическим признакм	
	данные этикетки	современное название	ITS1F/ITS4		Did2F/Did2R	
130130	Lappa sp.	Ph. oleracea	Ph. herbarum	sect. Phoma	Didymella pomorum	-
129915	Lapsana communis	Ph. lapsanae	?	sect. Phoma	-	Didymella sp.
129934	Leonurus cardiaca	Ph. leonuri	Leptosphaeria slovacica	sect. Phoma	-	-
129935	Leonurus cardiaca	Ph. leonuri	L. slovacica	L. slovacica	-	Ascochyta sp.
129848	Matricaria indora	Ph. herbarum	Ph. herbarum	Diaporthe sp.	-	-
130081	Mulgedium sp.	Ph. mulgedii	?	sect. Phoma	-	-
130447	Scorzonera tausaghyz	Ph. tausaghyzicola	?	sect. Phoma	-	-
130378	Solidago virgaurea	Ph. solidaginis	?	sect. Phoma	-	Stagonosporopsis sp.
129389	Tanacetum sp.	Ph. ambiquella	?	Didymella sp.	-	-
129822	Tripholium pratense	Ph. herbarum	Ph. herbarum	Ph. herbarum	-	A. rabiei
129808	Asteraceae	Ph. herbarum	Ph. herbarum	Ph. herbarum	Ascochyta rabiei	-

Фиолетовым выделены образцы, для которых совпали морфологические и молекулярно-генетические признаки;

Оранжевым выделены образцы, ITS-локусы которых не были успешно амплифицированы ни с одной из пар праймеров.

Ни для одного образца полностью не совпали как данные этикетки, так и результаты идентификации по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам. Молекулярные данные и морфологические признаки согласовались только для образца LEP 129311. По морфологическим признакам он был признан представителем бывшей секции *Phyllostictoides*. Молекулярные признаки (последовательность ITS-области) позволили идентифицировать этот образец, как *Boeremia exigua* – вид, который был типовым для данной секции. Для остальных 17 образцов данные, представленные на этикетке, морфологические и молекулярно-генетические признаки не согласовывались.

Всего с помощью молекулярно-генетических признаков до уровня рода было определено 9 образцов. Пять (LEP 129642, 129537, 130273, 129428, 129935) – *Ascochyta* sp. Два (LEP 129828, 129915) – *Didymella* sp. Два (LEP 129310,130378) – *Stagonosporopsis* sp. Видовая принадлежность была определена для 9 гербарных образцов фомоидных грибов. *В. ехідиа* (LEP 129728, 129750 129509, 129815, 129311), *А. rabiei* (LEP 129822, 129808), *D. pomorum* (LEP 130130), *Epicoccum nigrum* (LEP 129816).

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

#### 5.2.1. Идентификация по морфологическим признакам

По микроскопическим признакам, представленным в определителе (Воегета et al., 2004), изученные изоляты были отнесены к 21 виду шести секций рода *Phoma* в широком понимании (табл. 7).

К самой крупной секции *Phoma* было отнесено наибольшее количество видов (6), представленных восемью изолятами. Второй по представленности секцией оказалась секция *Phyllostictoides*: 5 видов, включающая 7 изолятов. Менее представленными оказались секции *Heterospora*, к ней были отнесены 5 видов (6 изолятов). *Peyronellaea* – 2 вида (5 изолятов). К секции *Plenodomus* было отнесено два изолята одного вида. К секции *Macrospora* – один изолят одного вида.

Изоляты секции *Phoma* формировали сходные круглые и овальные пикниды, в которых содержались одноклеточные, бесцветные конидии с каплями масла или без них. В чистых культурах этих изолятов могли быть обнаружены одноклеточные хламидоспоры, которые у одних изолятов располагались одиночно, у других – формировали цепочки. Так же у некоторых изолятов было отмечено формирование покоящихся структур – микропикнид.

Таблица 7. Коллекция видов и изолятов фомоидных грибов, выделенных из растений семейства *Asteraceae*, идентификация по морфологическим признакам

№ Изолята	Идентификация по морфологическим признакам	Секция <i>Phoma</i> sensu lato	Современное название
MF 010-002	Phoma americana	Peyronellaea	Didymella americana
MF 010-003	Ph. multirostrata	Phoma	Ectophoma multirostrata
MF 010-006	Ph. urticicola	Phoma	Neodidymellopsis cannabis
MF 010-020	Ph. ligulicola var. inoxydabilis	Phyllostictoides	Stagonosporopsis inoxydabilis
MF 010-025	Ph. glomerata	Peyronellaea	D. glomerata
MF 010-026	Ph. schneiderae	Heterospora	S. lupini
MF 010-031	Ph. ruttneri	Plenodomus	Phoma ruttneri
MF 010-033	Ph. herbarum	Phoma	Ph. herbarum
MF 010-037	Ph. heliopsidis	Phyllostictoides	S. heliopsidis
MF 010-039	Ph. multirostrata	Phoma	Ectophoma multirostrata
MF 010-042	Ph. urticicola	Phoma	N.cannabis
MF 010-049	Ph. zantedeschiae	Peyronellaea	Allophoma zantedeschiae
MF 010-051	Ph. nigripycnidia	Heterospora	Ascochyta nigripycnidia
MF 010-064	Ph. telephii	Phyllostictoides	Boeremia telephii
MF 010-065	Ph. exigua var. heteromorpha	Phyllostictoides	B. exigua (var. heteromorpha)
MF 010-066	Ph. heteromorphospora	Heterospora	Ph. heteromorphospora
MF 010-067	Ph. subboltshauseri	Heterospora	S. hortensis
MF 010-069	Ph. ruttneri	Plenodomus	Ph. ruttneri
MF 010-071	Ph. plurivora	Phoma	Epicoccum plurivorum
MF 010-075	Ph. herbicola	Phoma	Ascochyta herbicola
MF 010-076	Ph. nigripycnidia	Heterospora	A. nigripycnidia
MF 010-077	Ph. rabiei	Macrospora	A. rabiei
MF 010-078	Ph. anserina	Phoma	D. anserina
MF 010-080	Ph. samarorum	Heterospora	Neosetophoma samarorum
MF 010-081	Ph. macrostoma var. macrostoma	Phyllostictoides	D. macrostoma var. macrostoma
MF As16-003	Ph. zantedeschiae	Peyronellaea	Allophoma zantedeschiae
MF As16-004	Ph. zantedeschiae	Peyronellaea	A. zantedeschiae
MF As16-005	B. exigua	Phyllostictoides  Phyllostictoides	B. exigua
MF As16-008	B. exigua	Phyllostictoides	B. exigua

Для изолятов, которые были отнесены к секциям *Heterospora* и *Phyllostictoides*, было характерно формирование конидий двух разных типов (размеров). Крупные конидии были в разной степени крупнее меньших конидий; септированные или одноклеточные. При

наблюдении конидий двух разных типов не во всех случаях можно было с уверенностью определить секцию, к которой относили изучаемый штамм.

Все изоляты, отнесенные к секции *Peyronellaea*, в чистой культуре формировали многоклеточные хламидоспоры, похожие на конидии грибов родов *Alternaria* или *Epicoccum*, они могли располагаться одиночно (интеркалярно или терминально) или формировать цепочки разной длины. Для представителей этой секции также было характерно формирование в чистой культуре покоящихся структур и помимо многоклеточных хламидоспор, также одноклеточных.

К секции *Macrospora* был отнесен изолят, который формировал очень крупные конидии, конидии меньших размеров также формировались, но в небольших количествах.

Такой таксономически значимый признак, как формирование кристаллов, не наблюдался ни у одного из исследованных нами изолятов. Выделение пигментов в питательную среду было характерно лишь для небольшого количества изолятов, и при пересеве изолята этот признак проявлялся не всегда.

#### 5.2.2. Идентификация по молекулярно-генетическим признакам

Всего с помощью методов молекулярной филогении было исследовано 29 изолятов фомоидных грибов, выделенных из 13 видов дикорастущих растений семейства *Asteraceae* (табл. 2). В результате проведённого секвенирования ДНК для всех исследованных изолятов были определены нуклеотидные последовательности ITS-области, для 24 изолятов – LSU области рДНК, для 23 – гена β-тубулина. Полученные нуклеотидные последовательности ITS-области имели размер около 550 п. н., LSU – 900 п. н., гена β-тубулина – 300 п. н.

После объединения последовательностей разных видов и штаммов фомоидных грибов и внешней группы (*Macroventuria anomochaeta*) и их выравнивания были получены матрицы данных для последующего филогенетического анализа. Длина выровненных последовательностей фрагмента ITS-области составляла 444 п. н., LSU-области – 806 п. н., гена β-тубулина – 293 п. н.

Наиболее полиморфным оказался ген β-тубулина, в его последовательностях нуклеотидные замены выявлены в 94 сайтах (32%) Нуклеотидные замены в последовательностях LSU-региона выявлены в 231 сайте (29%), а в последовательностях ITS-области – в 120 сайтах (27%).

В результате было построено 5 филограмм: три для каждого локуса по отдельности и две комбинированные – одна, включающая нуклеотидные последовательности ITS-локуса и гена β-тубулина, для 23 изолятов и вторая, построенная на основании последовательностей всех трёх изученных локусов, для 19 изолятов.

Согласно генеалогиям, реконструированным по каждому из трёх локусов, все исследованные изоляты относились к семейству *Didymellaceae* порядка *Pleosporales*, к 6 родам: *Ascochyta, Boeremia, Didymella, Neoascochyta, Nothophoma* и *Stagonosporopsis*.

На филогенетическом древе, построенном на основании нуклеотидных последовательностей локуса ITS, все изоляты были распределены по 16 кладам (рис. 27). Десять изолятов (МF 010-026, MF 010-037, MF 010-039, MF 010-049, MF 010-051, MF 010-064, MF 010-065, MF 010-071, MF 010-076, MF 010-078) располагались в пределах большой клады, содержащей референсные нуклеотидные последовательности только *В. ехідиа*. В пределах этой клады наши изоляты сформировали 4 подклады, и ни одна из них не включила в свой состав ни одного референсного штамма *В. ехідиа*.

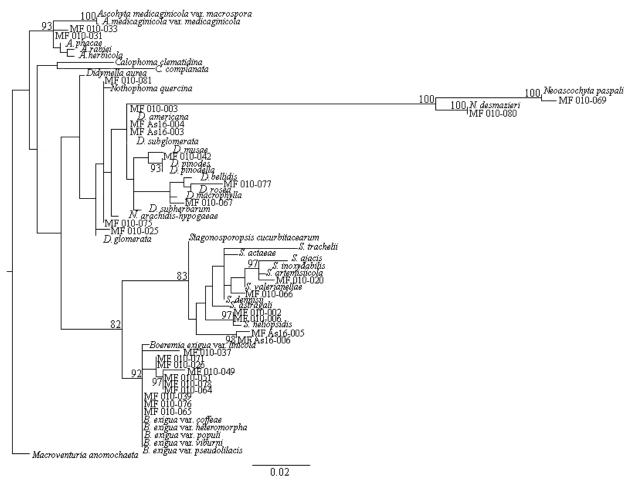


Рисунок 27 – Филогенетическое дерево для видов и изолятов фомоидных грибов, полученное с помощью метода максимального правдоподобия (Maximumlikelihood), на основе последовательности генов ITS-локуса рДНК

Два изолята MF 010-031 и MF 010-033 оказались в составе крупной клады, сформированной видами *Ascochyta*, однако в подкладе с этими штаммами не оказалось референсных последовательностей видов *Ascochyta*.

Девять изолятов вошли в состав крупной клады *Didymella/Nothophoma*. Изолят MF 010-025 вошёл с состав подклады, образованной референсным изолятом *D. glomerata*, MF 010-042 – *D. pinodella* и *D. pinodes*, MF 010-067 – *D. macrophylla*, MF 010-077 – *D. rosea*. Изоляты MF 010-003, MF As16-003, MF As16-004 показали близкое родство одновременно с двумя референсными штаммами – *D. americana* и *D. subglomerata*. Изоляты MF 010-075 и MF 010-081 хотя и вошли в состав клады *Didymella*, внутри неё они кластеризовались с референсной последовательностью *Nothophoma quercina*.

Два изолята MF 010-002 и MF 010-006 формировали единую кладу с видом *S. heliopsidis*. Изолят MF 010-020 — образовывал кладу, содержащую референсные последовательности *S. inoxydabilis* и *S. artemisiicola*. Изоляты MF 010-066, MF As16-005, MF As16-008 были в общей кладе *Stagonosporopsis*, но не имели очевидного близкого родства с референсом какого-либо вида.

Два изолята входили в состав клад, образованных референсными последовательностями видов рода Neoascochyta, изолят MF 010-069 – в кладе с N. paspali, a MF 010-080 – с N. desmazieri.

Ha филогенетическом древе, построенном нуклеотидных на основании последовательностей LSU локуса рДНК, изученные 24 изолята также распределились по 16 кладам и были отнесены также к 5 родам. В целом состав клад совпадал с таковым, представленным на филограмме, построенной на основании анализа локуса ITS и топология дендрограмм была сходной, что не позволило определить видовую принадлежность тех изолятов, которые либо не включали в состав формируемых ими клад референсных штаммов фомоидных грибов, либо включали несколько референсных штаммов. Таким образом, можно сделать заключение, что ITS и LSU-локусы рДНК являются сравнительно сходными по филогенетической информативности и секвенирование последовательностей обеих этих областей не целесообразно. Поскольку ITS-локус рДНК для реконструкции молекулярной филогении грибов является более широко используемым, для изучения фомоидных грибов, очевидно, предпочтительнее определять нуклеотидные последовательности именно этого участка рибосомальной ДНК.

На комбинированном филогенетическом древе, построенном на основании нуклеотидных последовательностей ITS-локуса рДНК и гена β-тубулина, исследованные 23 изолята формировали 16 клад. Самой крупной, также как и на всех предыдущих филограммах, оказалась клада видового комплекса *В. ехідиа*. Распределение изолятов внутри трёх подклад совпадало с распределением по кладам на филограммах, построенных как на основании последовательностей локуса ITS, так и на основании последовательностей локуса LSU (рис. 28). Изоляты MF 010-065 и MF 010-037 оказались в пределах одной клады, MF 010-064, MF 010-051,

MF 010-78 — другой, MF 010-071 формировал кладу близкородственную кладе, содержащей изоляты MF 010-064, MF 010-051, MF 010-78. Изоляты MF 010-039 и MF 010-076 формировали отдельные клады, сестринские по отношению к *B. exigua* var. *linicola* и *B. exigua* var. *coffeae*.

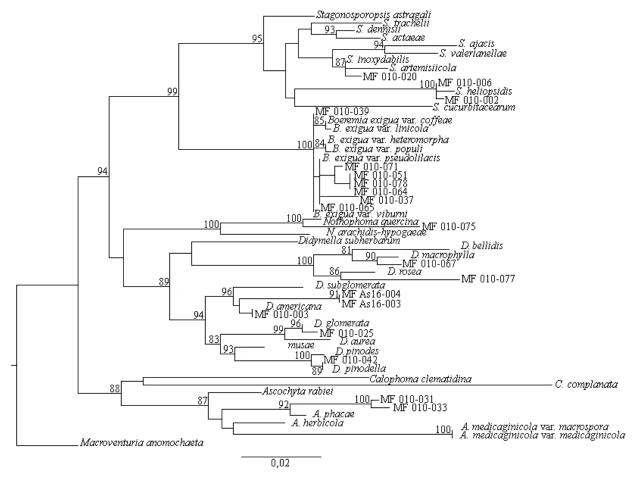


Рисунок 28 – Комбинированное филогенетическое дерево для изолятов фомоидных грибов, полученное с помощью метода максимального правдоподобия (Maximumlikelihood), на основе последовательности ITS-локуса рДНК и гена β-тубулина

Остальные изоляты с высокой степенью бутстреп-поддержки вместе с референсными последовательностями оказались в пределах следующих клад: MF 010-031, MF 010-033 Ascochyta, MF As16-005, MF As16-008 – Stagonosporopsis, MF 010-003 – D. americana, MF 010-042 – D. pinodella, MF 010-025 – D. glomerata, MF 010-067 – D. macrophylla, MF 010-077 – D. rosea. Изолят MF 010-020 – в кладе S. inoxydabilis, MF 010-002 и MF 010-006 – в кладе S. heliopsidis. Изолят MF 010-075 формировал кладу с референсной  $Nothophoma\ quercina$ .

Включение в молекулярно-генетический анализ гена β-тубулина помимо локусов рДНК, позволило сконструировать филограммы с более дробной топологией, чем филограммы, построенные на основании сиквенсов только рибосомальных локусов или только гена β-тубулина. В сравнении оба комбинированных филогенетических древа, построенные на основании последовательностей как ITS-локуса и гена β-тубулина, так и LSU-области и гена β-

тубулина, были информативны практически в одинаковой степени. Таким образом, можно заключить, что для реконструкции молекулярной филогении фомоидных грибов, выделенных из поражённых сложноцветных растений, целесообразно включать в филогенетический анализ как минимум один локус рДНК (предпочтительнее ITS-область) и часть гена, ответственного за синтез белка β-тубулина.

По молекулярно-генетическим признакам в коллекции фомоидных грибов, выделенных их поражённых растений семейства *Asteraceae*, было идентифицировано 11 видов грибов.

Определение изолятов MF 010-020, MF 010-025, MF 010-065 по морфологическим признакам согласовывалось с данными, полученными в результате молекулярно-генетического анализа. Определение остальных изолятов по морфологическим признакам не подтвердилось молекулярно-генетическими данными, однако, в распределении изолятов по кладам морфологические закономерности очевидно наблюдались.

Для всех представителей клады *В. exigua* было характерно формирование либо чётко отличающихся друг от друга двух типов конидий – крупных и маленьких, крупные при этом часто были септированы (рис. 29), либо разных конидий, незначительно отличающихся по размерам. И для большинства представителей этой клады было характерно образование покоящихся структур: хламидоспор, как многоклеточных, так и одноклеточных (рис. 30), микропикнид (рис. 31) и просто склероциоподобных структур (рис. 32).

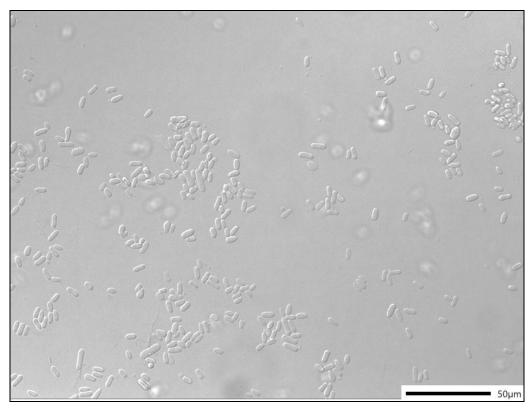


Рисунок 29 – Конидии двух морфотипов *Boeremia exigua* изолят MF 010-037

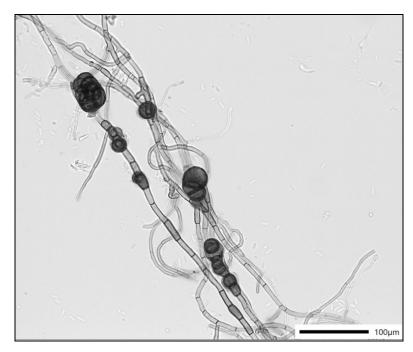


Рисунок 30 — Одно- и многоклеточные хламидоспоры *Boeremia exigua* изолят MF 010- 049

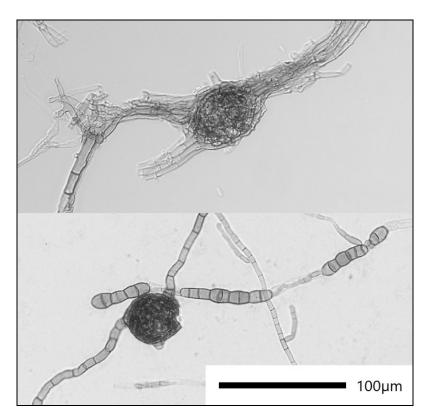


Рисунок 31- Микропикниды *Boeremia exigua* изолят MF 010-071

Для той части клады *Didymella*, которая включает референсные штаммы *D. glomerata* и *D. pomorum* было характерно образование многоклеточных (рис. 33) и одноклеточных хламидоспор, для той, которая включает референсный *D. pinodella* – формирование только

одноклеточных хламидоспор. А представители внутренней клады, близкой к *D. rosea* и *D. macrophylla* характеризовались тем, что не формировали ни покоящихся структур, ни хламидоспор, но их конидии были либо крупных размеров, либо очевидно диморфны (рис. 34).

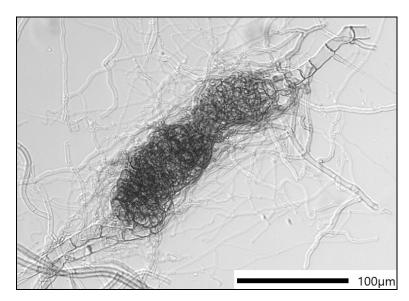


Рисунок 32 – Склероциоподобные структуры *Boeremia exigua* изолят MF 010-076

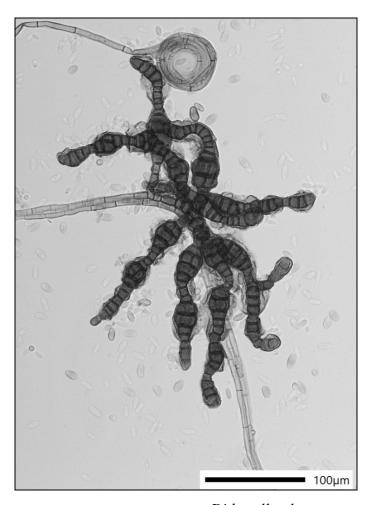


Рисунок 33 – Многоклеточные хламидоспоры Didymella glomerata изолят MF 010-025

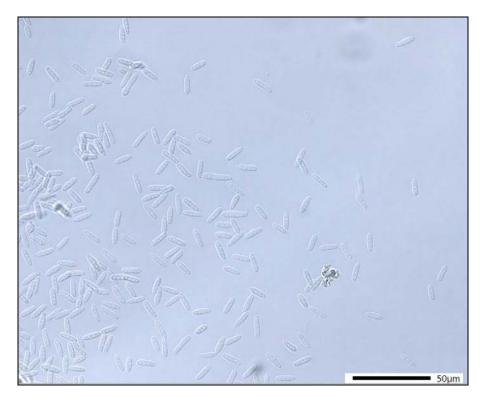


Рисунок 34 – Конидии Didymella rosea изолят MF 010-077

Всего по молекулярно-генетическим признакам из 29 изолятов в коллекции фомоидных поражённых растений семейства Asteraceae, грибов, выделенных ИЗ 14 изолятов идентифицировано до уровня вида, 15 до уровня рода. Таким образом, в коллекции представлено родов (Ascochyta, Boeremia, Didymella, Neoascochyta, *Nothophoma*, Stagonosporopsis) и 13 видов (Ascochyta sp., Stagonosporopsis sp., S. inoxydabilis, S. heliopsidis, В. exigua, D. americana, D. glomerata, D. macrophylla, D. pinodella, D. rosea, Neoascochyta desmazieri, N. paspali, Nothophoma quercina) фомоидных грибов представителей семейства Didymellaceae (табл. 8).

Изоляты MF 010-031, MF 010-033 и MF As16-005, MF As16-008 на всех филогенетических деревьях формировали отдельные клады, не включающие в свой состав ни одного референсного штамма Ascochyta и Stagonosporopsis, соответственно. Два первых изолята были выделены из поражённых растений Artemisia arctica, собранной в Камчатском крае. А изоляты MF As16-005 и MF As16-008 из дурнишника, собранного в Краснодарском крае. Вероятно, эти штаммы представляют собой новые для науки виды Ascohyta и Stagonosporopsis. В распределении на филограммах по кладам остальных изолятов изученных фомоидных грибов, выделенных из поражённых растений семейства Asteraceae не было обнаружено ни географической закономерности, ни связи с питающим растением.

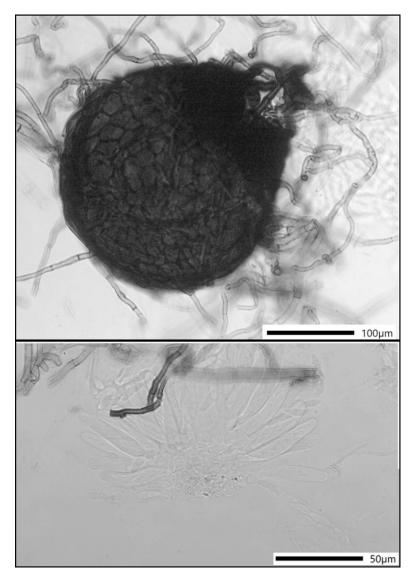


Рисунок 35 – Плодовое тело (сверху) и сумки с аскоспорами (снизу) Stagonosporopsis inoxydabilis MF 010-020

Вид *D. pinodella* считается специфичным патогеном растений семейства бобовых (Irinyi, 2009). Изолят MF 010-042, который с высокой долей вероятности является этим видом, был выделен из поражённых растений бодяка полевого. В доступной нам литературе (Каталог культур грибов, изолированных из сорных растений, 2007; Каталог микологического гербария патогенов сорных растений, 2007; Мельник 1977; Воегета et al., 2004; Воhár et. al., 2009) нет упоминаний о том, что данный вид ранее встречался на этих растениях. Виды *D. macrophylla* (МF 010-067) и *S. heliopsidis* (МF 010-002, МF 010-006) ранее не были обнаружены на территории России.

Таблица 8. Идентификация фомоидных грибов, выделенных из поражённых растений семейства Asteraceae

		Идентификация по	Идентификация по молекулярно-генетическим признакам				
№ Изолята	Растение-хозяин	морфологическим признакам	ITS	LSU	β-tubulin	итоговое определение	
MF 010-002	Ambrosia artemisiifolia	Phoma americana	Stagonosporopsis heliopsidis	Stagonosporopsis heliopsidis	Stagonosporopsis heliopsidis	Stagonosporopsis heliopsidis	
MF 010-003	A. artemisiifolia	Ph. multirostrata	Didymella americana	Didymella sp.	Didymella americana	Didymella americana	
MF 010-006	A. artemisiifolia	Ph. urticicola	S. heliopsidis	S. heliopsidis	S. heliopsidis	S. heliopsidis	
MF 010-020	Arctium tomentosum	Ph. ligulicola var. inoxydabilis	S. inoxydabilis	Stagonosporopsis sp.	S. inoxydabilis	S. inoxydabilis	
MF 010-025	Acroptilon repens	Ph. glomerata	D. glomerata	D. glomerata	D. glomerata	D. glomerata	
MF 010-026	Taraxacum officinale	Ph. schneiderae	Boeremia sp.	Boeremia sp.	-	Boeremia sp.	
MF 010-031	Artemisia arctica	Ph. ruttneri	Ascochyta sp.	Ascochyta sp.	Ascochyta sp.	Ascochyta sp.	
MF 010-033	A. arctica	Ph. herbarum	Ascochyta sp.	Ascochyta sp.	Ascochyta sp.	Ascochyta sp.	
MF 010-037	Cirsium sp.	Ph. heliopsidis	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	
MF 010-039	A. vulgaris	Ph. multirostrata	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	
MF 010-042	Cirsium arvense	Ph. urticicola	D. pinodella	Xenodidymella sp.	D. pinodella	D. pinodella	
MF 010-049	Cirsium arvense	Phoma zantedeschiae	Boeremia sp.	Boeremia sp.	-	Boeremia sp.	
MF 010-051	Arctium sp.	Ph. nigripycnidia	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	
MF 010-064	C. arvense	Ph. telephii	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	
MF 010-065	C. arvense	Ph. exigua var. heteromorpha	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	
MF 010-066	Taraxacum officinale	Ph. heteromorphospora	Stagonosporopsis sp.	Stagonosporopsis sp.	-	Stagonosporopsis sp.	
MF 010-067	T. officinale	Ph. subboltshauseri	D. marophylla	D. marophylla	D. marophylla	D. marophylla	
MF 010-069	Achillea millefolia	Ph. ruttneri	Neoascochyta paspali	Neoascochyta paspali	-	Neoascochyta paspali	
MF 010-071	T. officinale	Ph. plurivora	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	
MF 010-075	Artemisia absinthia	Ph. herbicola	Nothophoma quercina	Nothophoma quercina	Nothophoma quercina	Nothophoma quercina	

78

### Продолжение таблицы 8

		Идентификация по	Идентификация по молекулярно-генетическим признакам				
№ Изолята	Растение-хозяин	морфологическим признакам	ITS	LSU	β-tubulin	итоговое определени	
MF 010-076	Cyclachaena xanthifolia	Phoma nigripycnidia	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	
MF 010-077	Sonchus arvensis	Ph. rabiei	Didymella rosea	Didymella rosea	Didymella rosea	Didymella rosea	
MF 010-078	S. arvensis	Ph. anserina	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	Boeremia sp.	
MF 010-080	Taraxacum officinale	Ph. samarorum	Neoascochyta desmazieri	Neoascochyta desmazieri	-	Neoascochyta desmazieri	
MF 010-081	Phoenix canariensis	Ph. macrostoma var. macrostoma	Nothophoma quercina	-	-	Nothophoma quercine	
MF As16-003	Xanthium sp.	Ph. zantedeschiae	D. americana	-	D. americana	D. americana	
MF As16-004	Xanthium sp.	Ph. zantedeschiae	D. americana	-	D. americana	D. americana	
MF As16-005	Xanthium sp.	Boeremia exigua	Stagonosporopsis sp.	-	Stagonosporopsis sp.	Stagonosporopsis sp.	
MF As16-008	Xanthium sp.	B. exigua	Stagonosporopsis sp.	-	Stagonosporopsis sp.	Stagonosporopsis sp.	

В результате проведённой идентификации фомоидных грибов из гербарных образцов поражённых сложноцветных растений и коллекции фомоидных грибов, выделенных из растений семейства *Asteraceae*, по молекулярно-генетическим и морфологическим признакам можно сделать следующие выводы:

1. Впервые с применением методов молекулярной филогении установлено, что в коллекции чистых культур фомоидных грибов, ассоциированных с дикорастущими растениями семейства Asteraceae, насчитывающей 29 изолятов фомоидных грибов и 28 гербарных образцов поражённых фомоидными грибами сложноцветных растений, представлено 14 видов шести родов фомоидных грибов из семейства Didymellaceae: Ascohyta rabiei, Boeremia exigua, Didymella glomerata, D. americana, D. pomorum, D. macrophylla, D. pinodella, D. rosea, Epicoccum nigrum, Neoascochyta paspali, N. desmazieri, Nothophoma quercina, Stagonosporopsis heliopsidis, S. inoxydabilis.

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

Самый старый образец фомоидного гриба, хранящийся в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР, LEP 129311, который был успешно амплифицирован, и для которого была определена нуклеотидная последовательность ITS-локуса, имеет возраст 124 года

- В большинстве случаев морфологические признаки не могут быть использованы, единственные для корректной идентификации фомоидных грибов. В результате гербарных образцов, морфологические длительного хранения структуры неизбежно разрушаются. Морфологические признаки фомоидных грибов формируемые в чистой культуре в незначительной мере согласуются с молекулярно-генетическими признаками. Поэтому идентификация тех гербарных образцов или изолятов, которые были изучены только по морфологическим признакам, нуждается в уточнении с помощью методов молекулярной филогении. Методы молекулярной филогении оказались более информативными и надёжными и позволили дифференцировать близкородственные виды, что было невозможно с помощью морфологических признаков.
- 3. Для амплификации ITS-локусов рДНК фомоидных грибов, выделенных из гербарных образцов, целесообразно использовать пары праймеров ITS1F/ITS4 и Did2F/Did2R. В большинстве случаев, последующее секвенирование с использованием этих праймеров, может позволить провести идентификацию гербарного образца фомоидного гриба до рода и даже до вида. Предпочтительнее при этом использовать праймеры, специфичные для представителей семейства *Didymellaceae*, так как нуклеотидные последовательности ITS-регионов в большинстве случаев были определены после амплификации именно с ними.

- 4. Другой локус рДНК LSU-область не является более филогенетически информативным, чем традиционно используемый ITS-локус. Секвенирование для целей идентификации фомоидных грибов двух рибосомальных областей не целесообразно и рекомендуется отдать предпочтение секвенированию внутренних транскрибируемых спейсеров.
- 5. Для определения видовой принадлежности тех изолятов, которые были идентифицированы до уровня рода, необходимо дальнейшее изучение молекулярногенетических признаков (например, секвенирование локуса грb2).

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

#### 6.1. Изучение органотропной специализации Plenodomus lindquistii

Для изучения особенностей развития *P. lindquistii*, растения подсолнечника с предварительным ранением и без него были инокулированы суспензией спор и блоками, высеченными из 10-дневной чистой культуры гриба.

В результате было показано, что без предварительного ранения инокуляция растений суспензией спор во всех случаях не приводила к заражению. При инокуляции с предварительным поранением, незначительные некрозы размерами в среднем 2,7±0,8 мм проявлялись только на стебле спустя 32 дня после инокуляции.

Симптомы поражения в виде некрозов на листьях и стеблях в результате инокуляции агаровыми блоками, высеченными из чистой культуры гриба, проявлялись на 4–5 сутки после заражения.

Таким образом, для изучения особенностей развития, а также в дальнейшем для оценки патогенности и субстратной специализации изолятов, в качестве инокулюма использовали агаровые блоки из чистой культуры гриба, а не суспензию спор, что совпадает с ранее неоднократно использованной методикой (Miric et al., 1999).

Для того, чтобы оценить в какой части растения происходит заражение, блоки были помещены на лист, черешок листа, влагалище листа, стебель.

На пятые сутки после инокуляции некрозы были отмечены на всех инокулированных частях подсолнечника. Самые крупные некрозы формировались на стебле и во влагалище листа, некрозы меньших размеров – на листе и черешке листа (табл. 9).

Впоследствии при дальнейшем развитии заболевания некрозы с листа и стебля не распространялись на остальные части растения, в то время, как некрозы с черешков в отдельных случаях переходили на листья, а из листовых влагалищ в 75% случаев – далее на стебли, что в обоих случаях приводило к увяданию листа (рис. 36). Стебель в районе некроза часто на 5-6 сутки после инокуляции оказывался сломлен (рис. 36).



Рисунок 36 – Растения подсолнечника, 5 сутки после инокуляции агаровыми блоками изолята *Plenodomus lindquistii* MF Ha15-001

Так, заражение, вероятно, происходит не на листе или стебле, а скорее во влагалище листа. Это может быть связано с тем, что именно в этом месте создаются благоприятные условия для прорастания конидий и дальнейшего их проникновения в растение, а именно, оптимальная влажность, температура, концентрация питательных веществ.

Таблица 9. Патогенность изолятов *Plenodomus lindquistii* для разных частей подсолнечника

№ Изолята	Средние размеры некрозов (мм)				
312 1130313114	стебель	влагалище листа	лист	черешок	
MF Ha15-001	23,3±3,2	23±2,5	5,7±6,9	12,3±7,6	
MF Ha16-001	14, 7±4,6	9,3±1,4	9,3±7,8	11,±5,5	
MF Ha16-005	16, 7±1,8	14,3±3,9	10±6,3	25±0,7	

## 6.2. Оценка специализации к растению-хозяину изолятов фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника и близкородственных дикорастущих сложноцветных растений.

В результате искусственной инокуляции подсолнечника разными видами и изолятами фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника, было показано, что все изоляты вызывают некрозы на растениях (табл. 10). При этом, некрозы были отмечены в 100% случаях на стеблях при инокуляции с предварительным ранением, а на листьях с предварительным ранением некрозы вызывали все изоляты *Plenodomus lindquistii*, один *Diaporthe phaseolorum* (МF 16-010), один *Didymella glomerata* (МF На17-016) и один *Diaporthe* sp. (МF На18-046) (рис. 37). Без предварительного ранения ни один изолят *Diaporthe* не вызывал образование некрозов ни на листьях, ни на стеблях. Некрозы только на листьях без предварительного ранения вызывал изолят *Didymella glomerata* MF На17-017, только на стеблях – 2 изолята *P. lindquistii* (МF На15-001, МF На16-001), а на стеблях и на листьях – изоляты *P. lindquistii* МF На16-005 и *D. glomerata* МF На17-016. В среднем размеры некрозов, формирующихся в результате инокуляции с предварительным ранением, были больше, чем без такового.

Таблица 10. Патогенность изолятов фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника и близкородственных дикорастущих растений для разных частей подсолнечника

		Средние размеры некрозов (мм)				
№ Изолята	D	без ра	без ранения		с ранением	
ATRICOEIA EN	Вид	лист	стебель	лист	стебель	
Изоляты, выделенные из подсолнечника						
MF Ha15-001		0	2±2,4	8±3,7	15,3+4,1	
MF Ha16-001	Plenodomus lindquistii	0	2±1,4	2,7±2,2	11,3±0,8	
MF Ha16-005		3,7±2,2	4,3±3,6	13±1,4	13,3±2,3	
MF Ha17-016	Didwella alamanata	2,7±3,3	4,7±2,9	2,7±3,2	5±1,9	
MF Ha17-017	Didymella glomerata	3,3±2	0	0	9,7±1,5	
MF Ha17-042	Diaporthe gulyae	0	0	0	4,3±2,7	
MF Ha17-043		0	0	0	3,3±2,2	
MF Ha18-001	D' 4	0	0	0	2,7±0,41	
MF Ha18-002	Diaporthe eres	0	0	0	2,3±0,4	
MF Ha18-045	Dian outh o an	0	0	0	6, 7±5	
MF Ha18-046	Diaporthe sp.	0	0	0,7±0,8	12,3±3, 9	
MF 16-010	Diaporthe phaseolorum	0	0	4±5	3,7±0,5	
Изоляты, выделенные из дурнишника						
MF As16-003	Didwa ella america a	-	-	1,3±1,6	13±1,9	
MF As16-004	Didymella americana	-	-	0	3±0,7	
MF As16-005	Stagonosporopsis sp.	-	-	0	6±1,9	
MF As16-008	σιαξοπουροπορείε εφ.	-	-	0	7,3±3,7	

Продолжение таблицы 10

		Средние размеры некрозов (мм)					
№ Изолята	Вид	без ранения		с ранением			
		лист	стебель	лист	стебель		
Изоляты, выделенные из амброзии полыннолистной							
MF 010-002	Stagonosporopsis heliopsidis	-	-	14,7±9,1	6,3±2,1		
MF 010-003	Didymella americana	-	-	0	0		
MF 010-006	Stagonosporopsis heliopsidis	-	-	10,3±1,8	9,3±4,8		



Рисунок 37 – Некрозы на стебле подсолнечника, 5 сутки после инокуляции агаровыми блоками изолята *Diaporthe* sp. MF Ha18-045

Для оценки специализации видов к растению-хозяину, искусственную инокуляцию подсолнечника изолятами, выделенными из дикорастущих сородичей, осуществляли только с предварительным ранением. В результате было показано, что все изученные изоляты, кроме Didymella americana MF 010-003, выделенного из амброзии полыннолистной, являются патогенными для подсолнечника. Образование некрозов и на листьях и стеблях вызывают оба изолята Stagonosporopsis heliopsidis и изолят D. americana MF As16-003, выделенные из дурнишника (рис. 38). Все остальные изоляты фомоидных грибов вызывают некрозы лишь на стеблях (табл. 10, рис. 39).

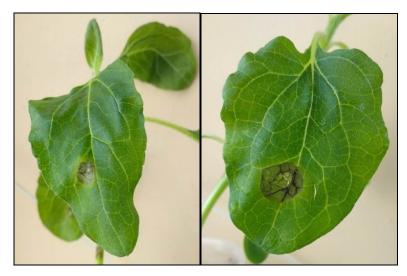


Рисунок 38 — Некрозы на листьях подсолнечника, 5 сутки после инокуляции с предварительным ранением агаровыми блоками изолята *Stagonosporpsis heliopsidis* MF 010-006.



Рисунок 39 — Некроз на стебле подсолнечника, 5 сутки после инокуляции с предварительным ранением агаровыми блоками изолята *Stagonosporopsis* sp. MF As16-005

В результате оценки специализации к растению-хозяину изолятов фомоидных грибов, выделенных из поражённых растений подсолнечника и близкородственных ему дикорастущих растений, было показано, что дурнишник не поражается изолятами *Diaporthe gulyae* MF Ha17-042 и *Diaporthe* sp. MF Ha18-046. Некрозы только листьев вызывает *D. eres* MF Ha18-001, а только стеблей – *P. lindquistii* MF Ha16-001, *D. phaseolorum* MF 16-010, *Diaporthe* sp. MF Ha18-045. Все остальные изоляты вызывали образование некрозов как на листьях, так и на стеблях (табл. 11, рис. 40).

Таблица 11. Патогенность изолятов фомоидных грибов для разных частей дурнишника

	11	Средние размер	ы некрозов (мм)	
	Изолят	лист	стебель	
No	Вид	JIMC1	СТСОСЛВ	
	Изоляты, выделенные из п	одсолнечника		
MF Ha15-001		$3,3\pm 2$	$3,7\pm3,3$	
MF Ha16-001	Plenodomus lindquistii	0	4,3±1,8	
MF Ha16-005		-	-	
MF Ha17-016	Didymella glomerata	$0,7\pm0,8$	3±0,7	
MF Ha17-017	Diaymetia giomeraia	$0,7\pm0,8$	2,7±0,8	
MF Ha17-042	Dian outh a gulya a	0	0	
MF Ha17-043	Diaporthe gulyae	4±5	0,7±0,8	
MF Ha18-001	Dignortha aves	2,7±1,8	0	
MF Ha18-002	Diaporthe eres	2,7±3,3	1±1,2	
MF Ha18-045	Diaporthe sp.	0	2,3±2,9	
MF Ha18-046	1 1	0	0	
MF 16-010	Diaporthe phaseolorum	0	4,3±2,3	
	Изоляты, выделенные из	дурнишника		
MF As16-003	Didymella americana	4±5	8±5,3	
MF As16-004	Diaymetta americana	3±1,9	1±1,2	
MF As16-005	Stagonospovonsis sp	0	2,3±1,5	
MF As16-008	Stagonosporopsis sp.	5,7±3,5	2,3±0,4	
Изоляты, выделенные из амброзии полыннолистной				
MF 010-002	Stagonosporopsis heliopsidis	21±3,7	16±5,1	
MF 010-003	Didymella americana	-	-	
MF 010-006	Stagonosporopsis heliopsidis	-	-	



Рисунок 40 – Некрозы на стебле (справа) и листе (слева) дурнишника, 5 сутки после инокуляции с предварительным ранением агаровыми блоками изолята *Stagonosporopsis heliopsidis* MF 010-002.

В результате оценки специализации к растению-хозяину изолятов фомоидных грибов, выделенных из поражённых растений подсолнечника близкородственных дикорастущих растений, было показано, что амброзию полыннолистную не поражают следующие изоляты из подсолнечника: Didymella glomerata (MF Ha17-016, MF Ha17-017), Diaporthe gulyae MF Ha17-042, D. phaseolorum MF 16-010, Diaporthe sp. MF Ha18-045 (табл. 12). Образование некрозов только на стеблях вызывают изоляты P. lindquistii MF Ha16-005, D. gulyae (MF Ha17-043), D. eres (MF Ha18-001, MF Ha18-002), Diaporthe sp. MF-Ha18-046 (рис. 41), Didymella americana (MF As16-003, MF 010-003), Stagonosporopsis sp. (MF As16-008). Некрозы как стеблей, так и листьев были отмечены в результате инокуляции изолятами P. lindquistii MF Ha15-001, MF Ha16-001, изолятами S. heliopsidis MF 010-002, MF 010-006 (рис. 42), изолятом Stagonosporopsis sp. MF As16-005, D. americana MF As16-004.

Таблица 12. Патогенность изолятов фомоидных грибов для разных частей амброзии полыннолистной

		Средние разме	ры некрозов (мм)		
	Изолят	лист	стебель		
No	Вид	JIMC1	СТСОСЛВ		
	Изоляты, выделенные из п	одсолнечника			
MF Ha15-001		2±1,2	1,7±0,4		
MF Ha16-001	Plenodomus lindquistii	1±1,2	2		
MF Ha16-005		0	3±0,7		
	Изоляты, выделенные из п	одсолнечника			
MF Ha17-016	Didumalla alamanata	0	0		
MF Ha17-017	Didymella glomerata	0	0		
MF Ha17-042	Diamouth a culus a	0	0		
MF Ha17-043	Diaporthe gulyae	0	0,7±0,4		
MF Ha18-001	D:	0	1,3±0,8		
MF Ha18-002	Diaporthe eres	0	1		
MF Ha18-045	Diaporthe sp.	0	0		
MF Ha18-046	• •	0	3,3±2		
MF 16-010	Diaporthe phaseolorum	0	0		
	Изоляты, выделенные из	дурнишника			
MF As16-003	Didywalla amariaana	0	1,7±1,1		
MF As16-004	Didymella americana	2, 7±0,8	3,3±1,1		
MF As16-005	Stagonosporopsis sp.	16±1,9	12±1,9		
MF As16-008	siagonosporopsis sp.	0	1,7±1,1		
Изоляты, выделенные из амброзии полыннолистной					
MF 010-002	Stagonosporopsis heliopsidis	4,7±0,4	5,3±1,8		
MF 010-003	Didymella americana	0	2±1,4		
MF 010-006	Stagonosporopsis heliopsidis	9,3±0,8	9,3±1,1		



Рисунок 41 — Некрозы на стебле амброзии полыннолистной, 5 сутки после инокуляции с предварительным ранением агаровыми блоками изолята *Diaporthe* sp. MF Ha18-046



Рисунок 42 — Некрозы на стебле (справа) и листе (слева) амброзии полыннолистной, 5 сутки после инокуляции с предварительным ранением агаровыми блоками изолята Stagonosporopsis heliopsidis MF 010-006

В результате оценки специализации к растению-хозяину изолятов фомоидных грибов, выделенных из поражённых растений подсолнечника и близкородственных дикорастущих

растений, было показано, что топинамбур могут поражать все исследованные виды и изоляты фомоидных грибов (табл. 13). При этом, образование некрозов вследствие инокуляции было отмечено только на стеблях (рис. 43), и в двух случаях на листьях топинамбура, при инокуляции изолятами *P. lindquistii* MF Ha16-001 (рис. 44) и *S. heliopsidis* MF 010-002 (рис. 45).

Таблица 13. Патогенность изолятов фомоидных грибов для разных частей топинамбура

	Изолят	Средние размеры некрозов (мм)			
<u>No</u>	Dwa	лист	стебель		
740	Вид Изоляты, выделенные из по	опсоппенника			
MF Ha15-001	изолиты, выделенные из по	0	6±1,4		
	Plenodomus lindquistii		,		
MF Ha16-001 MF Ha16-005	1 tenodomus unaquisiii	5,7±1,1 0	11±1,2		
MF Ha17-016			4,3±1,8		
	Didymella glomerata	0	2,3±0,4		
MF Ha17-017	, 0	0	3		
MF Ha17-042	Dimmonth a solution	0	2±1,4		
MF Ha17-043	Diaporthe gulyae	0	3±0,7		
MF Ha18-001	Diamouth a area	0	3,3±0,8		
MF Ha18-002	Diaporthe eres	0	3,3±1,1		
MF Ha18-045	Diaporthe sp.	0	2,7±0,8		
MF Ha18-046	Diaporine sp.	0	4±0,7		
MF 16-010	Diaporthe phaseolorum	0	1,3±0,8		
	Изоляты, выделенные из д	дурнишника			
MF As16-003	Didomella americana	0	$4\pm 2,5$		
MF As16-004	Didymella americana	0	1,3±1,6		
MF As16-005	Stagonosporopsis sp.	0	2±1,4		
MF As16-008	siagonosporopsis sp.	0	2,3±0,4		
Изоляты, выделенные из амброзии полыннолистной					
MF 010-002	Stagonosporopsis heliopsidis	6,3±1,5	5,7±0,8		
MF 010-003	Didymella americana	0	6±1,9		
MF 010-006	MF 010-006 Stagonosporopsis heliopsidis		4		



Рисунок 43 – Некрозы на стебле топинамбура, 5 сутки после инокуляции с предварительным ранением агаровыми блоками изолята *Didymella americana* MF 010-003



Рисунок 44 — Некрозы на листе (справа) и стебле (слева) топинамбура, 5 сутки после инокуляции с предварительным ранением агаровыми блоками изолята *Plenodomus lindquistii* MF Ha16-001



Рисунок 45 – Некрозы на листе (слева) и на стебле (справа) топинамбура, 5 сутки после инокуляции с предварительным ранением агаровыми блоками изолята *Stagonosporopsis heliopsidis* MF 010-002

Таким образом, в результате проведенных опытов по искусственной инокуляции подсолнечника, дурнишника, амброзии полыннолистной и топинамбура видами и изолятами фомоидных грибов, выделенных из поражённых растений подсолнечника и близкородственных дикорастущих и культурных растений, можно сделать следующие выводы.

- 1. Для изучения особенностей развития, оценки патогенности и субстратной специализации изолятов, в качестве инокулюма предпочтительнее использовать агаровые блоки диаметром 5 мм высеченные из чистой культуры изолята, чем суспензию спор;
- 2. Заражение подсолнечника видом *Plenodomus lindquistii*, вероятно, происходит не на листе или стебле, а во влагалище листа;
- 3. В лабораторных условиях изоляты грибов P. lindquistii и Diaporthe spp., считающихся специализированными патогенами подсолнечника, способны заражать не только подсолнечник, но близкородственные ему дикорастущие виды. Изоляты P. lindquistii патогенны для всех изученных растений, при этом на инокулированном подсолнечнике и топинамбуре вызывают на 5 сутки некрозы на стебле размером  $\geq 5$  мм, на стеблях амброзии полыннолистной и дурнишника вызывают образование некрозов  $\leq 5$  мм. Изоляты Diaporthe gulyae, D. eres и Diaporthe sp. патогенны для подсолнечника и всех исследованных близкородственных ему дикорастущих сорных растений. Изолят D. phaseolorum патогенен для

подсолнечника, дурнишника и топинамбура, но не патогенен для амброзии полыннолистной. Все исследованные изоляты Diaporthe также имеют широкую субстратную специализацию, но они менее агрессивные, чем изоляты  $P.\ lindquistii$  и на 5 сутки после инокуляции вызывали на стеблях инокулированных растений некрозы размером  $\leq 5$ мм (табл. 14).

- Изоляты видов Didymella glomerata и D. americana в лабораторных условиях патогенны для подсолнечника, дурнишника, топинамбура и амброзии быть полыннолистной. Изоляты D. glomerata патогенны для подсолнечника, топинамбура, дурнишника и не патогенны для амброзии полыннолистной. На 5 сутки они вызывают образование некрозов на стеблях инокулированного подсолнечника размерами  $\geq 5$  мм, на стеблях дурнишника и топинамбура ≤5мм. Изоляты D. americana патогенны для всех изоляты различаются исследованных растений, разные ПО агрессивности. Ha инокулированных стеблях подсолнечника, дурнишника, топинамбура амброзии полыннолистной, на 5 сутки эти изоляты вызывают формирование некрозов разных размеров в зависимости от изолята (табл. 14).
- 5. В лабораторных условиях показано, что изоляты вида *Stagonosporopsis heliopsidis*, считающегося специализированным для амброзии полыннолистной, патогенны также и для подсолнечника, дурнишника и топинамбура, вызывая на 5 сутки на их стеблях некрозы размерами ≥5 мм. Изоляты *Stagonosporopsis* sp., выделенные из дурнишника, патогенны для подсолнечника, дурнишника, амброзии полыннолистной и топинамбура, но эти изоляты более агрессивны (вызывают на 5 сутки на стеблях некрозы размерами ≥5 мм) для подсолнечника и амброзии полыннолистной, и менее (вызывают на 5 сутки на стеблях некрозы размерами ≤5 мм) для дурнишника и топинамбура (табл. 14).
- 6. Отмечена существенная разница между разными изолятами одного вида. Так из двух изолятов *Diaporthe gulyae*, изолят MF Ha17-043 вызывал некрозы стеблей всех инокулированных растений, в то время, как MF Ha17-042 только подсолнечника и топинамбура. Показана разница для изолятов одного вида, выделенных из разных растений. Так изоляты *Didymella americana* MF As16-003 и MF As16-004 были патогенны для всех изученных растений. А изолят этого же вида MF 010-003 не был патогенным для подсолнечника. Различались изоляты также и субстратной специализацией. Так изоляты *Diaporthe phaseolorum* MF 16-010 и оба изолята *Didymella glomerata* (MF Ha17-016, MF Ha17-017) были патогенными для подсолнечника, топинамбура и дурнишника, но не для амброзии полыннолистной (табл. 14).
- 7. Впервые в лабораторных условиях было показано, что виды *Plenodomus lindquistii*, *Diaporthe gulyae*, *D. phaseolorum*, *D. eres* могут поражать, помимо подсолнечника, дурнишник, амброзию полыннолистную и топинамбур. Исходя из этого, можно сделать вывод,

что потенциально для хранения и распространения инфекции этих видов грибов могут выступать эти близкородственные подсолнечнику растения, часто произрастающие на одних и тех же или соседствующих полях.

- 8. Вид *Stagonosporopsis heliopsidis*, считающийся специализированным патогеном для амброзии полыннолистной, в лабораторных условиях является патогенным для подсолнечника, дурнишника, топинамбура.
- 9. Виды *Didymella glomerata*, *D. americana* являются широко распространёнными, патогенность изолятов этих видов впервые отмечена для подсолнечника, дурнишника, амброзии полыннолистной и топинамбура.

Таблица 14. Патогенность изолятов фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника и дурнишника для разных растений

		Патогенность для разных растений					
Растение-хозяин	Вид гриба (количество изолятов)	подсолнечник	топинамбур	дурнишник	амброзия полыннолистная		
	Plenodomus lindquistii (3)	++	++	+	+		
	Didymella glomerata (2)	++	+	+	-		
полоонионии	Diaporthe gulyae (2)	+	+	+/-	+/-		
подсолнечник	Diaporthe eres (2)	+	+	+	+		
	Diaporthe phaseolorum (1)	+	+	+	-		
	Diaporthe sp. (2)	++	+	++/-	+/-		
	Didymella americana (2)	++/+	+	++/+	+		
дурнишник	Stagonosporopsis sp. (2)	++	+	+	++/+		
амброзия	Didymella americana (1)	-	++		+		
полыннолистная	Stagonosporopsis heliopsidis (2)	++	++/+	++	++		

<sup>++ -</sup> изолят при инокуляции с предварительным ранением стебля вызывает некрозы ≥5 мм.

<sup>+ -</sup> изолят при инокуляции с предварительным ранением стебля вызывает некрозы ≤5 мм.

<sup>-</sup> изолят при инокуляции с предварительным ранением стебля не вызывает образование некрозов

<sup>/ -</sup> наблюдалась разница между разными изолятами одного вида по патогенности или агрессивности заштрихованное поле – нет данных.

#### 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 является 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 (LepliF2/LepliR2), которые могут использоватья 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 были 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 heliopsidis, 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 heliopsidis* выявлены на территории России впервые.
- 7. Показано, что изоляты видов *Plenodomus lindquistii, Diaporthe gulyae, D. eres, Didymella americana, Stagonosporopsis* sp. и *S. heliopsidis* 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Аксель, М.Ю. Род *Phyllosticta* в Эстонской СССР / М.Ю. Аксель // Труды Ботанического института им. В. Л. Комарова АН СССР. Серия II. Споровые растения. — 1956. — В. 11. — С. 75-174.

Алексеева, С.П. Фомоз подсолнечника / С.П. Алексеева // Защита растений. — 1969. — В.  $8.-\mathrm{C}.48.$ 

Антонова, Т.С. Токсичность культурального фильтрата и агрессивность географически отдаленных изолятов *Phomopsis (Diaporthe) helianthi* Munt.-Cvetk., Michal., Petr. для подсолнечника / Т.С. Антонова, Н.М. Арасланова, Т.А. Челюстникова // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2006. – В. 2(135). – С. 67-72.

Андросова, В.М. Методическое пособие по новым аспектам диагностики возбудителя фомопсиса подсолнечника / В.М. Андросова, А.О. Диденко. – Краснодар, 2011 – 18 с.

Арасланова, Н.М. Интенсивность роста в культуре изолятов фомопсиса при разных температурах и токсичность их культуральных фильтратов для проростков подсолнечника / Н.М. Арасланова, Т.А. Челюстникова, Т.С. Антонова // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2013. – В. 1(153-154). – С. 60-66.

Арасланова, Н.М. К вопросу о вредоносности *Phoma macdonaldii* Воегета на подсолнечнике / Н.М. Арасланова, С. Л. Саукова, Т. С. Антонова // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2018. – В. 3(175). – С. 117-123.

Афонин, А.Н. Агроэкологический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения / А.Н. Афонин, С.Л. Грин, Н.И. Дзюбенко; [под ред. Фролов А.Н.]. DVD-версия, 2008. – режим доступа: http://www.agroatlas.ru.

Бородин, С.Г. Грибные болезни подсолнечника в Краснодарском крае / С.Г. Бородин, И.А. Котлярова // Болезни и вредители масличных культур (сборник научных работ). – 2006. – С. 3-10.

Васютин, А.С. Не допустить распространения фомопсиса подсолнечника / А.С. Васютин, Б.И. Юдин, В.В. Чумакова // Защита и карантин растений. – 2003. – № 9. – С. 28-30.

Вороненко, М.А. О новом заболевании подсолнечника / М.А. Вороненко, Е.И. Примаковская // Защита растений. —  $1983. - N_0 1. - C.39.$ 

Выприцкая, А.А. Видовой состав и вредоносность микобиоты семян подсолнечника в Тамбовской области / А.А. Выприцкая, А.М. Пучнин, А.А. Кузнецов, И.И. Мустафин // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2010. – В. 1(142-143). – С. 62-67.

Гуркина, Т.А. Первая находка *Phomopsis phaseoli* на томате // «Ломоносов»: материалы XXV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Москва, 9-13 апреля 2018г.). – Москва, 2018. – 1с.

Долженко, Е.Г. Сорная растительность – резерватор фомопсиса / Е.Г. Долженко // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 1998. – В. 120. – С. 71-72.

Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка, С.П Вассер, И.А. Элланская и др.; [под редакцией А.В. Янковской]. Киев: Наукова думка, 1982. – С. 550.

Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза. – Режим доступа: http://docs.cntd.ru/document/456047397/

Каталог культур грибов, изолированных из сорных растений / Л.Б. Хлопунова, Ф.Б. Ганнибал; [под. ред. академика РАСХН М.М. Левитина]. Санкт-Петербург: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 2007. – 75с.

Каталог микологического гербария патогенов сорных растений / И.В. Бильдер, Ф.Б. Ганнибал; [под. ред. академика РАСХН М.М. Левитина]. Санкт-Петербург: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 2007. – 156с.

Мельник, В.А. Определитель грибов рода *Ascochyta* Lib. / В.А. Мельник. - Л.: Наука, 1977. – 246с.

Неделько, В.К. Распространение и вредоносность фомоза и пепельной гнили подсолнечника в Краснодарском крае / В.К. Неделько // Бюллетень научно-технической информации по масличным культурам ВНИИ МК. – 1973. – В. 2. – С. 65-68.

Пивень, В.Т. Фомопсис на подсолнечнике / В.Т. Пивень, И.И. Шуляк, Т.П. Алифирова, Е.Г. Самелик // Болезни и вредители масличных культур (сборник научных работ). – 2006. – С. 90- 92.

Пономарев, В.Ф. Серая пятнистость стеблей подсолнечника / В.Ф. Пономарев // Защита и карантин растений. -1989. -№ 2. - C. 63.

Саукова, С.Л. Возбудитель фомоза на вегетирующих растениях подсолнечника в Краснодарском крае / С.Л. Саукова, М.В. Ивебор, Т.С. Антонова, Н.М. Арасланова // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2014. – В. 2(159-160). – С. 167-172.

Саукова, С.Л. Фомоз (*Phoma macdonaldii* Boerema) в семенах подсолнечника / С.Л. Саукова, Н.М. Арасланова, Т.С. Антонова, М.В. Ивебор // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2018. – В. 2(174). – С. 107-111.

Скрипка, О.В. Внутривидовая гетерогенность возбудителя фомопсиса подсолнечника / О.В. Скрипка // Защита растений. -1991. -№ 5. - C 40-41.

Слюсарь, Э.Л. Вредоносность фомопсиса на подсолнечнике / Э.Л. Слюсарь, А.М. Фираз // Защита и карантин растений. —  $1994. - N_2 3-4. - C. 6.$ 

Успенская, Г.Д. Порядок *Sphaeropsidales /* Г.Д. Успенская // Жизнь растений. Том 2. Грибы. – М.: Просвещение, 1976. – С. 424-438.

Успенская, Г.Д. О некоторых путях установления филогенетических связей Сферопсидальных грибов / Г.Д. Успенская // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. – 1981. – Т. 86(1). – С. 56-60.

Успенская, Г.Д. Таксономические критерии Сферопсидальных грибов и ультраструктура конидиогенного аппарата / Г.Д. Успенская, М.З. Эль-Шанауани // Микология и фитопатология. – 1983. – Т. 17(2). – С. 112-116.

Эль-Шанауани, М.З. Изучение таксономической ценности некоторых признаков грибов рода *Phoma* Sacc. и *Ascochyta* Lib.: Автореф. дис. канд. биол. наук. - Москва, 1976.

Якуткин, В.И. Фомопсис подсолнечника / В.И. Якуткин // Защита растений. — 1990. — №  $3.-\mathrm{C}.~37\text{-}38.$ 

Якуткин, В.И. Болезни и вредители подсолнечника / В.И. Якуткин, С.М. Ломовской // Прогноз распространения главнейших вредителей и болезней сельскохозяйственных культур на 1991 год. – 1991. – С. 103-109.

Якуткин, В.И. Идентификация возбудителя фомопсиса подсолнечника и методы его учета / В.И. Якуткин // Методические указания. – Санкт-Петербург, 1991. – 23с.

Якуткин, В.И. Появление бурой пятнистости стеблей подсолнечника в России / В.И. Якуткин // Микология и фитопатология. – 1993. – Т. 27(5). – С. 68-73.

Якуткин, В.И. Методы выявления и учета фомопсиса подсолнечника / В.И. Якуткин // Сборник методических рекомендаций по защите растений. – Санкт-Петербург, 1998. – С. 191-207.

Якуткин, В.И. Болезни подсолнечника в России и борьба с ними / В.И. Якуткин // Защита и карантин растений. -2001. -№ 10. - C. 26-28.

Якуткин, В.И. Прогноз болезней подсолнечника в России в 2005 г. и борьба с ними / В.И. Якуткин // Защита и карантин растений. -2005. -№ 5. - C. 41.

Якуткин, В.И. История изучения болезней подсолнечника в России // Материалы международной научной конференции. Проблемы микологии и фитопатологии в XXI веке. Санкт-Петербург, 2-4 октября 2013 – Санкт-Петербург, 2013. – С. 332.

Ячевский, А.А. Определитель грибов, т. ІІ. / А.А. Ячевский. – 2-е изд. – Петроград, 1917.

Acimovic, M. Occurrence of sunflower diseases in Bulgaria, Rumania, Hungary and Yugoslavia / M. Acimovic // Helia. − 1980. − № 3. − P. 33-36.

Acimovic, M. Mogucnosti suzbijanja *Phomopsis* sp. ostalih prouzrokovaca bolesti suncokreta / M. Acimovic, N. Straser, S. Drazik // Zastita Bilja. – 1982. – Vol. 33(3). – P. 293 – 299.

Acimovic, M. Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia / M. Acimovic // Helia.  $-1984. - N_{\odot} 7. - P. 45-54.$ 

Allesher, A. Fungi imperfecti. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland / A. Allesher. - Oesterreich und der Schweiz 1, 6, 1901.

Anagnostakis, S.L. *Diaporthe eres* (*Phomopsis oblonga*) as a pathogen of butternut (*Juglans cinerea*) in Connecticut / S.L. Anagnostakis // Plant disease – 2007. – V. 91. – P. 1198.

Ariyawansa, H.A. Revision and phylogeny of *Leptosphaeriaceae* / H.A. Ariyawansa, C. Phukhamsakda, K.M. Thambugala, T.S. Bulgakov, D.N. Wanasinghe, R.H. Perera, A. Mapook, E. Camporesi, J.-C. Kang, E.B.G. Jones, A.H. Bahkali, S.C. Jayasiri, K.D. Hyde, Z.-Y. Lio, J.D. Bhat // Fungal diversity. – 2015a. – V. 74. – P. 19-51.

Ariyawansa, H.A. Towards a natural classification and backbone tree for *Pleosporaceae /* H.A. Ariyawansa, K.M. Thambugala, D.C. Manamgoda, R. Jayawardena, E. Camporesi, S. Boonmee, D.N. Wanasinghe, R. Phookamsak, S. Hongsanan, C. Singtripop, E. Chukeatirote, J.-C. Kang, E.B.G. Jones, K.D. Hyde // Fungal diversity. – 2015b. – V. 71. – P. 85-139.

Ash, G.J. Genetic diversity and phylogeny of a *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus* / G.J. Ash, S. Sakuanrungsirikul, E. Anschaw, B.J. Stodart, N. Crump, D. Hailstones, J.D.I. Harper // Mycologia. – 2010. – V. 102. – P. 54-61.

Aveskamp, M.M. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance / M.M. Aveskamp, J. de Guyter, P.W. Crous // Fungal diversity. – 2008. – V. 31. – P. 1-18.

Aveskamp, M.M. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties / M.M. Aveskamp, G.J.M. Verkley, J. de Gruyter, M.A. Murace, A. Perelló, J.H.C. Woudenberg, J.Z. Groenewald, P.W. Crous // Mycologia. – 2009. – V. 101(3). – P. 363-382.

Aveskamp, M.M. Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera // M.M. Aveskamp, J. de Gruyter, J.H.C. Woudenberg, G.J.M. Verkley, P.W. Crous // Studies in mycology. – 2010. – V. 65. – P. 1-60.

Aveskamp, M.M. Phylogeny and DNA-based identification in *Phoma* and related genera: PhD thesis. – Wageningen University, Wageningen, NL, 2014.

Baumgartner, K. Characterization of species of *Diaporthe* from Wood Cankers of grape in Eastern North American Vineyards / K. Baumgartner, P.T. Fujiyoshi, R. Travadon, L.A. Castlebury, W.F. Wilcox, P.E. Rolshausen // Plant disease. – 2013. – V. 97(7). – P. 912-920.

Boerema, G.H. Additional notes on *Phoma herbarum* / G.H. Boerema // Persoonia. – 1970. – V. 6(1). – P. 15-48.

Boerema, G.H. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta* / G.H. Boerema, G.J. Bollen // Persoonia. – 1975. – V. 8. – P. 111-144.

Boerema, G.H. Notes on *Phoma //* G.H. Boerema, H.A. van Kesteren, W.M. Loerakker // Transactions of the British Mycological Society. – 1981. – V. 77. – P. 61-74.

Boerema, G.H. *Phoma* identification Manual / G.H. Boerema, J. de Gruyter, M.E. Noordeloos, M.E.C. Hamers. – UK: CABI Publishing, 2004. – 470p.

Bohár, G. First European report of a leaf spot on common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) caused by a *Phoma* sp. / G. Bohár, V. Bohár, A. Pintye, L. Kiss // Plant disease. – 2009. – V. 93(7) – P. 763.

Boyle, J.S. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification / J.S. Boyle, A.M. Lew // Trends Genet. – 1995. – Vol. 11(1). – P. 8.

Brever, Y.G. Electron microscope observation on the development of pycnidiospores in *Phoma* and *Ascochyta* spp. / Y.G. Brever, G.H. Boerema // Proceedings K. Nederlandse Akademie van Wetenschappen C. – 1965. – V. 68. – P. 86-97.

Bruns, T.D. Fungal molecular systematics / T.D. Bruns, T.J. White, J.W. Taylor // Ann Rev Ecol Syst. – 1991. – V. 22. – P. 525-564.

Carbone, I. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes / I. Carbone, L.M. Kohn // Mycologia. – 1999. – V. 91. – P. 553-556.

Chandrashekar, M. Evaluation of Seedborne Quarantinable Diseases of Oilseeds: *Carthamus*, *Glycine*, *Helianthus*, *Linum* and *Ricinus* / M. Chandrashekar // Department of Primary Industries and Energy Bureau of Resource Sciences. A review commissioned by the Australian Quarantine and Inspection Service (AQIS). – Canberra, 1993.

Chen, Q. Resolving the *Phoma* enigma / Q. Chen, J.R. Jiang, G.Z. Zhang, L. Cai, P.W. Crous // Studies in mycology. – 2015. – V. 82. – P. 137-217.

Chen, Q. *Didymellaceae* revisited / Q. Chen, L.W. Hou, W.J. Duan, P.W. Crous, L. Cai // Studies in mycology. – 2017. – V. 87. – P. 105-159.

Crous, P.W. Phylogenetic lineages in the *Capnodiales /* P.W. Crous, C.L. Schoch, K.D. Hyde, A.R. Wood, C. Gueidan, G.S. de Hoog, J.Z. Groenewald // Studies in mycology. – 2009. – V. 64. – P. 17-47.

Crous, P.W. Fungal Planet Description Sheets: 214–280 / P.W. Crous, R.G. Shivas, W. Quaedvlieg, M. van der Bank, Y. Zhang, B.A. Summerell, J. Guarro, M.J. Wingfield, A.R. Wood, A.C. Alfenas, U. Braun, J.F. Cano-Lira, D. García, Y. Marin-Felix, P. Alvarado, J.P. Andrade, J. Armengol, A. Assefa, A. den Breeÿen, I. Camele, R. Cheewangkoon, J.T. De Souza, T.A. Duong, F. Esteve-Raventós, J. Fournier, S. Frisullo, J. García-Jiménez, A. Gardiennet, J. Gené, M. Hernández-Restrepo, Y. Hirooka, D.R. Hospenthal, A. King, C. Lechat, L. Lombard, S.M. Mang, P.A.S. Marbach,

- S. Marincowitz, Y. Marin-Felix, N.J. Montaño-Mata, G. Moreno, C.A. Perez, A.M. Pérez Sierra, J.L. Robertson, J. Roux, E. Rubio, R.K. Schumacher, A.M. Stchigel, D.A. Sutton, Y.P. Tan, E.H. Thompson, E. van der Linde, A.K. Walker, D.M. Walker, B.L. Wickes, P.T.W. Wong, J.Z. Groenewald // Persoonia. 2014. V. 32. P. 184-306.
- Crous, P.W. The seldom occur alone / P.W. Crous, J.Z. Groenewald // Fungal biology. 2016. –V. 120. P. 1392-1415.
- de Gruyter, J. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex / J. de Gruyter, M.M. Aveskamp, J.H.C. Woudenberg, G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, P.W. Crous // Mycological research. 2009. V. 113. P. 508-519.
- de Gruyter, J. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma* / J. de Gruyter, J.H.C. Woudenberg, M.M. Aveskamp, G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, P.W. Crous // Mycologia. 2010. V. 102(5). P. 1066-1081.
- de Gruyter, J. Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in *Pleosporales /* J. de Gruyter, J.H.C. Woudenberg, M.M. Aveskamp, G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, P.W. Crous // Studies in mycology. 2012. V. 75. P. 1-36.
- Dennis, R.W.G. Notes on some British fungi ascribed to *Phoma* and related genera / R.W.G. Dennis // Transactions of the British Mycological Society. 1946. V. 29. P. 11-42.
- Dhingra, O. D. Basic plant pathology methods / O.D. Dhingra, J.B. Sinclair. Second edition. USA: CRC Lewis publishers, 1995. P. 434.
- Dissanayake, A.J. Molecular phylogenetic analysis reveals seven new *Diaporthe* species from Italy / A.J. Dissanayake, E. Camporesi, K.D. Hyde, W. Zhang, J.Y. Yan, X.H. Li // Mycosphere. 2017. V. 8(5). P. 853-877.
- Donald, P.A. Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower in North Dakota / P.A. Donald, J. R. Venette, T.J Gulya // Plant Disease. 1987. V. 71. P. 466-468.
- Doyle, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Focus. 1990. V. 12. P. 13-15.
- Frezzi, M.J. Especie del genero *Phoma* parasite de *Helianthus annuus* L. en Manfredi (Cordoba) Republica Argentina / M.J. Frezzi // Idia. 1964. P. 37-40.
- Farr, D.F. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States / D.F. Farr, L.A. Castlebury, A.Y. Rossman // Mycologia. 2002. V. 94. P. 494-504.
- Gao, Y. Three new species of *Phomopsis* in Gutianshan Nature Reserve in China / Y. Gao, W. Sun, Y. Su, L. Cai // Mycological progress. 2014. V. 13. P. 111-121.

Gardes, M. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts / M. Gardes, T.D. Bruns // Molecular ecology. – 1993. – V. 2. – P. 113-118.

Garibaldi, A. First report of black rot caused by *Phomopsis* cucurbitae on cantaloupe (*Cucumis melo*) in the piedmont region of northern Italy / A. Garibaldi, D. Bertetti, A. Poli, M.L. Gullino // Plant disease. – 2011. – V. 95. – P. 1317.

Gaudet, M.D. Transmission of *Phoma oleraceae* var. *helianthi-tuberosi* by the adult stage of *Apion occidentale* / M.D. Gaudet, J.T. Schulz // Journal of economic entomology. – 1981. – V. 4(1). – P. 486-489.

GenBank. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Gomes, R.R. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi / R.R. Gomes, C. Glienke1, S.I.R. Videira, L. Lombard, J.Z. Groenewald, P.W. Crous // Persoonia. – 2013. – V. 31. – P. 1-41.

Grove, W.B. British stem- and leaf-fungi, I, *Sphaeropsidales /* W.B. Grove. – Cambridge: at the University press, 1935.

Gulya, T.J. Changes in sunflower disease incidence in the United States during the last decade // Proc. 14th International Sunflower Conference. – Beijing, China, 1996. – P. 651-657.

Gulya, T.J. Sunflower diseases / T.J. Gulya, K.Y. Rashid, S.M. Masirevic // In Sunflower Technology and Production. – Madison, WI: American Society of Agronomy, 1997.

Harrison, A.L. The perfect stage of *Phomopsis stewartii* on *Cosmos /* A.L. Harrison // Mycologia. – 1935. – V. 27(5). – P. 521-526.

Harveson, R.M. Sunflower disease profiles II, Head and stalk rots and wilts / R.M. Harveson, L.J. Giesler, T.A. Jackson, B. Liu, S.N. Wegulo, K.A. Korus. – University of Nebraska Coop. Ext., Linkoln, 2012.

Huang, F. *Diaporthe* species occurring on citrus in China / F. Huang, X. Hou, M.M. Dewdney, Y. Fu, G. Chen, K.D. Hyde, H. Li // Fungal diversity. – 2013. – V. 61. – P. 237-250.

Hughes, S.J. Conidiophores, conidia, and classification / S.J. Hughes // Canadian journal of botany. - 1953. - V. 31. P. 577-659.

Hyde, K.D. A case for re-inventory of Australia's plant pathogens / K.D. Hyde, P. Chomnunti, P.W. Crous, J.Z. Groenewald, U. Damm, T.W. KoKo, R.G. Shivas, B.A. Summerell, Y.P. Tan // Persoonia. – 2010. – V. 25. – P. 50-60.

Irinyi, L. Classification of *Phoma* species using new phylogenetic marker / L. Irinyi, G.J. Kövics, E. Sándor // Analele Universității din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului. – 2007. – V. 12. – P. 63-69.

Irinyi, L. Conventional and molecular comparisons of the taxonomy of *Phoma*-like species: Thesis of doctoral (PhD) dissertation. - University of Debrecen, Debrecen, 2009.

Irinyi, L. Morphology and molecular biology of *Phoma //* L. Irinyi, A.K. Gade, A.P. Ingle, G.J. Kövics, M.K. Rai, E. Sàndor // In Current advances in molecular mycology. Chapter 7. – N. Y.: Nova Science publishers, 2009a. – P. 171-203.

Irinyi, L. Taxonomic re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi / L. Irinyi, G.J. Kövics, E. Sándor // Mycological research. – 2009b. – V. 113. – P. 249-260.

James, T.Y. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny / T.Y. James, F. Kauff, C.L. Schoch, P.B. Matheny, V. Hofstetter, C.J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, H.T. Lumbsch, A. Rauhut, V. Reeb, A.E. Arnold, A. Amtoft, J.E. Stajich, K. Hosaka, G.-H. Sung, D. Johnson, B. O'Rourke, M. Crockett, M. Binder, J.M. Curtis, J.C. Slot, Z. Wang, A.W. Wilson, A. Schüßler, J.E. Longcore, K. O'Donnell, S. Mozley-Standridge, D. Porter, P.M. Letcher, M.J. Powell, J.W. Taylor, M.M. White, G.W. Griffith, D.R. Davies, R.A. Humber, J.B. Morton, J. Sugiyama, A.Y. Rossman, J.D. Rogers, D.H. Pfister, D. Hewitt, K. Hansen, S. Hambleton, R.A. Shoemaker, J. Kohlmeyer, B. Volkmann-Kohlmeyer, R.A. Spotts, M. Serdani, P.W. Crous, K.W. Hughes, K. Matsuura, E. Langer, G. Langer, W.A. Untereiner, R. Lücking, B. Büdel, D.M. Geiser, A. Aptroot, P. Diederich, I. Schmitt, M. Schultz, R. Yahr, D.C. Hibbett, F. Lutzoni, D.J McLaughlin, J.W. Spatafora, R. Vilgalys // Nature. – 2006. – V. 443. – P. 818-822.

Kodsueb, R. The family *Pleosporaceae*: intergeneric relationships and phylogenetic perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA / R. Kodsueb, V. Dhanasekaran, A. Aptroot, S. Lumyong, E.H.C. McKenzie, K.D. Hyde, R. Jeewon // Mycologia. – 2006. – V. 98(4). – P. 571-583.

Kolomiets, T. First Report of Stem Canker of *Salsola tragus* caused by *Diaporthe eres* in Russia / T. Kolomiets, Z. Mukhina, T. Matveeva, D. Bogomaz, D.K. Berner, C.A. Cavin, L.A. Castlebury // Plant disease. – 2009. – V. 93(1). – P. 110.

Libert, M.A. Mémoire concernant les plantes cryptogames qui peuvent être reunites sous le nom d'Ascoxytacei / M.A. Libert // In Plantae cryptogamicae quas in Arduenna collegit. Cent. I. – Soc. Roy. Soc. Agr. Arts Lille, Mém 1829-1831, 1830. – P. 174-176.

Lamarque, C. Nouvelle maladie du tournesol, le *Phomopsis* / C. Lamarque, R. Perny // Cultivar. La revue technique des agriculteurs dynamica. − 1985. − № 179. − P. 57-59.

Lesovoy, M.P. *Phomopsis* of sunflower in Ukraine and development of breeding methods for resistance / M.P. Lesovoy, A.J. Parfenuk, S.V. Vasiluk // Arch. Phytopath. Pflanz. − 1993. − № 28. − P. 321-328.

Lombard, L. *Diaporthe* species associated with *Vaccinium*, with specific reference to Europe / L. Lombard, G.C.M. van Leeuwen, V. Guarnaccia, G. Polizzi, P.C.J. van Rijswick, K.C.H.M. Rosendahl, J. Gabler, P. W. Crous // Phytopathologia mediterranea. – 2014. – V. 53. – P. 287-299.

Lutzoni, F.O. Assembling the fungal tree of life: progress and classification, and evolution of subcellular traits / F.O. Lutzoni, F. Kauff, C.J. Cox, D. Mclaughlin, G. Celio, B. Dentinger, M. Padamsee, D. Hibbett, T.Y. James, E. Baloch, M. Grube, V. Reeb, V. Hofstetter, C. Schoch, A.E. Arnold, J. Miadlikowska, J. Spatafora, D. Johnson, S. Hambleton, M. Crockett, R. Shoemaker, G.-H. Sung, R. Lücking, T. Lumbsch, K. O'Donnell, M. Binder, P. Diederich, D. Ertz, C. Gueidan, K. Hansen, R.C. Harris, K. Hosaka, E.-W. Lim, B. Matheny, H. Nishida, D. Pfister, J. Rogers, A. Rossman, I. Schmitt, H. Sipman, J. Stone, J. Sugiyama, R. Yahr, R. Vilgalys // American journal of botany. – 2004. – V. 91(10). – P. 1446-1480.

Maric, A. Prilog proucavanju *Phomopsis* spp. (*Diaporthe* sp.) prouzrokovaca sive pegavosti stabla suncokreta / A. Maric, S. Masirevic, S. Li // Zastita Bilja. – 1982. – № 33. – P. 403-419.

Maric, A. Bolesti i stetocine suncokreta injihovo-suzbijanje / A. Maric, D. Comprag, S. Masirevic. – Beograd: Nolit. - 1987. – 380 p.

Maric, A. La tacheture noire du toumesol (*Phoma macdonaldii* Boerema; synonymes: *Phoma oleraceae* var. *helianthi-tuberosi* Sacc. Stad. Tenninal; *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi) (in Serbo-Croatian) / A. Maric, D. Camprag, S. Masirevic // Bolesti I stetocine suncokreati njihovo suzbijanje. – 1987. – P. 37-45.

Maric, A. Bolesti I Stetocine suncokreta / A. Maric, D. Camprag, S. Masirevic. – Belgrad, Yugoslavia: Injihovosuzbijanje Nolit. – 1988. – P. 37-45.

Masirevic, S. *Sclerotinia* and *Phomopsis* - two devastating sunflower pathogens / S. Masirevic, T.J. Gulya // Field crops res. – 1992. – V. 30. – P. 271-300.

Mathew, F. Reevaluation of *Phomopsis* species affecting sunflowers in the United States / F. Mathew, K. Alananbeh, N. Balbyshev, E. Heitkamp, L. Castlebury, T. Gulya, S. Markell // Phytopathology. – 2011. – V. 101. – P. 101-115.

Mathew, F.M. First report of stem disease of soybean (*Glycine max*) caused by *Diaporthe gulyae* in North Dakota / F.M. Mathew, T.J. Gulya, J.G. Jordahl, S.G. Markell // Disease notes. – 2018. – V. 102(1). – P. 240.

Mattei, A.S. Cutaneous infection by *Diaporthe phaseolorum* in Brazil / A.S. Mattei, C.B. Severo, L.C. Guazzelli, F.M. Oliveira, J. Gené, J. Guarro, J. Cano, LC. Severo // Medical mycology case reports. – 2013. – V. 2. – P. 85-87.

McDonald, W.C. Phoma black stem of sunflowers / W.C. McDonald // Phytopathology. – 1964. – V. 54. – P. 492-493.

Mihaljčević, M. Sourse of infection of sunflower plants by *Diaporthe helianthi* in Yugoslavia / M. Mihaljčević, M. Muntañola-Cvetković, J. Vucojevic, M. Petrov // Phytopathology. − 1985. − № 4. − P. 334-342.

Miric, E. Identification in Australia of the quarantine pathogen of sunflower *Phoma macdonaldii* (Teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*) / E. Miric, E.A.B. Aitken, K.C. Goulter // Australian journal of agricultural research. – 1999. – V. 50. – P. 325-332.

Miric, E. Pathological, morphological and molecular studies of a worldwide collection of the sunflower pathogens *Phomopsis helianthi* and *Phoma macdonaldii*: PhD thesis. – University of Queensland, Australia, 2002.

Mostert, L. Species of *Phomopsis* and a *Libbertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization / L. Mostert, P.W. Crous, C.-J. Kang, A.J.L. Phillips // Mycologia. – 2001. – V. 93. – P. 146-167.

Muntañola-Cvetković, M. Species of *Diaporthe* and *Phomopsis* recorded in Yugoslavia / M. Muntañola-Cvetković, M. Mihaljčević, M. Petrov // Savremena poliprivreda. – 1981. – V. 29(7-8). – P. 293-306.

Muntañola-Cvetković, M. On the identity of the causative agent of a serious Phomopsis-Diaporthe disease in sunflower plants / M. Muntañola-Cvetković, M. Mihaljčević, M. Petrov // Nova Hedwigia. – 1985. – V. 34. – P. 417-435.

Murali, T.S. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates / T.S. Murali, T.S Suryanarayanan, R. Geeta // Can j microbiol. – 2006. – V. 52. – P. 673–680.

Mycobank. – Режим доступа: http://www.mycobank.org/

O'Donnell, K. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous / K. O'Donnell, E. Cigelnik // Mol phylogenet evol. – 1997. – V. 7. – P. 103-116.

Olson, T.R. First report of *Diaporthe stewartii* causing Phomopsis stem canker of sunflower (*Helianthus annuus*) in Minnesota / T.R. Olson, B. Kontz, S.G. Markell, T.J. Gulya, F. M. Mathew // Disease notes. – 2017. – V. 101(2). – P. 382.

Peres, A. *Phoma macdonaldii* Boerema: elements de biologie et mise au point d'une method de contamination artificielle en conditions controlees / A. Peres, C. Lefol // Proc. Of the 14<sup>th</sup> Intern. Sunfl. Conf. – Beijing, China, 1996. – P. 687-693.

Persoon, C.H. Traité sur les champignons comestibles, contenant l'indication des espèces nuisibles; précédé d'une introduction a l'histoire des champignons, avec quatre planches coloriées Paris l'histoire des champignons / C.H. Persoon. – Paris: Belin-Leprieur, - 1818.

Phookamsak, R. Revision of *Phaeosphaeriaceae* / R. Phookamsak, J.-K. Liu, E.H.C. McKenzie, D.C. Manamgoda, H. Ariyawansa, K.M. Thambugala, D.-Q. Dai, E. Camporesi, E.

Chukeatirote, N.N. Wijayawardene, A.H. Bahkali, P.E. Mortimer, J.-C. Xu, K.D. Hyde // Fungal diversity. – 2014. – V. 68. – P. 159-238.

Primer3plus. - Режим доступа: <a href="http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi">http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus.cgi</a>

Punithalingam, E. Graminicolous *Ascochyta* species / E. Punithalingam // Mycological papers. – 1979. – V. 142. – P. 1-214.

Quaedvlieg, W. Sizing up *Septoria* / W. Quaedvlieg, G.J.M. Verkley, H.-D. Shin, R.W. Barreto, A.C. Alfenas, W.J. Swart, J.Z. Groenewald, P.W. Crous // Studies in mycology. – 2013. – V. 75. – P. 307-390.

Rai, M.K. Advances in taxonomy of genus *Phoma*: polyphyletic nature and role of phenotypic traits and molecular systematics / M.K. Rai, V.V. Tiwari, L. Irinyi, G.J. Kövics // Indian journal of microbiology. – 2014. – V. 54(2). – P. 123-128.

Rehner, S.A. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences / S.A Rehner, G.J. Samuels // Mycological research. – 1994. – V. 98. – P. 625-634.

Rossman, A.Y. A review of the phylogeny and biology of the *Diaporthales /* A.Y. Rossman, D.F. Farr, L.A. Castleburry // Mycoscience. – 2007. – V. 48. – P. 135-144.

Saccardo, P.A. Conspectus generum fungorum Italiae inferiorum nempe ad *Sphaeropsideas*, *Melanconieas* et *Hyphomyceteas* pertinentium systemate sporologico dispositorum / P.A. Saccardo // Michelia. – 1880. – V. 2. – P. 1-38.

Saccardo, P.A. Silloge Sphaeropsidearum et Melanconiearun omnium hucusque cognitorum / P.A. Saccardo // Sylloge fungorum. – 1884. – V. 3. – P. 1-860.

Sackston, W.E. On a treadmill: Breeding sunflowers for resistance to disease / W.E. Sackston // Annual Review of Phytopathology. - 1992. – V. 30. – P. 529-551.

Samson, R.A. Introduction to food- and airborne fungi / R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad, O. Filtenborg. – 6 edition. – Utrecht: Centraal bureau voor schimmel cultures, 2000.

Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A. – 1977. – Vol. 74(12). – P. 5463-5467.

Santos, J.M. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal / J.M. Santos, A.J.L. Phillips // Fungal diversity. – 2009. – V. 34. – P. 111-125.

Santos, J.M. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition / J.M. Santos, V.G. Correia, A.J.L. Phillips // Fungal biology. – 2010. – V. 114(2-3). – P. 255-270.

Santos, J.M. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia / J.M. Santos, K. Vrandečić, J. Ćosić, T. Duvnjak, A.J.L. Phillips // Persoonia. – 2011. – V. 27. – P. 9-19.

Sarkinen, T. How to Open the Treasure Chest? Optimising DNA Extraction from Herbarium Specimens / T. Sarkinen, M. Staats, J.E. Richardson, R.S. Cowan, F.T. Bakker // Plos one. – 2012. – P. 1-9.

Schilder, A.M.C. Characterization of *Phomopsis* spp., infecting grapevines in the Great Lakes Region of North America / A.M.C. Schilder, O. Erincik, L. Castlebury, A. Rossman, M.A. Ellis // Plant disease. – 2005. – V. 89(7). – P. 755-762.

Schneiter, A.A. Description of sunflower growth stages / A.A. Schneiter, J.F. Miric, D.R. Berglund // Crop. sci. – 1981. – V. 21. – P. 901-903.

Schoch, C.L. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci / C.L. Schoch, R.A. Shoemaker, K.A. Seifert, S. Hambleton, J.W. Spatafora, P.W. Crous // Mycologia. – 2006. – V. 98(6). – P. 1041-1052.

Schoch, C.L. A class-wide phylogenetic assessment of *Dothideomycetes* / C.L. Schoch, P.W. Crous, J.Z. Groenewald, E.W.A. Boehm, T.I. Burgess, J. de Gruyter, G.S. de Hoog, L.J. Dixon, M. Grube, C. Gueidan, Y. Harada, S. Hatakeyama, K. Hirayama, T. Hosoya, S.M. Huhndorf, K.D. Hyde, E.B.G. Jones, J. Kohlmeyer, Å. Kruys, Y.M. Li, R. Lücking, H.T. Lumbsch, L. Marvanová, J.S. Mbatchou, A.H. McVay, A.N. Miller, G.K. Mugambi, L. Muggia, M.P. Nelsen, P. Nelson, C.A. Owensby, A.J.L. Phillips, S. Phongpaichit, S.B. Pointing, V. Pujade-Renaud, H.A. Raja, E. Rivas Plata, B. Robbertse1, C. Ruibal, J. Sakayaroj, T. Sano, L. Selbmann, C.A. Shearer, T. Shirouzu, B. Slippers, S. Suetrong, K. Tanaka, B. Volkmann-Kohlmeyer, M.J. Wingfield, A.R. Wood, J.H.C. Woudenberg, H. Yonezawa, Y. Zhang, J.W. Spatafora // Studies in mycology. – 2009. – V. 64. – P. 1-15.

Schoch, C.L. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi / C.L. Schoch, K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen and Fungal Barcoding Consortium // Proc natl Acad Sci U SA. – 2012. – V. 109. – P. 6241-6246.

Schoch, C.L. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi / C.L. Schoch, B. Robbertse, V. Robert, D. Vu, G. Cardinali, L. Irinyi, W. Meyer, R.H. Nilsson, K. Hughes, A.N. Miller, P.M. Kirk, K. Abarenkov, M.C. Aime, H.A. Ariyawansa, M. Bidartondo, T. Boekhout, B. Buyck, Q. Cai, J. Chen, A. Crespo, P.W. Crous, U. Damm, Z.W. de Beer, B.T.M. Dentinger, P.K. Divakar, M. Dueñas, N. Feau, K. Fliegerova, M.A. García, Z.-W. Ge, G.W. Griffith, J.Z. Groenewald, M. Groenewald, M. Grube, M. Gryzenhout, C. Gueidan, L. Guo, S. Hambleton, R. Hamelin, K. Hansen, V. Hofstetter, S.-B. Hong, J. Houbraken, K.D. Hyde, P. Inderbitzin, P.R. Johnston, S.C. Karunarathna, U. Kõljalg, G.M. Kovács, E. Kraichak,

K. Krizsan, C.P. Kurtzman, K.-H. Larsson, S. Leavitt, P.M. Letcher, K. Liimatainen, J.-K. Liu, D.J. Lodge, J.J. Luangsaard, H.T. Lumbsch, S.S.N. Maharachchikumbura, D. Manamgoda, M.P. Martín, A.M. Minnis, J.-M. Moncalvo, G. Mulè, K.K. Nakasone, T. Niskanen, I. Olariaga, T. Papp, T. Petkovits, R. Pino-Bodas, M.J. Powell, H.A. Raja, D. Redecker, J.M. Sarmiento-Ramirez, K.A. Seifert, B. Shrestha, S. Stenroos, B. Stielow, S.-O. Suh, K. Tanaka, L. Tedersoo, M.T. Telleria, D. Udayanga, W.A. Untereiner, J.D. Uribeondo, K.V. Subbarao, C. Vágvölgyi, C. Visagie, K. Voigt, D.M. Walker, B.S. Weir, M. Weiß, N.N. Wijayawardene, M.J. Wingfield, J.P. Xu, Z.L. Yang, N. Zhang, W.-Y. Zhuang, S.Federhen // The journal of biological databases and curation. – 2014. – P. 1-21.

Smolik, J.D. Initial evaluations of early dying of sunflower in South Dacota / J.D. Smolik, D.D. Walgenbach, M.L. Carson // Sunflower res. Workshop, Fargo. – 1983. – P. 24-25.

Spatafora, J.W. A five-gene phylogeny of *Pezizomycotina /* J.W. Spatafora, G.-H. Sung, D. Johnson, C. Hesse, B. O'Rourke, M. Serdani, R. Spotts, F. Lutzoni, V. Hofstetter, J. Miadlikowska, V. Reeb, C. Gueidan, E. Fraker, T. Lumbsch, R. Lücking, I. Schmitt, K. Hosaka, A. Aptroot, C. Roux, A.N. Miller, D.M. Geiser, J. Hafellner, G. Hestmark, A.E. Arnold, B. Büdel, A. Rauhut, D. Hewitt, W.A. Untereiner, M.C. Cole, C. Scheidegger, M. Schultz, H. Sipman, C.L. Schoch // Mycologia. – 2006. – V. 98(6). – P. 1018-1028.

Stamatakis, A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models / A. Stamatakis // Bioinformatics. – 2006. – Vol. 22. – P. 2688-2690.

Stoop, P. Tournesol: Des maladies a surveiller / P. Stoop // Agroperform. – 1995. – № 46. – P. 41-43.

Sutton, B.C. *Phoma* and related genera / B.C. Sutton // Trans. brit. mycol. soc. – 1964. – V. 47. – P. 497-509.

Sutton, B.C. The *Coelomycetes*. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata / B.C. Sutton. – 1st edition. – U.K: Commonwealth Mycological Institute, 1980.

Tan, Y.P. Molecular phylogenetic analysis reveals six new species of *Diaporthe* from Australia / Y.P. Tan, J. Edwards, K.R.E. Grice, R.G. Shivas // Fungal diversity. – 2013. – V. 61. – P. 251-260.

Thomidis, T. Studies on *Diaporthe eres* as a new pathogen of peach trees in Greece / T. Thomidis, T.J. Michailides // Plant disease. – 2009. – V. 93. – P. 1293–1297.

Thompson, J.D. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools / J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins // Nucl. acids res. – 1997. – Vol. 24. – P. 4876-4882.

Thompson, S.M. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species / S.M. Thompson, Y.P. Tan, A.J. Young, S.M. Neate, E.A.B Aitken, R.G. Shivas // Persoonia. – 2011. – V. 27. – P. 80-89.

Thompson, S.M. Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia / S.M. Thompson, Y.P. Tan, R.G. Shivas, S.M. Neate, L. Morin, A. Bissett, E.A.B. Aitken // Persoonia. – 2015. – V. 35. – P. 39-49.

Udayanga, D. The genus *Phomopsis*: Biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens / D. Udayanga, X. Liu, E.H.C. McKenzie, E. Chukeatirote, A.H.A. Bahkali, K.D. Hyde // Fungal diversity. – 2011. – V. 50. – P. 189-225.

Udayanga, D. Multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe (Phomopsis)* / D. Udayanga, X. Liu, P.W. Crous, E.H.C. McKenzie, E. Chukeatirote, K.D. Hyde // Fungal diversity. – 2012. – V. 56. – P. 157-171.

Udayanga, D. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex / D. Udayanga, L.A. Castlebury, L.A. Rossman, E. Chukeatirote, K.D. Hyde // Fungal diversity. – 2014a. – V. 64. – P. 203-229.

Udayanga, D. Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytosporella*, *D. foeniculina* and *D. rudis* / D. Udayanga, L.A. Castlebury, A.Y. Rossman, K.D. Hyde // Persoonia. – 2014b. – V. 32. – P. 83-101.

Valenzuela-Lopez, N. Coelomycetous *Dothideomycetes* with emphasis on the familis *Cucurbitariaceae* and *Didymellaceae* / N. Valenzuela-Lopez, J.F. Cano-Lira, J. Guarro, D.A. Sutton, N. Wiederhold, P.W. Crous, A.M. Stchigel // Studies in mycology.— 2018. — V. 90. — P. 1-69.

van der Aa H.A. Studies in *Phyllosticta /* H.A. Aa van der // Studies in mycology. – 1973. – V. 5:1. – P. 110.

van Niekerk, J.M. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines / J.M. van Niekerk, J.Z. Groenewald, D.F. Farr, P.H. Fourie, F. Halleen, P.W. Crous // Australasian plant pathology. – 2005. – V. 34. – P. 27-39.

van Rensburg, J.C.J. Characterization of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa / J.C.J. van Rensburg, S.C. Lamprecht, J.Z. Groenewald, L.A. Castlebury, P.W. Crous // Studies in mycology. – 2006. – V. 55. – P. 65-74.

Vaz, A.B.M. Arbuscular mycorrhizal colonization of *Sorghum vulgare* in presence of root endophytic fungi of *Mytus communis* / A.B.M. Vaz, I. Sampedro, J.A. Siles, J.A. Vasquez, I. Garcia-Romera, H. Vierheilig, C. A. Rosa, J.A. Ocampo // Applied soil ecology. – 2012. – V. 61. – P. 288-294.

von Brackel, W. *Phoma ficuzzae* sp. nov. and some other lichenocolous fungi from Sicily, Italy / W. von Brackel // Sauteria. – 2008. – V.15 Contribution in Honour of Volkmar Wirth. – P. 103-120.

Vrandečić, K. Morphological and molecular identification of *Diaporthe helianthi* from *Xantium italicum* / K. Vrandecic, D. Jurkovic, J. Cosic, L. Riccioni, T. Duvnjac // Proceedings of the 17th International Sunflower Conference. – Cordoba: Spain, 2008. – P. 121-124.

Vrandečić, K. *Xanthium italicum*, *Xanthium strumarium* and *Arctium lappa* as new hosts for *Diaporthe helianthi* / K. Vrandečić, D. Jurković, L. Riccioni, J. Cosic, T. Duvnjak // Mycopathologia. - 2010. – V. 170. – P. 51-60.

Vukojevic, J. The comparative investigation of *Phomopsis helianthi* isolates from different European localities / J. Vukojevic, F. Dubravka, M. Mihajlovic // Plant pathology. − 1995. − № 10. − P. 173-738.

Wang, J. Endophytic *Diaporthe* from Southeast China are genetically diverse based on multilocus phylogeny analyses / J. Wang, X. Xu, L. Mao, J. Lao, F. Lin, Z. Yuan, C. Zhang // World journal of microbiology & biotechnology. – 2014. – V. 30. – P. 237-243.

Westendorp, G.D. Cinquiéme notice sur quelques Hypoxylées inédites / G.D. Westendorp // Nouvelles pour la flore de la Belgique. – 1857. – V. 2. – P. 554-579.

White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor // In PCR Protocols : A guide to Methods and Applications (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White). – U.S.A., San Diego: Academic Press. – 1990. – P. 315-322.

Wijayawardene, N.N. Taxonomy and phylogeny of dematiaceous coelomycetes / N.N. Wijayawardene, K.D. Hyde, D.N. Wanasinghe, M. Papizadeh, I.D. Goonasekara, E. Camporesi, D.J. Bhat, E.H.C. McKenzie, A.J.L. Phillips, P. Diederich, K. Tanaka, W.J. Li, N. Tangthirasunun, R. Phookamsak, D.-Q. Dai, A.J. Dissanayake, G. Weerakoon, S.S.N. Maharachchikumbura, A. Hashimoto, M. Matsumura, A.H. Bahkali, Y. Wang // Fungal diversity. – 2016. – V. 77. – P. 1-316.

Wikee, S. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (*Botryosphaeriales*) / S. Wikee, L. Lombard, C. Nakashima, K. Motohashi, E. Chukeatirote, R. Cheewangkoon, E.H.C. McKenzie, K.D. Hyde, P.W. Crous // Studies in mycology. – 2013. – V. 76. – P. 1-29.

Wollenweber, H.W. Beiträge zur Kenntnis parasitärer und saprophytotischer Pilze. I. *Phomopsis, Dendrophoma, Phoma* und *Ascochyta* und ihre Beziehung zur Fruchtfäule / H.W. Wollenweber, H. Hochapfel // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1936. – V. 8. – P. 561—605.

Wu, P.S. Occurrence of *Phoma macdonaldii*, the causal agent of sunflower black stem disease, in sunflower Fields in China / P.S. Wu, H.Z. Du, X.L. Zhang, F. Luo, L. Fang // Plant disease. – 2012. – Vol. 96(11). – P. 1696.

Yang, S.M. *Diaporthe (Phomopsis)* isolates obtained from cultivated sunflower / S.M. Yang, T.J. Gulya // Phytopathology. – 1985. – Vol. 75(2). – P. 201.

приложения

Приложение. Таблица 1. Изученные гербарные образцы сложноцветных растений, поражённых фомоидными грибами

05	Данные этикетки								
Образец LEP	гриб	растение хозяин	поражённый орган	страна	место сбора	дата сбора			
LEP 129310	Phoma achilleae	Achillea millefolium	стебли	СССР	Курская область, Стрелецкая степь	06.06.1936			
LEP 129311	Ph. achilleae	Achillea millefolium	стебли	Россия	Смоленск	1895			
LEP 129816	Ph. herbarum	Anthemis tinctoria	стебли	Россия	Вятская губерния, Вятский уезд, деревня Паутиха	13.04.1916			
LEP 129642	Ph. decolorans	Arctium tomentosum	стебли	Россия	Петроградская губерния, Лужский уезд	27.05.1915			
LEP 129435	Ph. artemisiae	Artemisia absinthium	стебли	Россия	Вятка, Малмыж	1			
LEP 129801	Ph. herbarum	Artemisia absinthium	стебли	СССР	Курская область, Борисовский район, около 8 квартала заказника "Лес на Ворскле"	10.08.1935			
LEP 129815	Ph. herbarum	Artemisia sp.	стебли	Россия	Ростовский уезд, Новочеркасск	1897			
LEP 129828	Ph. herbarum	Carduus crispus	стебли	СССР	Ленинградская губерния, Мартышкино	24.05.1927			
LEP 129532	Ph. chrysanthemi	Chrysanthemum leucanthemum	стебли	СССР	-	28.05.1915			
LEP 129537	Ph. cichorii	Cichorium sp.	стебли	CCCP	Ростов	27.03.1927			
LEP 130273	Ph. pycnocephali	Cirsium lanceolatum	стебли	Россия	Ленинградская область, Красные горы	05.05.1911			
LEP 129744	Ph. fictilis	Cirsium sp.	стебли	Россия	-	13.08.1914- 12.08.1915			
LEP 129535	Ph. cichoracearum	Crepis tectorium	стебли	Россия	Вятка, Малмыж	-			
LEP 129509	Ph. canadensis	Erigeron acer	стебли	CCCP	Вятка, Малмыж	1929			
LEP 129728	Ph. erigerontis	Erigeron acer	стебли	Россия	Вятская губерния, Малмыж	-			
LEP 129750	Ph. filaginis- arvensis	Filago arvensis	стебли	Россия	Вятская губерния, Малмыж	-			

## Продолжение таблицы 1

Образец	Данные этикетки					
LEP	гриб	растение хозяин	поражённый	страна	место сбора	дата сбора
LEP 129428	Ph. arctii	Lappa tomentosum	стебли	CCCP	Ст. Петергоф	06.08.1928
LEP 130130	Ph. oleracea	Lappa sp.	стебли	Россия	Псковская губерния, Порховский уезд, Никольское	04.11.1919
LEP 129915	Ph. lapsanae	Lapsana communis	стебли	СССР	Курская область, Борисовский район, заказник "Лес на Ворскле"	09.05.1934
LEP 129934	Ph. leonuri	Leonurus cardiaca	стебли	Россия	Новгородская губерния, Княжий двор	25.07.1919
LEP 129935	Ph. leonuri	Leonurus cardiaca	стебли	СССР	Курская область, Борисовский район, огород заказника "Лес на Ворскле"	23.07.1936
LEP 129848	Ph. herbarum	Matricaria indora	стебли	СССР	Ленинградская область, совхоз Выборгский, отделение Янино	07.09.1960
LEP 130081	Ph. mulgedii	Mulgedium sp.	стебли	Россия	Пермская губерния, Добрянский завод	11.09.1913
LEP 130447	Ph. tausaghyzicola	Scorzonera tausaghyz	стебли	СССР	Москва, Институт каучука и гуттаперчи	1934
LEP 130378	Ph. solidaginis	Solidago virgaurea	стебли	СССР	Ленинградская область, Ленинград, Детское Село	01.05.1929
LEP 129389	Ph. ambiquella	Tanacetum sp.	стебли	СССР	Ярославская губерния, Ростовский уезд	08.05.928
LEP 129822	Ph. herbarum	Trifolium pratense	стебли	Россия	Ленинградская область, Лужский уезд, Красные горы	17.05.1915
LEP 129808	Ph. herbarum	Asteraceae	стебли	CCCP	Краснодарский край, Сочи	19.06.1925
LEP 129310	Ph. achilleae	Achillea millefolium	стебли	CCCP	Курская область, Стрелецкая степь	06.06.1936
LEP 129311	Ph. achilleae	Achillea millefolium	стебли	Россия	Смоленск	1895
LEP 129816	Ph. herbarum	Anthemis tinctoria	стебли	Россия	Вятская губерния, Вятский уезд, деревня Паутиха	13.04.1916
LEP 129642	Ph. decolorans	Arctium tomentosum	стебли	Россия	Петроградская губерния, Лужский уезд	27.05.1915

## Продолжение таблицы 1

Образец	Данные этикетки						
LEP	гриб	растение хозяин	поражённый	страна	место сбора	дата сбора	
LEP 129435	Ph. artemisiae	Artemisia absinthium	стебли	Россия	Вятка, Малмыж	-	
LEP 129801	Ph. herbarum	Artemisia absinthium	стебли	СССР	Курская область, Борисовский район, около 8 квартала заказника "Лес на Ворскле"	10.08.1935	
LEP 129815	Ph. herbarum	Artemisia sp.	стебли	Россия	Ростовский уезд, Новочеркасск	1897	
LEP 129828	Ph. herbarum	Carduus crispus	стебли	СССР	Ленинградская губерния, Мартышкино	24.05.1927	
LEP 129532	Ph. chrysanthemi	Chrysanthemum leucanthemum	стебли	СССР		28.05.1915	
LEP 129537	Ph. cichorii	Cichorium sp.	стебли	CCCP	Ростов	27.03.1927	
LEP 130273	Ph. pycnocephali	Cirsium lanceolatum	стебли	Россия	Ленинградская область, Красные горы	05.05.1911	
LEP 129744	Ph. fictilis	Cirsium sp.	стебли	Россия	-	13.08.1914- 12.08.1915	
LEP 129535	Ph. cichoracearum	Crepis tectorium	стебли	Россия	Вятка, Малмыж	-	
LEP 129509	Ph. canadensis	Erigeron acer	стебли	CCCP	Вятка, Малмыж	1929	
LEP 129728	Ph. erigerontis	Erigeron acer	стебли	Россия	Вятская губерния, Малмыж	-	
LEP 129750	Ph. filaginis- arvensis	Filago arvensis	стебли	Россия	Вятская губерния, Малмыж	-	
LEP 129428	Ph. arctii	Lappa tomentosum	стебли	CCCP	Ст. Петергоф	06.08.1928	
LEP 130130	Ph. oleracea	Lappa sp.	стебли	Россия	Псковская губерния, Порховский уезд, Никольское	04.11.1919	
LEP 129915	Ph. lapsanae	Lapsana communis	стебли	СССР	Курская область, Борисовский район, заказник "Лес на Ворскле"	09.05.1934	
LEP 129934	Ph. leonuri	Leonurus cardiaca	стебли	Россия	Новгородская губерния, Княжий двор	25.07.1919	

# Продолжение таблицы 1

Образец		Данные этикетки						
LEP	гриб	растение хозяин	поражённый	страна	место сбора	дата сбора		
LEP 129935	Ph. leonuri	Leonurus cardiaca	стебли	СССР	Курская область, Борисовский район, огород заказника "Лес на Ворскле"	23.07.1936		
LEP 129848	Ph. herbarum	Matricaria indora	стебли	СССР Ленинградская область, совхоз Выборгский, отделение Янино		07.09.1960		
LEP 130081	Ph. mulgedii	Mulgedium sp.	стебли	Россия	Пермская губерния, Добрянский завод	11.09.1913		
LEP 130447	Ph. tausaghyzicola	Scorzonera tausaghyz	стебли	СССР	Москва, Институт каучука и гуттаперчи	1934		
LEP 130378	Ph. solidaginis	Solidago virgaurea	стебли	СССР	Ленинградская область, Ленинград, Детское Село	01.05.1929		
LEP 129389	Ph. ambiquella	Tanacetum sp.	стебли	СССР	Ярославская губерния, Ростовский уезд	08.05.928		
LEP 129822	Ph. herbarum	Tripolium pratense	стебли	Россия	Ленинградская область, Лужский уезд, Красные горы	17.05.1915		
LEP 129808	Ph. herbarum	Asteraceae	стебли	CCCP	Краснодарский край, Сочи	19.06.1925		

Приложение. Таблица 2. Референсные нуклеотидные последовательности видов и штаммов фомоидных грибов (GenBank)

Deve	№ Штамма	Локус				
Вид	№ ШТамма	ITS	LSU	β-тубулин	EF-1α	
Ascochyta herbicola	CBS 629.97	GU237898	GU238083	GU237614	-	
A. medicaginicola var. macrospora	CBS 112.53	GU237749	GU238101	GU237628	-	
A. medicaginicola var. medicaginicola	CBS 316.90	GU237828	GU238103	GU237630	-	
A. phacae	CBS 184.55	KT389475	KT389692	KT389769	-	
A. rabiei	CBS 237.37	KT389479	KT389696	KT389772	_	
Boeremia exigua var. coffeae	CBS 119730	GU237759.1	GU237942.1	GU237504.1	-	
B. exigua var. exigua	CBS 431.74	FJ427001.1	EU754183.1	FJ427112	-	
B. exigua var. forsythiae	CBS 101197	GU237718.1	GU237931.1	GU237493.1	-	
B. exigua var. heteromorpha	CBS 443.94	GU237866	GU237935	GU237497	-	
B. exigua var. linicola	CBS 114.28	GU237752.1	GU237937.1	GU237499.1	-	
B. exigua var. populi	CBS 100167	GU237707.1	GU237939.1	GU237501.1	-	
B. exigua var. pseudolilacis	CBS 101207	GU237721.1	GU237941.1	GU237503.1	-	
B. exigua var. viburni	CBS 100354	GU237711.1	GU237944.1	GU237506.1	-	
Calophoma complanata	CBS 268.92	FJ515608.1	EU754180.1	FJ515626	-	
C. clematidina	CBS 102.66	FJ426988	FJ515630	FJ427099	-	
Didymella americana	CBS 185.85	FJ426972	GU237990	FJ427088	-	
D. aurea	CBS 269.93	GU237818	GU237999	GU237557	-	
D. bellidis	CBS 714.85	GU237904	GU238046	GU237586	-	
D. glomerata	CBS 133.72	FJ427004	KT389718	FJ427115	-	
D. macrophylla	CGMCC:3.18357	KY742070.1	KY742224.1	KY742312.1	-	
D. musae	CBS 463.69	FJ427026	GU238011	FJ427136	-	
D. pinodella	CBS 318.90	FJ427051	GU238016	FJ427161	-	
D. pinodes	CBS 525.77	NR_136000.1	EU754136.1	GU237572.1	-	
D. rosea	TAS 042-0012	KT287020.1	KT287021.1	KT286971.1	-	
D. subglomerata	CBS 110.92	FJ427080.1	GU238032.1	FJ427186.1	-	

#### Продолжение таблицы 2.

D	Ma III may a sa	Локус				
Вид	№ Штамма	ITS	LSU	β-тубулин	EF-1α	
D. musae	CBS 463.69	FJ427026	GU238011	FJ427136	-	
D. pinodella	CBS 318.90	FJ427051	GU238016	FJ427161	-	
D. pinodes	CBS 525.77	NR_136000.1	EU754136.1	GU237572.1	_	
D. rosea	TAS 042-0012	KT287020.1	KT287021.1	KT286971.1	_	
D. subglomerata	CBS 110.92	FJ427080.1	GU238032.1	FJ427186.1	_	
D. subherbarum	CBS 249.92	GU237808	GU238144	GU237658	_	
Macroventuria anomochaeta	CBS 502.72	GU237873.1	GU237985.1	GU237545	-	
Neoascochyta desmazieri	CBS 247.79	KT389507	KT389725	KT389805	-	
N. paspali	CBS 560.81	FJ427048	GU238124	FJ427158	-	
Nothophoma anigozanthi	CBS 381.91	GU237852	GU238039	GU237580	-	
N. arachidis-hypogaeae	CBS 125.93	GU238043.1	GU237771.1	GU237583.1	-	
N. quercina	CBS 633.92	GU237900.1	EU754127.1	GU237609.1	-	
Stagonosporopsis actaeae	CBS 106.96	GU237734.1	GU238166.1	GU237671.1	-	
S. ajacis	CBS 177.93	GU237791.1	GU238168.1	GU237673.1	-	
S. artemisiicola	CBS 102636	GU237728.1	GU238171.1	GU237676.1	_	
S. astragali	CBS 178.25	GU237792.1	GU238172.1	GU237677.1	_	
S. cucurbitacearum	CBS 133.96	GU237780.1	GU238181.1	GU237686.1	-	
S. dennisii	CBS 631.68	NR_136005.1	GU238182.1	GU237687.1	-	
S. heliopsidis	CBS 109182	GU237747.1	GU238186.1	GU237691	-	
S. inoxydabilis	CBS 425.90	GU237861	GU238188	GU237693	-	
S. trachelii	CBS 379.91	GU237850.1	GU238173.1	GU237678.1	-	
S. valerianellae	CBS 273.92	GU237819.1	GU238200.1	GU237705.1	-	
Diaporthe alleghaniensis	CBS 495.72	KC343007	_	KC343975	KC343733	
D. alnea	CBS 146.46	KC343008	-	KC343976	KC343734	
D. ambigua	CBS 114015	KC343010.1	-	KC343978.1	KC343736.1	

Продолжение таблицы 2.

Dava	№ Штамма	Локус				
Вид	№ ШТамма	ITS	LSU	β-тубулин	EF-1α	
D. bicincta	CBS 121004	KC343134	1	KC344102	KC343860	
D. celastrina	CBS 139.27	KC343047	-	KC344015	KC343773	
D. chamaeropis	CBS 454.81	KC343048.1	-	KC344016.1	KC343774.1	
D. endophytica	CBS 133811	KC343065.1	-	KC344033.1	KC343791.1	
D.eres	CBS 116953	KC343147	-	KC344115	KC343873	
D.eres	CBS 200.39	KC343151	-	KC344119	KC343877	
D.eres	CBS 101742	KC343073	-	KC344041	KC343799	
D. eres	CBS 439.82	KC343090	-	KC344058	GQ250341	
D. eres	CBS 113470	KC343146	-	KC344114	KC343872	
type D. eres	CBS 109767	KC343075	-	KC344043	KC343801	
type D.gulyae	BRIP 54025	NR111615.1	-	KJ197271.1	JN645803.1	
type D.helianthi	CBS 592.81	KC343115.1	-	KC344083.1	KC343841.1	
D.infecunda	CBS 133812	KC343126.1	-	KC344094.1	KC343852.1	
D.goulteri	BRIP 55657a	KJ197290.1	-	KJ197270.1	KJ197252.1	
D.kochmanii	Brip 54033	NR111614.1	-	-	JN645809.1	
D. manihotia	CBS 133812	KC343138.1	-	KC344106.1	KC343864.1	
D.masirevicii	BRIP 54256	KJ197277.1	-	KJ197256.1	KJ197238.1	
D.middletonii	BRIP 57329	KJ197285.1	-	KJ197265.1	KJ197247.1	
D.miriciae	BRIP 54736j	KJ197282.1	-	KJ197262.1	KJ197244.1	
D. neilliae	CBS 144.27	KC343144	-	KC344112	KC343870	
D.phaseolorum	CBS 116019	KC343175.1	-	KC344143.1	KC343901.1	
D.sackstonii	BRIP 54669b	KJ197287.1	-	KJ197267.1	KJ197249.1	
D.serafiniae	BRIP 54136	KJ197273.1	-	KJ197253.1	KJ197235.1	
type D. stewartii	CBS 193.36	NR111417.1	-	-	GQ250324.1	
D. vaccinii	CBS 118571	KC343223.1	-	KC344191.1	KC343949.1	
Diaporthe sp. 1	CBS 119639	KC343202.1	-	KC344170.1	KC343928.1	

# Приложение. Таблица 3. Номера доступа сиквенсов фомоидных грибов в базе данных GenBank, полученных в ходе работы для локусов ITS, LSU, генов $\beta$ -тубулина и фактора элонгации трансляции- $1\alpha$

D	11	Номер	Номер доступа в базе данных GenBank				
Вид	<b>Изолят</b>	ITS	LSU	β-tubulin	EF-1α		
Diaporthe. gulyae	MF Ha17-042	MK024252	-	MK033488	MK039420		
D. gulyae	MF Ha17-043	MK024253	-	MK033489	MK039421		
D. eres	MF Ha18-001	MK024709	-	MK033490	MK039422		
D. eres	MF Ha18-002	MK024710	-	MK033491	MK039423		
D. phaseolorum	MF 16-010	MH732990	-	MH734197	MH768350		
Stagonosporopsis heliopsidis	MF 010-002	KX928773	MF065743	KX928775	-		
Didymella americana	MF 010-003	MF065720	KY552992	MF065765	-		
S. heliopsidis	MF 010-006	KX928774	KY552983	KX928776	-		
S. inoxydabilis	MF 010-020	MF065721	MF065744	MF065766	-		
D. glomerata	MF 010-025	MF065722	MF065745	MF065767	-		
Boeremia sp.	MF 010-026	MF065723	MF065746	-	-		
Ascochyta sp.	MF 010-031	MF065724	MF065747	MF065768	-		
Ascochyta sp.	MF 010-033	MF065725	MF065748	MF065769	-		
Boeremia sp.	MF 010-037	MF065726	MF065749	MF065770	-		
Boeremia sp.	MF 010-039	MF065727	MF065750	MF065771	-		
D. pinodella	MF 010-042	MF065728	MF065751	MF065772	-		
Boeremia sp.	MF 010-049	MF065729	MF065752	_	-		
Boeremia sp.	MF 010-051	MF065730	MF065753	MF065773	-		
Boeremia sp.	MF 010-064	MF065731	MF065754	MF065774	-		
Boeremia sp.	MF 010-065	MF065732	MF065755	MF065775	-		
Stagonosporopsis sp.	MF 010-066	MF065733	MF065756	_	_		
D. marophylla	MF 010-067	MF065734	MF065757	MF065776	_		
Neoascochyta paspali	MF 010-069	MF065735	MF065758	_	_		
Boeremia sp.	MF 010-071	MF065736	MF065759	MF065777	_		
Nothophoma quercina	MF 010-075	MF065737	MF065760	MF065778	_		
Boeremia sp.	MF 010-076	MF065738	MF065761	MF065779	_		
D.rosea	MF 010-077	MF065739	MF065762	MF065780	_		
Boeremia sp.	MF 010-078	MF065740	MF065763	MF065781	_		
Neoascochyta desmazieri	MF 010-080	MF065741	MF065764	-	-		
Nothophoma quercina	MF 010-081	MF065742	-	-	-		
D. americana	MF As16-003	MK495981	-	MK501786	_		
D. americana	MF As16-004	MK495982	-	MK501787	-		
Stagonosporopsis sp.	MF As16-005	MK495983	-	-	-		
Stagonosporopsis sp.	MF As16-008	MK495984	-	-	-		
Plenodomus lindquistii	MF Ha15-001 MF Ha16-001	MK495985 MK495986	-	-	-		
P. lindquistii	MIL U910-001	WIN493980	-	-	-		

Продолжение таблицы 3.

121

Deve	Иооля	Номер доступа в базе данных GenBank				
Вид	Изолят	ITS	LSU	β-tubulin	EF-1α	
P. lindquistii	MF Ha16-002	-	-	MK501788	-	
P. lindquistii	MF Ha16-003	-	-	MK501789	-	
P. lindquistii	MF Ha16-004	MK495987	-	-	-	
P. lindquistii	MF Ha16-005	MK495988	1	MK501790	1	
P. lindquistii	MF Ha16-006	-	1	MK501791	1	
P. lindquistii	MF Ha16-008	-	-	MK501792	-	
D. glomerata	MF Ha17-016	MK495989	-	-	-	
D. glomerata	MF Ha17-017	MK495990	_	MK501793	-	