

УДК: 581.2, 582.282.19

ПЕРВАЯ НАХОДКА ГРИБА *DIAPORTHE GULYAE* НА ПОДСОЛНЕЧНИКЕ В РОССИИ

Гомжина М.М., Ганнибал Ф.Б.

196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского д. 3

ФГБНУ «ВНИИЗР»

gomzhina91@mail.ru

Длительное время считалось, что фомопсис подсолнечника в России вызывает единственный вид *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljc. & M. Petrov. Традиционно идентификацию видов *Diaporthe* осуществляли по морфологическим признакам и связи с питающим растением. На настоящий момент известно, что достоверную идентификацию видов этого рода рекомендуется осуществлять с применением молекулярных методов. Изучение видов *Diaporthe* в России с применением этих методов не проводилось. Работа посвящена идентификации двух изолятов *Diaporthe* sp., выделенных в 2017 году из семян подсолнечника, выращенного в Белгородской области. Согласно результатам изучения молекулярно-генетических и морфологических признаков, изоляты были идентифицированы, как вид *D. gulyae*. В России эти изоляты являются первой достоверной находкой данного вида на подсолнечнике. В результате искусственной инокуляции было показано, что изоляты являются для подсолнечника патогенными.

Ключевые слова: фомопсис, подсолнечник, молекулярная филогения, *Diaporthe*, *Phomopsis*.

Введение. Фомопсис подсолнечника – заболевание, широко распространенное во всех регионах, где возделывается эта культура [1, 2]. В перечень карантинных объектов СССР фомопсис подсолнечника был включен в 1986 г. [3]. На настоящий момент возбудитель этого заболевания входит в Единый перечень карантинных объектов, ограниченно распространенных на территории Евразийского экономического союза.

Заболевание было описано впервые в бывшей Югославии, где возбудитель был определен как *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljc. & M. Petrov в анаморфной стадии – *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljc. & M. Petrov [4]. Согласно современной номенклатуре грибов в данном случае единственным верным родовым эпитетом следует считать *Diaporthe* [5].

Традиционно идентификацию вида *D. helianthi* проводили в первую очередь по вызываемым им симптомам, а также по морфолого-культуральным и микроморфологическим признакам *in vitro* [6]. Из-за такого подхода длительное время считалось, что на подсолнечнике развивается единственный вид рода *Diaporthe* – *D. helianthi*, встречающийся повсеместно в местах возделывания подсолнечника [3, 6-10].

Некоторое время назад было показано, что микроморфологические и морфолого-культуральные признаки являются ненадежными и недостаточными для разграничения видов рода *Diaporthe* [11]. Установлено, что многие виды рода имеют широкий круг растений-хозяев [12]. Кроме того, одно и то же питающее растение может быть поражено более чем одним видом *Diaporthe* [12].

В последние десятилетия с использованием молекулярно-генетического анализа было описано восемь новых для науки видов *Diaporthe*, которые также наряду с *D. helianthi* вызывают заболевание подсолнечника: *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, *D. goulteri* R.G. Shivas, S.M. Thoms. & Y.P. Tan, *D. masirevicii* R.G. Shivas, L. Morin, S.M. Thoms. & Y.P. Tan, *D. miriciae* G. Shivas, S.M. Thoms. & Y.P. Tan, *D. sackstonii* R.G. Shivas, S.M. Thoms. & Y.P. Tan, *D. serafinae* R.G. Shivas, S.M. Thoms. & Y.P. Tan [2, 13]. Показано, что эти виды отличаются друг от друга и от *D. helianthi* не только по молекулярно-генетическим признакам, но и по морфологическим, а также по патогенности. Кроме того, в результате ревизии коллекции изолятов *Diaporthe*, выделенных из пораженных стеблей подсолнечника, было показано, что с этим растением могут быть ассоциированы как минимум ещё четыре ранее известных науке вида этого рода: *D. sojae* Lehman [14], *D. phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. [15], *D. ambigua* Nitschke [16], *D. novem* J.M. Santos, Vrandecic & A.J.L. Phillips [17]. Таким образом, на настоящий момент известно, что с подсолнечником всего могут быть ассоциированы 13 видов рода *Diaporthe*.

В России впервые *D. helianthi* был зарегистрирован на подсолнечнике в 1990 г. в Ставропольском крае [18]. 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 [19]. Однако, следует отметить, что все эти находки основаны лишь на идентификации вида по симптомам на питающем растении, в редких случаях – по морфологическим признакам, формируемым изолятами в чистой культуре.

Изучение биоразнообразия и географии видов *Diaporthe* в России на подсолнечнике с применением методов молекулярной филогении и с учётом современной систематики рода не проводилось. Данные о видовом составе и распространении отдельных видов, особенно обладающих экономической значимостью, на территории страны требуют уточнения. Представленная работа посвящена идентификации двух изолятов рода *Diaporthe*, выделенных в 2017 году из семян подсолнечника, выращенного на территории Белгородской области.

Материал и методы. В 2017 году была произведена фитосанитарная оценка семян подсолнечника, выращенного в Белгородской области, Шебекинском районе. Всего было выделено 10 изолятов пикнидиальных грибов. Из них по морфологическим признакам конидий в чистой культуре 8 были предварительно идентифицированы, как вид *Plenodomus lindquistii* (Frezzi) Gruyter, Aveskamp & Verkley – возбудитель фомоза подсолнечника, два изолята MF-Ha17-042 и MF-Ha17-043 как виды *Diaporthe* sp. Эти два изолята и послужили материалом для выполнения работы.

Для изоляции грибов семена подвергали поверхностной стерилизации 5% гипохлоритом натрия. Поверхностно стерилизованные образцы были разложены на картофельно-сахарозную питательную среду (КСА). Чашки Петри инкубировали при 24 °С в темноте. Учёт производился на 7-10 сутки культивирования. Все изоляты хранятся в коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии. Изоляты были идентифицированы до уровня вида по молекулярно-генетическим признакам: секвенирование филогенетически информативных локусов ДНК (область внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-область), гены β-тубулина и фактора элонгации трансляции 1-α). Номера доступа нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank: MF-Ha17-042: MK024252, MK033488, MK039420; MF-Ha17-043: MK024253, MK033489, MK039421 соответст-

венно. Также была проведена оценка и морфологических признаков, формируемых изолятами в чистой культуре.

Оценку патогенности проводили в отношении гибрида подсолнечника Тунка (селекция компании Limagren, Франция) согласно стандартной методике [2, 20, 21]. Инокуляция интактных растений была осуществлена на стадии развития R1-R2 (6-8 пар настоящих листьев, начало бутонизации) [21] в трёхкратной повторности.

В качестве инокулюма использовали агаровые блоки размером 5 мм, высеченные из 10-дневной чистой культуры гриба, выращенной на КСА. Агаровые блоки были помещены на листья и стебли, как с предварительным ранением, так и без него. В контрольном варианте растения инокулировали 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.

Результаты и обсуждение. В результате молекулярно-филогенетического анализа было показано, что на всех филогенетических деревьях изученные изоляты *Diaporthe* sp. с максимальными значениями бутстреп-поддержки (100%) формируют единую кладу с типовым штаммом *D. gulyae*.

На КСА изоляты MF-Ha17-042, MF-Ha17-043 формировали быстрорастущие колонии с обильным пушисто-войлочным кремовым воздушным мицелием. Немногочисленные пикниды размером 244-426 × 399-190 мкм располагались под мицелием. В пикнидах формировались только α -конидии 7.1 - 8.8 × 2.9 - 3.6 μ m (рис.) по морфологии также соответствующие *D. gulyae* [2].

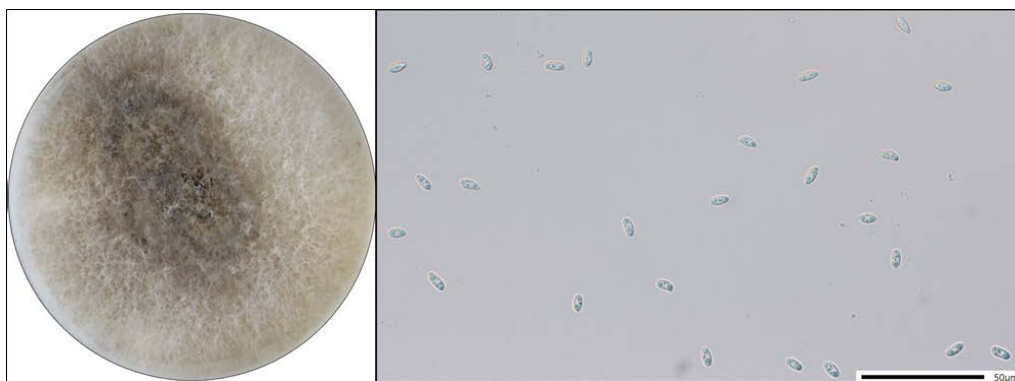


Рисунок – Колония изолята *Diaporthe gulyae* MF-Ha17-043, 14-дневная чистая культура (слева) и α -конидии (справа), КСА.

В результате искусственной инокуляции подсолнечника было показано, что изученные изоляты вызывают некрозы только на стеблях в 100% случаев при инокуляции с предварительным ранением. Средние размеры некрозов на стеблях через 7 суток после инокуляции составляли: изолят MF-Ha17-042 – 4.3±2.7 мм, MF-Ha17-043 – 3.3±2.2 мм.

Изоляты не вызывают образования некротических повреждений при инокуляции листьев с предварительным ранением и как листьев, так и стеблей без ранения.

Для подтверждения триады Коха из образовавшихся некрозов были получены реизолаты *D. gulyae*, обладающие морфологическими признаками, идентичными изолятам MF-На17-042 и MF-На17-043.

Корректная идентификация фитопатогенных видов грибов, особенно входящих в список карантинных объектов, в том числе и видов рода *Diaporthe*, вызывающих фомопсис подсолнечника, обладает несомненной практической значимостью. 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* [2]. Выявленный на территории России, патогенный для подсолнечника вид *D. gulyae*, согласно данным из литературы не являются специализированными для подсолнечника и также был обнаружен на сое [22, 23].

Изученные изоляты являются первой находкой *D. gulyae* на территории России, подтвержденной молекулярно-генетическими исследованиями. Вероятно, вид *D. gulyae* присутствовал на территории России и ранее, но не был корректно идентифицирован. На настоящий момент из 13 видов *Diaporthe*, которые могут быть ассоциированы с подсолнечником, в России достоверно (подтверждено молекулярно-генетическими исследованиями) обнаружено два вида: *D. phaseolorum* [24] и *D. gulyae*.

Литература

1. Masirevic S., Gulya T.J. Sclerotinia and Phomopsis - two devastating sunflower pathogens // *Field Crops Res.* – 1992. – Vol. 30. – P. 271-300.
2. Thompson SM, Tan YP, Young AJ, Neate SM, Aitken EAB, Shivas RG. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (Phomopsis) species // *Persoonia.* – 2011. – Vol. 27. – P. 80-89.
3. Якуткин В.И. Фомопсис подсолнечника // *Защита растений.* – 1990. – №3. – С. 37-38.
4. Muntañola-Cvetković M, Mihaljčević M, Petrov M. On the identity of the causative agent of a serious Phomopsis-Diaporthe disease in sunflower plants // *Nova Hedwigia.* – 1985. – Vol. 34. – P. 417-435.
5. Santos JM, Correia VG, Phillips AJL. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition // *Fungal Biology.* – 2010. – Vol. 114 (2-3). – P. 255-70.
6. Якуткин В.И. Методы выявления и учета фомопсиса подсолнечника // *Сборник методических рекомендаций по защите растений.* Санкт-Петербург, 1998. – С. 191-207.
7. Слюсарь Э.Л., А. М. Фираз. Вредоносность фомопсиса на подсолнечнике // *Защита и карантин растений.* – 1994. – № 3-4. – С. 6.
8. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Челюстникова Т.А. Токсичность культурального фильтрата и агрессивность географически отдаленных изолятов *Phomopsis* (*Diaporthe*) *helianthi* Munt.-Cvetk., Michal., Petr. для подсолнечника // *Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК.* – 2006. – Вып. 2 (135). – С. 67-72.
9. Андронова В.М., Диденко А.О. Методическое пособие по новым аспектам диагностики возбудителя фомопсиса подсолнечника. Краснодар, 2011. – 18 с.
10. Арасланова Н.М., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С. Интенсивность роста в культуре изолятов фомопсиса при разных температурах и токсичность их культуральных фильтратов для проростков подсолнечника // *Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК.* – 2013. – Вып. 1 (153-154). – С. 60-66.

11. Mostert L, Crous PW, Kang C-J, Phillips AJL. Species of *Phomopsis* and a *Libbertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization // *Mycologia*. 2001. – Vol. 93. – P. 146-167.
12. Santos J, Phillips AJL. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal // *Fungal Diversity*. 2009. – Vol. 34. – P. 111-125.
13. Thompson SM, Tan YP, Shivas RG, Neate SM, Morin L, Bissett A, Aitken EAB. Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia // *Persoonia*. – 2015. – Vol. 35. – P. 39-49.
14. Dissanayake AJ, Camporesi E, Hyde KD, Zhang W, Yan JY, Li XH. Molecular phylogenetic analysis reveals seven new *Diaporthe* species from Italy // *Mycosphere*. – 2017. – Vol. 8(5). – P. 853-877.
15. Udayanga D, Liu X, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Bahkali ANA, Hyde KD. The genus *Phomopsis*: Biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens // *Fungal diversity*. – 2011. – Vol. 50. – P. 189-225.
16. Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi // *Persoonia*. – 2013. – Vol. 31. – P. 1-41.
17. Santos J.M, Vrandečić K., Čosić J., Duvnjak T., Phillips A.J.L. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia // *Persoonia*. – 2011. – Vol. 27. – P. 9-19.
18. Якуткин В.И. Идентификация возбудителя фомопсиса подсолнечника и методы его учёта // Методические указания. Санкт-Петербург, 1991. – 23 с.
19. Васютин А.С., Юдин Б.И., Чумакова В.В. Не допустить распространения фомопсиса подсолнечника // *Защита и карантин растений*. – 2003. – №9. – С. 28-30.
20. Miric E, Aitken EAB, Goulter KC. Identification in Australia of the quarantine pathogen of sunflower *Phoma macdonaldii* (Teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*) // *Australian Journal of Agricultural Research*. – 1999. – Vol. 50. – P. 325-32.
21. Schneiter AA, Miric JF, Berglund DR. Description of sunflower growth stages // *Crop. Sci.* – 1981. – Vol. 21(6). – P. 901-903.
22. Mathew FM, Gulya TJ, Jordahl JG, Markell SG. First Report of Stem Disease of Soybean (*Glycine max*) Caused by *Diaporthe gulyae* in North Dakota // *Disease notes*. – 2018. – Vol. 102(1). – P. 240.
23. Udayanga D, Liu X, Crous PW, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Hyde KDA. Multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*) // *Fungal diversity*. – 2012. – Vol. 56. – P. 157-171.
24. Гомжина М.М., Ганнибал Ф.Б. Первая находка гриба *Diaporthe phaseolorum* на подсолнечнике в России // *MIR Journal*. – 2018. – Т. 5 (1). – С. 59-64.

FIRST REPORT OF PHOMOPSIS STEM CANKER OF SUNFLOWER CAUSED BY *DIAPORTHE GULYAE* IN RUSSIA

Gomzhina M.M., Gannibal Ph.B.

For a long time it was considered, that *Diaporthe helianthi* is the only species of the genus *Diaporthe* that causes *Phomopsis* stem canker of sunflower in Russia.

However, these data on distribution are based on the identification of the pathogen solely by the symptoms on the plant or by the morphological traits, formed by isolates in the pure culture. Currently, it is known that the correct identification of species of the genus *Diaporthe* should be performed by molecular genetic methods. A comprehensive analysis of biodiversity and geographic distribution of *Diaporthe* species in Russia has not been performed. The aim of the research was identification of two *Diaporthe* isolates, obtained from sunflower seeds. According to both molecular-genetic and morphology data, studied isolates were identified as *D. gulyae*. To the best of our knowledge, this isolates represent the first report of *D. gulyae* associated with sunflower in the Russian Federation. The development of the stem lesions as a result of the artificial inoculation proved that these isolates are pathogenic for sunflower.

Keywords: phomopsis, sunflower, molecular phylogeny