

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 582.282+582.288+577.29

РЕДКИЕ ВИДЫ ФОМОИДНЫХ ГРИБОВ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С СОЕЙ

© 2024 г. М. М. Гомжина^{1,*}, Е. Л. Гасич^{1,**}

¹ Всероссийский НИИ защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: gomzhina91@mail.ru

**e-mail: elena_gasich@mail.ru

Поступила в редакцию 01.11.2023 г.

После доработки 16.12.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Аскохитоз сои — широко распространенное заболевание, которое вызывают несколько близкородственных видов фомоидных грибов, и которое нередко приводит к ощутимым потерям урожая. Из числа представителей этой большой и таксономически гетерогенной группы наиболее традиционными представителями микобиоты сои являются виды родов *Boeremia* и *Didymella*. Надежную идентификацию видов фомоидных грибов можно осуществлять, только анализируя совокупность молекулярно-филогенетических, микроморфологических и культуральных признаков. В результате многолетнего фитосанитарного мониторинга посевов сои, нами были собраны листья с симптомами аскохитоза, из которых в чистую культуру было выделено более 100 изолятов фомоидных грибов. Большинство из них в результате филогенетического анализа были идентифицированы как виды *Boeremia* и *Didymella*. Восемь изолятов были определены как представители других родов, предположительно относящиеся к редким видам. Целью работы была идентификация этих изолятов и оценка их патогенности. Мультилокусный филогенетический анализ, основанный на последовательностях ITS-локуса и участков, ответственных за синтез β-тубулина и второй большой субъединицы фермента РНК-полимеразы II позволил отнести эти изоляты к четырем видам — *Neosascochyta graminicola*, *Remotididymella capsici*, *Stagonosporopsis heliopsisidis* и *S. stuijvenbergii*. Все эти грибы были впервые выявлены на таком растении-хозяине, как соя. Виды *Neosascochyta graminicola* и *Stagonosporopsis stuijvenbergii* были впервые выявлены на территории России в Рязанской и Амурской областях соответственно. В результате оценки патогенности изолятов этих грибов в отношении сои было установлено, что таким свойством они не обладают, по всей вероятности, развиваются сапротрофно или эндофитно в листьях сои. Помимо детальных филогенетических данных, рукопись сопровождается подробным описанием культуральных и микроморфологических признаков всех видов, а также оценкой патогенных свойств.

Ключевые слова: аскохитоз сои, молекулярная филогения, патогенность, *Didymellaceae*, *Neosascochyta*, *Phoma*, *Remotididymella*, *Stagonosporopsis*

DOI: 10.31857/S0026364824020062, **EDN:** vozrsf

ВВЕДЕНИЕ

Соя — перспективная культура, активно возделываемая в России. Расширение посевов и увеличение доли сои в севооборотах способствует накоплению инфекционного потенциала фитопатогенных микроорганизмов. Аскохитоз сои — широко распространенное заболевание, которое вызывают несколько близкородственных видов фомоидных грибов, приводящих к развитию на сое сходных симптомов.

Фомоидные грибы — крупная, таксономически гетерогенная, полифилетическая группа морфологически сходных аскомицетов. Ранее большинство представителей этой группы объединяли в несколько

крупных морфологически сходных родов, в основном *Phoma* Sacc., а также в *Ascochyta* Lib., *Diaporthe* Fuckel, *Mycosphaerella* Johanson, *Paraphoma* Morgan-Jones et J.F. White, *Phyllosticta* Pers., *Stagonospora* (Sacc.) Sacc. и др. (также понимаемых широко). Теперь фомоидные грибы делят на более чем 60 родов, относящихся к 20 семействам (Aveskamp et al., 2008, 2009, 2010; Boerema et al., 2004; Chen et al., 2015, 2017; Hou et al., 2020a, b; Rai et al., 2022; Gomzhina, Gannibal, 2017). Многие роды и виды фомоидных грибов являются фитопатогенами, приводящими к существенным потерям урожая (Deb et al., 2020; Hou et al., 2020a, 2020b; Rai et al., 2021; Zhao et al., 2021).

Одним из ключевых элементов для понимания того, как возникают и распространяются болезни растений и как с ними можно бороться, является выявление и корректная идентификация их возбудителей. Известно, что оценку биоразнообразия и надежную идентификацию видов фомоидных грибов в настоящее время осуществляют только с применением полифазного подхода в рамках консолидированной концепции вида (Consolidated species concept, CSC) (Crous et al., 2015), анализирующей в совокупности набор морфологических и молекулярно-генетических признаков. Таксономически информативными локусами ДНК, используемыми для реконструкции филогении в этой группе грибов, являются ITS-локус, участки генов, ответственные за синтез β -тубулина (*tub2*) и второй большой субъединицы фермента РНК-полимеразы II (*rpb2*).

Среди фомоидных грибов пятнистость листьев сои могут вызывать *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter et Verkley и виды рода *Didymella* Sacc., в частности, *Didymella glomerata* (Corda) Qian Chen et L. Cai, *D. pinodella* (L.K. Jones) Qian Chen et L. Cai, *D. pomorum* (Thüm.) Qian Chen et L. Cai, и др. (Kövcics et al., 2014; Deb et al., 2020; Hou et al., 2020a). Все эти виды являются сапротрофами и могут развиваться в почве, на растительных остатках, в воде, на широком круге других растений, включая культивируемые бобовые. На сое они могут быть патогенами, сапротрофами и эндофитами.

На текущий момент информация о фомоидных грибах, распространенных на территории России, является фрагментарной. Существуют отдельные работы, посвященные микобиоте конкретных растений-хозяев или биоразнообразию отдельных родов фомоидных грибов (Gomzhina et al., 2020a, 2020b, 2022; Gomzhina, Gasich, 2022; Nekrasov et al., 2022).

Исследования биоразнообразия фомоидных грибов, ассоциированных с соей, в рамках консолидированной концепции видов находятся на начальной стадии. Существует большое количество отечественных публикаций, посвященных изучению микобиоты сои, возделываемой на территории России (Abramov, 1931, 1938; Bondartseva-Monteverde, Vasilevskiy, 1940; Nikitina, 1962; Gunina, 1967; Nelen, 1977; Muravieva, 1977; Zhukovskaya, 1979; Naumova, 1988; Zaostrovnykh et al., 2018). Идентификация видов фомоидных микромитетов в опубликованных работах проводилась традиционными методами по морфологическим признакам спороносных структур. Очевидно, что данные, приведенные в этих работах, утратили свою актуальность.

Целью настоящего исследования являлась идентификация изолятов фомоидных грибов, выделенных из

сои, собранной на территории нескольких регионов России, по молекулярно-генетическим, микроморфологическим и культуральным признакам и оценка их патогенности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал. В результате фитосанитарного мониторинга посевов сои, проводимого с 2017 г. в основных регионах, где возделывают эту культуру, были собраны листья с симптомами аскохитоза (рис. 1), а также семена пораженных растений. Образцы листьев хранятся в Микологическом гербарии ЛЕР (ВИЗР).

Изоляты. Растительный материал поверхностно стерилизовали 5%-м р-ром гипохлорита натрия. Затем фрагменты листьев раскладывали на агаризованную картофельно-сахарозную питательную среду (КСА) (Samson et al., 2000) с добавлением смеси антибиотиков (ампициллин, стрептомицин, пенициллин, HyClone, Austria) и 0.4 мкл/л раствора Triton X-100 (Panreac, Spain). Чашки Петри инкубировали при 24 °С в темноте. Отсев выросших грибов проводили на 7–10-е сут, из каждой культуры гриба получали монопикнидальные изоляты. Всего было выделено 100 изолятов фомоидных грибов. Большая часть изолятов в результате мультилокусного секвенирования (данные не представлены) были идентифицированы как широко распространенные виды родов *Boeremia* и *Didymella* — традиционные представители микобиоты листьев сои. Восемь изолятов, отличающихся от большинства, было выбрано для исследования (табл. 1). Все изоляты хранятся в коллекции чистых культур микромитетов лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР (MF).

Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование. Мицелий для экстракции ДНК был собран с поверхности 14-суточных чистых культур, выращенных на КСА при 24 °С. ДНК выделяли согласно стандартному методу СТАВ/хлороформ (Doyle, Doyle, 1990).

Для всех изолятов были определены нуклеотидные последовательности ITS-локусов рДНК и участки генов, *tub2* и *rpb2*. Амплификацию локусов ДНК проводили с соответствующими парами праймеров: ITS-локус — ITS1/ITS4 (White et al., 1990), *tub2* — β tub2Fw/ β tub4Rd (Aveskamp et al., 2009), *rpb2* — fRPB2—5F2 (Sung et al., 2007)/fRPB2—7cR (Liu et al., 1999). Финальный объем ПЦР смеси 25 мкл, включая dNTPs (200 μ M), прямой и обратный праймеры (0.5 μ M каждый), *Taq* ДНК полимеразу (5 ед./мкл), 10 $\times$ ПЦР буфер с ионами Mg^{2+} и NH_4^+ , и 1–10 нг totalной геномной ДНК. Условия проведения ПЦР были следующие: преденатурация 95 °С, 5 мин.; затем 35 циклов, состоящие из денатурации 92 °С, 50 с; отжиг праймеров 55 °С, 40 с, (ITS1/ITS4), 52 °С, 40 с (β tub2Fw/ β tub4Rd),

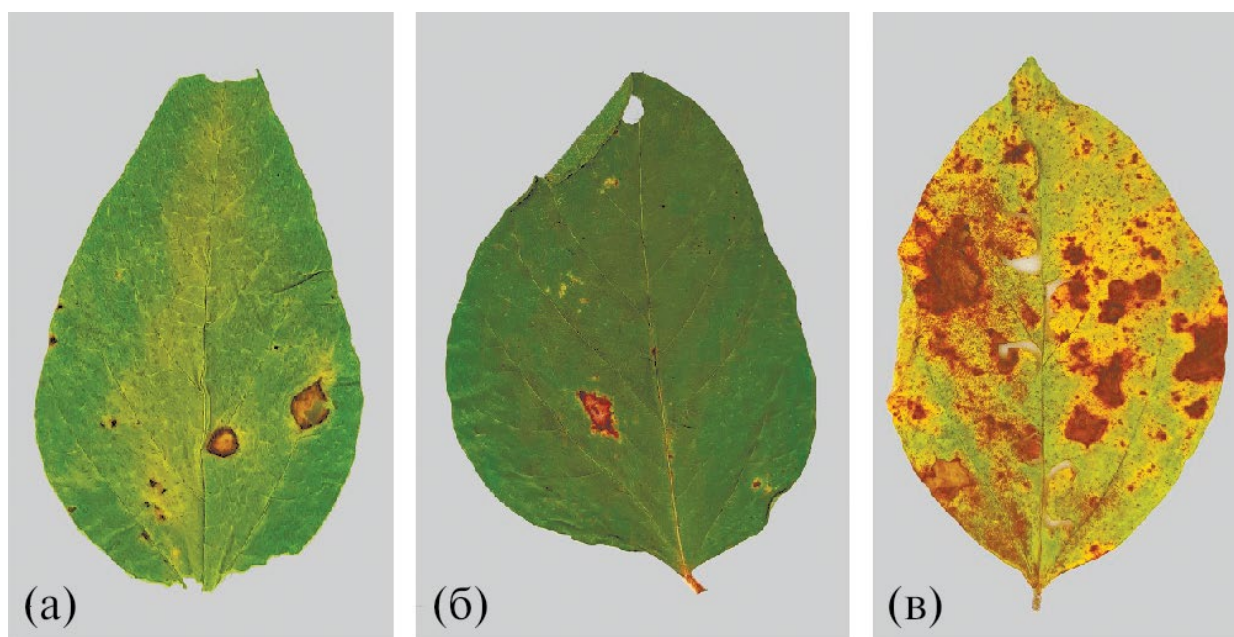


Рис. 1. Листья сои с симптомами аскохитоза, из которых были выделены изученные изоляты: А — Рязанская обл., выделен *Neosascochyta graminicola* MF 1.42, 2020 г. (LEP 123703); Б — Амурская обл., выделен *Remotididymella capsici* MF 1.28, 2019 г. (LEP 123702); В — Амурская обл., выделен *Stagonosporopsis stuijvenbergii* MF 1.30, 2019 г. (LEP 123704).

Таблица 1. Исследованные изоляты фомоидных грибов, выделенные из сои

№ штамма	Вид гриба	Сорт	Субстрат	Дата сбора	Место сбора
MF 1.42	<i>Neosascochyta graminicola</i>	—	лист	2020	Рязанская обл.
MF 1.28	<i>Remotididymella capsici</i>	—	лист	26.08.2019	Амурская обл., Константиновский р-н, Золотоножка
MF 21.1	<i>Stagonosporopsis heliopsisidis</i>	Лазурная	лист	5.10.2019	Амурская обл., Тамбовский р-н, Козьмодемьяновка
MF 21.6		Опус	лист	5.09.2019	Амурская обл., Тамбовский р-н, Толстовка
MF 1.2—15		Даурия	семя	2018	Амурская обл., Белогорский р-н, Белогорск
MF 1.25	<i>Stagonosporopsis stuijvenbergii</i>	—	семядоля	2018	Приморский край, Уссурийск, Новоникольск
MF 1.30		—	лист	26.08.2019	Амурская обл., Тамбовский р-н, Новоалександровка
MF 6.1		Нега	семя	2018	Амурская обл., Белогорский р-н

элонгация 72 °С, 75 с; финальная элонгация 5 мин при 72 °С. Участок гена *rpb2* был амплифицирован согласно протоколу с прогрессивным снижением температуры отжига. Все этапы были проведены, как описано выше, но температуру отжига последовательно снижали, начиная с пяти циклов при 60 °С, 40 с, далее пять циклов при 58 °С, 40 с, затем 30 циклов при 54 °С, 40 с.

Для секвенирования, согласно стандартному протоколу (Boyle, Lew, 1995), производили очистку ДНК, полученной после ПЦР. Очищенные фрагменты секвенировали по методу Сэнгера (1977) на секвенаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems — Hitachi,

Япония) в соответствии с протоколами производителя с использованием набора реактивов с флуоресцентно меченными дезоксирибонуклеотидтрифосфатами BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, США).

Филогенетический анализ. Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalX 1.8 (Thompson et al., 1997), после чего при необходимости выравнивание корректировали вручную.

Филогенетические деревья были построены согласно трем алгоритмам. Метод максимального правдоподобия (maximum likelihood — ML) был применен

с использованием программного обеспечения IQ-tree (Minh et al., 2020). Оптимальная модель нуклеотидных замен была определена согласно Байесовскому информационному критерию (BIC) в программе IQ-tree. Принцип максимальной экономии (maximum parsimony — MP) — в программном обеспечении Molecular Evolutionary Genetics Analysis версии 10 (MEGA X; Kumar et al., 2018). Анализ последовательностей методом Байесовской статистики был проведен с использованием программы Mr. Bayes v. 3.2.1., интегрированной в платформу Armadillo v. 1.1 (Lord et al., 2012). Надежность топологии дендрограмм, построенных разными методами, была оценена с помощью бутстреп-анализа с 1000 повторностей. В качестве референсных были использованы полученные из базы данных GenBank последовательности ITS локуса рДНК, участков генов *tub2*, *rpb2* всех видов на настоящий момент описанных для родов *Neosascochyta* Qian Chen et L. Cai, *Remotididymella* Valenz.-Lopez, Crous, Cano, Guarro et Stchigel и *Stagonosporopsis* Died. (табл. 2). В качестве внешней группы были взяты последовательности штамма *Pyrenochaetopsis kuksensis* Špetík, Eichmeier et Berraf-Tebbal.

Морфология. Для оценки культуральных признаков изоляты выращивали на трех агаризованных питательных средах, традиционно используемых для изучения фомоидных грибов, а именно на КСА, овсяной (ОА) и солодовой (МЕА) (Voerema et al., 2004). Изоляты культивировали в течение 14 сут при 24 °С. Первые семь сут в темноте, следующие семь — при переменном облучении ближним УФ в режиме день/ночь (12/12 ч). Диаметр колоний измеряли как на седьмые, так и на 14-е сут роста. Описание колоний осуществляли на 14-е сут. Микроморфологические признаки спороносных структур оценивали на 14-е сут на ОА. Наблюдения и измерения по 100 конидий и по 50 пикнид для каждого изолята были осуществлены на стереомикроскопе Olympus SZX16 (Olympus, Токуо, Japan) и на микроскопе Olympus BX53. Микрофотографии были получены с камеры PROKYON (Jenoptik, Jena, Germany) с дифференциальным интерференционным контрастом Номарского.

Патогенность. Изучение патогенности изолятов в отношении сои осуществляли путем искусственного заражения отрезков листьев в лабораторных условиях. Для инокуляции использовали восприимчивый к листовым пятнистостям сорт сои Селекта 201 (ООО “Компания Соевый Комплекс”). Поверхностно стерилизованные 0.1%-м р-ром нитрата серебра семена помещали в чашки Петри на увлажненную водой фильтровальную бумагу и инкубировали в термостате при 24 °С, проросшие семена высевали в сосуды с почвой (по 2 шт. на 250 мл сосуд). Растения выращивали на светоустановке при переменном освещении

люминесцентными лампами (12 ч день/12 ч ночь) до стадии двух тройчатых листьев. Инокулировали отрезки листочков первого тройчатого листа.

В качестве инокулята использовали мицелиальную суспензию, полученную при культивировании изолятов на жидкой соевой среде (KH_2PO_4 — 2 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1 г; MgSO_4 — 1 г; глюкоза — 20 г; соевая мука — 10 г; вода — 1 л; 50 мл среды на 250 мл колбу) в течение четырех суток на качалке (200 об./мин). Мицелий отделяли от культуральной жидкости, отжимали и измельчали, концентрацию мицелия доводили до 50 мг/мл.

Отрезки листьев растений раскладывали в чашки Петри на увлажненную стерильной водой фильтровальную бумагу. В центр листового отрезка помещали каплю (10 мкл) мицелиальной суспензии. Инокулом наносили на абаксиальную или адаксиальную поверхности листовых отрезков, интактные или надколотые в центре иглой. Чашки инкубировали на лабораторном столе при естественном освещении. Диаметр некрозов измеряли на 7, 14 и 21-е сут.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ, основанный на нуклеотидных последовательностях трех филогенетически информативных локусов ДНК (ITS, *rpb2* и *tub2*), включал 82 штамма. Выборка объединяла все исследованные российские изоляты (8) а также типовые или репрезентативные штаммы, представляющие на настоящий момент все виды, принятые в родах *Neosascochyta* (17), *Remotididymella* (10) и *Stagonosporopsis* (34). Данные об общей длине матриц для каждого изолята, длине каждого локуса в отдельности, числе переменных сайтов и оптимальных моделях нуклеотидных замен суммированы в табл. 3.

Топология филограмм, построенных разными методами на основании последовательностей каждого локуса в отдельности, совпадали с топологией комбинированной филограммы (рис. 2).

Изолят MF 1.42 на мультилокусном филогенетическом древе формировал кладу с тремя репрезентативными штаммами *Neosascochyta graminicola* (Punith.) Qian Chen et L. Cai CBS102789, CBS301.69 и CBS586.79. Три изолята MF 1.28, MF 21.1, MF 21.6 формировали кладу вместе с типовым штаммом *Remotididymella capsici* (Bond.-Mont.) L.W. Hou, L. Cai et Crous CBS679.77. Четыре изолята *Stagonosporopsis* на комбинированной филограмме входили в состав двух клад. Одну составляли два изолята MF 1.2—15 и MF 1.25 и репрезентативный штамм *Stagonosporopsis heliopsisidis* (H.C. Greene) Aveskamp, Gruyter et Verkley CBS109182, вторую — MF 1.30, MF 6.1 и типовой

Таблица 2. Номера доступа (GenBank) нуклеотидных последовательностей штаммов фомоидных грибов, включенных в исследование

Вид	Номер штамма, статус	Номера доступа (GenBank)		
		ITS	<i>rpb2</i>	<i>tub2</i>
<i>Allophoma tropica</i>	CBS436.75; DSM 63365, T	GU237864	KT389556	GU237663
<i>Boeremia exigua</i>	CBS431.74; PD74/2447, T	FJ427001	KT389569	FJ427112
<i>Chaetasbolisia erysiphoides</i>	CBS148.94, T	GU237785	MT018061	GU237522
<i>Heterophoma sylvatica</i>	CBS874.97; PD93/764, T	GU237907	MT018052	GU237662
<i>Macroaschochyta grandis</i>	CBS100409, T	GU237712	MT018063	GU237593
<i>Neoaschochyta argentina</i>	CBS112524, T	KT389524	MT018302	KT389822
<i>N. cylindrispora</i>	UTHSC: DI16—352; FMR13845	LT592962	LT593101	LT593031
<i>N. dactylidis</i>	MFLU19—2859, T	MT185527	—	—
<i>N. desmazieri</i>	CBS297.69, T	KT389508	KT389644	KT389806
<i>N. euorpaea</i>	CBS820.84, T	KT389511	KT389646	KT389809
<i>N. exitialis</i>	CBS389.86	KT389515	KT389648	KT389813
<i>N. fuci</i>	CMG 47; MUM19.41, T	MN053014	—	MN066618
<i>N. fusiformis</i>	CBS876.72, T	KT389527	MT018303	KT389825
<i>N. graminicola</i>	CBS102789; ICMP 14103, R	KT389518	KT389649	KT389816
“ “	CBS301.69, R	KT389519	KT389650	KT389817
“ “	CBS586.79, R	KT389521	MN983637	KT389819
“ “	MF 1.42	OR452316	OR460084	OR464020
<i>N. humicola</i>	CBS127323, T	MN973628	MT018316	MT005740
<i>N. longispora</i>	CBS113420, T	MN973629	MT018317	MT005741
<i>N. mortariensis</i>	CBS516.81, T	KT389525	KT389653	KT389823
<i>N. paspali</i>	CBS560.81; PD92/1569, T	FJ427048	KP330426	FJ427158
<i>N. rosicola</i>	MFLUCC15—0048, T	MG828921	MG829258	—
<i>N. soli</i>	CGMCC3.18365; LC8165, T	KY742121	MT018306	KY742363
<i>N. tardicrescens</i>	CBS689.97, T	KT389526	KT389654	KT389824
<i>N. triticicola</i>	CBS544.74, T	GU237887	KT389652	GU237488
<i>Pseudopezronella eucalypti</i>	CPC27678; CBS142522, T	KY979755	KY979848	KY979921
<i>Pyrenochaetopsis kuksensis</i>	CBS146534; MEND-F57, T	MT371092	MT372656	MT372662
<i>Remotididymella ageratinae</i>	YMF1.6173; CGMCC3.19991, T	MN864294	MN871530	MN871533
<i>R. anemophila</i>	YMF1.6171; CGMCC3.19990, T	MN864293	MN871529	MN871532
<i>R. anthropophila</i>	CBS142462; UTHSC: DI16—278; FMR13770, T	LT592936	LT593075	LT593005
<i>R. bauhiniae</i>	MFLUCC17—2281, T	MK347737	MK434914	MK412884
<i>R. brunnea</i>	CBS993.95, T	MN973476	MT018064	MT005576
<i>R. capsici</i>	CBS679.77; LEV 11926b	MN973478	MT018066	MT005578
“ “	MF 1.28	OR452317	OR460085	OR464021
“ “	MF 21.1	OR452318	OR460086	OR464022
“ “	MF 21.6	OR452319	OR460087	OR464023
<i>R. destructiva</i>	CBS378.73, T	GU237849	LT623258	GU237601
<i>R. fici-microcarpae</i>	ZHKU22—0095, T	NR_185819	OQ343377	OQ336261
<i>R. humicola</i>	CBS120117, T	MN973477	MT018065	MT005577
<i>R. villepreuxpowerae</i>	BRIP 71430a, T	OP903484	OP921970	—
<i>Stagonosporopsis actaeae</i>	CBS106.96; PD94/1318, T	GU237734	KT389672	GU237671

Таблица 2. Окончание

<i>S. ajacis</i>	CBS177.93; PD90/115, T	GU237791	KT389673	GU237673
<i>S. andigena</i>	CBS269.80; PD75/914, R	GU237817	MT018026	GU237675
<i>S. artemisiicola</i>	CBS102636, R	GU237728	KT389674	GU237676
<i>S. astragali</i>	CBS178.25; MUCL 9915, R	GU237792	MT018030	GU237677
<i>S. bomiensis</i>	CGMCC3.18366; LC8167, T	KY742123	KY742189	KY742365
<i>S. caricae</i>	CBS282.76	GU237821	MT018022	GU237682
“ “	CBS248.90	GU237807	MT018023	GU237680
<i>S. centaureae</i>	MFLUCC16—0787, T	KX611240	—	—
<i>S. chrysanthemi</i>	CBS500.63; MUCL 8090, R	GU237871	MT018012	GU237695
<i>S. citrulli</i>	CBS214.65; BBA 9963	MN973454	MT018020	MT005553
<i>S. crystalliniformis</i>	CBS713.85; ATCC76027; PD83/826, T	GU237903	KT389675	GU237683
<i>S. cucumeris</i>	CBS386.65, T	MN973455	MT018021	MT005554
<i>S. cucurbitacearum</i>	CBS109171; PD91/310, R	GU237922	MN983682	GU237685
<i>S. dennisii</i>	CBS631.68; PD68/147, T	GU237899	KT389677	GU237687
<i>S. dorenboschii</i>	CBS426.90; IMI 386093; PD86/551, T	GU237862	KT389678	GU237690
<i>S. helianthi</i>	CBS200.87, T	KT389545	KT389683	KT389848
<i>S. heliopsidis</i>	CBS109182, R	GU237747	KT389679	GU237691
“ “	PD95/6189	GU237924	—	GU237692
“ “	MF 1.25	OR452320	OR460088	OR464024
“ “	MF 1.2—15	OR452321	OR460089	OR464025
<i>S. hortensis</i>	CBS572.85; PD79/269, R	GU237893	KT389681	GU237704
<i>S. inoxydabilis</i>	CBS425.90, T	GU237861	KT389682	GU237693
<i>S. loticola</i>	CBS562.81; PDDCC6884, T	GU237890	KT389684	GU237697
<i>S. lupini</i>	CBS101494; PD98/5247, T	GU237724	KT389685	GU237699
<i>S. nemophilae</i>	CBS715.85; PD74/364, T	MN973460	MT018031	MT005559
<i>S. oculi-hominis</i>	CBS634.92; IMI 193307, T	GU237901	KT389686	GU237701
<i>S. papillata</i>	CGMCC3.18367; LC8169, T	KY742125	KY742191	KY742367
<i>S. pedicularis-striatae</i>	ZHKUCC22—0167, T	OQ275212	OQ343379	OQ336263
<i>S. pini</i>	MFLUCC18—1549, T	MK347800	MK434860	MK412886
<i>S. pogostemonis</i>	ZHKUCC21—0001, T	MZ156571	MZ203135	MZ203132
<i>S. rhizophila</i>	CGMCC3.19852; XDPOP-RS-9, T	MN422101	MN422105	MN422099
<i>S. rudbeckiae</i>	CBS109180; PD79/175, R	GU237745	MT018015	GU237702
<i>S. sambucellae</i>	CBS130003, T	MN973459	MT018029	MT005558
<i>S. stuijvenbergii</i>	CBS144953; JW 132011, T	MN823449	MN824475	MN824623
“ “	MF 1.30	OR452322	OR460090	OR464026
“ “	MF 6.1	OR452323	OR460091	OR464027
<i>S. tanacetii</i>	CBS131484, T	NR_111724	MT018013	JQ897496
<i>S. trachelii</i>	CBS379.91; PD77/675, T	GU237850	KT389687	GU237678
<i>S. valerianellae</i>	CBS329.67; PD66/302, T	GU237832	MT018034	GU237706
<i>S. vannaccii</i>	LFN0148; IMI 507030, T	MK519453	MN534891	MK519454
<i>S. weymaniae</i>	CBS144959; JW 201003, T	MN823453	MN824479	MN824627

Примечание. Типовые и репрезентативные штаммы обозначены буквами Т и R соответственно. Номера доступа нуклеотидных последовательностей исследованных изолятов выделены полужирным. ATCC — American Type Culture Collection, Virginia, USA; BRIP — Plant Pathology Herbarium, Department of Employment, Economic, Development and

Innovation, Queensland, Australia; DSM — Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; CBS — Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; CGMCC — China General Microbiological Culture Collection Center, Beijing, China; CMG — Culture collection of Micael Gonçalves, housed at Department of Biology, University of Aveiro, Aveiro, Portugal; CPC — Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS; FMR — Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; JW — Johanna Westerdijk working collection housed at the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; ICMP — International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand; IMI — International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Bakenham Lane, UK; LC — Personal Culture Collection Lei Cai, State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China; LEV — Plant Health and Diagnostic Station, Auckland, New Zealand; MF — Collection of Pure Cultures of the Laboratory of Mycology and Phytopathology, All-Russian Institute of Plant Protection, VIZR, Saint Petersburg, Russia; MFLU — Herbarium of Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand; MFLUCC — Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand; MUCL — Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium; MUM — Culture collection hosted at Center for Biological Engineering of University of Minho, Braga, Portugal; PD — Plant Protection Service, Wageningen, the Netherlands; PDDCC — Plant Diseases Division Culture Collection, Auckland, New Zealand; UTHSC — Fungus Testing Laboratory at the University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA; YMF — Herbarium of the Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan University, Kunming, Yunnan, PR China; ZHKUCC — Culture Collection of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, China; ZHKU — Herbarium of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, China.

Таблица 3. Данные об общей длине матриц, длине каждого локуса в отдельности, числе переменных сайтов и оптимальных моделях нуклеотидных замен, использованных для филогенетического анализа

Параметр	Локус ДНК			
	ITS	<i>rpb2</i>	<i>tub2</i>	ITS + <i>rpb2</i> + <i>tub2</i>
Общая длина	486	600	325	1411
Невариабельные значения	335	309	173	817
Информативные значения	83	255	115	453
Неинформативные значения	68	36	37	141
Оптимальная модель нуклеотидных замен	K2 + G + I	TN93 + G + I	K2 + G	TIM2e + I + G4
Длина МР дерева	326	1674	560	2607
Индекс согласованности	0.4811	0.2776	0.3836	0.3165
Индекс гомоплазии	0.5189	0.7224	0.6164	0.6835
Индекс удержания	0.8819	0.7534	0.7606	0.7687
Перемасштабированный индекс согласованности	0.4242	0.2092	0.2917	0.2433

Примечание. K2 — двухпараметрическая дистанция Кимуры; TN93 — дистанция Тамуры — Нея; TIM — переходная модель.

штамм *S. stuijvenbergii* Hern.-Restr., L.W. Hou, L. Cai et Crous CBS144953.

Морфология

Neosascochyta graminicola MF 1.42, соя, листья, Рязанская обл., 2020 г. (рис. 3). Колонии на КСА 45.0 ± 0.9 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 3, А) и 74.2 ± 3.1 мм после 14 сут (рис. 3, Г). Край неровный, дендритный. Колония равномерно покрыта матом пушистого, слегка хлопьевидного воздушного мицелия, оливково-серого в центре, край золотисто-оливковый, очевидно отличается границей от всей колонии. Реверс в центре темно-серый, по краю двухцветная кайма, состоящая из серо-оливковой и желтовато-серой полос. Колонии на ОА 39.8 ± 1.0 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 3, Б) и 73.0 ± 3.6 мм после 14 сут (рис. 3, Д). Край слегка неровный, хлопьевидный. Колония покрыта необильным хлопьевидным воздушным мицелием темно-серого цвета, субстратный

мицелий серо-зеленый, с краю перламутрово-серый. Реверс сходный, в центре крапчатый. Колонии на MEA 39.5 ± 0.5 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 3, В) и 60.0 ± 4.9 мм после 14 сут (рис. 3, Е). Край сильно неровный, лопастной и дендритный, центр слегка складчатый. Колония равномерно покрыта бархатистым мицелием персиково-коричневого цвета, по периферии бежево-персиковая. Реверс сходный.

На ОА пикниды (рис. 3, Ж, З) немногочисленные, рассеянные по периферии колонии, поверхностные и полупогруженные, одиночные, реже в группах по две, с одним, реже двумя остиолами, иногда с кремовым споровым экссудатом, гладкие, коричневые и светло-коричневые, $118\text{--}322(206 \pm 35) \times 111\text{--}332(217 \pm 36)$ мкм. Стенка пикниды состоит из изодиаметрических клеток, внешние слои пигментированы. Конидиеносцы редуцированы до прозрачных колбовидных конидиогенных клеток (рис. 3, З), формирующихся на внутренних слоях стенки пикниды. Конидии (рис. 3, И) в большинстве бобовидные с двумя полярными гуттулами, редко конидии яйцевидные или гантелевидные

с многочисленными гуттулами, прозрачные, несептированные, $3.55\text{--}6.06(4.82 \pm 0.4) \times 1.58\text{--}2.24(1.94 \pm 0.01)$ мкм.

На ОА многочисленные погруженные практически до самого донца чашки Петри скопления толстостенных меланизированных гиф со вздутиями клетками, а также склероциоподобных структур, из-за чего реверс выглядит крапчатым. На МЕА также формируются меланизированные утолщенные гифы, но их мало и они не погруженные, а в воздушном мицелии.

Remotididymella capsici MF 1.28, соя, листья, Амурская обл., 2019 г. (рис. 4). Колонии на КСА 72.2 ± 0.2 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 4, А), после 14 сут колонии достигают края чашки (рис. 4, Г). Край ровный. Колония равномерно покрыта матом обильного войлочного воздушного мицелия, серебристо-серая в центре, зелено-серая по периферии. Реверс в центре графитно-черный, по периферии темно-серый. Многочисленные плодовые тела равномерно рассеяны по поверхности колонии. Колонии на ОА 67.2 ± 0.5 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 4, Б), после 14 сут колонии достигают края чашки (рис. 4, Д). Край ровный. Колония покрыта обильным войлочным воздушным мицелием агатово-серого цвета, в центре колония практически черная, по периферии зеленовато-серая. Реверс серо-зеленый, в центре крапчатые секторы, по периферии равномерно крапчатый. Колонии на МЕА 49.5 ± 0.9 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 4, В), после 14 сут колонии достигают края чашки (рис. 4, Е). Край неровный, слегка лопастной. В центре колонии мицелий лизирован. Далее колония равномерно покрыта бархатистым мицелием, располагающимся радиальными кругами, разных оттенков персиково-бежевого цвета. Реверс сходный.

На ОА многочисленные плодовые тела (рис. 4, Ж, З), одиночные или собранные в крупные конгломераты, поверхностные. Многочисленные погруженные конгломераты из плодовых тел прямо на донце чашки Петри, из-за чего реверс выглядит крапчатым. Плодовые тела округлые или кувшинообразные, с одним слегка выраженным сосочком, темные, в массе практически черные, размеры сильно варьируют $52\text{--}145(114 \pm 7) \times 77\text{--}153(108 \pm 5)$ мкм. Стенка плодового тела состоит из изодиаметрических клеток, внешние слои пигментированы. Внутри плодового тела в массе веером развиваются многочисленные сумки (рис. 4, З, И), в зрелых сумках формируется по восемь аскоспор. Аскоспоры двуклеточные с многочисленными гуттулами, у перегородки перетянутые (обе части слегка сужаются к основанию), вершины закругленные, самая широкая часть — верхняя в основании сразу после септы (рис. 4, К) $9.78\text{--}17.3(13.47 \pm 0.18) \times 2.88\text{--}4.59(3.76 \pm 0.04)$ мкм.

Stagonosporopsis heliopsisidis MF 1.25, соя, семядоли, Приморский край, Уссурийск, 2018 г. (рис. 5). Колонии на КСА достигают края чашки после седьмых сут роста (рис. 5, А). Край ровный. Колония равномерно покрыта матом обильного войлочного воздушного мицелия от светлого серо-зеленого до оливково-серого, по периферии крапчатая. Реверс графитно-черный. Многочисленные пикниды равномерно рассеяны по колонии и под воздушным мицелием. Колонии на ОА достигают края чашки после седьмых сут роста (рис. 5, Б). Край ровный. Колония покрыта необильным клочковатым войлочным воздушным мицелием серо-пепельного цвета, субстратный мицелий темный серо-оливково-зеленый. Реверс металлическо-серый, по периферии равномерно или секторно-крапчатый. Колонии на МЕА 72.5 ± 1.0 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 5, В), после 14 сут достигают края чашки (рис. 5, Е). Край ровный. Колония слегка складчатая, равномерно покрыта необильным редким бархатистым мицелием, оранжево-коричневая в центре, далее к периферии перламутрово-золотистая. Реверс сходный. На ОА многочисленные пикниды (рис. 5, Ж—И), одиночные или собранные в конгломераты по две-три, поверхностные, погруженные и полупогруженные. Многочисленные погруженные пикниды прямо на донце чашки Петри, из-за чего реверс выглядит крапчатым. Пикниды округлые (рис. 5, И) $61.6\text{--}184.9(149.4 \pm 29.4) \times 57\text{--}218.8(162.6 \pm 36.5)$ мкм или кувшинообразные (рис. 5, З) $119.5\text{--}144.9(133.5 \pm 7.4) \times 76.5\text{--}81.8(78.5 \pm 1.75)$ мкм, с одним небольшим сосочком, темные. Стенка пикниды состоит из изодиаметрических клеток, внешние слои пигментированы. Конидиеносцы редуцированы до прозрачных колбовидных конидиогенных клеток (рис. 5, К), формирующихся на

внутренних слоях стенки пикниды. Конидии (рис. 5, Л) в большинстве бобовидные с двумя полярными гуттулами, прозрачные, несептированные, $3.7\text{--}5.07(4.41 \pm 0.03) \times 1.67\text{--}2.74(2.02 \pm 0.02)$ мкм.

S. stuijvenbergii MF 6.1, соя, семена, Амурская обл., 2018 г. (рис. 6). Колонии на КСА 71.0 ± 0.4 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 6, А), после 14 сут достигают края чашки (рис. 6, Г). Край ровный. Колония равномерно покрыта обильным хлопьевидным воздушным мицелием серо-желтого цвета в центре, далее серовато-желто-оливкового. Реверс черно-коричневый, по периферии светлый оливково-серый, в центре крапчатый. Колонии на ОА 59.8 ± 2.0 мм в диаметре после седьмых сут роста (рис. 6, Б), после 14 сут достигают края чашки (рис. 6, Д). Край ровный. Колония покрыта редким воздушным мицелием серебристо-серого цвета, субстратный мицелий практически черный в центре, по периферии желтовато-серо-оливковый. Реверс графитно-серый, по периферии коричнево-зеленый, крапчатый. Многочисленные пикниды равномерно рассеяны по поверхности колонии, на пикнидах крупные капли светло-серого экссудата. Колонии на МЕА 62.0 ± 0.9 мм в диам. после седьмых сут роста (рис. 6, В), после 14 сут достигают края чашки (рис. 6, Е). Край ровный. Колония равномерно покрыта бархатистым мицелием серебристо-серого цвета. Реверс коричнево-оранжевый.

На ОА многочисленные пикниды (рис. 6, Е, Ж), одиночные или собранные в конгломераты по двое-трое, с обильным спорным экссудатом светло-кремового цвета. Большая часть пикнид поверхностные, полупогруженные и редко погруженные. Многочисленные погруженные пикниды прямо на донце чашки Петри, из-за чего реверс выглядит крапчатым. Пикниды округлые (рис. 6, З) $137.8\text{--}250.8(192 \pm 12.6) \times 142.5\text{--}283.6(195.3 \pm 12.7)$ мкм, с одним или двумя сосочками, светло-коричневые. Стенка пикниды состоит из изодиаметрических клеток, внешние слои пигментированы. Конидиеносцы редуцированы до прозрачных колбовидных конидиогенных клеток, формирующихся на внутренних слоях стенки пикниды. Конидии (рис. 6, И) в большинстве бобовидные или эллипсоидные, с двумя полярными гуттулами, прозрачные, несептированные, $3.39\text{--}5.5(4.27 \pm 0.04) \times 1.52\text{--}2.38(1.87 \pm 0.02)$ мкм, отдельные конидии очевидно крупнее остальных $5.82\text{--}8.24(6.97 \pm 0.23) \times 1.64\text{--}2.46(2.01 \pm 0.09)$ мкм.

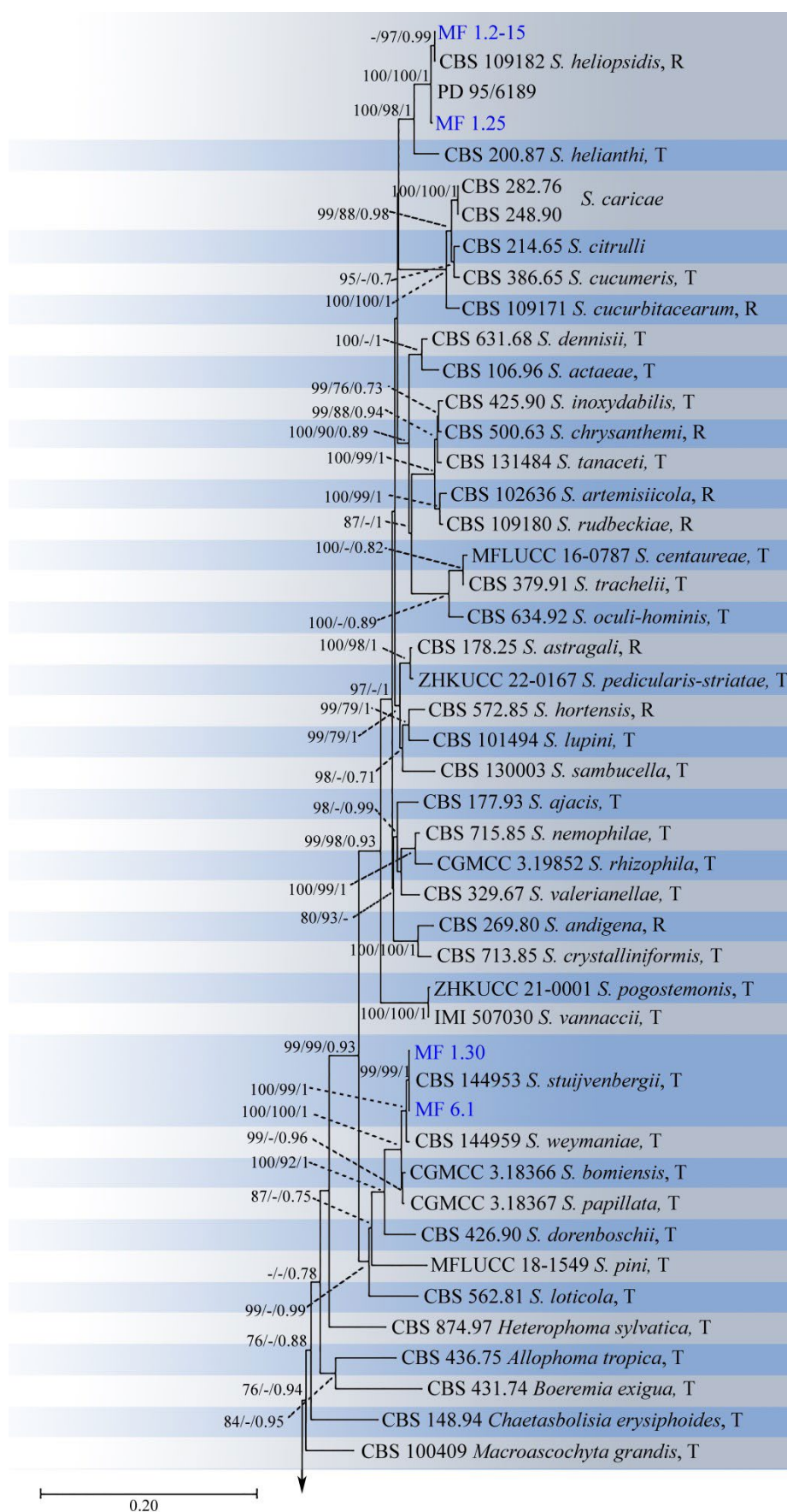
Патогенность

Все исследованные изоляты не проявили патогенных свойств в отношении листьев сои тестируемого восприимчивого к листовым пятнистостям сорта Селекта 201. На 21-е сут после заражения симптомы отсутствовали на всех листьях во всех вариантах опыта (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследованные изоляты в результате мультилокусного филогенетического и сравнительно-морфологического анализа были идентифицированы до таксонов уровня вида. Обычно аскохитоз сои вызывают виды родов *Didymella*: *D. pinodella*, *D. pinodes*, *D. pomorum* и др., поэтому находки грибов *Neosascochyta graminicola*, *Remotididymella capsici*, *Stagonosporopsis heliopsisidis* и *S. stuijvenbergii* являются редкими. Все эти грибы были впервые выявлены на таком растении-хозяине, как соя.

Изоляты MF 1.28, MF 21.1 и MF 21.6 по морфологическим признакам плодовых тел были идентифицированы как *Mycosphaerella*. Результаты мультилокусного филогенетического анализа позволили заключить, что



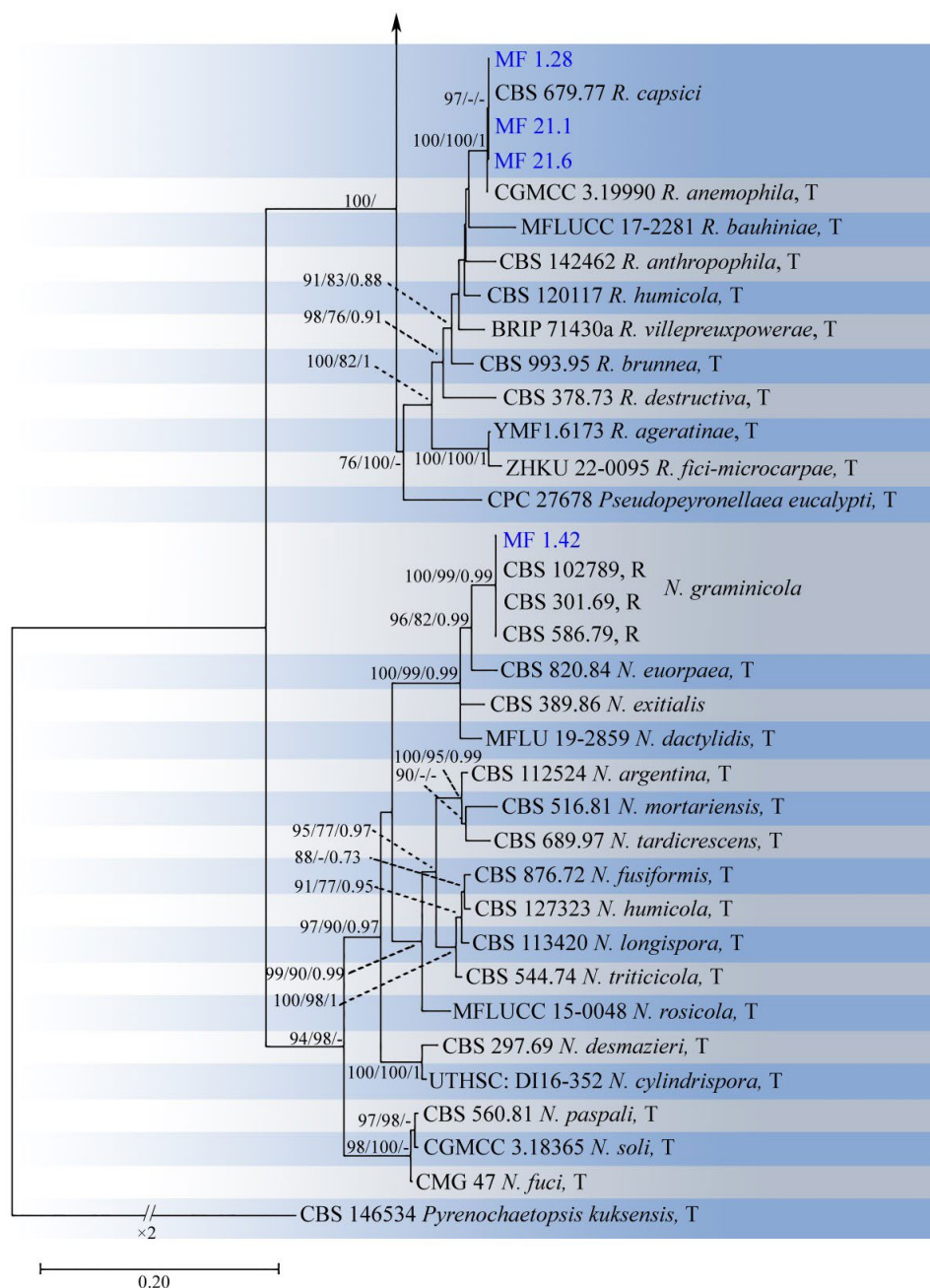


Рис. 2. Комбинированное филогенетическое древо видов *Neoascochyta*, *Remotididymella*, *Stagonosporopsis*, построенное методом ML, основанное на нуклеотидных последовательностях ITS, *rpb2* и *tub2*. Числовые значения бутстреп-поддержки, полученные методами ML (≥ 70), MP (≥ 70) и Байесовский статистики (≥ 0.7), приведены в узлах ветвей дендрограммы соответственно. Номера типовых или репрезентативных штаммов выделены буквами Т или R. Номера исследованных изолятов выделены синим.

эти изоляты являются видом *Remotididymella capsici*, входящими в состав другого рода и даже семейства. Базионимом *R. capsici* был *Ascochyta capsici* Bond.-Mont. Этот гриб был описан В.Н. Бондарцевой-Монтеверде в 1923 (Bondartseva-Monteverde, 1923) с листьев *Capsicum annuum*, собранных в РСФСР. В 1977 г. на Фиджи были собраны и сохранены в гербарии (CBS H-24340)

листья этого же вида растения с симптомами пятнистости, возбудитель которой был идентифицирован как *Ascochyta capsici*. В мире существует единственный штамм *A. capsici* CBS679.77 = LEV 11926b, выделенный из этого образца. В 2020 г. в результате идентификации этого штамма по молекулярно-филогенетическим признакам было установлено, что он не является

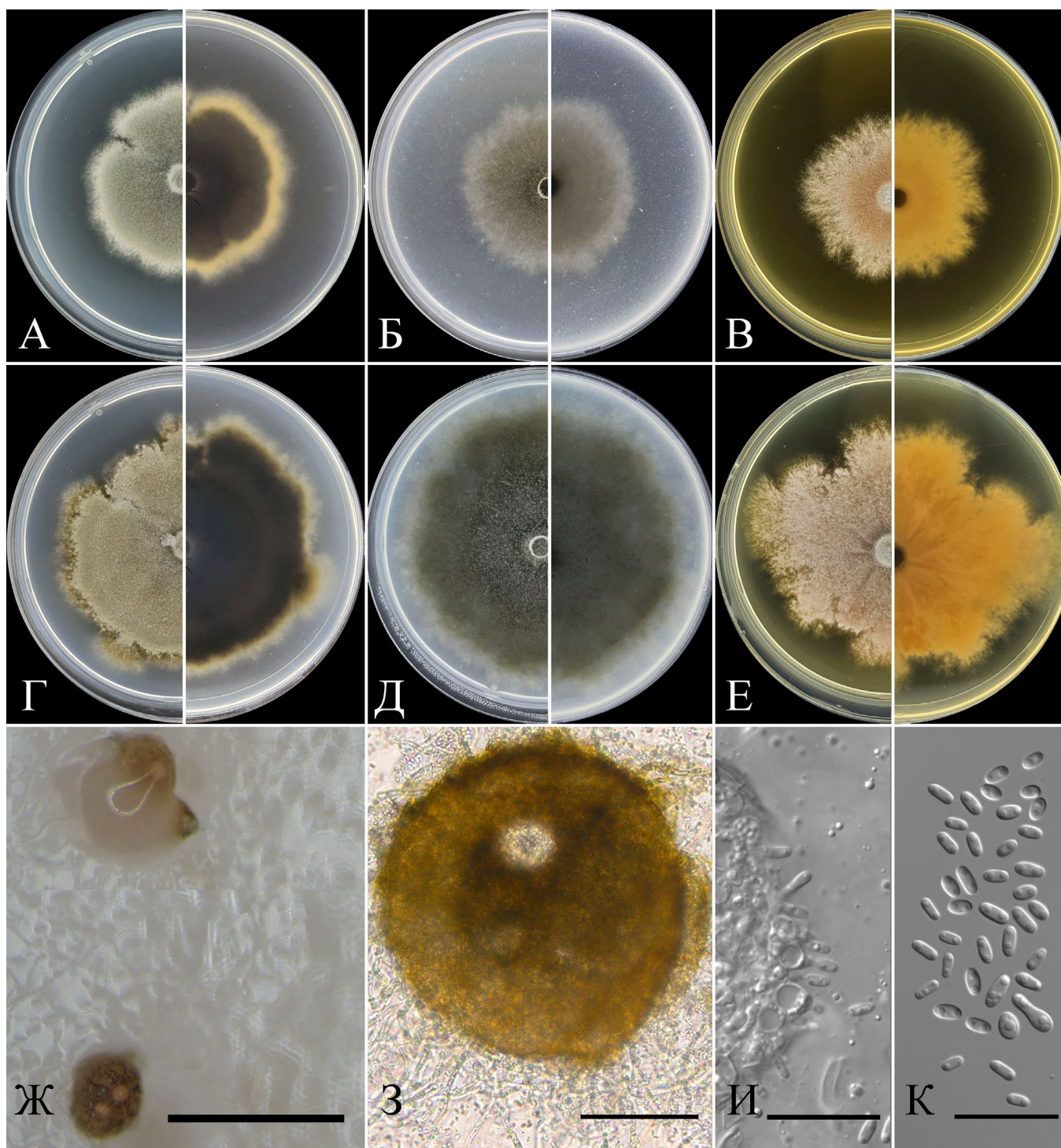


Рис. 3. Морфологические особенности *Neoscochyta graminicola* MF 1.42: А–Е — культуры (А — на КСА, 7 сут; Б — на ОА, 7 сут; В — на МЕА, 7 сут; Г — на КСА, 14 сут; Д — на ОА, 14 сут; Е — на МЕА, 14 сут); Ж, З — пикниды; И — внутренняя стенка пикниды, выстланная конидиогенными клетками; К — конидии. Левая половина — верхняя часть колонии, правая — реверс колонии. Масштаб: Ж — 500 мкм; З — 100 мкм; И и К — 20 мкм.

сестринским другим штаммам *Ascochyta*, а попадает в кладу, сформированную видами *Remotididymella*, где образует отдельную монофилетичную линию (Hou et al., 2020a). Так была предложена новая таксономическая комбинация *Remotididymella capsici*. Штамм

CBS679.77, который предложили использовать как репрезентативный для этого вида, в чистой культуре является стерильным. По морфолого-культуральным признакам исследованные нами изоляты отличались от репрезентативного. Так на ОА репрезентативный

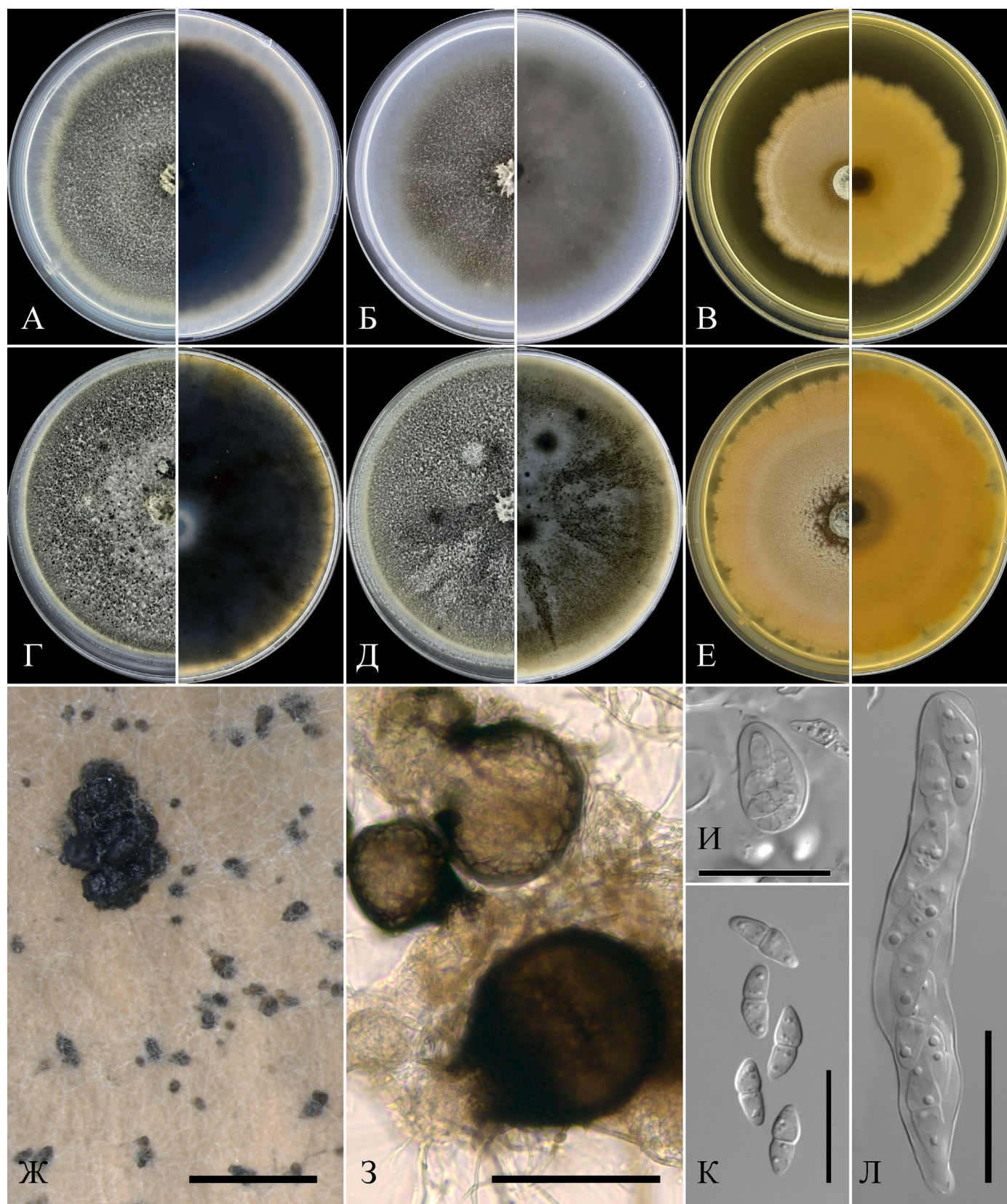


Рис. 4. Морфологические особенности *Remotididymella capsici* MF 1.28: А–Е — культуры (А — на КСА, 7 сут; Б — на ОА, 7 сут; В — на МЕА, 7 сут; Г — на КСА, 14 сут; Д — ОА, 14 сут; Е — МЕА, 14 сут); Ж, З — плодовые тела; И — незрелая сумка; К — аскоспоры; Л — сумка. Левая половина — верхняя часть колонии, правая — реверс колонии. Масштаб: Ж — 1 мм; З — 100 мкм; И и К — 20 мкм.

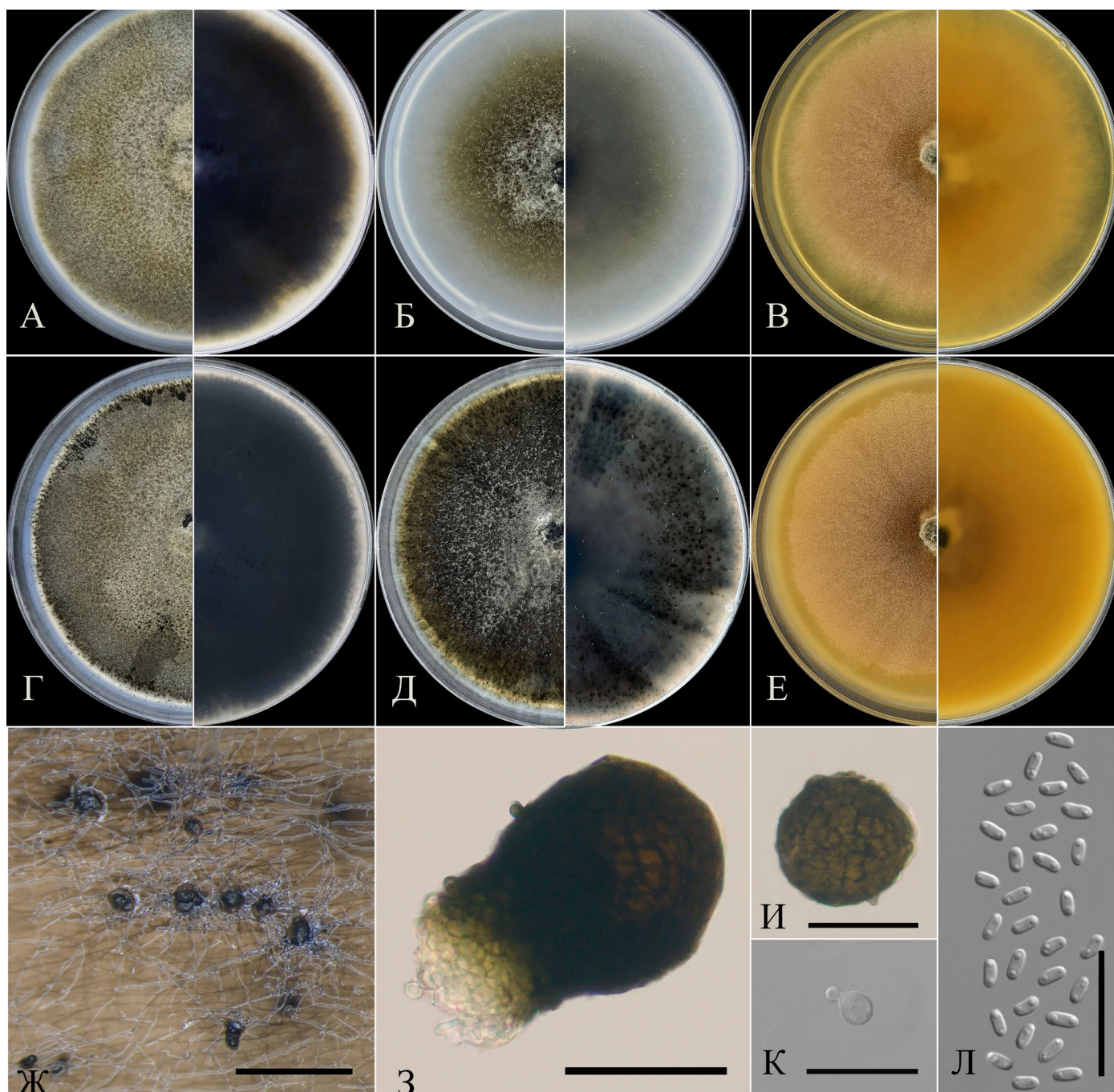


Рис. 5. Морфологические особенности *Stagonosporopsis heliopsidis* MF 1.25: А–Е — культуры (А — на КСА, 7 сут; Б — на ОА, 7 сут; В — на МЕА, 7 сут; Г — на КСА, 14 сут; Д — ОА, 14 сут; Е — МЕА, 14 сут); Ж–И — пикниды; К — конидиогенная клетка; Л — конидии. Левая половина — верхняя часть колонии, правая — реверс колонии. Масштаб: Ж — 2 мм; З, И — 50 мкм; К, Л — 20, мкм.

штамм формирует быстрорастущие колонии светло-коричневатого оттенка (Hou et al., 2020a), в то время как колонии исследованных изолятов зеленовато-серого оттенка. На МЕА колонии репрезентативного штамма беловатые с черными зонами (Hou et al., 2020a), а колонии исследованных изолятов персиково-бежевого цвета.

В 2021 г. из воздуха, взятого между листьями *Ageratina adenophora* в Китае в провинции Юннань, был выделен штамм CGMCC3.19990, на основании которого был описан новый вид *Remotididymella anemophila* H.B. Zhang, A.L. Yang et L. Chen (Yang et al., 2021). В мультилокусный филогенетический анализ по необъяснимой причине авторы не включили

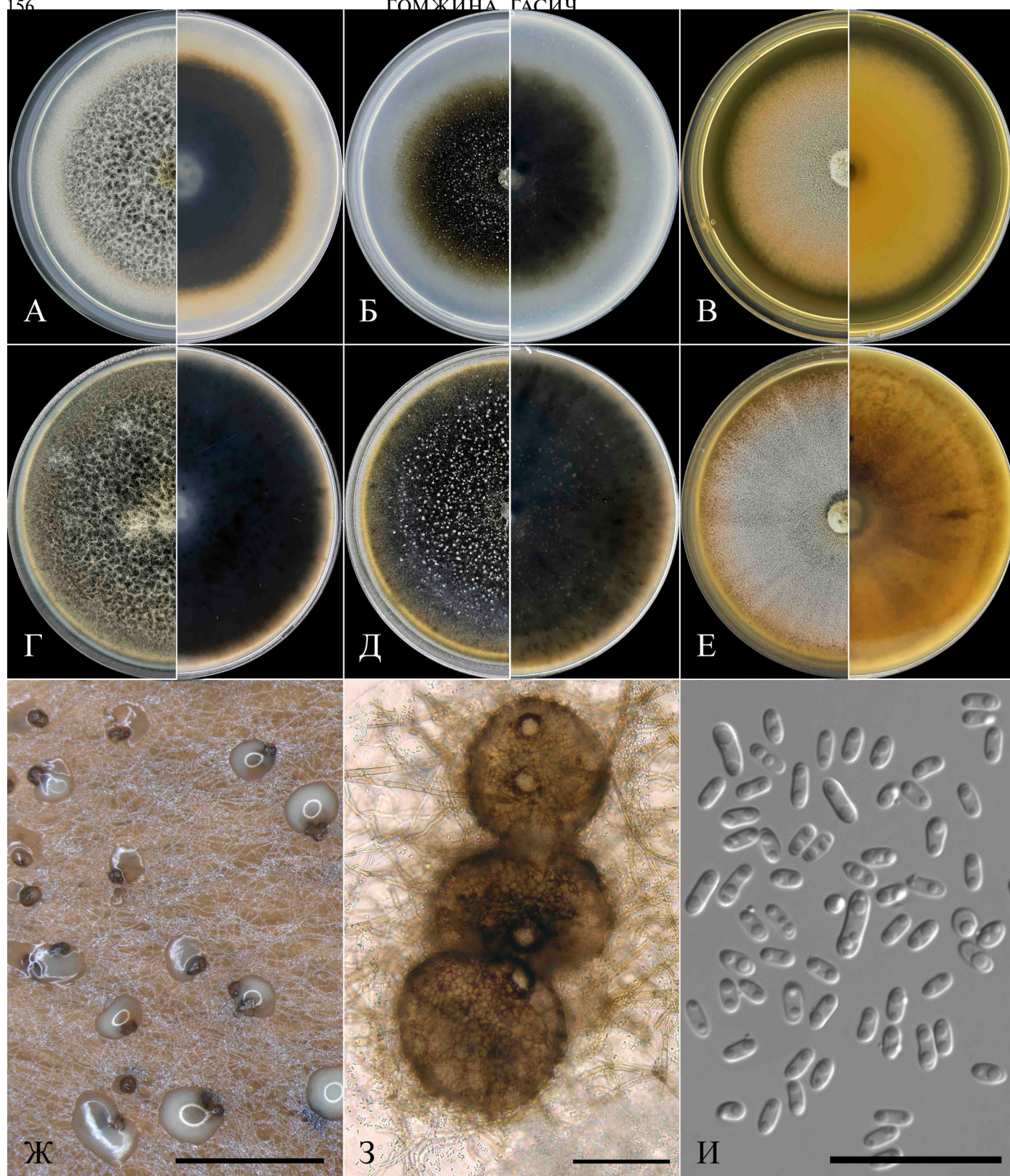


Рис. 6. Морфологические особенности *Stagonosporopsis stuijvenbergii* MF 6.1: А–Е — культуры (А — на КСА, 7 сут; Б — на ОА, 7 сут; В — на МЕА, 7 сут; Г — на КСА, 14 сут; Д — ОА, 14 сут; Е — МЕА, 14 сут); Ж, З — пикниды; И — конидии. Левая половина — верхняя часть колонии, правая — реверс колонии. Масштаб: Ж — 5 мм; З — 100 мкм; И — 20, мкм.



Рис. 7. Результаты теста на патогенность, отрезки листьев сои, сорт Селекта 201, 14 сут после инокуляции. Варианты инокуляции: А — негативный контроль, стерильная вода; Б — мицелиальная суспензия изолята MF 6.1 *Stagonosporopsis stuijvenbergii*; В — позитивный контроль, мицелиальная суспензия изолята *Cercospora* cf. *sigesbeckiae* MF 3.13. Первый ряд в каждой чашке Петри — инокулюм нанесен на верхнюю сторону intactного отрезка. Второй ряд — инокулюм нанесен на верхнюю сторону отрезка с предварительным ранением. Третий ряд — инокулюм нанесен на нижнюю сторону intactного отрезка. Четвертый ряд — инокулюм нанесен на нижнюю сторону отрезка с предварительным ранением.

последовательности ITS, *rpb2* и *tub2* репрезентативного штамма *R. capsici* CBS679.77, хотя другие виды *Remotididymella*, описанные в работе Hou et al. (2020), в этом анализе были использованы. Нуклеотидные последовательности всех трех локусов штамма CGMCC3.19990 являются идентичными таковым у штамма *R. capsici* CBS679.77. Кроме того, все исследованные нами изоляты имеют также одинаковые нуклеотидные последовательности ITS, *rpb2* и *tub2*, что и штаммы CGMCC3.19990 и CBS679.77. Более того, морфологические особенности *R. anetophila*, описанные в протологе, полностью согласуются с морфологическими признаками исследованных изолятов MF 1.28, MF 21.1 и MF 21.6. Таким образом, на основании изучения молекулярно-филогенетических, морфолого-культуральных и микроморфологических признаков, очевидно, что все пять штаммов (CGMCC3.19990, CBS679.77, MF 1.28, MF 21.1 и MF 21.6) являются представителями одного вида *Remotididymella*. Согласно кодексу номенклатуры водорослей, грибов и растений, имя *R. anetophila* следует признать избыточным и изменить его статус на nom. rej., оставив приоритет за ранее описанным именем *R. capsici* (Bond.-Mont.) L.W. Hou, L. Cai et Crous. *R. capsici* был выявлен на листьях перца в России (Bondartseva-Monteverde, 1923) и на Фиджи (Hou et al., 2020a). Соя впервые зарегистрирована нами как субстрат для этого гриба.

Neoascochyta graminicola широко распространен в Европе на растениях семейства *Poaceae* (Chen et al., 2017; Hou et al., 2020a). *Stagonosporopsis stuijvenbergii* известен из образцов почвы, собранной в Нидерландах (Hou et al., 2020a), а изоляты *S. heliopsisidis* были обнаружены в США, Канаде, Нидерландах, России только

на сложноцветных растениях. Таким образом, виды *Neoascochyta graminicola* и *Stagonosporopsis stuijvenbergii* были впервые выявлены на территории России в Рязанской и Амурской областях соответственно.

В результате оценки патогенности изолятов этих грибов в отношении сои восприимчивого сорта Селекта 201 было установлено, что таким свойством они не обладают, по всей вероятности, развиваются сапротрофно на вызванных другими фитопатогенными грибами некротических пятнах или же являются эндوفитами. Микобиота листьев сои обогатилась на четыре новых вида фомоидных грибов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-76-30005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abramov I.N. Fungal diseases of soybean in the Russian Far East. Vladivostok, 1931. (In Russ.)
- Abramov I.N. Diseases of agricultural crops in the Russian Far East. Khabarovsk, 1938. (In Russ.)
- Aveskamp M.M., de Guyter J., Crous P.W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity*. 2008. V. 31. P. 1–18.
- Aveskamp M.M., Verkley G.J.M., de Gruyter J. et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia*. 2009. V. 101 (3). P. 363–382. <https://doi.org/10.3852/08-199>
- Aveskamp M.M., de Gruyter J., Woudenberg J.H.C. et al. Highlights of the *Didymellaceae*: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean

- genera. *Stud. Mycol.* 2010. V. 65. P. 1—60.
<https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- Boerema G.H., Gruyter J., Noordeloos M.E. et al. *Phoma* identification Manual. CABI Publishing, L., 2004.
- Bondartseva-Monteverde V.N. *Ascochyta capsici*. Monitor Phytopath. Sect. Chief Bot. Gard. R.S.F.S.R. 1923. V. 12. P. 70—72. (In Russ.)
- Bondartseva-Monteverde V.N., Vasilevskiy N.I. To biology and morphology of several *Ascochyta* species associated with *Fabaceae*. *Trudy botanicheskogo instituta AN SSSR. Ser. 2. Sporovye Rasteniya*. 1940. V. 4. P. 345—376. (In Russ.)
- Boyle J.S., Lew A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genetics*. 1995. V. 11 (1). P. 8.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)88977-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)88977-5)
- Carbone I., Kohn L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 1999. V. 91. P. 553—556.
<https://doi.org/10.2307/3761358>
- Chen Q., Jiang J.R., Zhang G.Z. et al. Resolving the *Phoma* enigma. *Stud. Mycol.* 2015. V. 82. P. 137—217.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- Chen Q., Hou L.W., Duan W.J. et al. *Didymellaceae* revisited. *Stud. Mycol.* 2017. V. 87. P. 105—259.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.06.002>
- Crous P.W., Hawksworth D.L., Wingfield M.J. Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2015. V. 53. P. 247—267.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120245>
- Deb D., Khan A., Dey N. *Phoma* diseases: epidemiology and control. *Plant Pathol.* 2020. V. 69 (7). P. 1203—1217.
<https://doi.org/10.1111/ppa.13221>
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990. V. 12. P. 13—15.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Hou L.W., Groenewald J.Z., Pfenning L.H. et al. The *Phoma*-like dilemma. *Stud. Mycol.* 2020a. V. 96. P. 309—396.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.001>
- Hou L., Hernández-Restrepo M., Groenewald J.Z. et al. Citizen science project reveals high diversity in *Didymellaceae* (*Pleosporales*, *Dothideomycetes*). *MycKeys*. 2020b. V. 65. P. 49—99.
<https://doi.org/10.3897/mycokeys.65.47704>
- Gomzhina M.M., Gannibal Ph.B. Modern systematics of the genus *Phoma* sensu lato. *Mikologiya i Fitopatologiya*. 2017. V. 51 (5). P. 268—275.
<https://doi.org/10.31857/S0026364821050056> (In Russ.)
- Gomzhina M.M., Gasich E.L., Khlopunova L.B. et al. New species and new findings of *Phoma*-like fungi (*Didymellaceae*) associated with some *Asteraceae* in Russia. *Nova Hedwigia*. 2020a. V. 111 (1—2). P. 131—149.
https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2020/0586
- Gomzhina M.M., Gasich E.L., Khlopunova L.B. et al. *Paraphoma* species associated with *Convolvulaceae*. *Mycol. Progress*. 2020b. V. 19. P. 185—194.
<https://doi.org/10.1007/s11557-020-01558-8>
- Gomzhina M.M., Gasich E.L., Gagkaeva T. Yu. et al. Biodiversity of fungi inhabiting European blueberry in North-Western Russia and in Finland. *Dokl. Biol. Sci.* 2022. V. 507. P. 439—453.
<https://doi.org/10.1134/S0012496622060047>
- Gomzhina M.M., Gasich E.L. *Plenodomus* species infecting oilseed rape in Russia. *Vestnik zashchity rasteniy*. 2022. V. 105 (3). P. 135—147.
<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-3-15425>
- Gunina A.M. Diseases of soybean in the Amur region. *Vsesoyuznoe soveshanie po voprosam biologii i vozde-lyvaniya soi v Sovetskom Soyuze*. Blagoveschensk, 1967. (In Russ.)
- Kövics G.J., Sándor E., Rai M.K. et al. *Phoma*-like fungi on soybean. *Crit. Rev. Microbiol.* 2014. V. 40 (1). P. 49—62.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.755948>
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547—1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Liu Y.J., Whelen S., Hall B.D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 1799—1808.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- Lord E., Leclercq M., Boc A. et al. Armadillo 1.1: An original workflow platform for designing and conducting phylogenetic analysis and simulations. *PLOS One*. 2012. V. 7 (1). P. e29903.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029903>
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., et al. IQ-TREE2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* 2020. V. 35 (7). P. 1530—1534.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Muravieva M.F. Features of the development of soybean diseases in the Khabarovsk Territory and resistance of various varieties to them. *Sibirskiy vestnik selskokhozyaystvennoy nauki*. 1977. V. 5. P. 54—58. (In Russ.)
- Naumova E.S. Fungal biodiversity in soybean in the Voronezh region. *Mikologiya i fitopatologiya*. 1988. V. 22 (3). P. 217—223. (In Russ.)
- Nikitina A.I. Dangerous soybean diseases in the Russian Far East. *Zashchita rasteniy*. 1962. V. 7. P. 37—40. (In Russ.)
- Nekrasov E.V., Shumilova L.P., Gomzhina M.M. et al. Diversity of endophytic fungi in annual shoots of *Prunus mandshurica* (*Rosaceae*) in the South of Amur Region, Russia. *Diversity*. 2022. V. 14:1124.
<https://doi.org/10.3390/d14121124>
- Nelen E.S. New pycnidial fungi in the south of the Russian Far East. *Novosti sistematiki nizshikh rasteniy*. 1977. V. 14. P. 105. (In Russ.)
- Rai M., Zimowska B., Kövics G.J. The genus *Phoma*: what we know and what we need to know? In: M. Rai, B. Zimowska, G.J. Kövics (eds). *Phoma: diversity, taxonomy, bioactivities, and nanotechnology*. Springer, Cham, 2022.

- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. et al. Introduction to food- and airborne fungi. Sixth edn. Centraal bureau voor schimmel cultures, Utrecht, 2002.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74 (12). P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sung G.H., Sung J.M., Hywel-Jones N.L. et al. A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (*Ascomycota*, *Fungi*): identification of localized incongruence using a combinatorial bootstrap approach. Mol. Phylogenet. Evol. 2007. V. 31. P. 1204–1223. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.011>
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997. V. 24. P. 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols. In: M.A. Innis etc. (eds). A guide to methods and applications. San Diego, Acad. Press, 1990. pp. 315–322.
- Yang A.L., Chen L., Fang K. et al. *Remotididymella ageratinae* sp. nov. and *Remotididymella anemophila* sp. nov., two novel species isolated from the invasive weed *Ageratina adenophora* in PR China. IJSEM. 2021. V. 71 (1). Art. 004572. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004572>
- Zaostrovnykh V.I., Kadurov A.A., Dubovitskaya L.K. et al. Monitoring of the species composition of soybean diseases in different sowing zones. Dalnevostochnyy agrarnyy vestnik. 2018. V. 4 (48). P. 51–67. (In Russ.)
- Zhao P., Crous P.W., Hou L.W. et al. Fungi of quarantine concern for China I: *Dothideomycetes*. Persoonia. 2021. V. 47. P. 45–105. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.47.02>
- Zhukovskaya S.A. Mycoflora of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in the Soviet Far East. In: Tikhookeanskiy nauchyy kongress. Komitet nauchnaya botanika, Moscow, 1979, pp. 23–24. (In Russ.)
- Абрамов И.Н. (Abramov) Грибные болезни соевых бобов на Дальнем Востоке. Владивосток, 1931. 84 с.
- Абрамов И.Н. (Abramov) Болезни сельскохозяйственных растений на Дальнем Востоке. Хабаровск, 1938. 286 с.
- Бондарцева-Монтеверде В.Н., Васильевский Н.И. (Bondartseva-Monteverde, Vasilyevskiy) К биологии и морфологии некоторых видов *Ascochyta* на бобовых // Тр. ботанического ин-та АН СССР. Сер. 2. Спорывые растения. 1940. Т. С. 345–376.
- Гомжина М.М., Ганнибал Ф.Б. (Gomzhina, Gannibal) Современная систематика грибов рода *Phoma* sensu lato // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. № 5. С. 268–275. <https://doi.org/10.31857/S0026364821050056>
- Гунина А.М. (Gunina) Болезни сои в Амурской области // Всесоюзное совещание по вопросам биологии и возделывания сои в Советском Союзе. Благовещенск, 1967. С. 73–80.
- Жуковская С.А. (Zhukovskaya) Микофлора сои [*Glycine max* (L.) Merr.] на Советском Дальнем Востоке // В кн.: Тихоокеанский XIV научный конгресс. М.: Комитет Научная Ботаника, 1979. С. 23–24.
- Заостровных В.И., Кадунов А.А., Дубовицкая Л.К. и др. (Zaostrovnykh et al.) Мониторинг видового состава болезней сои в различных зонах соеосеяния // Дальневосточный аграрный вестник. 2018. Т. 4(48). С. 51–67.
- Муравьева М.Ф. (Muravyova) Особенности развития болезней сои в Хабаровском крае и устойчивость к ним различных сортов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 1977. Т. 5. С. 54–58.
- Наумова Е.С. (Naumova) Видовой состав грибов на сое в условиях Воронежской области // Микология и фитопатология. 1988. Т. 22. № 3. С. 217–223.
- Нелен Е.С. (Nelen) Новые виды пикнидиальных грибов с юга Дальнего Востока // Новости систематики низших растений. 1977. Т. 14. С. 105.
- Никитина А.И. (Nikitina) Опасные болезни сои на Дальнем Востоке // Защита растений. 1962. Т. 7. С. 37–40.

Unique Findings of *Phoma*-like Fungi Associated with Soybean

M.M. Gomzhina^{a, #} and E.L. Gasich^{a, ##}

^a All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: gomzhina91@mail.ru

^{##}e-mail: elena_gasich@mail.ru

Ascochyta leaf blight of soybean is a widespread disease caused by several closely related *Phoma*-like species, this disease often leads to significant crop losses. Among *Phoma*-like species from *Didymellaceae* family, the most frequently associated with symptomatic soybean tissues are species of the genera *Boeremia* and *Didymella*. Currently reliable species identification in *Didymellaceae* relies on polyphasic approach based on consolidated species concept and combined molecular phylogenetic, micromorphological and cultural features. At least three loci are commonly used for reconstruction of the molecular phylogeny of *Didymellaceae*: internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA, partial RNA-polymerase II gene (*rpb2*), and β -tubulin (*tub2*). As a result of long-term phytosanitary monitoring of soybean crops, soybean leaves with symptoms of Ascochyta blight were collected from major soybean producing areas of Russia. From surface sterilized plant tissues more than 100 isolates of *Phoma*-like fungi were obtained and stored in the collection of pure cultures of the Laboratory of Mycology and Phytopathology (MF, All-Russian Institute of Plant Protection). Most of them, as a result of multilocus phylogenetic analysis, were identified as *Boeremia* and *Didymella* species. Eight isolates were identified as species of other genera, suspected to be rare findings. The aim of this study was to identify these eight isolates based on multilocus phylogenetic analysis, as well micromorphological, cultural, and pathogenicity data. Multilocus phylogenetic analysis has resulted in identification of all eight isolates to species level. Single isolate from the Ryazan region was *Neoascochyta graminicola*. Three other from three different districts of the Amur region were *Remotididymella capsici*. Two isolates from the Primorskiy territory and Amur region were *Stagonosporopsis heliopsisidis*. Another two from two districts of the Amur region were *S. stuijvenbergii*. Pathogenicity tests have resulted in conclusion, that all studied isolates were not pathogenic for soybean leaves. Probably, these *Phoma*-like species are associate with soybean as saprophytes or endophytes. For all these *Phoma*-like species *Glycine max* was detected as substrate for the first time. *Neoascochyta graminicola* is widespread in Europe in association with *Poaceae* plants. There are only two findings of *Remotididymella capsici* in the world, both from leaves of *Capsicum annuum*. First finding was made in the former USSR in 1977 and was identified based on only morphological features. Second findings was collected in the Fiji and verified with multilocus phylogenetic analysis. *Stagonosporopsis heliopsisidis* isolates were revealed in the USA, Canada, Netherlands and Russia and this fungus was believed to be specific for *Asteraceae* plants. Isolates of *Stagonosporopsis stuijvenbergii* are known only from soil in the Netherlands. Thus, such species as *Neoascochyta graminicola* and *Stagonosporopsis stuijvenbergii* were revealed in the Russia for the first time. Studied *Remotididymella capsici* isolates were first confirmed findings of this fungus in Russia. Additionally to detailed phylogenetic data, the manuscript is supplement with a detailed description of the cultural and micromorphological features of all species.

Keywords: Ascochyta leaf blight, *Didymellaceae*, *Neoascochyta*, pathogenicity, *Phoma*, phylogeny, *Remotididymella*, *Stagonosporopsis*