

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 582.282. + 582.288.2 : 581.2 : 577.29

ФОМОИДНЫЕ ГРИБЫ НА РАСТЕНИЯХ СЕМЕЙСТВА *ASTERACEAE* В МИКОЛОГИЧЕСКОМ ГЕРБАРИИ ВИЗР (LEP)

© 2020 г. М. М. Гомжина^{1,*}, Ф. Б. Ганнибал^{1,**}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: gomzhina91@mail.ru

**e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru

Поступила в редакцию 22.03.2020 г.

После доработки 03.05.2020 г.

Принята к публикации 11.05.2020 г.

Незаменимыми биоресурсными коллекциями, используемыми для изучения биоразнообразия грибов, являются микологические гербарии. Гербарий Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ФГБНУ ВИЗР) – LEP является крупнейшей в России коллекцией микроскопических фитопатогенных грибов. После многолетнего хранения некоторые из ценнейших образцов уже не могут быть использованы для морфологических исследований, но, чаще всего, сохраняют какое-то количество ДНК грибов. Поэтому наряду с морфолого-анатомическими методами, гербарные коллекции начинают изучать с применением молекулярно-генетических подходов. Фомоидные грибы (*Phoma sensu lato*) – крупная таксономически неоднородная широко распространенная группа анаморфных аскомицетов, представители которой могут занимать разные экологические ниши. Значительная их часть – фитопатогены, вызывающие заболевания важных сельскохозяйственных культур. Всего в Микологическом гербарии LEP хранится 1328 образцов растений, пораженных грибами, которые при депонировании в коллекцию были определены как виды рода *Phoma*. Нами были изучены 28 образцов растений семейства *Asteraceae* (сложноцветные). Образцы были собраны на территории России и стран бывшего СССР с 1895 по 1960 годы. Самый старый образец (LEP 129311) на момент исследования имел возраст 124 года. Для всех отобранных образцов были изучены морфологические признаки пикнид и конидий, а из 18 – была успешно экстрагирована ДНК и определены нуклеотидные последовательности ITS-областей рДНК, для чего, была сконструирована пара праймеров Did2F/Did2R, специфично амплифицирующая ITS-области ДНК фомоидных грибов – представителей семейства *Didymellaceae*. Нуклеотидные последовательности только четырех образцов удалось получить в результате использования стандартных праймеров ITS1F/ITS4. Еще 14 образцов были секвенированы благодаря новым праймерам. Было показано, что в результате длительного хранения морфологические структуры в большинстве случаев разрушаются и не позволяют получить достаточно информации для корректной идентификации. С помощью молекулярно-генетических методов до уровня рода было определено 9 образцов и столько же – до уровня вида. Было определено, что в Микологическом гербарии LEP представлено 5 родов фомоидных грибов, ассоциированных со сложноцветными: *Ascochyta*, *Boeremia*, *Didymella*, *Epicoccum*, *Stagonosporopsis* и 4 вида: *Ascochyta rabiei*, *Boeremia exigua*, *Didymella pomorum*, *Epicoccum nigrum*. Видовая идентификация по молекулярным маркерам и морфологическим признакам совпала только для 124-летнего образца *Boeremia exigua*, который является на настоящий момент самым старым в мире образцом фомоидного гриба, ДНК которого была успешно выделена и амплифицирована.

Ключевые слова: гербарий, молекулярная филогения, таксономия, фомоидные грибы, *Asteraceae*, *Didymellaceae*, *Phoma*

DOI: 10.31857/S0026364820060070

ВВЕДЕНИЕ

Незаменимыми биоресурсными коллекциями, используемыми для изучения биоразнообразия грибов, являются микологические гербарии. В России поддерживается несколько микологических гербариев, насчитывающих в общей сложности несколько сот тысяч образцов.

Микологический гербарий Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ФГБНУ ВИЗР), имеющий международный акроним LEP, является крупнейшей в России коллекцией микроскопических фитопатогенных грибов. Гербарий начинался с коллекции из 177 видов грибов, собранных в Смоленской губернии в 1890-х гг. основоположником отечествен-

ной фитопатологии Артуром Артуровичем Ячевским. Впоследствии им в 1907 г. была основана лаборатория микологии и фитопатологии, где по настоящий момент и хранится ценнейшая и уникальнейшая коллекция фитопатогенных грибов. В гербарии насчитывается порядка 150 000 единиц хранения и ежегодно он пополняется десятками новых образцов. География образцов поистине широка – в нем представлены все части России, сопредельные территории и регионы мира.

В результате длительного хранения неизбежно гербарные образцы постепенно утрачивают свои первоначальные свойства. По прошествии десятилетий с момента сбора, некоторые из ценнейших образцов уже не могут быть полноценно использованы для морфологических исследований, но, чаще всего, сохраняют какое-то количество ДНК грибов. Поэтому наряду с традиционными морфолого-анатомическими методами, гербарные коллекции в настоящий момент начинают изучать и с применением молекулярно-генетических подходов.

Существует потенциальная возможность выделения ДНК микроорганизма из типового или иного репрезентативного образца, который был тем или иным способом “законсервирован” для длительного хранения, и последующего секвенирования таксономически значимого участка генома для пополнения баз данных, в том числе в рамках концепции ДНК-штрихкодирования жизни. Помимо уточнения видовой принадлежности хранящихся гербарных образцов их секвенирование должно привести в ближайшем будущем к значительному повышению репрезентативности баз данных, расширению знаний о видовом разнообразии грибов, существовавшем в прошедшее столетие.

Фомоидные грибы (грибы рода *Phoma* в его широком понимании) – крупная сложная и таксономически неоднородная группа микроскопических аскомицетов. Эти грибы широко распространены и могут быть встречены в самых разнообразных условиях (Aveskamp et al., 2008). Их обнаруживают на травянистых и древесных растениях, в почве, воде, воздухе, молоке, масле, краске, на бумаге (Voegera et al., 2004), известны изоляты с неорганическими материалами (Aveskamp et al., 2008). Среди них есть патогены насекомых и позвоночных животных (Sutton 1980), а также человека (Rai et al., 2014). Значительная часть фомоидных грибов является фитопатогенами, которые поражают важные сельскохозяйственные культуры и могут при этом вызывать большие потери урожая. Фомоидные грибы являются возбудителями корневых гнилей, листовых пятнистостей и других заболеваний, известных, как фомозы. Практической значимостью обладают и те виды, которые поражают наиболее трудноискоренимые сорные растения: выюнок полевой, борщевик

Сосновского, амброзию полыннолистную, полынь, осот, бодяк и т.д. На основе фомоидных грибов ведутся разработки микогербицидов – экологически безопасных средств контроля сорных растений.

Несмотря на то, что грибы рода *Phoma* известны науке уже более 130 лет, очень широко распространены, их систематика до сих пор остается дискуссионной (Aveskamp et al., 2009). Род *Phoma* в широком понимании по количеству входящих в него видов является одним из самых обширных (4960 видов; <http://www.mycobank.org>). В то же время, несмотря на большой интерес микологов и фитопатологов к представителям этого рода, он остается недостаточно изученным. До сих пор нет стабильного четкого мнения о границах родов фомоидных грибов, о положении в системе сумчатых грибов и филогенетических связях с морфологически сходными родами. После проведения многочисленных и обширных молекулярно-генетических исследований (Crous et al., 2009; de Gruyter et al., 2009, 2010, 2012; Quaedvlieg et al., 2013; Phookamsak et al., 2014; Ariyawansa et al., 2015a, 2015b; Chen et al., 2015, 2017) выяснилось, что представители фомоидных грибов попадают в состав почти 73 родов и 16 семейств сумчатых грибов (Gomzina, Gannibal, 2017). Также было показано, что проводить корректную идентификацию этих грибов до таксонов уровня рода или вида рекомендуется в первую очередь по молекулярно-генетическим признакам в результате секвенирования таксономически информативных локусов ДНК (рибосомальные локусы, гены β -тубулина, фактор элонгации трансляции 1- α и т.д.).

При этом фундаментальная и практическая значимость изучения биоразнообразия фитопатогенных фомоидных грибов неоспорима. Адекватная система и номенклатура этих грибов – патогенов растений – залог успешных исследований по фитопатологии, микogeографии, экологии и эволюции грибов, биотехнологии и т.д. В целях последующего усовершенствования системы защиты растений, безусловно, необходим тщательный анализ биоразнообразия экономически значимых патогенов растений – возбудителей опасных болезней сельскохозяйственных культур и потенциальных агентов биоконтроля сорных растений.

Всего в Микологическом гербарии ЛЕР хранится 1328 образцов растений, пораженных грибами, которые при депонировании в коллекцию были определены как виды рода *Phoma*. Образцы были собраны в разные годы и географически охватывают весь Земной шар. В том числе среди имеющихся в гербарии, 28 образцов представляют растения семейства сложноцветных.

Из-за неизбежной деформации и разрушения в процессе хранения части морфологических структур, уточнение видовой и родовой принадлежности может быть корректно произведено лишь с ис-

пользованием молекулярно-генетических методов, а именно, определения нуклеотидных последовательностей филогенетически информативных участков ДНК.

В связи с особенностями морфологии фомоидных грибов материал грибной этиологии на образцах пораженных растений виден невооруженным глазом, таким образом, для выделения ДНК есть возможность собрать непосредственно грибные структуры, минимизируя сбор растительной ткани. В процессе развития фомоидные грибы формируют на поверхности или под эпидермисом растений пикниды – визуально фиксируемые овальные или круглые структуры, связанные с бесполом размножением и хранящие споры. Именно из этих структур на наш взгляд целесообразно осуществлять процесс экстракции ДНК.

Из-за длительного хранения, пикниды неизбежно становятся хрупкими, и их аккуратный сбор становится трудноосуществимым, что повышает вероятность нахождения в пробе для экстракции растительной ткани, что в свою очередь может затруднять процесс последующей амплификации, либо приводить к ложноположительным результатам и иным артефактам.

Кроме того, при экстракции ДНК из гербарных образцов пораженных фомоидными грибами растений 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. Действенным методом, способствующим амплификации целевой ДНК, могло бы служить использование специфичных для ДНК фомоидных грибов пар праймеров. На настоящий момент существуют специфичные праймеры для определенных, в первую очередь, опасных фитопатогенных видов грибов рода *Phoma* (в его прежнем широком понимании). Поскольку фомоидные грибы входят в состав разных семейств аскомицетов, сконструировать возможно только праймеры, специфичность которых ограничена одним семейством.

Целью нашего исследования было проведение реидентификации фомоидных грибов в образцах сложноцветных растений, хранящихся в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР в течение 124–60 лет с применением методов молекулярной филогении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал. Материалом для выполнения работы по реидентификации фомоидных грибов из гербарных образцов пораженных растений семейства *Asteraceae* послужили 28 образцов. Гербарный материал хранится в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР (LEP). Растения были собраны на территории России в разные годы (1895–1960 гг.).

Самый старый образец (LEP 129311) был собран 124 года назад.

Изучение морфологических признаков. Таксономически значимые признаки пикнид и конидий, сохранившихся для наблюдения, анализировали с помощью методов световой микроскопии. Микроскопирование осуществляли с использованием микроскопа Микромед 3 (Санкт-Петербург) и бинокулярной лупы (Carl Zeiss, Германия). Для идентификации видов изучаемых грибов использовали руководство по определению фомоидных грибов (Voerema et al., 2004).

Экстракция и амплификация ДНК. Выделение ДНК грибов из гербарных образцов осуществляли согласно стандартному методу с использованием цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) и хлороформа с некоторыми модификациями (Doyle, Doyle, 1990).

Для последующего секвенирования и идентификации фомоидных грибов были амплифицированы участки таксономически информативного локуса – области внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомальной ДНК (ITS-локус) с парой праймеров: ITS1F (Gardes, Bruns, 1993) и ITS4 (White et al., 1990). Реакции были проведены согласно следующему протоколу: каждая ПЦР-смесь (25 мкл) содержала: смесь дезоксирибонуклеотрифосфатов (200 мкМ), каждый праймер (25 мкМ), Taq-полимеразы (5 ед./мкл), 10-кратный буфер для полимеразы и ДНК (1 нг). ДНК амплифицировали согласно следующему циклу: предденатурация ДНК при 94°C, 2 мин.; денатурация 92°C 50 с; отжиг праймеров 55°C, 40 с; элонгация 72°C в течение 75 с; финальный синтез 3–5 мин при 72°C; количество циклов – 30.

Дизайн специфичных для семейства *Didymellaceae* праймеров, амплифицирующих ITS-локус рДНК. Для целевой амплификации ДНК только фомоидных грибов в тотальной ДНК, выделенной из пораженных сложноцветных растений, и последующего секвенирования и идентификации фомоидных грибов, целесообразно использование специфичных праймеров. Большая часть наиболее распространенных 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 олигонуклеотидных праймеров Did2F/Did2R (ATCTCTTGGTTCGGCATCG, ACTGCGTCCGAAATCAATAC). Состав ПЦР смеси был тот же, как описано выше. Амплификацию предложенных праймеров осуществляли в формате touchdown согласно следующему протоколу: предденатурация 94°C, 2 мин.;

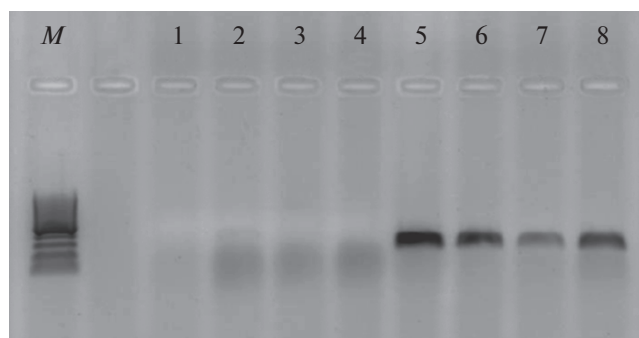


Рис. 1. Результаты амплификации ITS-области рДНК представителей разных родов аскомицетов с праймерами Did2F/Did2R, специфичными для родов семейства *Didymellaceae*: 1 – *Microdochium* sp.; 2 – *Fusarium* sp.; 3 – *Alternaria* sp.; 4 – *Hirsutella* sp.; 5 – *Ascochyta* sp.; 6 – *Stagonosporopsis* sp.; 7 – *Didymella* sp.; 8 – *Boeremia* sp.; М – маркер молекулярного веса.

92°C 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. Визуализацию продуктов ПЦР производили с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле с бромистым этидием.

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

Секвенирование ДНК и анализ нуклеотидных последовательностей. Для секвенирования производили очистку полученной после ПЦР ДНК согласно стандартному протоколу (Boyle, Lew, 1995). Очищенные фрагменты секвенировали по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977) на секвенаторе ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems – Hitachi, Япония) в соответствии с протоколами производителя с использованием набора реактивов с флуоресцентно мечеными дезоксирибонуклеозидтрифосфатами BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, США).

Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalX 1.8 (Thompson et al., 1997), после чего при необходимости выравнивание корректировали вручную, после чего их сравнивали с последовательностями, представленными в GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка специфичности праймеров Did2F/Did2R.

Была подтверждена ожидаемая специфичность разработанных нами праймеров Did2F/Did2R, избирательно амплифицирующих ITS-локусы в

рДНК фомоидных грибов из семейства *Didymellaceae* (рис. 1). Целевой фрагмент размером 250–300 п.н. в результате ПЦР образовывался лишь у грибов из этого семейства и не формировался у представителей других групп аскомицетов.

Идентификация по морфологическим признакам.

Из 28 гербарных образцов лишь у 6 нами была определена видовая принадлежность (табл. 1). В одном образце были обнаружены хламидоспоры, что позволило сделать предположение о таксономической принадлежности. Известно, что *in vivo* это характерно для двух видов: *Didymella pomorum* (Thüm.) Qian Chen et L. Cai и *D. glomerata* (Corda) Qian Chen et L. Cai. Идентификация четырех образцов нами была признана корректной. Они были определены как *Phoma herbarum* Westend., морфологически наблюдаемые структуры были схожи с представленными в литературе описаниями, однако, при оценке корректности проведенной реидентификации необходимо учитывать, что данный вид является типовым для рода и очень полиморфным.

У четырех 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 трех типов конидий α , β и γ , что характеризует их как представителей рода *Diaporthe*. Еще у одного – наличие многоклеточных хламидоспор, что свойственно некоторым представителям рода *Didymella*. Исходя из этого, была определена родовая принадлежность семи 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.

Идентификация по молекулярно-генетическим признакам.

Из 28 гербарных образцов фомоидных грибов из 18 была успешно выделена грибная ДНК. Для этих 18 образцов была осуществлена амплификация и последующее секвенирование ITS-локусов. Из них нуклеотидные последовательности четырех образцов были получены в результате секвенирования с праймерами ITS1F/ITS4, 14 – ПЦР с разработанными специфичными праймерами Did2F/Did2R (табл. 1).

По молекулярно-генетическим признакам до уровня рода были определены фомоидные грибы в 9 образцах: пять (LEP 129642, 129537, 130273, 129428, 129935) – *Ascochyta* sp., два (LEP 129828, 129915) – *Didymella* sp., два (LEP 129310, 130378) – *Stagonosporopsis* sp. Фомоидные грибы в других 9 образцах были определены до таксонов уровня вида: *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter et Verkley (LEP 129728, 129750, 129509, 129815, 129311), *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (LEP 129822, 129808),

Таблица 1. Идентификация гербарных образцов сложнопетельных растений, пораженных фомидными грибами из Микологического гербария ФГБНУ ВИЗР (LEP)

Образец LEP	Растение-хозяин	Ранее сделанная идентификация		Идентификация, выполненная в ходе данной работы
		данные этикетки	современное название	
129310	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Phoma achilleae</i>	?	<i>Didymella</i> sp.
129311	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Ph. achilleae</i>	?	sect. <i>Phyllostictoides</i>
129816	<i>Anthemis tinctoria</i>	<i>Ph. herbarum</i>		<i>Phoma herbarum</i>
129642	<i>Arcitium tomentosum</i>	<i>Ph. decolorans</i> (Lév.) Sacc.	?	sect. <i>Phoma</i>
129435	<i>Artemisia absinthium</i>	<i>Ph. artemisiae</i>	<i>Stagonosporopsis artemisiicola</i>	<i>Stagonosporopsis</i> sp.
129801	<i>Artemisia absinthium</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Stagonosporopsis</i> sp.
129815	<i>Artemisia</i> sp.	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Ph. herbarum</i>	sect. <i>Phoma</i>
129828	<i>Carduus crispus</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Didymella</i> sp.
129532	<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	<i>Ph. chrysanthemi</i> Voglino	?	—
129537	<i>Cichorium</i> sp.	<i>Ph. cichorii</i> Pass.	?	<i>Ascochyta</i> sp.
130273	<i>Cirsium lanceolatum</i>	<i>Ph. пусноcephali</i> Pass.	?	<i>Ascochyta</i> sp.
129744	<i>Cirsium</i> sp.	<i>Ph. ficitilis</i>	<i>Didymella pomorum</i>	—
129535	<i>Crepis tectorium</i>	<i>Ph. cichoriacearum</i> Sacc.	?	—
129509	<i>Erigeron acer</i>	<i>Ph. canadensis</i> Allesch.	?	<i>B. exigua</i>
129728	<i>Erigeron acer</i>	<i>Ph. erigerontis</i>	?	<i>B. exigua</i>
129750	<i>Filago arvensis</i>	<i>Ph. filaginis-arvensis</i>	?	<i>B. exigua</i>
129428	<i>Lappa tomentosum</i>	<i>Phomopsis arctii</i> (Lasch) Tra- verso	<i>Diaporthe arctii</i> (Lasch) Nitschke	<i>Ascochyta</i> sp.
130130	<i>Lappa</i> sp.	<i>Ph. oleracea</i> Sacc.	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Didymella pomorum</i> *
129915	<i>Lapsana communis</i>	<i>Ph. lapsanae</i> P. Karst.	?	<i>Didymella</i> sp.
129934	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Ph. leonuri</i>	<i>Leptosphaeria slovacica</i> Picb.	—
129935	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Ph. leonuri</i>	<i>L. slovacica</i>	<i>Ascochyta</i> sp.
129848	<i>Matricaria inodora</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Ph. herbarum</i>	—
130081	<i>Mulgedium</i> sp.	<i>Ph. mulgedii</i>	?	—
130447	<i>Scorzonera tausaghyz</i>	<i>Ph. tau-saghyzi</i>	?	—
130378	<i>Solidago virgaurea</i>	<i>Ph. solidaginis</i>	?	<i>Stagonosporopsis</i> sp.
129389	<i>Tanacetum</i> sp.	<i>Ph. ambigua</i> P. Karst. et Har.	?	—
129822	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Ascochyta rabiei</i>
129808	<i>Asteraceae</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>A. rabiei</i> *

Примечание. Подчеркиванием выделен образец, для которого совпала идентификация по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам; звездочкой (*) отмечены образцы, ДНК которых была амплифицирована и секвенирована с использованием праймеров ITS1F и ITS4.

Didymella pomorum (LEP 130130), *Epicoccum nigrum* Link (LEP 129816).

ОБСУЖДЕНИЕ

Фомоидные грибы в изучаемых образцах пораженных сложноцветных растений согласно этикеточным данным при депонировании в коллекцию были отнесены к 20 видам. Двенадцать видов, очевидно, были определены исключительно на основании связи с видом питающего растения (виды *Ph. achilleae* Sacc., *Ph. erigerontis* Petrov, *Ph. filaginisarvensis* Petrov, *Ph. leonuri* Letendre, *Ph. tau-saghyzi* Cherem., *Ph. kok-saghyz* Cherem. и др.). В связи с тем, что в современной таксономии фомоидных грибов произошли существенные преобразования, данные о видовой принадлежности, указанные на многих гербарных этикетках в большинстве случаев устарели и, очевидно, требуют уточнения. Соответствующие родовые и видовые эпитеты представлены в табл. 1.

В результате длительного хранения гербарные образцы неизбежно постепенно утрачивают свои первоначальные свойства. Нами при реидентификации по морфологическим признакам были учтены исключительно характеристики пикнид, конидий и плодовых тел, сформировавшихся непосредственно на растении (*in vivo*). Единственный на настоящий момент определитель фомоидных грибов (Voeregma et al., 2004) построен исключительно на признаках, которые можно наблюдать в условиях чистой культуры (*in vitro*). При проведении идентификации фомоидных грибов из гербарных образцов использование этой монографии имеет ряд ограничений, поскольку известно, что морфологические признаки изучаемых структур могут существенно различаться *in vivo* и *in vitro* (Voeregma 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 пораженного растительного материала. По этим причинам провести корректную реидентификацию фомоидных грибов в гербарных образцах исключительно по морфологическим признакам спороносных структур — задача практически невыполнимая. При наличии на пораженных 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 фомоидных грибов являются не таксономическими группами. Идентификация хотя бы до секции, однако, может быть полезной, по-

скольку это позволяет в первом приближении понять к кому семейству или группе видов относится изучаемый объект.

Кроме того, 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 разнообразнейшие неродственные виды. Кроме описанной выше проблемы, из-за большого возраста материала некоторые признаки не поддавались наблюдению. В результате в распоряжении оказался довольно скудный набор признаков для определения видов фомоидных грибов.

Более информативными оказались молекулярно-генетические признаки. Полученные нуклеотидные последовательности ITS-локуса рДНК позволили достоверно и объективно идентифицировать грибы девяти образцов до уровня рода, а девяти — до вида. Идентификация фомоидных грибов из гербарных образцов до рода также является информативной, поскольку позволяет судить о представленном в коллекции биоразнообразии грибов. Так, секвенирование ITS-локуса фомоидных грибов из гербарных образцов позволило установить, что в коллекции представлен не один род *Phoma*, а пять других родов. Видовая идентификация фомоидных грибов была осуществлена не во всех образцах. Это связано с тем, что нами были определены нуклеотидные последовательности только ITS-областей ДНК. Для определения фомоидных грибов до уровня вида в отдельных случаях достаточно секвенирования одного ITS-локуса, в других случаях необходимо включать в анализ как минимум последовательности гена β -тубулина. При работе с гербарными образцами эта задача усложняется, поскольку со временем ДНК неизбежно разрушается и если есть вероятность того, что многокопийные локусы (например ITS) сохранились, то вероятность того, что белок-кодирующие последовательности не деградировали, невелика.

Молекулярные данные и морфологические признаки согласовались только для образца LEP 129311. По морфологическим признакам он был признан представителем бывшей секции *Phyllostictoides*. Молекулярные признаки позволили идентифицировать этот образец, как *Boeremia exigua* — вид, который был типовым для данной секции. Для остальных 17 образцов морфологические и молекулярно-генетические признаки не согласовывались.

Определение видов фомоидных грибов, осуществленное нашими предшественниками, и, как следствие, названия, указанные на этикетках гербарных конвертов, не согласовывались ни для одного исследованного образца. Это может быть объяснено тем, что в предыдущие годы взгляды на

систематику и номенклатуру фомоидных грибов существенно отличались от современных. Например, вид *Phoma artemisiae* Kalchbr. et Cooke согласно современным взглядам следует называть *Stagonosporopsis artemisiicola* (Hollós) Aveskamp, Gruyter et Verkley, а *Phoma fictilis* Delacr. — *Didymella pomorum*. Кроме того, ранее полагали, что идентификацию видов *Phoma* можно проводить по связи с растением-хозяином. Так, *Phoma* на *Mulgedium* sp. идентифицировали как *Phoma mulgedii* Naumov, а обнаруженные пикниды на стеблях *Solidago virgaurea* связывали с развитием на этом растении *Phoma solidaginis* Cooke.

Впервые в России фомоидные грибы из гербарных образцов пораженных растений семейства *Asteraceae* были изучены и достоверно идентифицированы с применением методов молекулярной филогении. Таким образом, в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР, в гербарных образцах пораженных сложноцветных растений выявлено пять родов фомоидных грибов: *Ascochyta*, *Boeremia*, *Didymella*, *Epicoccum* и *Stagonosporopsis* и четыре вида *B. exigua*, *A. rabiei*, *D. pomorum*, *E. nigrum*.

Образец *Boeremia exigua* LEP 129311, собранный А.А. Ячевским на своей родине в Смоленской губернии, хранится в Микологическом гербарии ФГБНУ ВИЗР уже 125 лет. На настоящий момент он является самым старым в мире образцом фомоидного гриба, ДНК которого была успешно выделена, амплифицирована, и для которого была определена нуклеотидная последовательность ITS-локуса. До этого времени самым старым образцом фомоидного гриба, из которого была только выделена, но не отсеквенирована ДНК, был 97-летний образец *Didymella pinodes* (Berk. et A. Bloxam) Petr. (Cubero et al., 1999).

Разработанные праймеры Did2F/Did2R специфичные для грибов семейства *Didymellaceae* целесообразно использовать для амплификации и последующего секвенирования таксономически информативных локусов ITS рДНК фомоидных грибов в тотальной ДНК, выделенной из гербарных образцов пораженных растений. Использование этих специфичных праймеров позволяет избежать амплификации рДНК других грибов и растений и получения ложноположительных результатов.

В дальнейшем для усовершенствования возможностей идентификации фомоидных грибов из гербарных образцов растений разных семейств актуальна разработка и использование праймеров для амплификации таксономически информативных локусов, специфичных для разных семейств фомоидных грибов (*Didymellaceae*, *Phaeosphaeriaceae*, *Leptosphaeriaceae*, *Pleosporaceae* и т.д.). Секвенирование гербарных образцов грибов на настоящий момент является мощным инструментом, который позволит судить не только о разнообразии, но и о географическом распространении грибов, в том числе в историческом аспекте.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 19-76-30005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ariyawansa H.A., Phukhamsakda C., Thambugala K.M. et al. Revision and phylogeny of *Leptosphaeriaceae*. Fungal Diversity. 2015a. V. 74. P. 19–51.
<https://doi.org/10.1007/s13225-015-0349-2>
- Ariyawansa H.A., Thambugala K.M., Manamgoda D.C. et al. Towards a natural classification and backbone tree for *Pleosporaceae*. Fungal Diversity. 2015b. V. 71. P. 85–139.
<https://doi.org/10.1007/s13225-015-0323-z>
- 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., 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.
- Boerema G.H., Gruyter J., Noordeloos M.E. et al. *Phoma* identification Manual. CABI Publishing, 2004.
- Boyle J.S., Lew A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends Genet. 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)
- Brock P.M., Döring H., Bidartondo M.I. How to know unknown fungi: the role of a herbarium. New Phytologist. 2009. V. 181. P. 719–724.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02703.x>
- 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. 105–159.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.06.002>
- Crous P.W., Schoch C.L., Hyde K.D. et al. Phylogenetic lineages in the *Capnodiales*. Stud. Mycol. 2009. V. 64. P. 17–47.
<https://doi.org/10.3114/sim.2009.64.02>
- Cubero O.F., Crespo A., Fatehi J. et al. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. Pl. Syst. Evol. 1999. V. 216. P. 243–249.
<https://doi.org/10.1007/BF01084401>
- de Gruyter J., Woudenberg J.H.C., Aveskamp M.M. et al. Redispersion of *Phoma*-like anamorphs in *Pleosporales*. Studies in mycology. 2012. V. 75. P. 1–36.
<https://doi.org/10.3114/sim0004>
- de Gruyter J., Aveskamp M.M., Woudenberg J.H.C. et al. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. Mycol. Res. 2009. V. 113. P. 508–519.
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.002>
- de Gruyter J., Woudenberg J.H.C., Aveskamp M.M. et al. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. Mycologia. 2010. V. 102 (5). P. 1066–1081.
<https://doi.org/10.3852/09-240>
- 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
- Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes — application to the identification

- of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 1993. V. 2. P. 113–118.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Gomzhina M.M., Gannibal Ph.B. Modern systematics of the genus *Phoma* sensu lato. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2017. V. 51 (5). P. 268–275 (in Russ).
- Phookamsak R., Liu J.K., McKenzie E.H.C. et al. Revision of *Phaeosphaeriaceae*. *Fungal diversity*. 2014. V. 68. P. 159–238.
<https://doi.org/10.1007/s13225-014-0308-3>
- Quaedvlieg W., Verkley G.J. M., Shin H.D. et al. Sizing up *Septoria*. *Stud. Mycol.* 2013. V. 75. P. 307–390.
<https://doi.org/10.3114/sim0017>
- Rai M.K., Tiwari V.V., Irinyi L. et al. Advances in taxonomy of genus *Phoma*: polyphyletic nature and role of phenotypic traits and molecular systematics. *Indian J. Microbiol.* 2014. V. 54 (2). P. 123–128.
<https://doi.org/10.1007/s12088-013-0442-8>
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977. V. 74 (12). P. 5463–5467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sutton B.C. The Coelomycetes. *Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. 1st edn. Commonwealth Mycological Institute, U.K., 1980.
- 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. *Nucl. 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: Innis M.A. et al. (ed.) *A guide to methods and Applications*, Academic Press: San Diego, U.S.A., 1990. P. 315–322.
- 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.

***Phoma*-Like Fungi in the Mycological Herbarium of All-Russian Institute of Plant Protection (LEP)**

M. M. Gomzhina^{a,#} and Ph. B. Gannibal^{a,##}

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

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

^{##}e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru

Mycological herbaria constitute the basic and essential source of fungal biodiversity information. Mycological Herbarium of All-Russian Institute of Plant Protection (LEP) is the major collection of phytopathogenic fungi in Russia. A long-term storage of herbarium specimens results in fatal destruction of fungal morphological structures. Thus phytopathogenic fungi in such specimens could not be used for morphological studies. But these specimens contain several amounts of fungal DNA and thus could be used for molecular phylogenetic studies, especially for PCR. Moreover herbarium specimens are also a finite resource and molecular methods require small quantity of herbarium material. *Phoma*-like fungi is a huge taxonomically complex and controversial group of anamorph ascomycetes, that are widely distributed in different ecological niches. Significant part of these fungi are phytopathogens, that causes diseases of important crops. Sum total in Mycological Herbarium LEP there are 1328 specimens of plants, infected by fungi, that were identified as *Phoma*-like species. We have studied 28 specimens of phomoid fungi from plants of family *Asteraceae*. These specimens were collected from Russia and the territory of former USSR countries and ranged in collection date from 1895 to 1960. The age of the oldest specimen LEP 129311 is 124 years. Morphological features of sporebearing structures survived for examination (pycnidia, conidia, fruiting bodies, ascospores, chlamydospores etc) were estimated for all 28 specimens. Whereas fungal DNA for subsequent sequencing were extracted from 18 specimens. Taxonomically significant internal transcribed spacer (ITS loci) was amplified and sequenced with primers ITS1F/ITS4. Additionally the specific primers (Did2F/Did2R) were constructed to amplify ITS loci of *Phoma*-like fungi in the family *Didymellaceae*. It was shown, that in majority of cases long-term storage of plants, infected by phomoid fungi results in destruction of sporebearing structures. Thus we had not enough data on morphological features to correct identifying of these fungi. Molecular features were more explicit and allowed us to determine *Phoma*-like fungi in 9 herbarium specimens to genera level as well in another 9 – to species. Among them nucleotide sequences of ITS loci of four specimens were obtained by PCR with primers ITS1F/ITS4, whereas fourteen sequences were derived by PCR with new primers Did2F/Did2R, which were designed by authors. As a result in Mycological Herbarium LEP on infected plants of family *Asteraceae* are stored five genera of *Phoma*-like fungi: *Ascochyta*, *Boeremia*, *Didymella*, *Epicoccum*, *Stagonosporopsis* and four species: *Ascochyta rabiei*, *Boeremia exigua*, *Didymella pomorum* (*Epicoccum nigrum*). Primers Did2F/Did2R could be recommended to amplify ITS loci in DNA of phomoid fungi from *Didymellaceae* and to phylogenetic studies in this group of fungi, especially in herbarium specimens of *Phoma*-like species. Molecular features were in concordance with morphological characters only for 124 years old specimen *Boeremia exigua*. To date this specimen is the oldest herbarium sample of *Phoma*-like fungi, which DNA was sequenced. Previously the oldest sequenced herbarium specimen of phomoid fungi was 97 years old *Didymella pinodes*.

Keywords: *Asteraceae*, *Didymellaceae*, herbarium, molecular phylogeny, taxonomy, *Phoma*, *Phoma*-like fungi