МИКОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 353–370

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 582.282 + 582.288 + 577.29

МИКОБИОТА ЧЕРНИКИ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ И В ФИНЛЯНДИИ

© 2021 г. М. М. Гомжина[1,*], Е. Л. Гасич[1,], Т. Ю. Гагкаева[1,***], Ф. Б. Ганнибал[1,****]**

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

**e-mail: gomzhina91@mail.ru*

***e-mail: elena_gasich@mail.ru*

****e-mail: t.gagkaeva@mail.ru*

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

Поступила в редакцию 30.03.2021 г.
После доработки 15.05.2021 г.
Принята к публикации 24.05.2021 г.

Черника широко распространена в хвойных, хвойно-широколиственных лесах и произрастает на территории России, Северной Европы, Азии, Северной Америки и Канады. Среди микроорганизмов, вызывающих заболевания черники, наиболее вредоносными являются *Diaporthe vaccinii* и *Colletotrichum acutatum*. Эти грибы входят в единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза и их появление и распространение на территории стран, входящих в этот союз, требует строгого контроля. Корректная идентификация большинства микромицетов до таксонов уровня вида возможна только по молекулярным признакам, к таким таксонам относятся и представители родов *Diaporthe* и *Colletotrichum*. Целью данной работы была оценка биоразнообразия грибов, ассоциированных с черникой, произрастающей на территории северо-запада России и в Финляндии, с помощью морфологических и молекулярно-генетических методов. Всего проанализировано 17 образцов дикорастущей черники с некротическими пятнами на листьях и язвами на стеблях, собранных в 2017 г. на территории Санкт-Петербурга и пяти районов Ленинградской обл., а также в республике Карелия и в Финляндии. В результате идентификации выделенных из черники штаммов по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам нами идентифицировано 12 видов: *Boeremia exigua*, *Colletotrichum salicis*, *Diaporthe eres*, *D. pulla*, *Fusarium avenaceum*, *F. incarnatum, F. sporotrichioides*, *Heterophoma sylvatica*, *Kalmusia longispora*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Neocucurbitaria cava*, *Sporocadus rosigena*. Также выявлены грибы из двух секций рода *Alternaria*: *Alternaria* и *Infectoriae* и микромицеты из родов *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Sordaria*, *Trichoderma*. Впервые на территории России обнаружены виды *Colletotrichum salicis*, *Heterophoma sylvatica*, *Kalmusia longispora*, *Microsphaeropsis olivacea* и *Neocucurbitaria cava*. Вид *Sporocadus rosigena* впервые выявлен в Финляндии. *Fusarium avenaceum*, *F. incarnatum* и *F. sporotrichioides* впервые зарегистрированы в ассоциации с черникой. Входящие в единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза виды *Diaporthe vaccinii* и *Colletotrichum acutatum* нами обнаружены не были.

Ключевые слова: антракноз, карантин, молекулярная филогения, фомопсис, *Colletotrichum acutatum*, *Diaporthe vaccinii*, *Fusraium*, *Vaccinium myrtillus*

DOI: 10.31857/S0026364821050056

ВВЕДЕНИЕ

Черника (*Vaccinium myrtillus* L.) – ягодный кустарничек, широко распространенный в хвойных и хвойно-широколиственных лесах. Это многолетнее растение произрастает на территории Северной Европы, Азии, Северной Америки, Канады. Среди микроорганизмов, вызывающих заболевания черники, фитопатогенные грибы и грибоподобные организмы составляют значительную часть и играют важную роль. Наиболее широко распространенными считаются микромицеты, развивающиеся на стеблях, среди них такие виды как *Diaporthe vaccinii* Shear, *Topospora myrtilli* (Feltg.) Boerema, *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Reade.) Honey, *Phytophthora cinnamomi* Rands. и др. (Szmagara, 2009; Lombard et al., 2014; Hilário et al., 2020).

Самым вредоносным для черники является гриб *Diaporthe vaccinii*. Известно, что этот микромицет способен вызывать такие заболевания, как гнили, пятнистости листьев, рак стеблей и приводить к существенным потерям урожая (до 65%) ягод черники (Lombard et al., 2014). Вид *D. vaccinii* включен в единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза в первую

часть (отсутствующие на территории ЕЭС) (Eurasian economic commission, 2016).

Другой опасный и вредоносный для растений рода *Vaccinium* микромицет – возбудитель антракноза – гриб *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. Поражает этот фитопатоген не только чернику, голубику, клюкву, клубнику, вызывая гнили их ягод (Wharton, Schilder, 2008; Garrido et al., 2009; Polashock et al., 2009), но и плодовые (Lee et al., 2007) и хвойные деревья (Dingley, Gilmour, 1972). Гриб *C. acutatum* также входит в единый перечень карантинных объектов ЕЭС, но в его вторую часть (ограниченно распространенные на территории ЕЭС) (Eurasian economic commission, 2016).

При проведении идентификации того или иного возбудителя по симптомам на растении или по морфологическим признакам в чистой культуре, неизбежны ошибки, которые приводят к получению недостоверной информации. Известно, что корректная идентификация большинства грибов до таксонов уровня вида возможна только по молекулярным признакам. К таким грибам относятся и представители родов *Diaporthe* (Gomes et al., 2013; Udayanga et al., 2014; Gao et al., 2017; Santos et al., 2017) и *Colletotrichum* (Lee et al., 2007).

Например, длительное время считалось, что *Diaporthe vaccinii*, вызывающий заболевания черники, повсеместно распространен на территории Северной Америки, Канады, Европы, также сообщалось о находках на территории Китая и Чили (Naraouei-Khandan et al., 2017). Все находки были сделаны в результате идентификации этого гриба по морфологическим признакам спороносных структур или по симптомам на чернике. Однако, по морфологическим признакам *D. vaccinii* сходен с такими видами, как *D. conorum* (Desm.) Niessl, *D. viticola* Nitschke, *D. columnaris* (D. F. Farr et Castl.) Udayanga et Castl. (Farr et al., 2002b). Методы молекулярной филогении позволили заключить, что значительная часть изолятов из Северной Америки, Польши, Латвии, Нидерландов и все из Германии, которые по морфологическим признакам конидий и пикнид и по связи с питающим растением идентифицировали, как *D. vaccinii*, являются близкородственным видом *D. eres* Nitschke (Farr et al., 2002a; Vilka, Volkova, 2015; Michalecka et al., 2017). Кроме того, методы молекулярной филогении позволили заключить, что с видами рода *Vaccinium*, помимо видов *D. eres* и *D. vaccinii*, могут быть ассоциированы еще шесть видов этого рода: *D. ambigua* Nitschke, *D. passiflorae* Crous et L. Lombard (Elfar et al., 2013), *D. asheicola* L. Lombard et Crous, *D. baccae* L. Lombard, G. Polizzi et Crous, *D. neotheicola* A. J.L. Phillips et J.M. Santos, *D. sterilis* L. Lombard, G. Polizzi et Crous (Lombard et al., 2014) и *D. australafricana* Crous et Van Niekerk (Latorre et al., 2012; Elfar et al., 2013). Таким образом, данные о распространении этого опасного организма на территории Европы, Северной Америки, Канады и Чили требуют уточнения и ревизии. Так, на настоящий момент, в Европе достоверные находки *D. vaccinii* были сделаны только в Польше (Michalecka et al., 2017), Нидерландах, Латвии и Литве (Lombard et al., 2014).

Идентификация штаммов *Colletotrichum acutatum*, осуществляемая по морфологическим признакам, также может приводить к ошибкам в определении видовой принадлежности. Такой признак как форма конидий, имеющих веретеновидную форму и заостренные концы (Simmonds, 1965), который длительное время считался диагностическим, является нестабильным и может быть характерен и для других видов этого рода. Кроме того, конидии *C. acutatum* могут иметь и другую форму (Damm et al., 2012). Методы молекулярной филогении позволили заключить, что вид *C. acutatum* является сборным и включает в свой состав 29 видов *Colletotrichum* (Damm et al., 2012). Из них с кустарничками рода *Vaccinium* могут быть ассоциированы *C. acutatum*, *C. fioriniae* (Marcelino et Gouli) Pennycook, *C. rhombiforme* Damm, P.F. Cannon et Crous (Wharton, Schilder, 2008; Damm et al., 2012).

Изучение биоразнообразия грибов, вызывающих заболевания черники в России не проводилось. Опубликована информация об отдельных находках видов той или иной группы грибов, но нет результатов комплексного исследования микобиоты, сопровождаемого молекулярным анализом.

Целью данной работы была оценка биоразнообразия грибов, ассоциированных с черникой, произрастающей на территории северо-запада России и Финляндии, с помощью морфологических и молекулярно-генетических методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полевой материал. В период с июня по август 2017 г. на территории Пискаревского лесопарка в г. Санкт-Петербурге, в Ленинградской обл. (Лужский, Приозерский, Ломоносовский, Всеволожский, Гатчинский р-ны), в Республике Карелия (Пудожский р-н), а также на юго-западе Финляндии было собрано 17 образцов дикорастущей черники с некротическими пятнами на листьях и язвами на стеблях (рис. 1).

Изоляты. Из каждого образца брали фрагменты растений с симптомами поражения, которые поверхностно стерилизовали 5%-м р-ром гипохлорита натрия. В дальнейшем фрагменты тканей растений раскладывали на картофельно-сахарозную питательную среду (КСА) (Samson et al., 2000) с добавлением смеси антибиотиков (ампициллин, стрептомицин, пенициллин, HyClone, Austria) и 0.4 мкл/л р-ра Triton X-100 (Panreac, Spain). Чашки Петри инкубировали при 24°C в темноте. Отсев выросших грибов проводили на 7–10-е сутки, из каждой культуры гриба получали моноспоровые

Рис. 1. Симптомы листовой и стеблевой пятнистостей черники, наиболее часто наблюдаемые на северо-западе России и в Финляндии.

или монопикнидиальные изоляты. Все 67 анализированных изолятов хранятся в коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР.

Морфологический анализ. Идентификация изолятов до уровня секции, рода или семейства (в отдельных случаях до уровня вида) осуществлялась по морфологическим признакам, согласно определителям (Morochkovskiy et al., 1969; Boerema et al., 2004; Simmons, 2007; Gerlach, Nirenberg, 1982).

Выделение и секвенирование ДНК. Среди выделенных изолятов 31 был выбран для изучения с применением молекулярно-генетических методов (табл. 1). Мицелий для экстракции ДНК собрали с поверхности культур грибов, выращенных на КСА. Размол осуществляли с использованием шаровой мельницы MM 400 (Retsch, Germany) и стерильного стеклянного песка (0.3 мм диам.). Экстракцию ДНК проводили стандартным (CTAB/хлороформ) методом (Doyle, Doyle, 1990).

Для реконструкции молекулярной филогении и идентификации изолятов была произведена амплификация и последующее секвенирование таксономически информативных для анализируемой группы грибов локусов ДНК. Для *Diaporthe* анализировали последовательности областей внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК (ITS), участков генов β-тубулина (*TUB*), фактора элонгации трансляции 1-α (*TEF*) и фрагмента гена, ответственного за синтез фермента ДНК-лиазы (*apn2*); *Colletotrichum* – ITS, *TUB*, *TEF* и фрагмента гена актина (*ACT*); *Sporocadus* – ITS и область большой субъединицы рибосомы рДНК (LSU); *Kalmusia* и *Neocucurbitaria* – ITS, *TUB*; *Fusarium* – *TEF*; изолятов грибов представителей семейства *Didymellaceae* – ITS, *TUB* и участка гена второй большой субъединицы фермента РНК-полимеразы II (*RPB2*).

Амплификацию ITS-области проводили с использованием праймеров ITS1F (Gardes, Bruns, 1993) и ITS4 (White et al., 1990); LSU – LR0R (Rehner, Samuels, 1994) и LR5 (White et al., 1990), *ACT* – Act-512F и Act-728R (Carbone, Kohn, 1999), *apn2* – apn2fw2 и apn2rw2 (Udayanga et al., 2014), *RPB2* – fRPB2-5F2 (Sung et al., 2007) и fRPB2-7cR (Liu et al., 1999), *TEF* – EF1-983F и EF1-1567R (Rehner, Buckley, 2005) или EF1-728F/EF1-986R (Carbone, Kohn, 1999), *TUB* – βtub2Fw и βtub4Rd (Aveskamp et al., 2009) или T1 и T2 (O'Donnell, Cigelnik, 1997; Saleh, Leslie, 2004).

Очищенные по стандартному протоколу (Boyle, Lew, 1995) фрагменты секвенировали методом Сэнгера (1977) на секвенаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems – Hitachi, Япония) в соответствии с рекомендациями производителя с использованием набора реактивов Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, США).

Молекулярно-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) применяли с использованием программного обеспечения RAxML (randomized accelerated maximum likelihood) v. 7.2.8 (Stamatakis et al., 2006). Принцип максимальной экономии (maximum parsimony – MP) применяли с использованием программного обеспечения Molecular Evolutionary Genetics Analysis версии 10 (MEGA X; Kumar et al., 2018). Анализ последовательностей

Таблица 1. Исследуемая коллекция штаммов грибов, выделенных из черники

№ штамма	Вид гриба	Место сбора	Орган	Номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank						
				ITS	LSU	*ACT*	*apn2*	*TEF*	*TUB*	*RPB2*
MF-Vm17-035	*Boeremia exigua*	Санкт-Петербург, Пискаревский лесопарк	листья	MZ046048	–	–	–	–	MZ054672	MZ054693
MF-Vm17-043	*Colletotrichum salicis*	”	листья	MZ046049	–	MZ054645	–	MZ054663	MZ054673	–
MF-Vm17-044	*C. salicis*	Ленинградская обл., Лужский р-н	листья	MZ046050	–	MZ054646	–	MZ054664	MZ054674	–
MF-Vm17-001	*Diaporthe eres*	Ленинградская обл., Всеволожский р-н	стебель	MZ046051	–	–	MZ054647	MZ054665	MZ054675	–
MF-Vm17-008	”	”	стебель	MZ046052	–	–	MZ054648	MZ054666	MZ054676	–
MF-Vm17-009	”	Финляндия	стебель	MZ046053	–	–	MZ054649	MZ054667	MZ054677	–
MF-Vm17-019	”	Ленинградская обл., Гатчинский р-н, Меньково	листья	MZ046054	–	–	MZ054650	MZ054669	MZ054678	–
MF-Vm17-030	”	Ленинградская обл., Ломоносовский р-н, Горелово	стебель	MZ046055	–	–	MZ054651	MZ054670	MZ054679	–
MF-Vm17-013	*D. pulla*	Ленинградская обл., Гатчинский р-н, Меньково	листья	MZ046056	–	–	MZ054652	MZ054668	MZ054680	–
MF-Vm17-029	”	Санкт-Петербург, Пискаревский лесопарк	листья	MZ046057	–	–	MZ054653	MZ054670	MZ054681	–
MF-G60101	*Fusarium avenaceum*	Карелия, Пудожский р-н	стебель	–	–	–	–	MZ054654	–	–
MF-G60102	”	Ленинградская обл., Лужский р-н	листья	–	–	–	–	MZ054655	–	–
MF-G60103	”	”	стебель	–	–	–	–	MZ054656	–	–
MF-G60104	”	”	листья	–	–	–	–	MZ054657	–	–
MF-G60105	”	”	листья	–	–	–	–	MZ054658	–	–

Таблица 1. Окончание

№ штамма	Вид гриба	Место сбора	Орган	Номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank						
				ITS	LSU	*ACT*	*apn2*	*TEF*	*TUB*	*RPB2*
MF-G60106	”	Санкт-Петербург, Пискаревский парк	стебель	–	–	–	–	MZ054659	–	–
MF-G60107	”	Ленинградская обл., Ломоносовский р-н, Горелово	стебель	–	–	–	–	MZ054660	–	–
MF-G60108	”	Ленинградская обл., Лужский р-н	стебель	–	–	–	–	MZ054661	–	–
MF-G60109	”	Финляндия	стебель	–	–	–	–	MZ054662	–	–
MF-Vm17-010	*Heterophoma sylvatica*	Ленинградская обл., Ломоносовский р-н	стебель	MZ046058	–	–	–	–	MZ054682	–
MF-Vm17-012	”	”	стебель	MZ046059	–	–	–	–	MZ054683	MZ054694
MF-Vm17-015	”	Ленинградская обл., Всеволожский р-н	стебель	MZ046060	–	–	–	–	MZ054684	MZ054695
MF-Vm17-016	”	”	стебель	MZ046061	–	–	–	–	MZ054685	MZ054696
MF-Vm17-017	”	”	стебель	MZ046062	–	–	–	–	MZ054686	MZ054697
MF-Vm17-018	”	Ленинградская обл., Ломоносовский р-н	листья	MZ046063	–	–	–	–	MZ054687	MZ054698
MF-Vm17-028	”	Ленинградская обл., Всеволожский р-н	стебель	MZ046064	–	–	–	–	MZ054688	–
MF-Vm17-039	*Heterophoma* sp.	Ленинградская обл., Лужский р-н	стебель	MZ046065	–	–	–	–	MZ054689	MZ054699
MF-Vm17-041	*Kalmusia longispora*	Санкт-Петербург, Пискаревский лесопарк	листья	MZ046066	–	–	–	–	MZ054690	–
MF-Vm17-006	*Microsphaeropsis olivacea*	Ленинградская обл., Лужский р-н	стебель	MZ046067	–	–	–	–	MZ054691	MZ054700
MF-Vm17-040	*Neocucurbitaria cava*	Ленинградская обл., Ломоносовский р-н, Горелово	стебель	MZ046068	–	–	–	–	MZ054692	–
MF-Vm17-047	*Sporocadus lichenicola*	Финляндия	стебель	MZ046069	MZ046070	–	–	–	–	–

методом Байесовской статистики (BPP) проводили 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, оценивали с помощью бутстреп-анализа с 1000 повторностей. В качестве референсных использовали полученные из базы данных GenBank последовательности ITS и LSU локусов рДНК, генов *ACT*, *apn2*, *TEF*, *TUB*, *RPB2* разных видов и штаммов грибов (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего из листьев и стеблей черники было выделено 67 изолятов грибов. В результате идентификации по морфологическим признакам определено 16 родов аскомицетов, относящихся к 8 порядкам (*Amphisphaerellales*, *Diaporthales*, *Capnodiales*, *Eurotiales*, *Glomerellales*, *Hypocreales*, *Pleosporales*, *Sordariales*) и 13 семействам (*Capnodiaceae*, *Chaetomiaceae*, *Cladosporiaceae*, *Coniothyriaceae*, *Diaporthaceae*, *Didymellaceae*, *Glomerellaceae*, *Hypocreaceae*, *Nectriaceae*, *Pestalotiopsidaceae*, *Pleosporaceae*, *Sordariaceae*, *Trichocomaceae*).

Из исследуемой коллекции изолятов до уровня вида были определены *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. incarnatum* (Desm.) Sacc., *F. sporotrichioides* Sherb. До таксона уровня секции идентифицировали *Alternaria* sect. *Alternaria* D.P. Lawr., Gannibal, Peever et B.M. Pryor, *Alternaria* sect. *Infectoriae* Woudenb. et Crous. До уровня рода идентифицировали *Boeremia* Aveskamp, Gruyter et Verkley, *Chaetomium* Kunze, *Cladosporium* Link., *Colletotrichum* Corda, *Coniothyrium* Corda, *Curvularia* Boedijn, *Diaporthe* Nitschke, *Epicoccum* Link., *Penicillium* Link., *Pestalotiopsis* Steyaert, *Sordaria* Ces. et De Not, *Trichoderma* Pers. Кроме того, часть изолятов была идентифицирована только до уровня семейства *Didymellaceae*.

Также идентифицировали грибы из двух родов базидиомицетов – *Rhizoctonia* DC. и *Sporotrichum* Link., относящихся к порядкам *Cantharellales* и *Polyporales* и семействам *Ceratobasidiaceae* и *Fomitopsidaceae*, соответственно.

Всего 31 изолят из групп, надежное определение которых на настоящий момент рекомендуется осуществлять по молекулярно-генетическим признакам (роды *Colletotrichum*, *Diaporthe*, представители *Didymellaceae*, вид *F. avenaceum*), был изучен с применением методов молекулярной идентификации. В результате проведенного анализа установлена видовая принадлежность 30 штаммов, идентификация одного осуществлена до рода.

В мультилокусный анализ нуклеотидных последовательностей трех локусов семи наших изолятов *Diaporthe* были включены последовательности 58 референсных штаммов *Diaporthe*, составляющих комплекс видов *D. eres*, в качестве внешней группы взят штамм *D. citri* F.A. Wolf (AR3405). После проведения выравнивания, матрицы каждого штамма, используемые для реконструкции филогении, имели длину 1418 оснований (394 – *TUB*, 290 – *TEF*, 734 – *apn2*), число вариабельных сайтов составляло 265 (18.7%). Топология филограмм, построенных разными методами и на основании последовательностей каждого локуса в отдельности совпадала с топологией комбинированной филограммы. Участки ITS-локуса были проанализированы, но не включены в филогенетический анализ из-за низкой информативности. Филогенетическое дерево, сконструированное в результате анализа последовательностей трех локусов с применением метода ML, приведено на рисунке 2. Все наши штаммы *Diaporthe* кластеризовались в пределах комплекса видов *D. eres*. Два штамма MF-Vm17-013, MF-Vm17-029 формировали одну кладу со штаммом *D. pulla* Nitschke (CBS 338.89). Остальные пять штаммов (MF-Vm17-001, MF-Vm17-008, MF-Vm17-009, MF-Vm17-019, MF-Vm17-030) формировали субклады в пределах вида *D. eres*.

Для видов родов представителей семейства *Didymellaceae* осуществлено мультилокусное секвенирование нуклеотидных последовательностей трех таксономически информативных фрагментов. В анализ включены последовательности 10 наших изолятов представителей семейства *Didymellaceae* и 25 референсных штаммов, в качестве внешней группы взят штамм *Macroventuria anomochaeta* AA (CBS 525.71). После проведения выравнивания, матрицы каждого штамма, используемые для реконструкции филогении, имели длину 1333 оснований (454 – ITS, 289 – *TUB*, 590 – *RPB2*), число вариабельных сайтов составляло 298 (22.5%). Топология филограмм, построенных разными методами и на основании последовательностей каждого локуса в отдельности совпадала с топологией комбинированной филограммы. Филогенетическое дерево, сконструированное в результате анализа последовательностей трех локусов с применением метода ML, приведено на рис. 3.

Восемь штаммов (MF-Vm17-010, MF-Vm17-012, MF-Vm17-015, MF-Vm17-016, MF-Vm17-017, MF-Vm17-018, MF-Vm17-028, MF-Vm17-039) кластеризовались в пределах клады, сформированной видами рода *Heterophoma* Qian Chen et L. Cai. Внутри этой клады семь штаммов формировали единую субкладу с типовым штаммом *Heterophoma sylvatica* (Sacc.) Qian Chen et L. Cai (CBS 874.97). Штамм MF-Vm17-039 формировал отдельную субкладу, не включающую референсные штаммы этого рода. Штамм MF-Vm17-006 входил в состав клады *Microsphaeropsis* Höhn., внутри которой был в одной субкладе с репрезентативным штаммом *Microsphaeropsis olivacea* (Bonord.) Höhn. (CBS 233.77). Штамм MF-Vm17-035 располагался в кладе с ре-

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности референсных видов и штаммов грибов, использованные для реконструкции молекулярной филогении

Вид гриба	№ штамма	Номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank						
		ITS	LSU	*ACT*	*apn2*	*TEF*	*TUB*	*RPB2*
Alloconiothyrium aptrootii	CBS 981.95	JX496122	–	–	–	–	JX496461	–
Boeremia exigua	CBS 101150	GU237715	–	–	–	–	GU237495	KT389568
”	MF 010-037	MF065726	–	–	–	–	MF065770	MT293559
”	MF 010-039	MF065727	–	–	–	–	MF065771	MT293560
”	MF 010-065	MF065732	–	–	–	–	MF065775	MT293564
”	MF 010-071	MF065736	–	–	–	–	MF065777	MT293573
”	MF 010-076	MF065738	–	–	–	–	MF065779	MT293567
”	CBS 100354	GU237711	–	–	–	–	GU237506	KT389577
B. heteromorpha	CBS 443.94	GU237866	–	–	–	–	GU237497	KT389573
B. linicola	CBS 116.76	GU237754	–	–	–	–	GU237500	KT389574
B. lycopersici	CBS 378.67	GU237848	–	–	–	–	GU237512	KT389580
B. opuli	LC 8118	KY742046	–	–	–	–	KY742288	KY742134
B. populi	CBS 100167	GU237707	–	–	–	–	GU237501	MT018058
B. trachelospermi	CGMCC 3.18222; LC 8105	KY064028	–	–	–	–	KY064051	KY064033
Colletotrichum acerbum	CBS 128530	JQ948459	–	JQ949780	–	–	JQ950110	–
C. australe	CBS 116478	JQ948455	–	JQ949776	–	–	JQ950106	–
C. godetiae	CBS 133.44	JQ948402	–	JQ949723	–	–	JQ950053	–
C. johnstonii	CBS 128532	JQ948444	–	JQ949765	–	–	JQ950095	–
C. kinghornii	CBS 198.35	JQ948454	–	JQ949775	–	–	JQ950105	–
C. phormii	CBS 118194	JQ948446	–	JQ949767	–	–	JQ950097	–
C. pyricola	CBS 128531	JQ948445	–	JQ949766	–	–	JQ950096	–
C. rhombiforme	CBS 129953	JQ948457	–	JQ949778	–	–	JQ950108	–
C. salicis	CBS 607.94	JQ948460	–	JQ949781	–	–	JQ950111	–
”	CBS 465.83	JQ948468	–	JQ949789	–	–	JQ950119	–
Diaporthe alleghaniensis	CBS 495.72	–	–	–	KJ380963	KC343733	KC343975	–
D. alnea	CBS 146.46	–	–	–	KJ380969	KC343734	KC343976	–
”	LCM22B.02b	–	–	–	KJ380972	KJ210558	KJ420826	–
”	CBS159.47	–	–	–	KJ380970	KC343735	KC343977	–
”	LCM22B.02a	–	–	–	KJ380971	KJ210557	KJ420825	–
D. bicincta	CBS 121004	–	–	–	KJ380976	KC343860	KC344102	–

Таблица 2. Продолжение

Вид гриба	№ штамма	Номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank						
		ITS	LSU	*ACT*	*apn2*	*TEF*	*TUB*	*RPB2*
D. celastrina	CBS 139.27	–	–	–	KJ380974	KC343773	KC344015	–
D. citri	AR3405	–	–	–	KJ380981	KC343778	KC344020	–
D. eres	AR5193	–	–	–	KJ380958	KJ210550	KJ420799	–
”	AR5196	–	–	–	KJ380932	KJ210554	KJ420817	–
”	DP0438	–	–	–	KJ380935	KJ210553	KJ420816	–
”	LCM11401a	–	–	–	KJ380919	KJ210545	KJ420787	–
”	FAU483	–	–	–	KJ380933	JQ807422	KJ420827	–
”	DAN001A	–	–	–	KJ380914	KJ210540	KJ420781	–
”	DAN001B	–	–	–	KJ380915	KJ210541	KJ420782	–
”	AR5197	–	–	–	KJ380931	KJ210552	KJ420812	–
”	AR3519	–	–	–	KJ380922	JQ807410	KJ420789	–
”	FAU570	–	–	–	KJ380926	JQ807354	KJ420794	–
”	AR3723	–	–	–	KJ380941	JQ807351	KJ420793	–
”	AR3560	–	–	–	KJ380939	KJ210551	KJ420795	–
”	AR5224	–	–	–	KJ380961	KJ210555	KJ420802	–
”	AR5231	–	–	–	KJ380936	KJ210549	KJ420818	–
”	AR5223	–	–	–	KJ380938	KJ210549	KJ420830	–
”	DLR12a	–	–	–	KJ380916	KJ210543	KJ420783	–
”	AR4347	–	–	–	KJ380929	JQ807359	KJ420805	–
”	AR4355	–	–	–	KJ380942	JQ807364	KJ420797	–
”	AR4367	–	–	–	KJ380962	JQ807355	KJ420824	–
”	AR4348	–	–	–	KJ380952	JQ807415	KJ420811	–
”	AR3669=MAFF 625029	–	–	–	KJ380930	JQ807416	KJ420808	–
”	DP0591	–	–	–	KJ380946	JQ807366	KJ420821	–
”	AR4369	–	–	–	KJ380953	JQ807384	KJ420813	–
”	DP0180	–	–	–	KJ380928	JQ807383	KJ420804	–
”	DP0179	–	–	–	KJ380944	JQ807394	KJ420803	–
”	AR4371	–	–	–	KJ380927	JQ807408	KJ420796	–
”	CBS 113470	–	–	–	KJ380956	KC343872	KC344114	–
”	AR4374	–	–	–	KJ380943	JQ807369	KJ420785	–

Таблица 2. Продолжение

Вид гриба	№ штамма	Номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank						
		ITS	LSU	*ACT*	*apn2*	*TEF*	*TUB*	*RPB2*
”	AR4357	–	–	–	KJ380949	JQ807360	KJ420806	–
”	DNP128	–	–	–	KJ380960	KJ210561	KJ420801	–
”	FAU532	–	–	–	KJ380934	JQ807408	KJ420815	–
”	AR5231	–	–	–	KJ380936	KJ210555	KJ420818	–
”	AR3671=MAFF625033	–	–	–	KJ380954	JQ807417	KJ420814	–
”	AR3672=MAFF625034	–	–	–	KJ380937	JQ807418	KJ420819	–
”	AR3670=MAFF625030	–	–	–	KJ380950	JQ807416	KJ420807	–
”	AR4373	–	–	–	KJ380957	JQ807368	KJ420798	–
”	AR4346	–	–	–	KJ380955	JQ807355	KJ420823	–
”	DP0590	–	–	–	KJ380951	JQ807394	KJ420810	–
”	AR3538=CBS 109767	–	–	–	KJ380940	KC343801	KC344043	–
”	DNP129	–	–	–	KJ380959	KJ210560	KJ420800	–
”	CBS587.79	–	–	–	KJ380975	KC343879	KC344121	–
”	AR4349	–	–	–	KJ380947	JQ807358	KJ420822	–
”	AR4363	–	–	–	KJ380948	JQ807362	KJ420809	–
D. helicis	AR5211=CBS 138596	–	–	–	KJ380977	KJ210559	KJ420828	–
D. neilliae	CBS 144. 27	–	–	–	KJ380973	MH121567	KC344112	–
D. pulla	CBS 338.89	–	–	–	KJ380978	JQ807380	KC344120	–
D. vaccinii	DF5032=CBS 135436	–	–	–	KJ380964	JQ807413	KC843225	–
”	FAU468	–	–	–	KJ380965	JQ807399	KC843227	–
”	FAU446	–	–	–	KJ380967	JQ807398	KC843224	–
”	CBS160.32	–	–	–	KJ380968	KC343954	KC344196	–
Heterophoma adonidis	CBS 114309; UPSC 2982	KT389506	–	–	–	–	KT389803	MT018057
H. nobilis	CBS 507.91; PD 74/148	GU237877	–	–	–	–	GU237603	KT389638
H. poolensis	CBS 253.38	MN973475	–	–	–	–	MT005574	MT018054
H. sylvatica	CBS 874.97; PD 93/764	GU237907	–	–	–	–	GU237662	MT018052
H. verbascicola	CGMCC 3.18364; LC 8163	KY742119	–	–	–	–	KY742361	KY742187
H. novae-verbascicola	CBS 127.93; PD 92/347	GU237774	–	–	–	–	GU237639	MT018051
Kalmusia longispora	CBS 582.83	JX496097	–	–	–	–	JX496436	–
”	CBS 824.84	JX496115	–	–	–	–	JX496454	–

Таблица 2. Окончание

Вид гриба	№ штамма	Номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank						
		ITS	LSU	*ACT*	*apn2*	*TEF*	*TUB*	*RPB2*
K. variispora	CBS 121517	JX496030	–	–	–	–	JX496369	–
K. variispora	CBS 197.82	JX496053	–	–	–	–	JX496392	–
Macroventuria anomochaeta	CBS 525.71	GU237881	–	–	–	–	GU237544	GU456346
Microsphaeropsis fusca	CBS 116669	MN973572	–	–	–	–	MT005675	MT018219
M. olivacea	CBS 233.77	GU237803	–	–	–	–	GU237549	MT018217
M. taxicola	CBS 442.83	GU237865	–	–	–	–	GU237547	MT018211
M. viridis	CBS 639.80	MN973564	–	–	–	–	MT005667	MT018208
M. proteae	CBS 111303; STE-U 1423	JN712495	–	–	–	–	MT005677	MT018221
Neocucurbitaria cava	CBS 257.68	MH859129	–	–	–	–	KT389844	–
N. cava	CBS 115979	MH862993	–	–	–	–	LT623234	–
”	CBS 143400	MH107903	–	–	–	–	MH108046	–
N. citisisicola	CBS 142402	NR_156357	–	–	–	–	MF795900	–
N. juglandicola	CBS 142390	NR_156358	–	–	–	–	MF795901	–
N. hakeae	CPC28920	KY173436	–	–	–	–	KY173613	–
N. populi	CBS 142393	NR_156359	–	–	–	–	MF795902	–
Sporocadus cornicola	CBS 143889	MH554121	MH554326	–	–	–	–	–
S. cotini	CBS 139966	MH554003	MH554222	–	–	–	–	–
S. lichenicola	NBRC 32680	AB594806	AB593739	–	–	–	–	–
”	MFLUCC:14-0052	KT005515	KT005514	–	–	–	–	–
”	CPC 24528	MH554127	MH554332	–	–	–	–	–
”	NBRC 32625	AB594794	AB593726	–	–	–	–	–
”	CBS 354.90	AB594803	AB593735	–	–	–	–	–
S. rosigena	CBS 116498	MH553983	MH554200	–	–	–	–	–
”	CBS 129166	MH553996	MH554215	–	–	–	–	–
”	CBS 182.50	MH554013	MH554233	–	–	–	–	–
”	CBS 466.96	MH554052	MH554265	–	–	–	–	–
S. sorbi	CBS 160.25	MH854829	MH866330	–	–	–	–	–

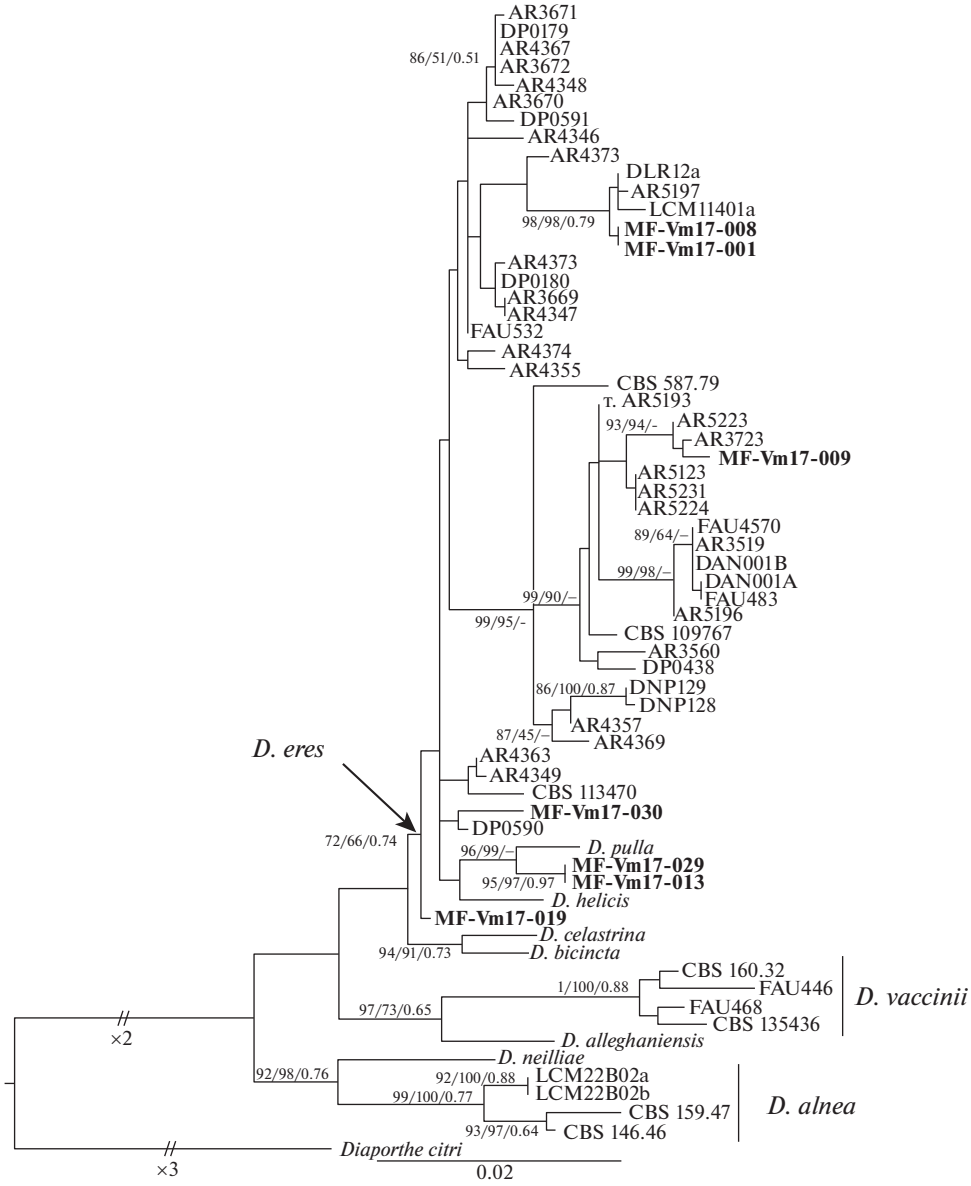

Рис. 2. Комбинированное филогенетическое древо комплекса видов *Diaporthe eres*, построенное методом ML, основанное на нуклеотидных последовательностях *TUB*, *TEF*, *apn2*. Числовые значения бутстреп-поддержки, полученные методами ML, MP и BPP, приведены в узлах ветвей филограммы, соответственно. Номера исследованных штаммов выделены полужирным.

презентативными штаммами *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter et Verkley.

В мультилокусный анализ видов рода *Colletotrichum* включены последовательности двух наших изолятов и 10 референсных штаммов, в качестве внешней группы взят штамм *Colletotrichum godetiae* Neerg. (CBS 133.44). После проведения выравнивания, матрицы каждого штамма, используемые для реконструкции филогении, имели длину 1220 оснований (538 – ITS, 461 – *TUB*, 221 – *ACT*), число вариабельных сайтов составляло 88 (7.2%). Участки гена *TEF* были проанализированы, но не включены в филогенетический анализ. Топология филограмм, построенных разными методами и на основании последовательностей каждого локуса в отдельности и комбинированная совпадали. Филогенетическое дерево, сконструированное в результате анализа последовательностей трех локусов с применением метода ML, приведено на рис. 4. Два исследованных штамма *Colletotrichum* (MF-Vm17-043, MF-Vm17-044) внутри комплекса видов *C. acutatum* J.H. Simmonds формировали единую кладу вместе со штаммами *C. salicis* (Fuckel) Damm, P.F. Cannon et Crous, включая типовой штамм CBS 607.94.

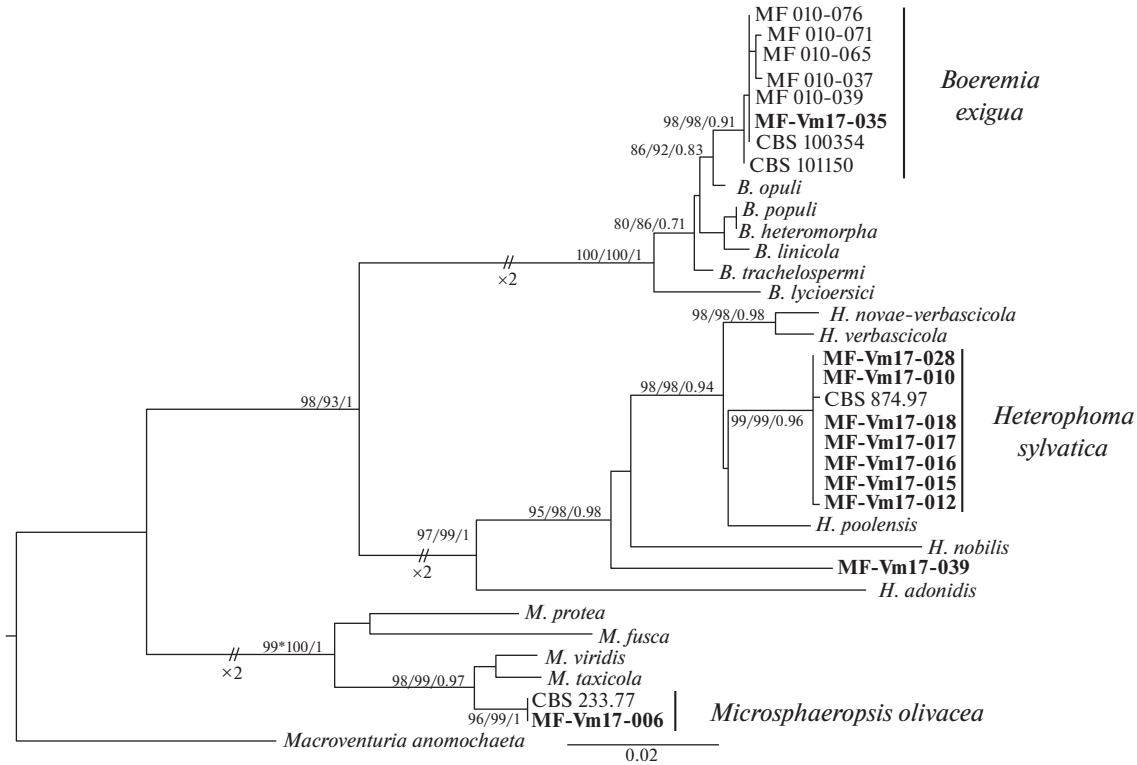

Рис. 3. Комбинированное филогенетическое древо семейства *Didymellaceae* (роды *Boeremia*, *Heterophoma*, *Microsphaeropsis*), построенное методом ML, основанное на нуклеотидных последовательностях ITS, *TUB*, *RPB2*. Числовые значения бутстреп-поддержки, полученные методами ML, MP и BPP, приведены в узлах ветвей филограммы, соответственно. Номера исследованных штаммов выделены полужирным.

Вид рода *Sporocadus* идентифицирован в результате мультилокусного секвенирования нуклеотидных последовательностей двух фрагментов рДНК. В анализ включены последовательности одного нашего изолята MF-Vm17-047 и 11 референсных штаммов, в качестве внешней группы взят штамм *Sporocadus cornicola* (Wijayaw. et Camporesi) F. Liu, L. Cai et Crous (CBS 143889). После проведения выравнивания, матрицы каждого штамма, используемые для реконструкции филогении, имели длину 1304 оснований (515 – ITS, 789 – LSU), число вариабельных сайтов составляло 29 (2.2%). Топология филограмм, построенных разными методами и на основании последовательностей каждого локуса в отдельности и комбинированная совпадали. Филогенетическое дерево, сконструированное в результате анализа последовательностей двух локусов с применением метода ML, приведено на рис. 5. Исследованный штамм MF-Vm17-047 внутри рода *Sporocadus* формирует единую кладу вместе со штаммами *S. rosigena* F. Liu, L. Cai et Crous.

В анализ результатов мультилокусного секвенирования видов рода *Kalmusia* включены последовательности одного нашего изолята MF-Vm17-041 и пяти референсных штаммов. В качестве внешней группы взят штамм *Alloconiothyrium aptrootii* Verkley, Göker et Stielow (CBS 981.95). После проведения выравнивания, матрицы каждого штамма, используемые для реконструкции филогении, имели длину 856 оснований (457 – ITS, 399 – *TUB*), число вариабельных сайтов составляло 132 (15.4%). Топология филограмм, построенных разными методами и на основании последовательностей каждого локуса в отдельности и комбинированная, совпадали. Филогенетическое дерево, сконструированное в результате анализа последовательностей двух локусов с применением метода ML, приведено на рис. 6. Исследованный штамм MF-Vm17-041 внутри рода *Kalmusia* формирует единую кладу вместе со штаммами *Kalmusia longispora* (Verkley, Göker et Stielow) Ariyaw. et K.D. Hyde, включая типовой штамм CBS582.83.

Мультилокусное секвенирование двух фрагментов ДНК видов рода *Neocucurbitaria* проведено для одного нашего изолята MF-Vm17-040 и семи референсных штаммов, в качестве внешней группы взят штамм *Neocucurbitaria hakeae* (Crous) Valenz.-Lopez, Crous, Stchigel, Guarro et J.F. Cano (CPC28920). После проведения выравнивания, матрицы каждого штамма, используемые для реконструкции филогении, имели длину 810 оснований (491 – ITS, 319 – *TUB*), число вариабельных сайтов составляло 74 (9.1%). Топология фило-

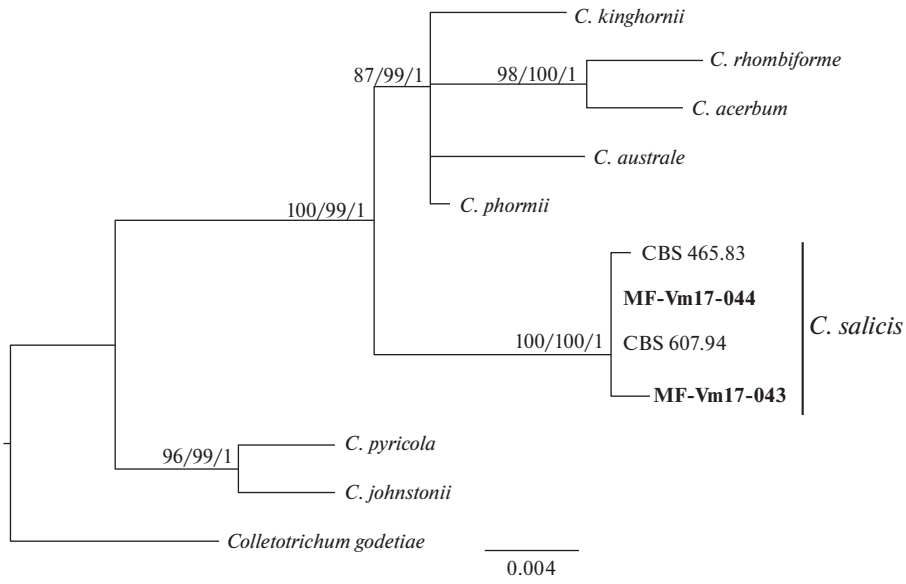

Рис. 4. Комбинированное филогенетическое древо видов *Colletotrichum*, построенное методом ML, основанное на нуклеотидных последовательностях ITS, *TUB*, *ACT*. Числовые значения бутстреп-поддержки, полученные методами ML, MP и BPP, приведены в узлах ветвей филограммы, соответственно. Номера исследованных штаммов выделены полужирным.

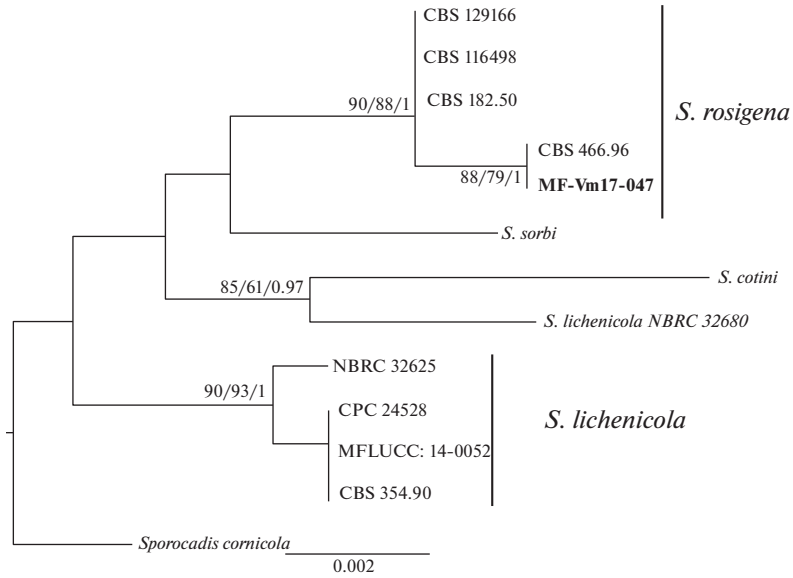

Рис. 5. Комбинированное филогенетическое древо видов *Sporocadus*, построенное методом ML, основанное на нуклеотидных последовательностях ITS и *LSU*. Числовые значения бутстреп-поддержки, полученные методами ML, MP и BPP, приведены в узлах ветвей филограммы, соответственно. Номера исследованных штаммов выделены полужирным.

грамм, построенных разными методами и на основании последовательностей каждого локуса в отдельности и комбинированная, совпадали. Филогенетическое дерево, сконструированное в результате анализа последовательностей двух локусов с применением метода ML, приведено на рис. 7. Исследованный штамм MF-Vm17-040 внутри рода *Neocucurbitaria* формировал единую кладу вместе со штаммами *N. cava* (Schulzer) Valenz.-Lopez, Crous, Stchigel, Guarro et J.F. Cano, включая типовой штамм CBS 257.68.

На основании нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *TEF* девяти штаммов *Fusarium*, предварительно отнесенных к *Fusarium avenaceum* по морфологическим признакам, показано наибольшее сходство (100%) со штаммом *F. avenaceum* BRIP:64445 (KU529161), выделенным из пиретрума, собранного в Австралии.

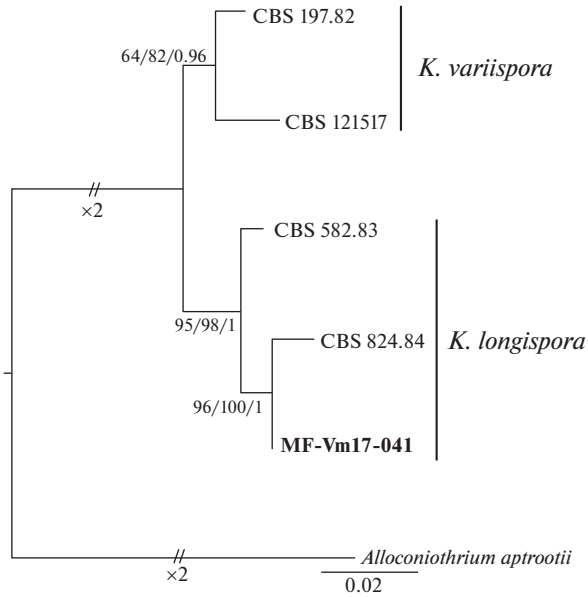

Рис. 6. Комбинированное филогенетическое древо видов *Kalmusia,* построенное методом ML, основанное на нуклеотидных последовательностях ITS и *TUB*. Числовые значения бутстреп-поддержки, полученные методами ML, MP и BPP, приведены в узлах ветвей филограммы, соответственно. Номера исследованных штаммов выделены полужирным.

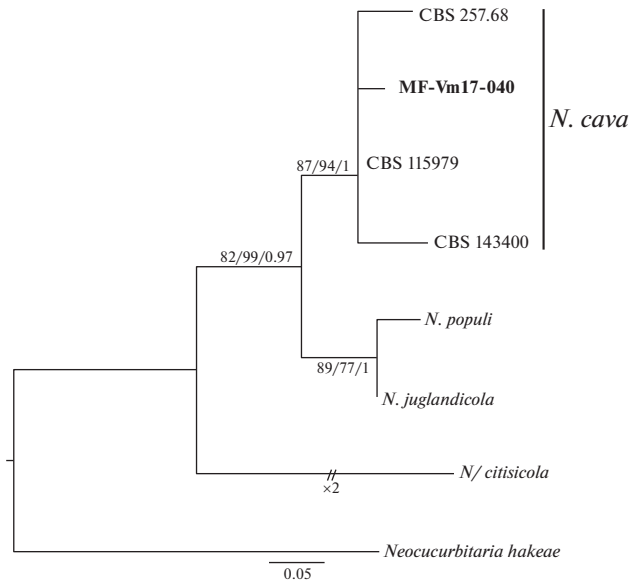

Рис. 7. Комбинированное филогенетическое древо видов *Neocucurbitaria,* построенное методом ML, основанное на нуклеотидных последовательностях ITS и *TUB*. Числовые значения бутстреп-поддержки, полученные методами ML, MP и BPP, приведены в узлах ветвей филограммы, соответственно. Номера исследованных штаммов выделены полужирным.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований коллекции штаммов грибов, выделенных из пораженных листьев и стеблей черники, по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам нами идентифицировано 12 видов грибов: *Boeremia exigua*, *Colletotrichum salicis*, *Diaporthe eres*, *D. pulla*, *Fusarium avenaceum*, *F. incarnatum, F. sporotrichioides*, *Heterophoma sylvatica*, *Kalmusia longispora*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Neocucurbitaria cava*, *Sporocadus rosigena*. Были выявлены грибы из двух секций рода *Alternaria*: *Alternaria* и *Infectoriae*. Кроме того, показано, что на растениях черники, растущей на северо-западе Европы, могут развиваться представители относящиеся, как минимум, к 21 роду грибов из двух отделов, 10 порядков, 15 семейств. Помимо вышеперечисленных родов грибов, обнаружены микромицеты из родов *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Sordaria*, *Trichoderma*.

Все выделенные из черники штаммы *Diaporthe* идентифицированы как представители комплекса видов *Diaporthe eres*. Известно, что этот гриб является весьма полиморфным и филогенетически гетерогенным, его представители могут быть ассоциированы с разными. Нуклеотидные последовательности ITS-локуса оказались неинформативными для реконструкции филогении в этой группе грибов, что было показано ранее (Udayanga et al., 2014). Поэтому они были депонированы в базу GenBank, но исключены из филогенетического анализа. Два штамма MF-Vm17-001, MF-Vm17-008 формировали субкладу в кладе, которую ранее трактовали, как вид *D. cotoneastri* (Punith.) Udayanga, Crous et K.D. Hyde. Штамм MF-Vm17-030 формировал отдельную субкладу, близкородственную кладам, которые ранее понимали, как виды *D. cotoneastri* и *D. nobilis* Sacc. et Speg. Штамм MF-Vm17-019 занимал на филогенетическом древе обособленное положение, формируя отдельную субкладу. В кладе, включающей штамм *D. eres* AR5193, являющийся эпитипом этого вида, оказался штамм MF-Vm17-009. В результате ревизии вида *D. eres* и видов, составляющих комплекс *D. eres*, выделение таких видов как *D. cotoneastri*, *D. nobilis* и других признано избыточным, и наименования этих таксонов синонимизировали с именем *D. eres* (Udayanga et al., 2014; Yang et al., 2018). Вероятно, это ожидает и вид *D. pulla*, который на филогенетических деревьях располагался среди штаммов *D. eres* и включал в состав формируемой им клады два штамма MF-Vm17-013 и MF-Vm17-029. На настоящий момент вид *D. pulla* еще является легитимным и эти штаммы, выделенные из черники, собранной в Санкт-Петербурге и Гатчинском р-не Ленинградской обл., согласно актуальным взглядам на филогению комплекса видов *D. eres* являются видом *D. pulla*. Входящий в список карантинных объектов Евразийского экономического союза, вид *D. vaccinii*, который также входит в состав комплекса видов *D. eres* нами обнаружен не был.

Гриб *Colletotrichum acutatum*, также входящий в единый перечень карантинных объектов, среди исследованных штаммов нами обнаружен не был. Два штамма *Colletotrichum* MF-Vm17-043, MF-Vm17-044 идентифицированы, как *C. salicis*. Этот микромицет входит в состав комплекса видов *C. acutatum*. Данный гриб не имеет узкой субстратной специализации и может быть ассоциирован с растениями разных семейств, однако, считается, что чаще он развивается на древесных растениях. Помимо разных видов ивы, из которых часто выделяют этот вид гриба, известны его штаммы из клена, араукарии, яблони, тополя, груши, томата и клубники (Cunnington et al., 2007; Pennycook, 1989; Guerber et al., 2003; Gadgil, 2005; Sun et al., 2011; Mulenko et al., 2008; Damm et al., 2012). Распространен *C. salicis* на территории стран Европы, в США, Австралии и Новой Зеландии, но в России этот гриб выявлен нами впервые.

Корректная и достоверная идентификация карантинных вредоносных видов *Diaporthe vaccinii* и *Colletotrichum acutatum* только на основании морфологических признаков невозможна и требует молекулярно-филогенетического анализа. Выявление и идентификацию этих грибов следует проводить в соответствии с современными взглядами на биоразнообразие и таксономию этих микромицетов.

Опубликованной информации о выявлении грибов *Fusarium* на чернике нами не обнаружено. Однако на культурных посадках голубики (*Vaccinium corymbosum*) виды *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Pérez et al., 2007), *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach et Nirenberg (Pérez et al., 2011), *F. oxysporum* Schltdl. (Moya-Elizondo et al., 2019) приводили к корневой гнили и увяданию растений, а *F. acuminatum* Ellis et Everh. вызывал некрозы стеблей (Wright et al., 2014). В проведенных исследованиях идентифицировано три вида: *F. avenaceum*, *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides*, среди которых *F. avenaceum* встречался повсеместно на несущих симптомы растениях. По всей видимости, это первое упоминание видов грибов *Fusarium* на чернике.

Считается, что вид *Heterophoma sylvatica*, к которому относятся семь исследованных штаммов, широко распространен в Европе на растениях семейства *Scrophulariaceae* и встречается также в ассоциации с корнями растений семейства *Poaceae* (Boerema et al., 2004). Нами этот вид впервые был выделен из черники, собранной во Всеволожском и Ломоносовском р-нах Ленинградской области. Несмотря на то, что для реконструкции молекулярной филогении штаммов *Heterophoma* в анализ были включены все шесть известных на настоящий момент видов этого рода, штамм MF-Vm17-039, выделенный из стеблей черники, собранной в Лужском районе Ленинградской обл. не входит в состав ни одной из клад, сформированной каждым видом, а формирует отдельную кладу. Таким образом, вероятно, этот штамм *Heterophoma* sp. является новым для науки видом этого рода.

Микромицет *Microsphaeropsis olivacea* (штамм MF-Vm17-006) был выявлен на многих растениях разных семейств, как сапротроф или эндофит (Hormazabal et al., 2014), в редких случаях, как фитопатоген (Razaghi, Zafari, 2016) или патоген, вызывающий микозы человека с ослабленным иммунитетом (Guarro et al., 1999). Данный вид впервые обнаружен на территории России – штамм выделен из черники, собранной в Лужском р-не.

Гриб *Kalmusia longispora* также выявлен на территории России впервые, штамм этого гриба MF-Vm17-041 выделен из черники, собранной на территории Санкт-Петербурга. До настоящего момента этот гриб был выделен из омелы (*Arceuthobium pusillum* Peck.) с территории Канады и из листьев пшеницы с симптомами пятнистости в Германии (Verkley et al., 2014).

Штамм MF-Vm17-040, который идентифицирован, как гриб *Neocucurbitaria cava* является первой находкой этого микромицета в России, он выявлен в Ломоносовском районе Ленинградской области. Это гриб известен как почвенный сапроторф или эндофит, ассоциированный преимущественно с древесными растениями или кустарниками (de Gruyter et al., 2010, Jaklitsch et al., 2018).

Sporocadus rosigena описан на территории Италии как сапротроф с мертвых иголок розы (Wanasinghe et al., 2018), впоследствии этот гриб также выявляли на растениях других семейств с территории других стран Европы и в Иране (Liu et al., 2019). Нами штамм этого гриба MF-Vm17-047 был впервые обнаружен на чернике, собранной на территории Финляндии.

Полученные результаты позволяют предварительно оценить биоразнообразие микромицетов на чернике, собранной на территории северо-запада России и в Финляндии. Для более детальной оценки, несомненно, необходим многолетний мониторинг и расширение географии сбора образцов, а также дальнейшие исследования, с включением в молекулярно-генетический анализ бóльшего числа штаммов.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР О.П. Гавриловой и И.А. Казарцеву за помощь со сбором пораженных растений черники. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-76-30005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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 in Genetics. 1995. V. 11(1). P. 8.
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

Cunnington J.H., Powney R.A., Adair R.J. et al. Glomerella miyabeana on willows in Australia. Austral. Mycol. 2007. V. 25. P. 69–72.

Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. Stud. Mycol. 2012. V. 73. P. 1–36.
https://doi.org/10.3114/sim0002

de Gruyter J.D., Woudenberg J.H.C., Aveskamp M.M. et al. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma, Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. Mycologia. 2010. V. 102. P. 1066–1081.
https://doi.org/10.3852/09-240

Dingley J.M., Gilmour J.W. Colletotrichum acutatum Simmds. f. sp. *pineum* associated with terminal crook disease of *Pinus* spp. N. Z. J. For. Sci. 1972. V. 2. P. 192–201.

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

Elfar K., Torres R., Díaz G.A. et al. Characterization of *Diaporthe australafricana* and *Diaporthe* spp. associated with stem canker of blueberry in Chile. Plant Dis. 2013. V. 97. P. 1042–1050.
https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1030-RE

Eurasian economic commission council decision. On approval of the common list of quarantine pests of the Eurasian Economic Union. 30.11.2016. No. 158. Moscow, 2016.

Farr D.F., Castlebury L.A., Rossman A.Y. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. Mycologia. 2002a. V. 94. P. 494–504.
https://doi.org/10.2307/3761783

Farr D.F., Castlebury L.A., Rossman A.Y. et al. A new species of *Phomopsis* causing twig dieback of *Vaccinium vitis-idaea* (lingonberry). Mycol. Res. 2002b. V. 10. P. 745–752.
https://doi.org/10.1017/S095375620200583X

Gadgil P.D. Fungi on trees and shrubs in New Zealand. In: *Z.Y. Gao, J. Gan* (eds). Fungi of New Zealand Volume 4. Fungal Diversity Press, Hong Kong, 2005. P. 437.

Gao Y., Liu F., Duan W. et al. Diaporthe is paraphyletic. IMA fungus. 2017. V. 8 (1). P. 153–187.
https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.01.11

Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 1993. V. 2. P. 113–118.
https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x

Garrido C., Carbú M., Fernández-Acero F.J. et al. Phylogenetic relationships and genome organisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. Eur. J. Plant Pathol. 2009. V. 125. P. 397–411.
https://doi.org/10.1007/s10658-009-9489-0

Gerlach W., Nirenberg H. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch. Berlin, Dahlem, 1982. 406 p.

Gomes R.R., Glienke C., Videira S.I.R. et al. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia. 2013. V. 31. P. 1–41.
https://doi.org/10.3767/003158513X666844

Guarro J., Mayayo E., Tapiol J. et al. Microsphaeropsis olivacea as an etiological agent of human skin infection. Med. Mycol. 1999. V. 37(2). P. 133–137.
https://doi.org/10.1080/02681219980000211

Guerber J.C., Liu B., Correll J.C., Johnston P.R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. Mycologia. 2003. V. 95. P. 872–895.
https://doi.org/10.2307/3762016

Hilário S., Amaral I.A., Gonçalves M.F.M. et al. Diaporthe species associated with twig blight and dieback of *Vaccinium corymbosum* in Portugal, with description of four new species. Mycologia. 2020. V. 112 (2). P. 293–308.
https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1698926

Hormazabal E., Astudillo L., Schmeda-Hirschmann G. et al. Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea*, an endophytic fungus of *Pilgerodendron uviferum*. Z. Naturforsch. 2014.
https://doi.org/10.1515/znc-2005-1-203

Jaklitsch W.M., Checa J., Blanco M.N. et al. A preliminary account of the *Cucurbitariaceae*. Stud. Mycol. 2018. V. 90. P. 71–118.
https://doi.org/doi.org/10.1016/j.simyco.2017.11.002

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

Latorre B.A., Elfar K., Espinoza J.G. et al. First report of *Diaporthe australafricana* associated with stem canker on blueberry in Chile. Plant Dis. 2012. V. 96. P. 768.
https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1025-PDN

Lee D.H., Kim D.H., Jeon Y.A. et al. Molecular and cultural characterization of *Colletotrichum* spp. causing bitter rot of apples in Korea. Plant Pathol. 2007. V. 23. P. 37–44.
https://doi.org/10.5423/PPJ.2007.23.2.037

Liu F., Bonthond G., Groenewald J.Z. et al. Sporocadaceae, a family of coelomycetous fungi with appendagebearing conidia. Stud. Mycol. 2019. V. 92. P. 287–415.
https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.11.001

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

Lombard L., van Leeuwen G., Guarnaccia V. et al. Diaporthe species associated with *Vaccinium*, with specific reference to Europe. Phytopathol. Mediterr. 2014. V. 53 (2). P. 287–299.
https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14034

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): e29903. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029903

Michalecka M., Bryk H., Seliga P. Identification and characterization of *Diaporthe vaccinii* Shear causing upright dieback and viscid rot of cranberry in Poland. Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 148. P. 595–605. https://doi.org/10.1007/s10658-016-1114-4

Morochkovskiy S.F., Zerova M.Ya., Lavitskaya Z.G. et al. Opredelitel gribov Ukrainy tom 2. Naukova dumka, Kiev, 1969 (in Russ.).

Moya-Elizondo E.A., Doussoulin H., San Martin J. et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing Fusarium wilt on blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Chile. Plant Dis. 2019. V. 103 (10). P. 2669. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0275-PDN

Mułenko W., Majewski T., Ruszkiewicz-Michalska M. A preliminary checklist of micromycetes in Poland. W. Szafer Institute of Botany. Polish Academy of Sciences, 2008. P. 1–752.

Naraouei-Khandan H.A., Harmon C.L., Harmon P. et al. Potential global and regional geographic distribution of *Phomopsis vaccinii* on *Vaccinium* species projected by two species distribution models. Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 148. P. 919–930. https://doi.org/10.1007/s10658-017-1146-4

O'Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non orthologous. Mol. Phylogenetics Evol. 1997. V. 7. P. 103–116. https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376

Pennycook S.R. Plant diseases recorded in New Zealand Vol. 3. Plant Diseases Division, DSIR, New Zealand, Auckland, 1989.

Pérez B.A., Berretta M.F., Carrión E. et al. First report of root rot caused by *Fusarium proliferatum* on blueberry in Argentina. Plant Dis. 2011. V. 95(11). P. 1478. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0307

Pérez B.A., Murillo F., Divo de Sesar M. et al. Occurrence of *Fusarium solani* on blueberry in Argentina. Plant Dis. 2007. V. 91(8). P. 1053. https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1053C

Polashock J.J., Oudemans P.V., Caruso F.L. et al. Population structure of the North American cranberry fruit rot complex. Plant Pathol. 2009. V. 58. P. 1116–1127. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02120.x

Razaghi P., Zafari D. First report of *Microsphaeropsis olivacea* causing brown spine rot on *Alhagi maurorum* in Iran. J. Plant Pathol. 2016. V. 98 (3). P. 677–697. https://doi.org/10.4454/JPP.V98I2.044

Rehner S.A., Samuels G.J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Mycol. Res. 1994. V. 98. P. 625–634. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80409-7

Rehner S.A., Buckley E.A. Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycologia. 2005. V. 97. P. 84–98. https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842

Saleh A.A., Leslie J.F. Cephalosporium maydis is a distinct species in the *Gaeumannomyces–Harpophora* species complex. Mycologia. 2004. V. 96 (6). P. 1294–1305. https://doi.org/10.2307/3762146

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. et al. Introduction to food-and airborne fungi. 6th edition. Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht, 2000.

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

Santos L., Alves A., Alves R. Evaluating multi-locus phylogenies for species boundaries determination in the genus *Diaporthe*. PerrJ. 2017. V. 5. P. 1–26. https://doi.org/10.7717/peerj.3120

Simmonds J.H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland J. Agric. Anim. Sci. 1965. V. 22. P. 437–459.

Simmons E.G. Alternaria. An identification manual. CBS biodiversity series n 6. CBS fungal biodiversity centre, Utrecht, 2007.

Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics. 2006. V. 22. P. 2688–2690. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446

Sun X., Guo L.-D., Hyde K.D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. Fungal Diversity. 2011. V. 47. P. 85–95. https://doi.org/10.1007/s13225-010-0086-5

Sung G.-H., Sung J.-M., Hywel-Jones N.L. et al. A multigene phylogeny of *Clavicipitaceae* (*Ascomycota, Fungi*): identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. Mol. Phylogenetics Evol. 2007. V. 31. P. 1204–1223. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.011

Szamagara M. Biodiversity of fungi inhabiting the highbush blueberry stems. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. 2009. V. 8 (1). P. 37–50.

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

Udayanga D., Castlebury L.A., Rossman L.A. et al. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. Fungal Diversity. 2014. V. 64. P. 203–229. https://doi.org/10.1007/s13225-014-0297-2

Verkley G.J.M., Dukik K., Renfurm R. et al. Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (*Ascomycota*). Persoonia. 2014. V. 32. P. 25–51. https://doi.org/10.3767/003158514X679191

Vilka L., Volkova J. Morphological diversity of *Phomopsis vaccinii* isolates from Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) in Latvia. Proceedings of the Latvia University of agriculture. 2015. V. 3 (328). P. 8–18. https://doi.org/10.1515/plua-2015-0002

Wanasinghe D.N., Phukhamsakda C., Hyde K.D. et al. Fungal diversity notes 709–839: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa with an emphasis on fungi on *Rosaceae*. Fungal Diversity. 2018. V. 89. P. 1–236. https://doi.org/10.1007/s13225-018-0395-7

Wharton P.S., Schilder A.M.C. Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit. Plant Pathol. 2008. V. 57. P. 122–134. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01698.x

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* (eds). A guide to methods and Aapplications. San Diego, Academic Press, 1990. P. 315–322.

Wright E.R., Rivera M.C., Campanella E.R. et al. Fusarium branch blight on highbush blueberry in Argentina. Afr. J. Biotechnol. 2014. V. 13 (51). P. 4628–4634. https://doi.org/10.5897/AJB2014.14156

Yang Q., Fan X.-L., Guarnaccia V. et al. High diversity of *Diaporthe* species associated with dieback diseases in China, with twelve new species described. MycoKeys. 2018. V. 39. P. 97–149. https://doi.org/10.3897/mycokeys.39.26914

Морочковский С.Ф., Зерова М.Я., Левицкая З.Г. и др. (Morochkovskiy et al.) Определитель грибов Украины. Т. 2. Киев: Наукова думка, 1969. 517 с.

Biodiversity of fungi inhabiting blueberry growing in North-West Russia and Finland

M. M. Gomzhina[a,#], E. L. Gasich[a,##], T. Yu. Gagkaeva[a,###], and Ph. B. Gannibal[a,####]

[a]*All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

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

[##]*e-mail: elena_gasich@mail.ru*

[###]*e-mail: t.gagkaeva@mail.ru*

[####]*e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru*

Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) is regarded as economically important plant to Russia and Europe. Many fungal pathogens can occur on this plant and lead to significant yield losses. Among them the most harmful are *Diaporthe vaccinii* and *Colletotrichum acutatum* that were classified as quarantine organisms for the Eurasian Economy Union and European Union. Many fungi particularly from the genus *Diaporthe*, *Colletotrichum*, *Fusarium* showing similar symptoms on *Vaccinium myrtillus* stems and leaves. Due to coexistence of some fungal species on one host, diagnosis of the disease based only on symptoms is not reliable. Identification of fungi to species level based on morphology alone can be challenging, since there are a limited number of morphological characters that can be used. Confirmation of the pathogen identity is required molecular phylogenetic assesment. A higher level of confidence in the identification can be obtained by a multigene approach to phylogenetic analyses. The aim of this study was estimation of fungal biodiversity on wild bushs of *V. myrtillus* growing in North-West of Russia and Finland according to polyphasic approach to species identification including multilocus phylogenies and studying of morphological features. Sum total 17 leaves and stems of blueberry exhibiting symptoms of stem canker and leaf spots, collected in Saint Petersburg, five districts of Leningrad Region, Republic of Karelia and on the southwest Finland were analysed. As a result of identifying the fungal strains by morphological and molecular genetic characteristics, 12 species were associated with blueberry: *Boeremia exigua*, *Colletotrichum salicis*, *Diaporthe eres*, *D. pulla*, *Fusarium avenaceum*, *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides*, *Heterophoma sylvatica*, *Kalmusia longispora*, *Microsphaeropsis olivaceae*, *Neocucurbitaria cava*, *Sporocadus rosigena*. Morphological approach allowed to identify fungi from two section *Alternaria* and *Infectoriae* of genus *Alternaria* as well as from nine other genera (*Chaetomium*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Sordaria*, *Trichoderma*). As far as we know, this is the first report of *Colletotrichum salicis*, *Heterophoma sylvatica*, *Kalmusia longispora*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Neocucurbitaria cava* in Russia, as well *Sporocadus rosigena* was firstly found in Finland. *Fusraium avenaceum*, *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides* were firstly detected on *Vaccinium myrtillus.* Fungal species *Diaporthe vaccinii* and *Colletotrichum acutatum* with quarantine significance and are subject to phytosanitary controls on the territory of Eurasian Economic Union, were not found.

Keywords: anthracnose, blueberry, *Colletotrichum acutatum*, *Diaporthe vaccinii*, quarantine, molecular phylogeny, Phomopsis stem canker, *Vaccinium myrtillus*