

УДК 632.4.01/.08

UDC 632.4.01/.08

Грибные заболевания сои на Дальнем Востоке

* ДУДЧЕНКО И.П.¹, КУЗНЕЦОВА А.А.²,
ДУДЧЕНКО Г.Н.³, КОПИНА М.Б.⁴,
КОСТИН Н.К.⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150

¹ ORCID 0000-0003-0169-414X,
e-mail: dudchenko_irina@vniikr.ru

² ORCID 0000-0001-8443-2641, e-mail: kyyznec@bk.ru

³ e-mail: dudchenko_gennadiy@vniikr.ru

⁴ ORCID 0000-0002-1613-1764,
e-mail: Kopinamaria645@gmail.com

⁵ ORCID 0009-0003-8066-0753,
e-mail: kostinwork1@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Соя – одна из самых востребованных и рентабельных сельскохозяйственных культур в мире. Заболевания, вызываемые грибными патогенами, являются одним из основных факторов, ограничивающих ее производство. В статье приводится информация о заболеваниях сои, распространенных в России, и Дальневосточном регионе в частности. В 2022 г. сотрудниками ФГБУ «ВНИИКР» было проведено частичное обследование фитосанитарного состояния посадок сои в Амурской области. Обследование проводилось с целью определения видового состава возбудителей грибных заболеваний сои в условиях Дальнего Востока РФ и методов их идентификации. В результате исследований были выявлены грибные патогены, относящиеся к 14 видам, 9 родам, 7 семействам, 5 порядкам и 2 классам. Самыми многочисленными оказались представители рода *Fusarium* – 6 видов. Род *Colletotrichum* включил в себя 4 вида. Остальные 7 родов были представлены по 1 виду. Среди выделенных и идентифицированных патогенов наиболее вредоносными и экономически значимыми являются представители родов *Colletotrichum* и *Diaporthe*, вызывающие антракноз и рак сои. На растениях сои было одновременно обнаружено 3 возбудителя антракноза – *C. truncatum*, *C. incanum* и *C. sojae*, что в значительной степени может усложнить борьбу с этим заболеванием. Также на растениях сои были выявлены такие опасные и экспортно значимые для России виды, как *Diaporthe caulivora* и *Phomopsis longicolla*. При проведении исследования морфологических структур возбудителей был выявлен ранее неизвестный штамм *D. caulivora*, содержащий в цикле своего развития пикнидиальную стадию. При этом в пикнидах одновременно присутствовали как α -, так и β -споры. Результаты, полученные культурально-морфологическим методом, были подтверждены с помощью секвенирования нуклеотидных последовательностей по внутреннему транскрибируемому спейсеру ITS рибосомальной ДНК с дальнейшим сравнением их с эталонными последовательностями в Генбанке NCBI.

Fungal diseases of soybean in the Far East

* IRINA P. DUDCHENKO¹, ANNA A. KUZNETSOVA²,
GENNADY N. DUDCHENKO³, MARIA B. KOPINA⁴,
NIKITA K. KOSTIN⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIICR”), Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia, 140150

¹ ORCID 0000-0003-0169-414X,
e-mail: dudchenko_irina@vniikr.ru

² ORCID 0000-0001-8443-2641, e-mail: kyyznec@bk.ru

³ e-mail: dudchenko_gennadiy@vniikr.ru

⁴ ORCID 0000-0002-1613-1764,
e-mail: Kopinamaria645@gmail.com

⁵ ORCID 0009-0003-8066-0753,
e-mail: kostinwork1@gmail.com

ABSTRACT

Soybeans are one of the most required and profitable crops in the world. Diseases caused by fungal pathogens are one of the main factors limiting its production. The article provides information about soybean diseases common in Russia and the Far East region in particular, with the description of the course and the symptoms. In 2022, employees of FGBU “VNIICR” conducted a survey of the phytosanitary state of soybean plantings of the All-Russian Scientific Research Institute of Soybean in Amur Oblast. The survey was carried out to determine the species composition of pathogens of soybean fungal diseases in the conditions of the Far East of the Russian Federation and methods for their identification. As a result of the research, fungal pathogens belonging to 14 species, 9 genera, 7 families, 5 orders and 2 classes were detected. The most numerous were members of the genus *Fusarium* – 6 species. The genus *Colletotrichum* included 4 species. The rest 7 genera were represented by 1 species. Among the detected and identified pathogens, the most harmful and economically significant are representatives of the genera *Colletotrichum* and *Diaporthe*, causing anthracnose, canker and soybean phomopsis. Three anthracnose pathogens were simultaneously detected on soybean plants – *C. truncatum*, *C. incanum* and *C. sojae*, which can greatly complicate control of this disease. Also, such dangerous and export-significant species for Russia were detected on soybean plants, such as *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and *Phomopsis longicolla*. When conducting a study of the pathogens' morphological structures, a previously unknown *D. caulivora* strain was identified, containing a pycnidial stage in its development cycle. Moreover, both α - and β -spores were simultaneously present in the pycnidia. The results obtained by the cultural and morphological method were confirmed by sequencing nucleotide sequences using the internal transcribed spacer ITS of ribosomal DNA with further comparison with reference sequences in the NCBI GenBank.

Ключевые слова. Возбудители болезней сои, фитопатогенное состояние, листовые пятнистости, корневые гнили, *Colletotrichum incanum*, *Colletotrichum sojae*, *Colletotrichum truncatum*, *Diaporthe caulivora*, *Phomopsis longicolla*.

ВВЕДЕНИЕ



а последние 40 лет мировое производство сои увеличилось более чем на 400% (Линников, 2018). В истории еще ни одна культура не давала столь значимой прибавки. Из нишевой позиции соя превратилась в одну из самых востребованных и рентабельных агрокультур в мире.

Основная часть урожая идет на нужды животноводства – соевый жмых и шрот. По данным Росстата, в нашей стране этой культуре отведено 4,3% от общей площади, занимаемой сельхозкультурами, что составляет 3507 тыс. га (Рынок сои в 2022 г.). В 2022 г. в нашей стране был собран рекордный урожай сои – 5,8 млн тонн, однако это количество не покрывает всех потребностей народного хозяйства, и недостающие объемы приходится импортировать. После февраля 2022 г. в связи с введением санкций возможности и структура импорта существенно изменились. Поэтому для удовлетворения потребностей в соепродуктах необходимо, помимо увеличения посевных площадей, повышать урожайность сои и качество собираемого урожая, особенно его фитосанитарную составляющую, так как одной из основных причин, сдерживающих увеличение урожайности сои, является действие патогенных грибов, которые значительно сокращают урожай и ухудшают его качество.

Наиболее распространенными и вредоносными в условиях нашей страны являются такие заболевания сои, как антракноз, фузариоз, ризоктониоз и белая гниль. В годы с большим количеством осадков также проявляют себя септориоз, аскохитоз, пероноспороз, фомопсис и серая гниль.

Амурская область является традиционным районом выращивания сои, что обусловлено ее соседством с Китаем, который является родиной данной культуры и основным ее потребителем на мировом рынке. Целью проводимого исследования было определение видового состава возбудителей грибных заболеваний сои в условиях Дальнего Востока РФ, изучение их культурально-морфологических особенностей и методов идентификации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В августе 2022 г. сотрудниками ФГБУ «ВНИИКР» было проведено частичное обследование фитосанитарного состояния посадок сои в Амурской области. Во время обследования были собраны образцы листьев и стеблей сои с различными симптомами некрозов, пятнистостей и общего увядания.

Для лабораторных исследований были представлены 15 образцов растений сои, отдельные части которых были помещены в условия влажной

Key words. Pathogens of soybean diseases, phytopathogenic state, leaf spots, root rot, *Colletotrichum incanum*, *Colletotrichum sojae*, *Colletotrichum truncatum*, *Diaporthe caulivora*, *Phomopsis longicolla*.

INTRODUCTION



ver the past 40 years, global soybean production has increased by more than 400% (Linnikov, 2018). In history, no culture has ever given such a significant increase.

From a niche position, soybeans have become one of the most sought-after and profitable crops in the world. The main part of the crop goes to the needs of animal husbandry – soybean cake and meal. According to Rosstat, in Russia 4.3% of the total area occupied by agricultural crops is allocated to this crop, which is 3,507 thousand hectares (Soybean market in 2022). In 2022, Russia collected a record soybean harvest of 5.8 million tons, but this amount does not cover all the needs of the national economy, and the missing volumes have to be imported. The structure of imports has changed significantly due to the sanctions. Therefore, to meet the needs for soy products, it is necessary, in addition to increasing the sown area, to increase the soybean yield and the quality of the harvested crop, especially its phytosanitary component, since one of the main reasons hindering the increase in soybean yield is the action of pathogenic fungi, which significantly reduce the yield and worsen its quality.

The most common and harmful diseases in Russia are soybean diseases such as rhizoctoniosis, fusarium, anthracnose and white rot. In years with high precipitation, septoria, ascochitosis, downy mildew, phomopsis and gray rot also manifest themselves.

Amur Oblast is a traditional soybean growing area, due to its proximity to China, which is the birthplace of this crop and its main consumer on the world market. The purpose of the study was to determine the species composition of soybean fungal diseases pathogens in the Far East of the Russian Federation, study their cultural and morphological characteristics and identification methods.

MATERIALS AND METHODS

In August 2022, the researchers of FGBU “VNIKR” conducted a partial survey of the phytosanitary condition of soybean plantings in Amur Oblast. During the survey, samples of soybean leaves and stems were collected with various symptoms of necrosis, spotting and general wilting.

For laboratory study, 15 soybean plant samples were presented, individual parts of which were placed in a humid chamber. After sporulation appeared in the infected areas, spores with mycelium were

Табл. 1. Список выделенных изолятов грибов и их таксономическое положение

Table 1. List of fungal isolates and their taxonomic position

№	Вид Species	Род Genus	Семейство Family	Порядок Order	Класс Class
1	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Dothideomycetes
2	<i>Cercospora</i> sp.	<i>Cercospora</i>	Mycosphaerellaceae	Capnodiales	Dothideomycetes
3	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum</i>	Glomerellaceae	Glomerellales	Sordariomycetes
4	<i>Colletotrichum incanum</i>	<i>Colletotrichum</i>	Glomerellaceae	Glomerellales	Sordariomycetes
5	<i>Colletotrichum sojae</i>	<i>Colletotrichum</i>	Glomerellaceae	Glomerellales	Sordariomycetes
6	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Colletotrichum</i>	Glomerellaceae	Glomerellales	Sordariomycetes
7	<i>Diaporthe caulivora</i>	<i>Diaporthe</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	Sordariomycetes
8	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Epicoccum</i>	Didymellaceae	Pleosporales	Dothideomycetes
9	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium</i>	Nectriaceae	Hypocreales	Sordariomycetes
10	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium</i>	Nectriaceae	Hypocreales	Sordariomycetes
11	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i>	Nectriaceae	Hypocreales	Sordariomycetes
12	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium</i>	Nectriaceae	Hypocreales	Sordariomycetes
13	<i>Fusarium tricinctum</i>	<i>Fusarium</i>	Nectriaceae	Hypocreales	Sordariomycetes
14	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium</i>	Nectriaceae	Hypocreales	Sordariomycetes
15	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma</i>	Didymellaceae	Pleosporales	Dothideomycetes
16	<i>Phomopsis longicolla</i>	<i>Phomopsis</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	Sordariomycetes
17	<i>Verticillium albo-atrum</i>	<i>Verticillium</i>	Plectosphaerellaceae	Glomerellales	Incertae sedis

камеры. После появления на зараженных участках спороношения споры с мицелием переносили на питательные среды – КГА (картофельно-глюкозный агар) и СА (carrot agar) – для выделения чистых культур возбудителей. В результате пересевов было выделено 50 изолятов грибов. Наблюдения за развитием колоний выполнялись в течение 30 дней с учетом характеристик образующихся морфологических структур.

Первичная идентификация возбудителей проводилась с помощью культурально-морфологического анализа с применением методов световой микроскопии и морфометрии. Подтверждающая идентификация осуществлялась классической полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием универсальных праймеров ITS5/ITS4 (White et al., 1990) и дальнейшего секвенирования полученных нуклеотидных последовательностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований культурально-морфологическим методом было идентифицировано 14 возбудителей до вида и 3 возбудителя до рода (см. табл. 1).

Пять возбудителей были выделены одновременно из листьев и стеблей, остальные возбудители были локализованы либо в листьях, либо в стеблях (см. табл. 2).

Среди выделенных и идентифицированных патогенов самыми вредоносными и экономически значимыми являются представители родов *Colletotrichum* и *Diaporthe*, вызывающие антракноз, рак стеблей и бобов сои.

Культурально-морфологические особенности возбудителей антракноза сои рода *Colletotrichum*

Антракноз сои поражает все надземные органы. Весной из зараженных семян появляются всходы, на семядолях которых образуются вдавленные

transferred to nutrient media – PDA (potato dextrose agar) and CA (carrot agar) – to isolate pure cultures of pathogens. As a result of subcultures, 50 fungal isolates were isolated. Observations of the colonies development were carried out over 30 days, taking into account the characteristics of the resulting morphological structures.

Primary pathogen identification was carried out by cultural and morphological analysis using light microscopy and morphometry methods. Confirmatory identification was conducted by classical polymerase chain reaction (PCR) using universal primers ITS5/ITS4 (White et al., 1990) and further sequencing of the resulting nucleotide sequences.

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of research using the cultural and morphological method, 14 pathogens were identified to species and 3 pathogens to genus (see Table 1).

Five pathogens were isolated simultaneously from leaves and stems, the remaining pathogens were localized either in leaves or stems (see Table 2).

Among the isolated and identified pathogens, the most harmful and economically significant are representatives of the genera *Colletotrichum* and *Diaporthe*, causing anthracnose, soybean stems and beans canker.

Cultural and morphological characteristics of soybean anthracnose pathogens of the genus *Colletotrichum*

Soybean anthracnose affects all above-ground organs. In spring, seedlings emerge from infected seeds, on the cotyledons of which depressed brown ulcers form. Sick plants are stunted, have weak branches and form a very weak root system. During the bean filling

бурые язвы. Больные растения отстают в росте, слабо ветвятся и образуют очень слабую корневую систему. В фазу налива бобов листья буреют и засыхают. На бобах вначале образуются небольшие пятна с бурым ободком, пятна со временем углубляются, сливаются, и створки бобов разрушаются. Инфекция переходит на семена. Семена в бобах больных растений образуются щуплые и мелкие, при сильном поражении они загнивают и покрываются грязновато-серым мицелием, на котором видны темные ацервулы со щетинками. Массовому развитию заболевания способствуют высокая относительная влажность воздуха и частые дожди. Заболевание передается семенами и сохраняется в пожнивных остатках.

До некоторых пор возбудитель антракноза сои четко ассоциировался с видом *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore (син.: *Colletotrichum glycines* Hori ex Hemmi). В настоящее время антракноз сои рассматривается как заболевание с более сложной, а порой и запутанной этиологией, но *C. truncatum* по-прежнему считается наиболее распространенным, ассоциированным видом для данного заболевания (Sharma et al., 2011; Dias et al., 2018). В разные годы из разных регионов поступала информация о других возбудителях антракноза сои, таких как *C. destructivum* (Manandhar et al., 1986), *C. coccodes* (Riccioni et al., 1998), *C. chlorophyti* (Yang et al., 2013), *C. gloeosporioides* (Mahmodi et al., 2013), *C. incanum* (Yang et al., 2014), *C. plurivorum* (Barbieri et al., 2017), *C. sojae* (Damm et al., 2019), *C. musicola* (Bouffleur et al., 2020) и *C. brevisporum* (Shi et al., 2021). Эти виды, в зависимости от места распространения, могут поодиночке или в различных сочетаниях встречаться на растениях сои, образуя при этом патологические комплексы. Одновременное появление на растениях сои нескольких видов *Colletotrichum*, связанных с антракнозом, способно влиять на характер протекания заболевания, поскольку эти виды могут по-разному реагировать на разные стратегии борьбы с заболеванием. Поэтому точная видовая идентификация возбудителя имеет важное значение для контроля и профилактики антракноза сои.

В нашем исследовании на одном растении сои было одновременно обнаружено 3 возбудителя антракноза – *C. incanum*, *C. sojae* и *C. truncatum*. Посеянные на 2%-й КГА и морковный агар, они образовывали характерные для рода *Colletotrichum* колонии, имеющие видовые различия между собой. Так, *C. truncatum* на морковном агаре образовывал округлые, иногда с волнистыми краями, плоские, слегка приподнятые колонии светлых тонов с концентрическими темными включениями в виде штрихов, иногда слабо закрученными в спираль. Характерной особенностью зрелых культур является равномерная разбросанность темных, щетинистых ацервул и стром по всей поверхности колонии (см. рис. 1).

Колонии *C. incanum* имели более воздушную, плотную структуру, вначале светло-серые, впоследствии серые и темно-серые, с округлым мягко очерченным краем и выраженным центром, с четкими концентрическими кругами и светлым ободком по краю. На зрелых культурах *C. incanum*, в отличие от *C. truncatum*, темные ацервулы

phase, the leaves turn brown and dry out. Small spots with a brown rim initially form on the beans; over time, the spots deepen, merge, and the bean flaps are destroyed. The infection spreads to the seeds. The seeds in the beans of diseased plants are puny and small; with severe damage, they rot and become covered with dirty-gray mycelium, on which dark acervuli with setae are visible. The massive disease development is facilitated by high relative humidity and frequent rains. The disease is transmitted by seeds and persists in crop residues.

Until recently, the soybean anthracnose pathogen was clearly associated with the species *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore (syn.: *Colletotrichum glycines* Hori ex Hemmi). Currently, soybean anthracnose is considered a disease with a more complex and sometimes confusing etiology, though *C. truncatum* is still considered the most common associated species for this disease (Sharma et al., 2011; Dias et al., 2018). Over the years, information has been received from different regions about other soybean anthracnose pathogens, such as *C. destructivum* (Manandhar et al., 1986), *C. coccodes* (Riccioni et al., 1998), *C. chlorophyti* (Yang et al., 2013), *C. gloeosporioides* (Mahmodi et al., 2013), *C. incanum* (Yang et al., 2014), *C. plurivorum* (Barbieri et al., 2017), *C. sojae* (Damm et al., 2019), *C. musicola* (Bouffleur et al., 2020) and *C. brevisporum* (Shi et al., 2021). Depending on the distribution, these species can occur singly or in various combinations on soybean plants, forming pathological complexes. Simultaneous appearance

Табл. 2. Части растений, из которых были выделены патогены

Table 2. Parts of plants from which pathogens were isolated

№ Вид Species	Листья Leaves	Стебли Stems
1 <i>Alternaria alternata</i>	+	+
2 <i>Cercospora</i> sp.	+	–
3 <i>Colletotrichum</i> sp.	+	–
4 <i>Colletotrichum incanum</i>	+	+
5 <i>Colletotrichum sojae</i>	+	+
6 <i>Colletotrichum truncatum</i>	+	–
7 <i>Diaporthe caulivora</i>	–	+
8 <i>Epicoccum nigrum</i>	+	–
9 <i>Fusarium equiseti</i>	+	–
10 <i>Fusarium graminearum</i>	+	–
11 <i>Fusarium oxysporum</i>	+	+
12 <i>Fusarium proliferatum</i>	+	–
13 <i>Fusarium tricinctum</i>	+	+
14 <i>Fusarium verticillioides</i>	+	–
15 <i>Phoma</i> sp.	+	–
16 <i>Phomopsis longicolla</i>	–	+
17 <i>Verticillium albo-atrum</i>	+	–

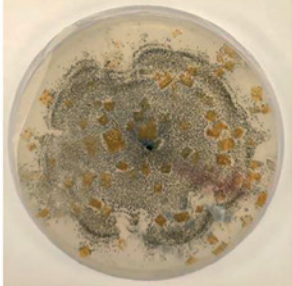
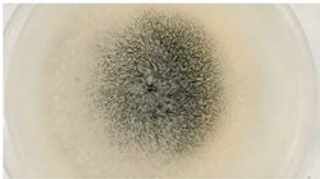
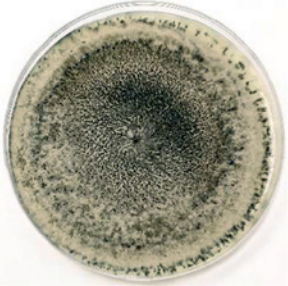
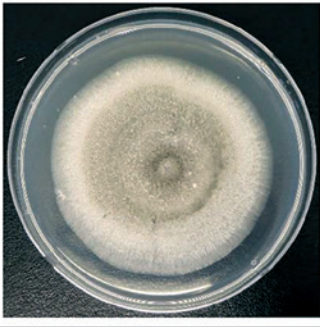
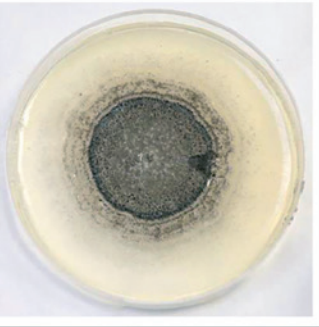
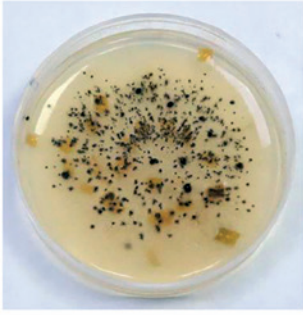
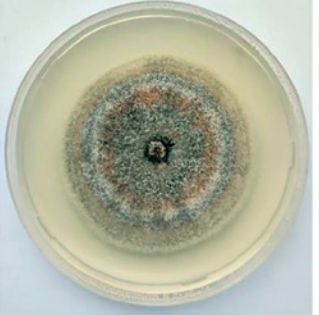
	Морковный агар СА	КГА PDA	
<i>Colletotrichum truncatum</i>			
	20 дн.	7 дн.	20 дн.
<i>Colletotrichum incanum</i>			
	20 дн.	7 дн.	20 дн.
<i>Colletotrichum sojae</i>			
	20 дн.	7 дн.	20 дн.

Рис. 1. Характер развития колоний возбудителей антракноза сои (фото авторов)

Fig. 1. Soybean anthracnose pathogens colonies development (photos by the authors)

не разбросаны, а неплотно собраны в центре (особенно это заметно на морковном агаре). Среда вокруг колонии непрозрачна из-за светло-молочной пигментации (см. рис. 1).

Возбудитель *C. sojae* на морковной среде образовывал погруженные в агар колонии без очерченных краев и выраженного центра, желтовато-белесых оттенков, с четко выделяющимися черными ацервулами и стромами на светлом фоне. Спороносные структуры начинают формироваться в центре колонии в виде концентрических черных колец. Развивающийся мицелий белый, пушистый, покрывает среду в виде снежных комочков и окрашивает ее в слегка розоватый цвет. На среде КГА зрелые колонии имели более насыщенную гамму – вначале светло-розовые с темным ободком выраженного центра и светлыми округлыми краями, впоследствии с концентрическими полями розового, серого, оливкового и светло-серого оттенков, со светлым ободком по краю колонии. Ацервулы не разбросаны, а сконцентрированы в центре. Пигментация среды серовато-молочная (см. рис. 1).

Особенности формирования культур различных антракнозных изолятов на питательных средах (СА и КГА) с характерным для них формирующимся спороношением показаны на рис. 1.

of several *Colletotrichum* species associated with anthracnose on soybean plants may influence the disease course, since these species may respond differently to different disease control strategies. Therefore, accurate species identification of the pathogen is essential for the control and prevention of soybean anthracnose.

In our study, 3 anthracnose pathogens were simultaneously detected on one soybean plant – *C. incanum*, *C. sojae* and *C. truncatum*. Sown on 2% PDA and CA, they formed colonies characteristic of the genus *Colletotrichum*, with species differences among themselves. Thus, *C. truncatum* on CA formed round, sometimes with wavy edges, flat, slightly raised colonies of light colors with concentric dark inclusions in the form of streaks sometimes weakly twisted into a spiral. A characteristic feature of mature cultures is the uniform distribution of dark, bristly acervuli and stroma over the entire surface of the colony (see Fig. 1).

C. incanum colonies had a more airy, dense structure, at first light gray, later gray and dark gray, with

Колонии *C. truncatum* на 3–4-й день развития формировали заметные темные тяжи мицелия, образующие стромы (см. рис. 2с). В дальнейшем, на 5–6-й день, на верхней стороне уже потемневшего мицелия начинал образовываться светлый воздушный мицелий, на котором формировались темные ацервулы. На этом этапе развитие колонии может пойти двумя путями – с плотным и обильным воздушным мицелием (см. рис. 2а) или без него, но с характерно разбросанными стромами (см. рис. 2б). На 5–8-й день на ацервулах начинают развиваться щетинки, характерные для этого вида (см. рис. 2д). На морковном агаре до появления щетинок было отмечено появление округлых образований небольшого размера, внешне напоминающих микроконидии и выходящих из формирующихся ацервул (см. рис. 2h). Щетинки по размеру и высоте растут неравномерно, их длина составляет 80–205 мкм. Вместе со щетинками на ацервулах появляются споры размером 20,8–23,4 x 3,3–5,2. Споры одноклеточные, бесцветные, серповидные, с заостренными, слегка заovalенными концами и каплей масла в середине (см. рис. 2e, 2f). Позже в колонии могут сформироваться перитеции с сумкоспорами (см. рис. 2g).

Процесс развития колоний *C. incanum* примерно такой же, как и у *C. truncatum*, хотя и менее динамичный – колонии растут медленно. На 6-й день на участках темно-бурого и светло-серого оттенков мицелия (см. рис. 3b) начинают формироваться воздушный белый мицелий и темные стромы, на которых формируются ацервулы. Образующиеся стромы имеют более округлую форму (см. рис. 3е). Щетинки на ацервулах несколько короче, чем у *C. truncatum*, – 30–140 мкм в длину, но могут и совсем отсутствовать (см. рис. 3с, 3d). Конидии образуются по мере формирования щетинок, размер конидий – 19,8–26,1 x 2,7–4,5 мкм. Споры *C. incanum* одноклеточные, гиалиновые, ладьеобразные, изогнуты в меньшей степени, чем у *C. truncatum*, с заостренными краями, один конец конидии может быть несколько вытянутым (см. рис. 3f). Наличия перитециев отмечено не было.

Морфологические структуры *C. sojae* отличаются от двух предыдущих видов. Субстратный мицелий септированный, с розоватым оттенком, что придает окрашенность всей колонии, гифы иногда сростаются, образуя тяжи (см. рис. 4а, 4b). Ацервулы округлые (см. рис. 4с), в основной массе не имеют щетинок, но иногда щетинки попадают, как бы спрятанные

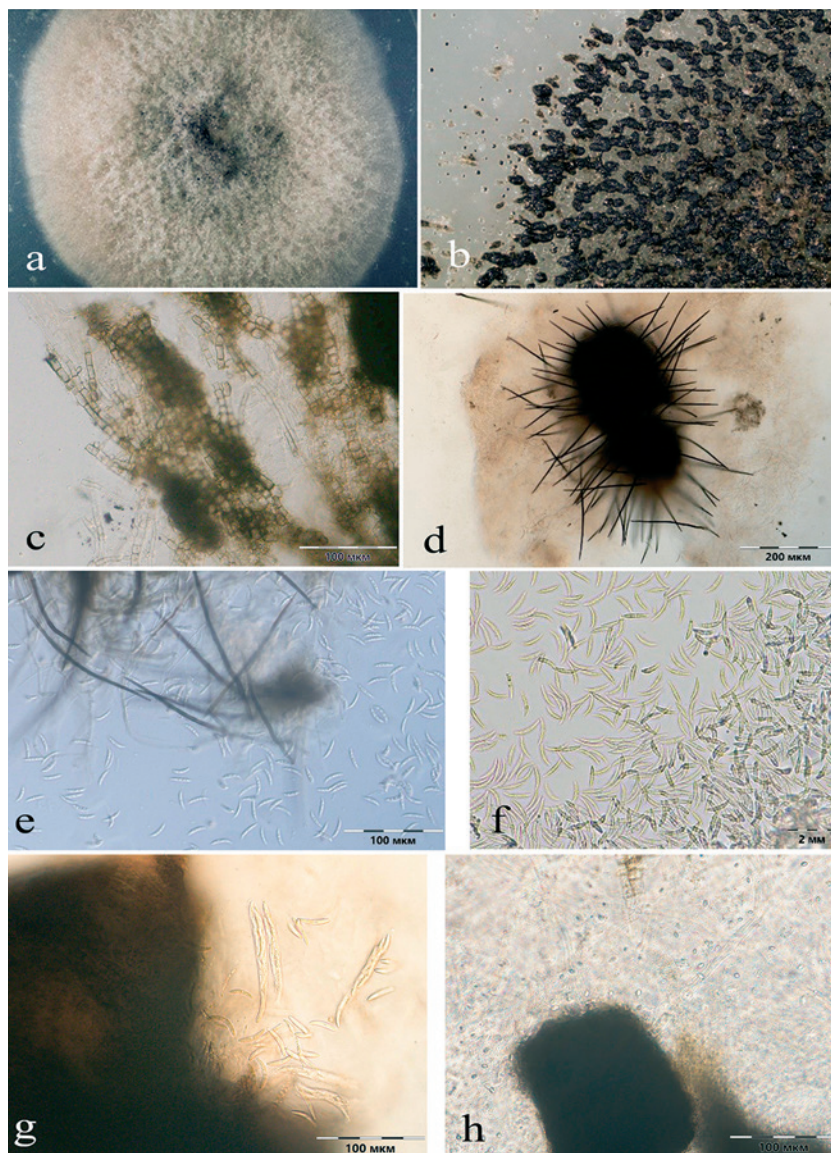


Рис. 2. Типичные структуры *Colletotrichum truncatum*: а – колония *C. truncatum* с воздушным мицелием; б – колония *C. truncatum* без воздушного мицелия, с разбросанными стромами; в – мицелиальные тяжи; д – ацервула со щетинками; е, ф – конидии; г – выход из перитеция сумок с сумкоспорами; h – образования, напоминающие микроконидии (фото авторов)

Fig. 2. *Colletotrichum truncatum* typical structures: а – *C. truncatum* colony with aerial mycelium; б – *C. truncatum* colony without aerial mycelium, with dispersed stroma; в – rhizomorphs; д – acervulus with setae; е, ф – conidia; г – exit from the perithecia of bursae with ascospores; h – formations resembling microconidia (photos by the authors)

a rounded, softly outlined edge and a pronounced center, with clear concentric circles and a light rim along the edge. Unlike *C. truncatum*, dark acervuli are not scattered, but loosely collected in the center on mature *C. incanum* cultures (especially noticeable on CA). The medium around the colony is opaque due to light milky pigmentation (see Fig. 1).

The *C. sojae* pathogen on carrot medium formed colonies immersed in agar without defined edges and a pronounced center, yellowish-whitish in color, with clearly visible black acervuli and stroma on a light background. Spore-bearing structures begin to form

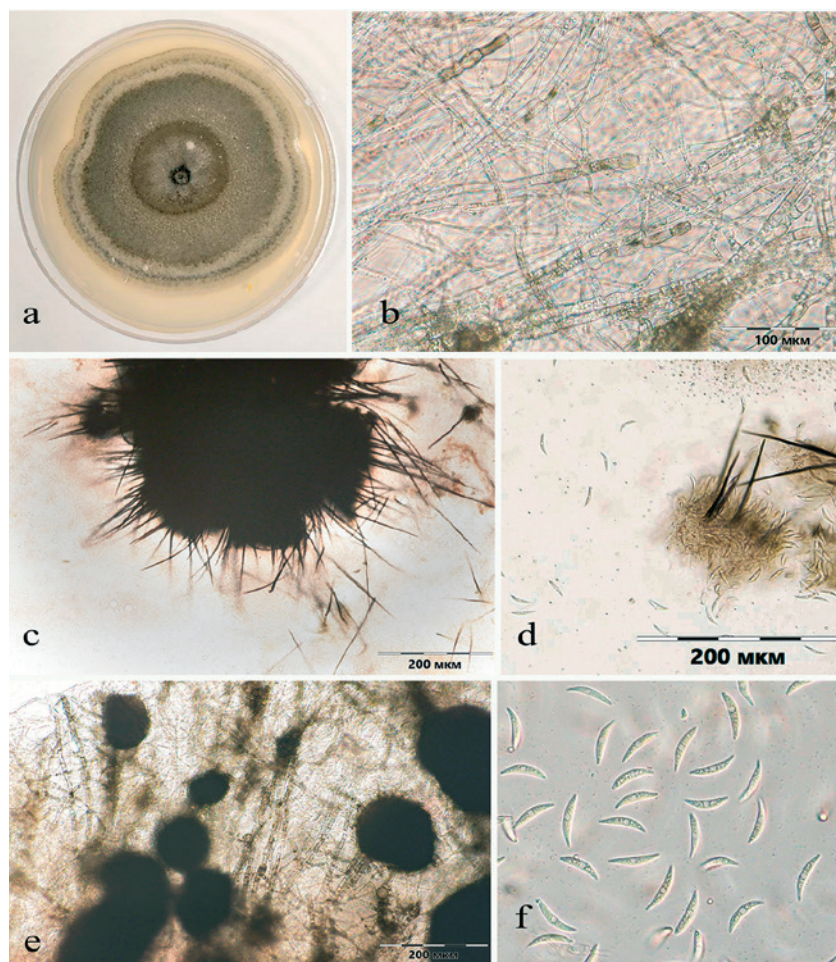


Рис. 3. Типичные структуры *C. incanum*:
а – 20-дневная колония *C. incanum*. КФА;
б – участки бурого мицелия;
с, d – ацервула со щетинками
и конидиоспорами; е – округлые стромы
C. incanum; f – конидии (фото авторов)

Fig. 3. *C. incanum* typical structures:
а – *C. incanum* 20-day colony, PDA;
б – areas of brown mycelium;
с, d – acervula with setae and
conidiospores; е – *C. incanum* round
stroma; f – conidia (photos by the authors)

внутри (см. рис. 4е). Споры одноклеточные, прямые, с закругленными концами и включениями масла внутри, размеры – 8,93–12,55 x 2,58–4,32 мкм (см. рис. 4f), образуют спорокучки (см. рис. 4g). Перитеции одиночные, шаровидные, погруженные в субстрат, цвет – от бледно-желто-коричневого до коричневого, 96–140 мкм в диаметре (см. рис. 4с, 4d, 4h). Перитеции созревают практически одновременно с ацервулами. Сумки с сумкоспорами, через разрыв в перидии, выходят наружу, смешиваясь с конидиями, поэтому и сумки, и сумкоспоры, и конидии можно видеть одновременно. Сумки 8-споровые, веретеновидные, 78–80 x 11–11,4 мкм (см. рис. 4h). Сумкоспоры гиалиновые, веретеновидные, изогнутые, с закругленными концами, 16–22 x 3,5–4,2 мкм (см. рис. 4i), по своей форме и параметрам сходны с конидиями *C. incanum*.

Макроскопический вид типичного расположения ацервул в воздушном мицелии для возбудителей антракноза из рода *Colletotrichum* показан на рис. 5.

Культурально-морфологические особенности возбудителей рака бобов и стеблей сои рода *Diaporthe*

Заболевание фомопсис, или рак бобов и стеблей, объединяет в себе несколько возбудителей,

in the center of the colony in the form of concentric black rings. The developing mycelium is white, fluffy, covers the medium in the form of snowballs and colors it slightly pinkish. On the PDA medium, mature colonies had a more saturated range – initially light pink with a dark rim of a pronounced center and light rounded edges, later with concentric fields of pink, gray, olive and light gray shades, with a light rim along the edge of the colony. The acervuli are not scattered, but concentrated in the center. Pigmentation of the medium is grayish-milky (see Fig. 1).

Various anthracnose isolates culture formation features on nutrient media (CA and PDA) with their characteristic sporulation are shown in Fig. 1.

C. truncatum colonies on days 3–4 of development formed noticeable dark strands of mycelium forming stromas (see Fig. 2c). Subsequently, light aerial mycelium began to form on the upper side of the already darkened mycelium on days 5–6, where dark acervuli were formed. At this stage, the colony development can develop in two ways – with dense and abundant aerial mycelium (see Fig. 2a) or without it, but with characteristically scattered stroma (see Fig. 2b). On days 5–8, the acervuli begin to develop the setae characteristic of this species (see Fig. 2d). On CA, before the appearance of setae, small round formations were noted, externally re-

sembling microconidia and emerging from the developing acervuli (see Fig. 2h). The setae grow unevenly in size and height, their length is 80–205 μm. Along with the setae, spores measuring 20.8–23.4 x 3.3–5.2 appear on the acervuli. The spores are single-celled, colorless, sickle-shaped, with pointed, slightly oval ends and a drop of oil in the middle (see Fig. 2e, 2f). Later, perithecia with ascospores may form in the colony (see Fig. 2g).

The *C. incanum* colonies development process is approximately the same as that of *C. truncatum*, although less dynamic – the colonies grow slowly. On the 6th day, in areas of dark brown and light gray shades of mycelium (see Fig. 3b), aerial white mycelium and dark stroma begin to form, on which acervuli form. The resulting stromas have a more rounded shape (see Fig. 3e). The setae on the acervuli are somewhat shorter than those of *C. truncatum* – 30–140 μm in length, but may be completely absent (see Fig. 3c, 3d). Conidia are formed as the setae form; the size of conidia is 19.8–26.1 x 2.7–4.5 μm. *C. incanum* spores of are unicellular, hyaline, boat-shaped, less curved than

образующих комплекс *Diaporthe/Phomopsis* (*Diaporthe/Phomopsis* Complex (DPC)). Одним из них является *Diaporthe caulivora* (Athow & Caldwell) J.M. Santos, Vrandečić & A.J.L. Phillips (син.: *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* Athow & Caldwell). Возбудитель поражает растения в середине лета или позднее. Вначале на стеблях и ветвях, преимущественно около черешков, появляются красноватые или серовато-коричневые посередине и красновато-коричневые по краям участки. Постепенно стебли оказываются опоясанными слегка вдавленными полосами красновато-коричневого, бурого или шоколадного

those of *C. truncatum*, with pointed edges; one end of the conidium may be somewhat elongated (see Fig. 3f). The presence of perithecia was not noted.

The *C. sojae* morphological structures differ from the previous two species. The substrate mycelium is septate, with a pinkish hue, which gives color to the entire colony; hyphae sometimes grow together to form strands (see Fig. 4a, 4b). The acervuli are round (see Fig. 4c), mostly without setae, but sometimes setae are found, as if hidden inside (see Fig. 4f). The spores are single-celled, straight, with rounded ends and oil inclusions inside, dimensions 8.93–12.55 x 2.58–4.32 µm (see Fig. 4f), forming spore clusters (see Fig. 4g). Perithecia are solitary, spherical, embedded in the substrate, pale yellow-brown to brown in color, 96–140 µm in diameter (see Fig. 4c, 4d, 4h). The perithecia mature almost simultaneously with the acervuli. Asci with ascospores, through a gap in the peridium, come out, mixing with conidia, so asci, ascospores, and conidia are visible simultaneously. Asci are 8-spored, fusiform, 78–80 x 11–11.4 µm (see Fig. 4h). Ascospores are hyaline, fusiform, curved, with rounded ends, 16–22 x 3.5–4.2 µm (see Fig. 4i), similar in shape and parameters to conidia of *C. incarnum*.

A macroscopic view of the acervuli typical arrangement in aerial mycelium for anthracnose pathogens from the genus *Colletotrichum* is shown in Fig. 5.

Cultural and morphological characteristics of soy beans and stems canker pathogen of the genus *Diaporthe*

Phomopsis disease, or beans and stems canker, combines several pathogens that form a complex *Diaporthe/Phomopsis* (*Diaporthe/Phomopsis* Complex (DPC)). One of them is *Diaporthe caulivora* (Athow & Caldwell) J.M. Santos, Vrandečić & A.J.L. Phillips (syn.: *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* Athow & Caldwell). The pathogen infects plants in mid-summer or later. Initially, reddish or grayish-brown areas in the middle and reddish-brown areas along the edges appear on the stems and branches, mainly near the petioles. Gradually, the stems become surrounded by slightly depressed stripes of reddish-brown, brown or chocolate color. As a result of the disease, individual branches and entire plants dry out along with the leaves, but

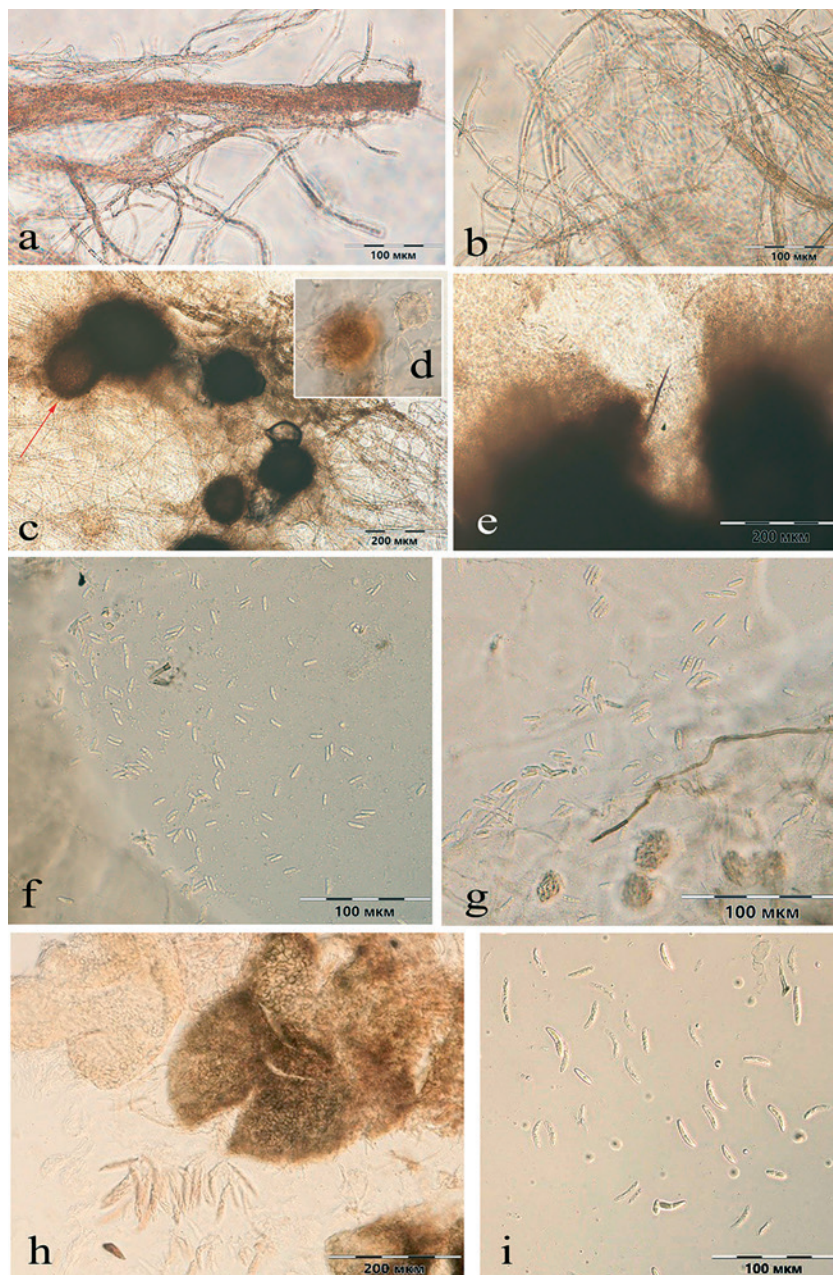


Рис. 4. Типичные структуры *C. sojae*: а, б – сросшиеся гифы мицелия *C. sojae*; с – ацервулы (стрелочка указывает на формирующийся более светлый перитеций); d – формирующийся перитеций; e – щетинка с выходящими спорами; f – споры *C. sojae*; g – в нижней части рисунка видны сформировавшиеся спорокучки; h – сумки, выходящие из перитеция; i – сумкоспоры (фото авторов)

Fig. 4. *C. sojae* typical structures: а, б – *C. sojae* fused mycelium hyphae; с – acervuli (the arrow indicates the developing lighter perithecia); d – developing perithecia; e – seta with spores emerging; f – *C. sojae* spores; g – formed spore clusters are visible in the lower part of the picture; h – asci emerging from the perithecia; i – ascospores (photos by the authors)

цвета. В результате заболевания вместе с листьями усыхают отдельные ветви и целые растения, при этом засохшие листья не опадают (Болезни растений, 1956). Иногда гриб на ранней стадии развития может образовывать пикниды с выходящими из них в капельках экссудата пикноспорами. Со временем пикниды усыхают и исчезают (Mena et al., 2020). В полевых условиях на отмерших стеблях в течение зимы развиваются плодовые тела – перитеции. Сформировавшиеся в них аскоспоры являются основным источником инфекции для распространения гриба в следующем году.

Возбудитель *Diaporthe longicolla* (Hobbs) J.M. Santos, Vrandečić & A.J.L. Phillips (анаморфа – *Phomopsis longicolla* Hobbs) вызывает гниль семян сои. Заражение растений происходит в начале вегетации и может вызывать гибель всходов. Погибшие всходы выглядят обожженными. На листьях взрослых пораженных растений между жилками образуются хлоротичные пятна, которые позднее буреют. Листья скручиваются, отмирают, но не опадают. На стеблях проявляются красновато-коричневые эллипсоидные пятнистости с вдавленными язвами, со временем на поверхности пятна развиваются пикниды гриба. Возбудитель первоначально развивается в нижней части стебля, но постепенно достигает бобов, проникает в семена и заражает их. Пораженные *P. longicolla* семена сморщенные, удлиненные, с треснутой оболочкой, во влажных условиях покрываются беловатым мицелием, на котором образуются черные пикниды гриба. Заражение семян может протекать бессимптомно, но такие семена, имея нормальный вид, обладают пониженной всхожестью, жизнеспособностью и качеством.

К числу возбудителей рака сои относится и *Diaporthe sojae* Lehman (син.: *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Lehman) Wehm.), вызывающий пятнистость бобов и стеблей. Заболевание проявляется в период начала созревания бобов. В это время на стеблях образуются линейные черные полосы из мелких точек, представляющих собой зрелые пикниды. На бобах пикниды появляются раньше, чем на стеблях. Источником инфекции в первую очередь являются пораженные стебли.

В нашем исследовании возбудитель рака сои *D. caulivora*, посеянный на среду КГА, вначале образовывал белый, прижатый к поверхности агара мицелий. Впоследствии мицелий становился более воздушным и пушистым, приобретал светло-кремовый, желтоватый оттенок и формировал плотные тяжи, образующие подушкообразные стромы неправильной формы, от 2 до 10 мм в диаметре (см. рис. 8а), которые могут сливаться между собой и образовывать продолговатые темные зоны, что

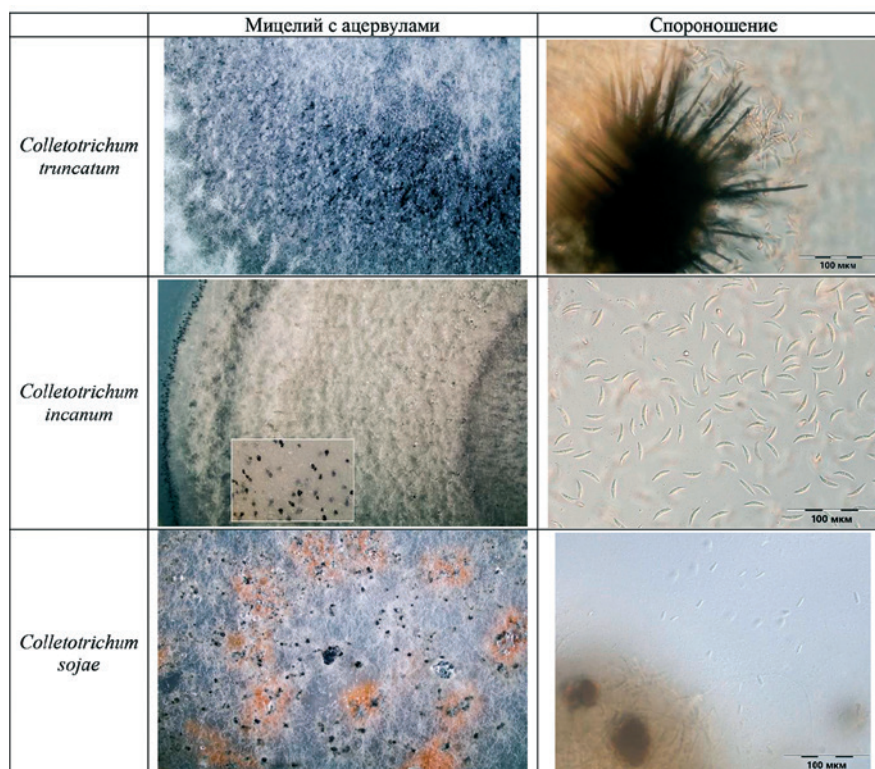


Рис. 5. Внешний вид сформированных на питательной среде ацервул со спороношением (фото авторов)

Fig. 5. Appearance of acervuli formed on a nutrient medium with sporulation (photos by the authors)

the dried leaves do not fall off (Plant diseases, 1956). Sometimes a fungus at an early development stage can form pycnidia with pycnosporos emerging from them in exudate droplets. Over time, the pycnidia shrink and disappear (Mena et al., 2020). In field conditions, fruiting bodies – perithecia – develop on dead stems during the winter. The ascospores formed in them are the main source of infection for the spread of the fungus next year.

The pathogen *Diaporthe longicolla* (Hobbs) J.M. Santos, Vrandečić & A.J.L. Phillips (anamorph – *Phomopsis longicolla* Hobbs) causes soybean seeds rot. Plant infection occurs at the beginning of the growing season and can cause the seedlings death. Dead seedlings look burned. On the leaves of adult infected plants, chlorotic spots are formed between the veins, which later turn brown. The leaves curl and die, without falling off. Reddish-brown ellipsoidal spots with depressed cankers appear on the stems; over time, fungal pycnidia develop on the spots surface. The pathogen initially develops in the lower part of the stem, though gradually reaches the beans, penetrates the seeds and infects them. Seeds affected by *P. longicolla* are wrinkled, elongated, with a cracked shell; in humid conditions, they are covered with whitish mycelium, on which black fungal pycnidia are formed. Seeds infection can be asymptomatic, but such seeds, while having a normal appearance, have reduced germination, viability and quality.

The soybean canker pathogens also include *Diaporthe sojae* Lehman (syn.: *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Lehman) Wehm.), causing spotting of beans and

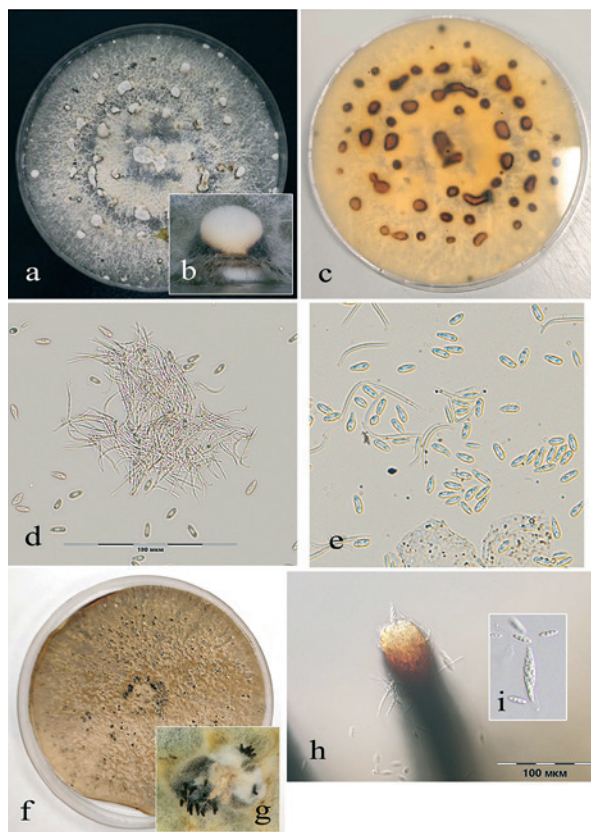


Рис. 6. *Diaporthe caulivora*:
 а – 20-дневная колония *D. caulivora*; б – пикнида с экссудатом; в – обратная сторона колонии; д – β-конидии *D. caulivora*; е – α-конидии; ф – 30-дневная колония *D. caulivora*; г – перитеции с носиками; h – сумка с сумкоспорами, выходящая из носика перитеция; i – сумка с сумкоспорами (фото авторов)

Fig. 6. *Diaporthe caulivora*:
 а – *D. caulivora* 20-day colony; б – pycnidia with exudate; в – reverse side of the colony; д – *D. caulivora* β-conidia; е – α-conidia; ф – *D. caulivora* 30-day colony; г – perithecia with spouts; h – ascus with ascospores emerging from the perithecia spout; i – ascus with ascospores (photos by the authors)

хорошо заметно на нижней стороне колонии (см. рис. 6с). На 5–6-й день изоляты в своем росте достигали края чашки Петри.

В цикле развития *D. caulivora* основным инфекционным агентом являются вышедшие из перитециев аскоспоры, и, по сообщениям зарубежных авторов, возбудитель крайне редко образует конидиальное спороношение как в природе, так и на питательной среде в лабораторных условиях (Santos et al., 2011). Если в культуре и образуются пикниды, то они, как правило, стерильны или содержат небольшое количество β-спор (Fernández, Hanlin, 1996). Однако на культуре выделенного нами дальневосточного изолята на 10–12-й день сформировались шаровидные, слегка вытянутые пикниды черного цвета, 192–210 мкм в диаметре, с капельками экссудата (см. рис. 6б), в котором были обнаружены α-конидии и β-конидии. α-конидии гиалиновые, неразделенные, с двумя капельками масла по краям споры, эллипсоидной и каплевидной формы, размером 6,02–7,68 x 2,22–3,57 мкм (см. рис. 6е). β-конидии гиалиновые, нитевидные, со слегка заостренными и заovalенными концами, от прямых до изогнутых и крючкообразных, размером 15,2–28,1 x 1,4 x 1,8 мкм



Рис. 7. α-конидии (А) и аскоспоры (В) *D. caulivora*
 (фото авторов)

Fig. 7. α-conidia (A) and ascospores (B) *D. caulivora*
 (photo by the authors)

stems. The disease appears when beans begin to ripen. At this time, linear black stripes of small dots form on the stems, representing mature pycnidia. Pycnidia appear on beans earlier than on stems. The source of infection is primarily the affected stems.

In our study, the soybean canker pathogen *D. caulivora*, sown on PDA medium, initially formed white mycelium pressed to the agar surface. Subsequently, the mycelium became more fluffy, acquired a light cream, yellowish tint and formed dense cords forming cushion-shaped stroma of irregular shape, from 2 to 10 mm in diameter (see Fig. 8a), which can merge with each other and form oblong dark zone, which is clearly visible on the underside of the colony (see Fig. 6c). On the 5th–6th day, the isolates in their growth reached the edge of the Petri dish.

In the development cycle of *D. caulivora*, the main infectious agent is ascospores emerging from the perithecia, and, according to foreign authors, the pathogen extremely rarely forms conidial sporulation both in nature and on a nutrient medium in the laboratory (Santos et al., 2011). If pycnidia are formed in culture, they are usually sterile or contain a small number of β-spores (Fernández and Hanlin, 1996). However, on days 10–12, on the culture of the Far Eastern isolate we obtained, there were formed spherical, slightly elongated black pycnidia, 192–210 μm in diameter, with droplets of exudate (see Fig. 6b), in which α-conidia and β-conidia were found. α-conidia are hyaline, undivided, with two droplets of oil at the edges of the spore, ellipsoidal and teardrop-shaped, measuring 6.02–7.68 x 2.22–3.57 μm (see Fig. 6e). β-conidia are hyaline, filamentous, with slightly pointed and oval ends, from straight to curved and hook-shaped, measuring 15.2–28.1 x 1.4 x 1.8 μm (see Fig. 6d). After 28 days of incubation under normal conditions, submerged, spherical black perithecia, 180–280 μm in diameter, with elongated spouts of different lengths began to form on the medium (see Fig. 6g). The asci are fusiform, measuring 28.6–34.6 x 6.2–9.0 μm, and contained 8 ellipsoidal ascospores. The ascospores are translucent, with oil droplets in the center, measuring 8.3–10.0 x 1.8–2.4 μm (see Fig. 6i). Compared to α-spores, ascospores are somewhat larger, more elongated and have a constriction in the middle (see Fig. 7).

(см. рис. 6d). Через 28 дней инкубации в обычных условиях на среде стали образовываться погруженные, шаровидные перитеции черного цвета, размером 180–280 мкм в диаметре, с вытянутыми носиками разной длины (см. рис. 6g). Аски веретенообразные, размером 28,6–34,6 x 6,2–9,0 мкм, содержали 8 аскоспор эллипсоидной формы. Аскоспоры полупрозрачные, с капельками масла в центре, размером 8,3–10,0 x 1,8–2,4 мкм (см. рис. 6i). По сравнению с α -спорами аскоспоры несколько больше, более вытянуты и имеют перетяжку посередине (см. рис. 7).

Второй возбудитель рака сои – *D. phaseolorum* Sacc. var. *sojae*, вызывающий пятнистость бобов и стеблей, при проведении исследования обнаружен не был.

На картофельно-глюкозном агаре возбудитель гнили семян сои *D. longicolla* образовывал плотные колонии белого цвета, хлопьевидно-опушенные, на которых после 10-дневного развития стали появляться охристые, желтовато-зеленые участки. После 20-го дня развития в колонии стали образовываться крупные, черные, распростертые, подушкообразные стромы, содержащие одиночные или скученные пикниды (240–500 мкм), с выступающими удлинёнными носиками, что является характерным признаком для этого вида. Некоторые пикниды выделяли молочно-розово-желтый экссудат, содержащий α -конидии, β -конидии отсутствовали. α -конидии эллипсоидные, одноклеточные, бесцветные, размером 5,4–8,2 x 1,7–3,0 мкм (см. рис. 8).

Другие виды патогенов, выделенные при обследовании сои

Присутствие других патогенов на растительных образцах было обусловлено в первую очередь несоблюдением севооборота, повышенной влажностью и неблагоприятными погодными условиями. Нами были выявлены возбудители фузариоза, альтернариоза, вертициллеза и точечной пятнистости (*Epicoccum*) (см. рис. 9).

Вид *Alternaria alternata*, как представитель многочисленного рода альтернариозных грибов, формировал темно-серо-коричневую концентрическую колонию, с включением различных по цвету клинообразных зон в начале роста и слоем воздушного хлопьевидного мицелия поверх сформированной колонии в последующее время.

Epicoccum nigrum отличался от остальных возбудителей яркой по цвету лимонно-оранжевой колонией плотно-войлочной консистенции и бордово-коричневым реверзумом.

Различные виды обнаруженных возбудителей фузариозов в нашем исследовании образовывали характерные для грибов рода *Fusarium* пушистые,

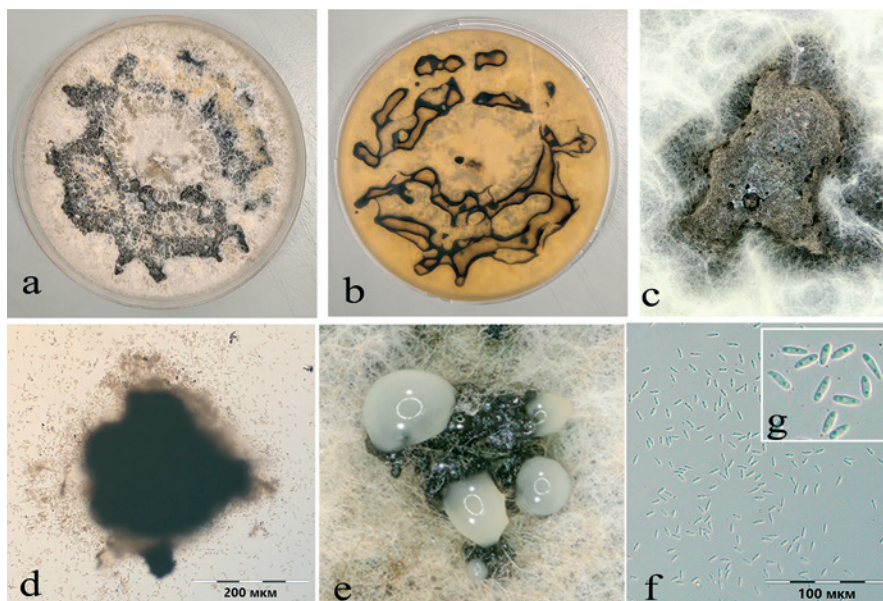


Рис. 8. *D. longicolla*:

a – 14-дневная колония *D. longicolla*;
b – обратная сторона колонии;
c – строма; d – пикнида; e – носики пикнид с выделяющимся экссудатом со спорами;
f–g – α -конидии (фото авторов)

Fig. 8. *D. longicolla*:

a – *D. longicolla* 14-day colony;
b – reverse side of the colony; c – stroma;
d – pycnidia; e – spouts of pycnidia with exudate containing spores; f–g – α -conidia (photos by the authors)

Second soybean canker pathogen – *D. phaseolorum* Sacc. var. *sojae*, causing spotting of beans and stems, was not detected during the study.

On PDA, the soybean seed rot pathogen, *D. longicolla*, formed dense colonies of white, flaky-pubescent, on which, after 10 days of development, ochre, yellowish-green areas began to appear. After the 20th day of development, large, black, prostrate, cushion-shaped stromas began to form in the colony, containing single or crowded pycnidia (240–500 μ m), with protruding elongated spouts, which is a characteristic feature of this species. Some pycnidia secreted a milky pink-yellow exudate containing α -conidia; β -conidia were absent. α -conidia are ellipsoidal, unicellular, colorless, 5.4–8.2 x 1.7–3.0 μ m in size (see Fig. 8).

Other pathogens identified in soybean surveys

The presence of other pathogens on plant samples was primarily due to poor crop rotation, high humidity and unfavorable weather conditions. We identified pathogens of fusarium, alternaria, verticillium and leaf spot disease (*Epicoccum*) (see Fig. 9).

Alternaria alternata species as a representative of a numerous *Alternaria* genus, formed a dark gray-brown concentric colony, with the inclusion of wedge-shaped zones of different colors at the beginning of growth and a layer of aerial flocculent mycelium on top of the formed colony subsequently.

Epicoccum nigrum differed from other pathogens by a bright lemon-orange colony with a dense felt consistency and a burgundy-brown reversum.

Various species of detected fusarium pathogens in our study formed fluffy, aerial colonies of pink,

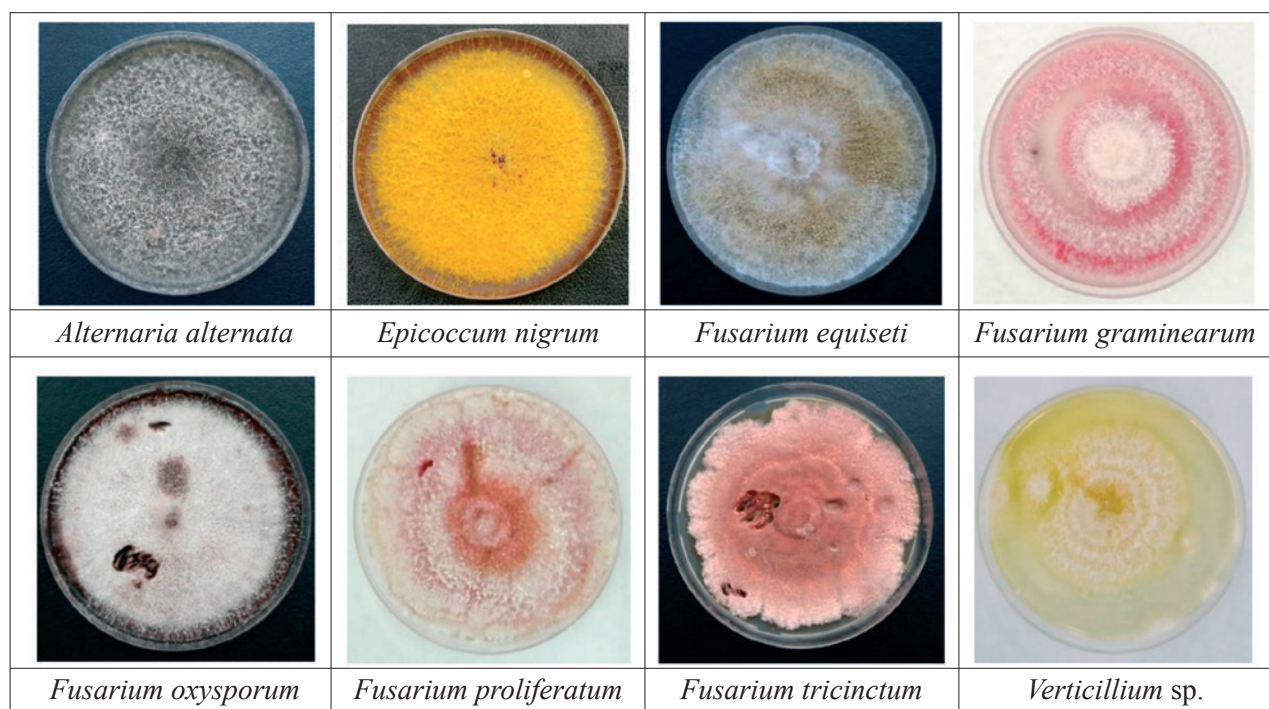


Рис. 9. Внешний вид колоний выявленных возбудителей (фото авторов)

Fig. 9. Appearance of identified pathogens colonies (photos by the authors)

воздушные колонии розового, бежевого, желтого и других цветов с типичным для каждого выявленного вида спороношением.

Возбудитель вертициллезного увядания *Verticillium albo-atrum* формировал медленнорастущую, приподнятую концентрическую колонию с воздушным мицелием белого цвета.

В результате лабораторных исследований были выявлены грибные патогены, относящиеся к 14 видам, 9 родам, 7 семействам, 5 порядкам и 2 классам (см. табл. 1). Самыми многочисленными оказались представители рода *Fusarium* – 6 видов. Род *Colletotrichum* включил в себя 4 вида. Остальные 7 родов были представлены по 1 виду. Из порядков чаще всего встречался порядок Нуро-creales – 6 случаев. На порядок Glomerellales пришлось 5 случаев; порядок Pleosporales – 3 случая; порядок Diaporthales – 2 случая; порядок Capnodi-ales – 1 случай. Самым многочисленным оказался класс Sordariomycetes – 12 случаев, на класс Dothideomycetes пришлось 4 случая.

Культурально-морфологический метод исследования выделенных в процессе работы изолятов достаточно точно подтверждает их видовую идентификацию по основным морфологическим признакам, которые проиллюстрированы на фотографиях выше и достаточно подробно описаны. При этом наличие как α -, так и β -спор изолята *D. caulivora* неоднократно проверялось в нашем исследовании.

Культурально-морфологическая идентификация выявленных изолятов подтверждалась также методом классической ПЦР с использованием универсальных праймеров ITS5/ITS4 (White et al., 1990) и последующим секвенированием полученных нуклеотидных последовательностей по внутреннему транскрибируемому спейсеру ITS рибосомальной ДНК с дальнейшим сравнением их с эталонными последовательностями в Генбанке NCBI.

beige, yellow and other colors characteristic of the genus *Fusarium* fungi with sporulation typical for each identified species.

The pathogen of verticillium wilt, *Verticillium albo-atrum*, formed a slow-growing, raised concentric colony with white aerial mycelium.

As a result of laboratory studies, fungal pathogens belonging to 14 species, 9 genera, 7 families, 5 orders and 2 classes were identified (see Table 1). The most numerous were representatives of the genus *Fusarium* – 6 species. The genus *Colletotrichum* included 4 species. The remaining 7 genera were represented by 1 species each. The order Hypocreales was the most common – 6 cases. The order Glomerellales accounted for 5 cases; order Pleosporales – 3 cases; order Diaporthales – 2 cases; order Capnodi-ales – 1 case. The class Sordariomycetes was the most numerous – 12 cases, the class Dothideomycetes accounted for 4 cases.

The cultural and morphological method of studying isolates isolated during the work quite accurately confirms their species identification based on the main morphological characteristics, which are illustrated in the photographs above and described in sufficient detail. Moreover, the presence of both α - and β -spores of the *D. caulivora* isolate was repeatedly checked in our study.

The cultural and morphological identification of the isolates was also confirmed by classical PCR using universal primers ITS5/ITS4 (White et al., 1990) and subsequent sequencing of the obtained nucleotide sequences using the internal transcribed spacer ITS of ribosomal DNA with further comparison with reference sequences in the NCBI GenBank.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Видовой состав грибов, выделенных в нашем исследовании, включал в себя виды, которые обычно присутствуют на сое, и патогены, появление которых было обусловлено неблагоприятными погодными условиями и накоплением инфекции вследствие преобладания сои в севообороте, вплоть до монокультуры. Самые вредоносные и агрессивные из выделенных видов относятся к роду *Colletotrichum*. Исследования показали, что виды *C. incanum*, *C. sojae* и *C. truncatum* присутствовали на растениях сои одновременно. Также на растениях сои были обнаружены такие опасные и экспортно значимые для России виды, как *D. caulivora* и *D. longicolla*. Вид *D. caulivora*, вызывающий рак стеблей и бобов сои, является карантинным видом для Китая, основного экспортера сои из России, и карантинным видом для Ирана. Возбудитель гниения семян *P. longicolla* также имеет карантинный статус в КНР. Карантинный для РФ вид *Cercospora kikuchii*, вызывающий пурпурный церкоспороз сои и получивший значительное распространение в регионе, в нашем исследовании обнаружен не был.

Применение культурально-морфологического метода при идентификации патогенов сои является традиционным. Несмотря на свою трудоемкость, этот метод позволяет более широко охватить и понять биологию проходящих процессов, визуально оценить их многочисленные аспекты. Применяя данный метод, мы смогли обнаружить штамм *D. caulivora*, в цикле развития которого присутствует пикнидиальная стадия, что, судя по литературным источникам, случается крайне редко (Fernández, Hanlin, 1996). Более того, в образовавшихся пикнидах штамма были обнаружены одновременно α - и β -споры возбудителя. Взятые из пикнид и посеянные на питательную среду α - и β -споры образовали полноценные колонии *D. caulivora*, доказав свою жизнеспособность. Установление этого факта может повлиять на изменение традиционного представления о патогенезе заболевания.

Несмотря на свою универсальность, культурально-морфологический метод требует довольно продолжительного времени для получения полностью достоверного результата. В нашем исследовании такой период составил 28 дней. В случаях, когда не требуется раскрытие полной картины биологических процессов, а ожидаемый результат обнаружения комплекса *Diaporthe/Phomopsis* (DPC) сводится только к факту «присутствует/не присутствует», следует использовать молекулярные методы исследования. Такой подход позволит значительно сократить сроки проводимого анализа. Однако в случае видовой идентификации применение только классической ПЦР с дальнейшим секвенированием внутреннего транскрибируемого участка ITS1-5.8S-ITS2 недостаточно в силу того, что виды *D. caulivora* и *D. longicolla* по данному участку практически неразличимы.

Полученные результаты, в силу ограниченности территории обследованных участков, не позволяют сделать обобщающие выводы о наличии и частоте встречаемости тех или иных видов на плантациях сои в регионе, поэтому исследование по фитосанитарному состоянию посевов следует продолжить.

CONCLUSION

The species composition of the fungi isolated in our study included species that are usually present on soybean, and pathogens whose emergence was due to adverse weather conditions and the accumulation of infection due to the predominance of soybean in the crop rotation, up to monoculture. The most harmful and aggressive of the identified species belong to the genus *Colletotrichum*. According to the research, the species *C. incanum*, *C. sojae* and *C. truncatum* were present on soybean plants simultaneously. Also, such dangerous and export-important species for Russia as *D. caulivora* and *D. longicolla*. The species *D. caulivora*, causing soybean stems and beans canker, is a quarantine species for China, the main exporter of soybeans from Russia, and a quarantine species for Iran. Seed rot pathogen *P. longicolla* also has quarantine status in China. Quarantine for the Russian Federation, the species *Cercospora kikuchii*, which causes the *Cercospora* leaf blight and purple seed stain diseases, and which become widespread in the region, was not detected in our study.

The use of the cultural and morphological method in identifying soybean pathogens is traditional. Despite its labor-intensive nature, this method allows to more widely cover and understand the biology of ongoing processes and visually evaluate their numerous aspects. Using this method, we were able to detect a *D. caulivora* strain, in the development cycle of which there is a pycnidial stage, which, judging by the literature, happens extremely rarely (Fernández, Hanlin, 1996). Moreover, α - and β -spores of the pathogen were simultaneously detected in the resulting strain pycnidia. The α - and β -spores taken from pycnidia and sown on a nutrient medium formed full *D. caulivora* colonies, proving their viability. Establishing this fact may influence changes in the traditional understanding of the pathogenesis of the disease.

Despite its versatility, the cultural and morphological method requires quite a long time to obtain a completely reliable result. In our study, this period was 28 days. In cases where the full picture of biological processes is not required, and the expected result of detecting the *Diaporthe/Phomopsis* complex (DPC) is reduced only to the fact “present/not present”, molecular research methods should be used. This approach will significantly reduce the time required for analysis. However, in the case of species identification, the use of only classical PCR with further sequencing of the internal transcribed region ITS1-5.8S-ITS2 is not enough due to the fact that the species *D. caulivora* and *D. longicolla* in this region are practically indistinguishable.

The results obtained, due to the limited territory of the surveyed areas, do not allow us to draw general conclusions about the presence and occurrence frequency of certain species on soybean plantations in the region, therefore, research on the phytosanitary state of crops should be continued.

REFERENCES

1. Plant diseases. Yearbook of the US Department of Agriculture. M.: Foreign literature, 1956, 241 pp.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезни растений. Ежегодник Министерства земледелия США. М.: Иностранная литература, 1956, 241 с.
2. Линников П.И. Российский рынок сои: тенденции, перспективы развития // Аграрный научный журнал. 2018. № 10. С. 81–86.
3. Barbieri M.C.G., Ciampi-Guillardi M., Moraes S.R.G., Bonaldo S.M., Rogério F., Linhares R.R. et al. First report of *Colletotrichum cliviae* causing anthracnose on soybean in Brazil // Plant Disease. 2017. Vol. 101. P. 1677.
4. Bouffleur T.R., Castro R.R.L., Rogério F., Ciampi-Guillardi M., Baroncelli R. & Massola Júnior N.S. First report of *Colletotrichum musicola* causing soybean anthracnose in Brazil // Plant Disease. 2020. Vol. 104. P. 1858.
5. Damm U., Sato T., Alizadeh A., Groenewald J.Z. & Crous P.W. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes // Studies in Mycology. 2019. Vol. 92. P. 1–46.
6. Dias M.D., Fonseca M.E.N., Dias-Neto J.J., Santos M.D.M., Pandolfo G.M., Boiteux L.S. et al. Biology, pathogenicity, and haplotype analyses of *Colletotrichum cliviae*: A novel soybean anthracnose agent in warm tropical areas // Tropical Plant Pathology. 2018. Vol. 43. P. 439–451.
7. Fernández F.A., Hanlin R.T. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean // Mycologia. 1996. Vol. 88. P. 425–440.
8. Mahmodi F., Kadir J.B., Wong M.Y., Nasehi A., Puteh A. & Soleimani N. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on soybean (*Glycine max*) in Malaysia // Plant Disease. 2013. Vol. 97. P. 841.
9. Manandhar J.B., Hartman G.L. & Sinclair J.B. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines* // Phytopathology. 1986. Vol. 76. P. 282–285.
10. Mena E., Stewart S., Montesano M., Ponce de León I. Soybean Stem Canker Caused by *Diaporthe caulivora*; Pathogen Diversity, Colonization Process, and Plant Defense Activation // Frontiers in Plant Science. Plant Pathogen Interactions. January 2020., Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01733>.
11. Riccioni L., Conca G. & Hartman G.L. First report of *Colletotrichum coccodes* on soybean in the United States // Plant Disease. 1998. Vol. 82. P. 959.
12. Santos J.M., Vrandečić K., Čosić J., Duvnjak T., Phillips A.J.L. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia // Persoonia. 2011. Vol. 27. P. 9–19. URL: <https://doi.org/10.3767/003158511X603719>.
13. Sharma S.K., Gupta G.K. & Ramteke R. *Colletotrichum truncatum* [(Schw.) Andrus and W.D. Moore], the causal agent of anthracnose of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] – a review // Soybean Research. 2011. Vol. 9. P. 31–52.
14. Shi X., Wang S., Duan X., Gao X., Zhu X. & Laborda P. First report of *Colletotrichum brevisporum* causing soybean anthracnose in China // Plant Disease. 2021. Vol. 105. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1910-PDN>.
15. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W., Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and
2. Linnikov P.I. Russian soybean market: trends, development prospects [Rossiyskiy ryok soi: tendentsii, perspektivy razvitiya] // Agrarian scientific journal. 2018; 10: 81–86. (In Russ.)
3. Barbieri M.C.G., Ciampi-Guillardi M., Moraes S.R.G., Bonaldo S.M., Rogério F., Linhares R.R. et al. First report of *Colletotrichum cliviae* causing anthracnose on soybean in Brazil // Plant Disease. 2017. Vol. 101. P. 1677.
4. Bouffleur T.R., Castro R.R.L., Rogério F., Ciampi-Guillardi M., Baroncelli R. & Massola Júnior N.S. First report of *Colletotrichum musicola* causing soybean anthracnose in Brazil // Plant Disease. 2020. Vol. 104. P. 1858.
5. Damm U., Sato T., Alizadeh A., Groenewald J.Z. & Crous P.W. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes // Studies in Mycology. 2019. Vol. 92. P. 1–46.
6. Dias M.D., Fonseca M.E.N., Dias-Neto J.J., Santos M.D.M., Pandolfo G.M., Boiteux L.S. et al. Biology, pathogenicity, and haplotype analyses of *Colletotrichum cliviae*: A novel soybean anthracnose agent in warm tropical areas // Tropical Plant Pathology. 2018. Vol. 43. P. 439–451.
7. Fernández F.A., Hanlin R.T. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean // Mycologia. 1996. Vol. 88. P. 425–440.
8. Mahmodi F., Kadir J.B., Wong M.Y., Nasehi A., Puteh A. & Soleimani N. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on soybean (*Glycine max*) in Malaysia // Plant Disease. 2013. Vol. 97. P. 841.
9. Manandhar J.B., Hartman G.L. & Sinclair J.B. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines* // Phytopathology. 1986. Vol. 76. P. 282–285.
10. Mena E., Stewart S., Montesano M., Ponce de León I. Soybean Stem Canker Caused by *Diaporthe caulivora*; Pathogen Diversity, Colonization Process, and Plant Defense Activation // Frontiers in Plant Science. Plant Pathogen Interactions. January 2020., Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01733>.
11. Riccioni L., Conca G. & Hartman G.L. First report of *Colletotrichum coccodes* on soybean in the United States // Plant Disease. 1998. Vol. 82. P. 959.
12. Santos J.M., Vrandečić K., Čosić J., Duvnjak T., Phillips A.J.L. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia // Persoonia. 2011. Vol. 27. P. 9–19. URL: <https://doi.org/10.3767/003158511X603719>.
13. Sharma S.K., Gupta G.K. & Ramteke R. *Colletotrichum truncatum* [(Schw.) Andrus and W.D. Moore], the causal agent of anthracnose of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] – a review // Soybean Research. 2011. Vol. 9. P. 31–52.
14. Shi X., Wang S., Duan X., Gao X., Zhu X. & Laborda P. First report of *Colletotrichum brevisporum* causing soybean anthracnose in China // Plant Disease. 2021. Vol. 105. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1910-PDN>.
15. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W., Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and

Applications. 18 // San Diego, CA, USA, Academic Press, 1990, p. 315–322.

16. Yang H.-C., Stewart J.M. & Hartman G.L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* infecting soybean seed in Arkansas, United States // Plant Disease. 2013. Vol. 97. P. 1510.

17. Yang H.-C., Haudenshield J.S. & Hartman G.L. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA // Mycologia. 2014. Vol. 106. P. 32–42.

18. Рынок сои в 2022 году: тенденции и прогнозы [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://agrovesti.net/lib/industries/beans/rynok-soi-v-2022-godu-tendentsii-i-prognozy.html> (дата обращения: 24.07.2023).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Дудченко Ирина Петровна, старший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-0169-414X, e-mail: dudchenko_irina@vniikr.ru.

Кузнецова Анна Александровна, старший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-8443-2641, SPIN-код: 7583-3409, e-mail: kyyznec@bk.ru.

Дудченко Геннадий Николаевич, агроном редакционно-издательского отдела ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; e-mail: dudchenko_gennadiy@vniikr.ru.

Копина Мария Борисовна, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, начальник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-1613-1764, SPIN-код: 3257-7483, e-mail: Kopinamaria645@gmail.com.

Костин Никита Константинович, кандидат сельскохозяйственных наук, агроном научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; ORCID 0009-0003-8066-0753, SPIN-код: 5183-3265, e-mail: kostinwork1@gmail.com.

Applications. 18 // San Diego, CA, USA, Academic Press, 1990, p. 315–322.

16. Yang H.-C., Stewart J.M. & Hartman G.L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* infecting soybean seed in Arkansas, United States // Plant Disease. 2013. Vol. 97. P. 1510.

17. Yang H.-C., Haudenshield J.S. & Hartman G.L. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA // Mycologia. 2014. Vol. 106. P. 32–42.

18. Soybean market in 2022: trends and forecasts [Electronic resource]. Access mode: <https://agrovesti.net/lib/industries/beans/rynok-soi-v-2022-godu-tendentsii-i-prognozy.html> (last accessed: 24.07.2023).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina Dudchenko, Senior Researcher, Mycology and Helminthology Research and Methodology Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-0169-414X, e-mail: dudchenko_irina@vniikr.ru.

Anna Kuznetsova, Senior Researcher, Mycology and Helminthology Research and Methodology Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-8443-2641, SPIN-code: 7583-3409, e-mail: kyyznec@bk.ru.

Gennady Dudchenko, Agronomist, Editorial and Publishing Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia; e-mail: dudchenko_gennadiy@vniikr.ru.

Maria Kopina, PhD in Agriculture, Leading Researcher, Head of Mycology and Helminthology Research and Methodology Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-1613-1764, SPIN-code: 3257-7483, e-mail: Kopinamaria645@gmail.com.

Nikita Kostin, Agronomist, Mycology and Helminthology Research and Methodology Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0009-0003-8066-0753, SPIN-code: 5183-3265, e-mail: kostinwork1@gmail.com.