

Изучение генетических особенностей возбудителя фомопсиса подсолнечника

Т.А. СУРИНА¹, О.В. СКРИПКА², Е.Р. РУЧКОВ³

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

¹ ORCID 0000-0002-0463-5762, e-mail: t.a.surina@yandex.ru

² e-mail: ovskripka@mail.ru

³ e-mail: egorruchkov1966@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Фомопсис подсолнечника является вредоносным заболеванием в странах, занимающихся промышленным выращиванием семенного и товарного подсолнечника. В последнее десятилетие на подсолнечнике описаны новые для науки виды рода *Diaporthe*, которые мало отличаются по морфологическим признакам. В связи с этим необходимо разработать молекулярно-генетические методы, которые позволят проводить исследования в сжатые сроки и обеспечат высокую точность идентификации патогена. В процессе работы проведен сбор и анализ имеющейся в мировой практике информации о возбудителе и молекулярно-генетических методах диагностики. Выделен список видов рода *Diaporthe*, зарегистрированных на подсолнечнике. Определены наиболее вариабельные участки генома.

Ключевые слова. Фомопсис подсолнечника, *Diaporthe helianthi*, молекулярно-генетический метод, генетические особенности, нуклеотидная последовательность.

Для корреспонденции. Сурина Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, начальник – старший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Россия, Московская обл., г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, 32, e-mail: t.a.surina@yandex.ru.



ВВЕДЕНИЕ

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) – это однолетнее растение из семейства Asteraceae, в семенах которого содержится ценное и питательное масло. Отличаясь своей толерантностью к повышенным температурам и низкой требовательностью к воде и к азоту, культура представляет большой интерес для зон с континентальным климатом. Россия является одним из крупнейших производителей подсолнечного масла. Одной из причин низкой урожайности

Study of the genetic peculiarities of the causative agent of stem canker of sunflower

T.A. SURINA¹, O.V. SKRIPKA², E.R. RUCHKOV³

All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

¹ ORCID 0000-0002-0463-5762, e-mail: t.a.surina@yandex.ru

² e-mail: ovskripka@mail.ru

³ e-mail: egorruchkov1966@gmail.com

ABSTRACT

Stem canker of sunflower is a harmful disease in the countries of industrial cultivation of seed and commercial sunflowers. In the last decade, new species of *Diaporthe* genus have been described on the sunflower, which have little differences in morphological characteristics. Therefore, it is necessary to develop molecular genetic methods that would allow to conduct research in short terms and provide high accuracy of the pathogen identification. During the study, the data on the pathogen and molecular genetic diagnosis methods available in international practice have been collected and analyzed. A list of species of *Diaporthe* genus registered on the sunflower has been made. The most variable regions of the genome have been identified.

Keywords. Stem canker of sunflower, *Diaporthe helianthi*, molecular genetic method, genetic characteristics, nucleotide sequence.

For correspondence. Tatyana Surina, PhD in Biology, head and senior researcher of Research Department for Molecular Genetic Methods of Diagnosis, FGBU “VNIIKR”, 140150, 32 Pogranichnaya St., Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, e-mail: t.a.surina@yandex.ru.

INTRODUCTION

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is an annual plant from the family Asteraceae, the seeds of which contain valuable and nutritious oil. Distinguished by its tolerance to high temperatures and low demand for water and nitrogen, the culture is of great interest for areas with

культуры являются потери, вызываемые различными факторами, в том числе вредителями и инфекционными болезнями. Белая и серая гниль, милдью, болезни увядания и другие в значительной степени снижают продуктивность подсолнечника и ухудшают качество масла.

В число таких возбудителей входит гриб *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. et al., впервые зарегистрированный в Российской Федерации в 1990 г.

Фомопсис подсолнечника, вызываемый *Diaporthe helianthi*, считается вредоносным заболеванием в регионах, которые занимаются промышленным выращиванием семенного и товарного подсолнечника. Потери урожая семян подсолнечника во время эпифитотий составляли 50–80%. Однако в последнее десятилетие на подсолнечнике были описаны новые для науки виды рода *Diaporthe*, в связи с чем существующие методы диагностики, основанные на морфологических признаках, не подходят для проведения идентификации вида.

Длительное время считали, что на подсолнечнике развивается только 1 вид рода *Diaporthe* – *D. helianthi*, широко распространенный в районах возделывания подсолнечника в РФ. Данные о распространении вида основывались на идентификации возбудителя в основном по симптомам на растении и морфологическим признакам гриба. Вместе с тем показано, что на настоящий момент достоверная идентификация видов *Diaporthe* spp. может быть осуществлена только с применением молекулярно-генетических методов. В 2014 г. было зарегистрировано 8 видов *Diaporthe*, вызывающих рак стеблей на подсолнечнике во всем мире. Эти 8 видов включали *D. helianthi*, *Diaporthe gulyae* Shivas, Thompson and Young, *Diaporthe kochmanii* Shivas, Thompson and Young, *Diaporthe kongii* Shivas, Thompson and Young, *Diaporthe longicolla* (Hobbs) Santos, Vrandečić и Phillips, *Diaporthe stewartii* Harrison, *Diaporthe phaseolorum* (Cooke and Ellis) Sacc. и *Diaporthe novem* Santos, Vrandečić и Phillips. В настоящее время в результате проведенных исследований, посвященных ревизии образцов пораженного подсолнечника и реидентификации штаммов *Diaporthe* spp., выделенных из подсолнечника в чистую культуру с применением методов молекулярной филогении, было выявлено, что на этом растении могут развиваться 14 видов *Diaporthe* spp. [1, 2].

На территории России, кроме *Diaporthe helianthi*, на подсолнечнике обнаружены *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc., *D. arctii*, *D. gulyae* и *D. eres* [3, 4, 5].

При анализе литературных данных о молекулярно-генетических методах идентификации фомопсиса подсолнечника (*Diaporthe helianthi*) были рассмотрены различные варианты метода ПЦР. Наиболее распространенным молекулярно-генетическим методом для идентификации фомопсиса подсолнечника является классическая ПЦР с 3 парами праймеров на различные участки генома с последующим секвенированием этих участков.

Для идентификации патогена рекомендуют использовать участки гена внутренней транскрибируемой области спейсера (ITS), ген β-тубулина (BT) и ген фактора элонгации трансляции 1-α (TEF-1α) [6, 7, 8].

Последовательности, полученные в результате секвенирования, необходимо сравнить с нуклеотидными последовательностями штамма *D. helianthi* CBS 592.81, внесенными в GenBank под номерами

a continental climate. Russia is one of the largest producers of sunflower oil. One of the reasons for the low crop yield is losses caused by various factors, including pests and infectious diseases. White and gray rot, mildew, wilting diseases and others significantly reduce the productivity of sunflower and degrade the quality of the oil.

The fungus *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. et al. is one these pathogens. It was first registered in Russia in 1990.

Stem canker of sunflower caused by *Diaporthe helianthi* is considered a harmful disease in regions that are engaged in the industrial cultivation of seed and commercial sunflower. The loss of sunflower seed yield during epiphytotic was 50–80%. However, in the last decade, new *Diaporthe* species have been described on sunflower, that is why the existing diagnostic methods based on morphological characteristics are not suitable for identifying the species.

It was long believed that only one species of the genus *Diaporthe* – *D. helianthi* developed on the sunflower, being widespread in sunflower cultivation areas in Russia. The data on the species spreading were based on the pathogen identification, mainly, by the symptoms on the plant and morphological characteristics of the fungus. However, it has been confirmed that currently the reliable identification of *Diaporthe* species can only be achieved using molecular genetic methods. In 2014, 8 *Diaporthe* species causing sunflower stem cankers were registered in the world. These 8 species included *D. helianthi*, *D. gulyae* Shivas, Thompson et Young, *D. kochmanii* Shivas, Thompson et Young, *D. kongii* Shivas, Thompson et Young, *D. longicolla* (Hobbs) Santos, Vrandečić et Phillips, *D. stewartii* Harrison, *D. phaseolorum* (Cooke et Ellis) Sacc. and *Diaporthe novem* Santos, Vrandečić et Phillips. At present, because of the conducted research dedicated to revising the samples of the infected sunflower and re-identification of *Diaporthe* strains extracted from the sunflower into pure culture using molecular phylogeny methods, it was revealed that 14 *Diaporthe* species can develop on this plant [1, 2].

In Russia, *Diaporthe phaseolorum* (Cooke et Ellis) Sacc., *D. arctii*, *D. gulyae* and *D. eres* were detected on the sunflower, apart from *Diaporthe helianthi* [3, 4, 5].

When analyzing the research data on molecular genetic methods of *Diaporthe helianthi* identification, various versions of the PCR method were considered. The most common molecular genetic method for identification of stem canker of sunflower is a classical PCR with 3 pairs of primers on different parts of the genome, followed by sequencing of these regions.

To identify the pathogen, it is recommended to use gene regions of the internal transcribed region of the spacer (ITS), β-tubulin gene (BT) and translation elongation factor gene 1-α (TEF-1α) [6, 7, 8].

The sequences obtained as a result of sequencing must be compared with the nucleotide sequences of the strain *D. helianthi* CBS 592.81, registered in GenBank under the numbers KC343115 (ITS), KC344083 (BT) and KC343841 (TEF-1α). For positive identification, the sequence of the ITS sample must

КС343115 (ITS), КС344083 (BT) и КС343841 (TEF-1α). Для положительной идентификации последовательность ITS-образца должна совпадать на 100%, а последовательности BT и TEF-1α должны совпадать на 99–100% (разница должна быть не более 3 п. н.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа была выполнена в 2020 г. на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР). В ходе исследования были использованы следующие методы: выделение ДНК, классическая ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, обработка нуклеотидных последовательностей в программе BioEdit. В работе были использованы 5 изолятов *D. helianthi* из коллекции ФГБУ «ВНИИКР», а также последовательности видов рода *Diaporthe*, депонированные в международную базу данных GenBank.

Для выделения ДНК из чистых культур применяли набор DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). С выделенными образцами ДНК проводили классическую ПЦР. Для амплификации ДНК использовали универсальные праймеры ITS4/ITS5 (White, 1990) [9], которые амплифицируют продукт от 600 п. о. региона ITS rRNA. Амплификация фрагмента гена актина (ACT) осуществляли с праймерами ACT512/ACT2Rd, которые амплифицируют продукт размером 700 п. о. Смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл содержала: 17 мкл свободной от РНК и ДНК воды, 5 мкл 5X ПЦР-буфера Mas^{DP}TaqMIX-2025 (ООО «Диалат Лтд.», Москва), по 0,5 мкл каждого праймера (10 мкм) и 2 мкл целевой ДНК.

Температурно-временные параметры амплификации для праймеров ITS4/ITS5 включали: преденатурацию 95 °С – 3 мин., далее 40 циклов, состоящих из денатурации 95 °С – 30 сек., отжига праймеров 52 °С – 30 сек., элонгации 72 °С – 30 сек.; финальный досинтез 72 °С – 7 мин.; хранение при +4 °С. Для праймеров ACT512/ACT2Rd: 95 °С – 30 мин., 40 циклов: 95 °С – 30 сек., 61 °С – 30 сек., 72 °С – 30 сек.; 72 °С – 7 мин.; хранение при +4 °С. Результаты амплификации после проведения электрофореза в 1,5%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, регистрировали в гель-документирующей системе Quantum-ST-4-1500 (Япония). Размер продукта ПЦР измеряли, используя маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 100+ п. н. и Fast Ruler™ (Fermentas). Секвенирование образцов проводили по методу Сэнгера. ПЦР-продукты, предназначенные для секвенирования, очищали с помощью коммерческого набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Реакцию секвенирования проводили с применением реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе «Нанофор-05» (ООО «Синтол»). Нуклеотидные последовательности участков генов изучаемых видов анализировали с помощью программного обеспечения BioEdit и базы данных BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для анализа генетических особенностей нами были выбраны все виды рода *Diaporthe*, которые зарегистрированы на подсолнечнике. Список видов

match 100%, and the BT and TEF-1α sequences must match 99–100% (the difference should be no more than 3 bp).

MATERIALS AND METHODS OF RESEARCH

The research was carried out in 2020 on the base of FGBU “VNIIKR”. During the study, the following methods were used: DNA extraction, classical PCR, Sanger sequencing, processing of nucleotide sequences in the BioEdit program. 5 isolates of *D. helianthi* from FGBU “VNIIKR” collection were used, as well as *Diaporthe* species sequences, deposited in the international GenBank database.

The DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) was used to isolate DNA from pure cultures. The isolated DNA samples were subjected to classical PCR. Universal primers were ITS4/ITS5 [9], which amplify the product from 600 bp of the region ITS rRNA. Amplification of the actin gene fragment (ACT) was carried out with primers ACT512/ACT2Rd (700 bp). A mixture of reagents for one reaction with a volume of 25 µl contained: 17 µl of RNA and DNA free water, 5 µl 5X PCR buffer Mas^{DP}TaqMIX-2025 (Dialat Ltd., Moscow), 0.5 µl of each primer (10 µM) and 2 µl of target DNA.

Temperature-time parameters of amplification for primers ITS4/ITS5 included: pre-denaturation at 95 °С – 3 min., then 40 cycles, consisting of denaturation at 95 °С – 30 sec., annealing of primers at 52 °С – 30 sec., elongation at 72 °С – 30 sec.; final synthesis 72 °С – 7 min.; storage at +4 °С. For the primers ACT512/ACT2Rd: 95 °С – 30 min., 40 cycles: 95 °С – 30 sec., 61 °С – 30 sec., 72 °С – 30 sec.; 72 °С – 7 min.; storage at +4 °С. The amplification results after electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide were recorded in a gel-documenting system Quantum-ST-4-1500 (Japan). PCR product size was measured using molecular weight markers GeneRuler™ 100+ bp and Fast Ruler™ (Fermentas). Samples were sequenced by the Sanger method. PCR products for sequencing were purified using a commercial kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). The sequencing reaction was carried out using reagents BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions, followed by separation of fragments on an automatic genetic analyzer “Nanoфор-05” (Syntol, Russia). Nucleotide sequences of gene regions of the studied species were analyzed using the BioEdit software and the BLAST NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTS AND DISCUSSION

For the analysis of genetic characteristics, we selected all *Diaporthe* species registered on the sunflower (see Table).

American and Australian academic papers mention 17 *Diaporthe* species damaging the sunflower. Many of these species damage a wide range of plants. All these species have similar morphological and cultural characteristics. Only 6 of these 17 species have been registered in Russia so far. The genetic peculiarities of the 17 species have been studied to different

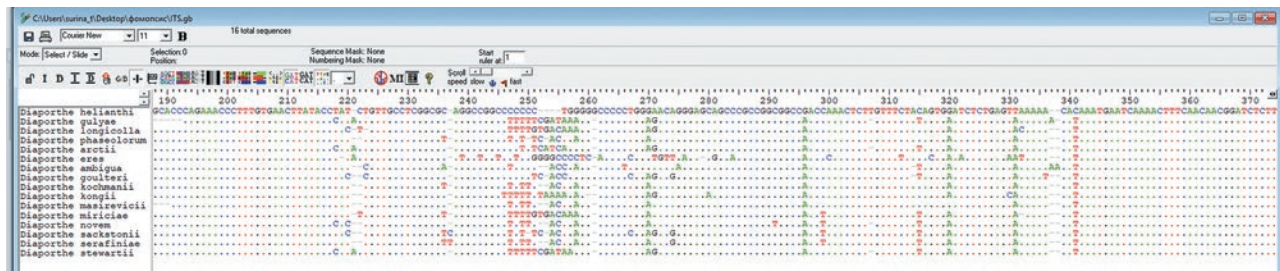


Рис. 1. Выворенные последовательности по гену ITS Fig. 1. Aligned ITS sequences

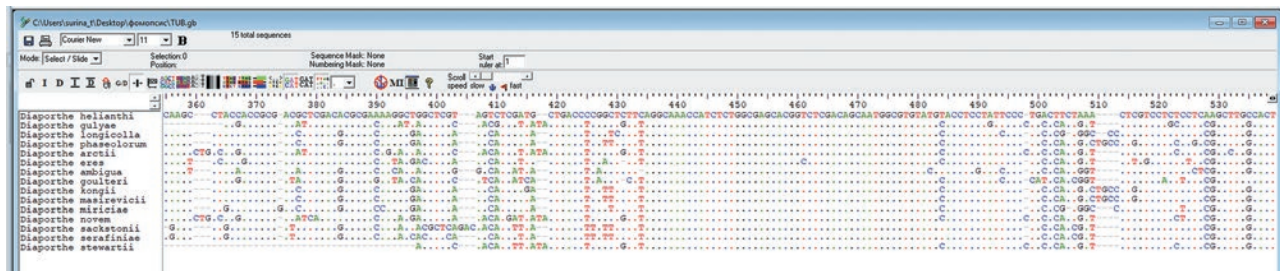


Рис. 2. Выворенные последовательности по гену BT Fig. 2. Aligned BT gene sequences

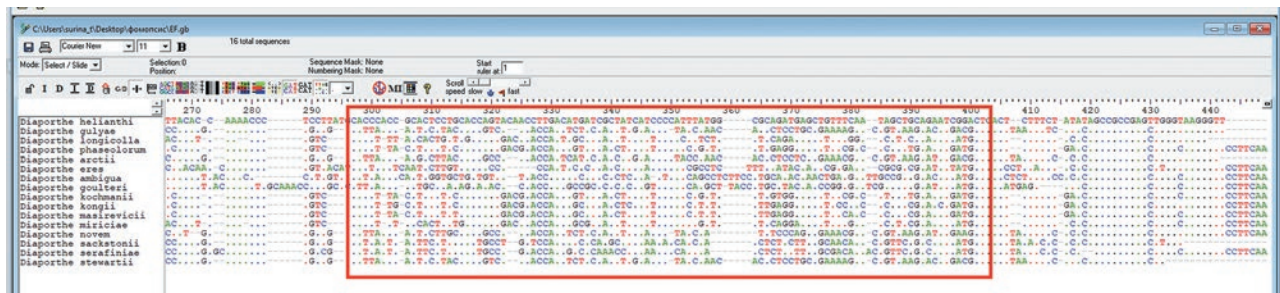


Рис. 3. Выворенные последовательности по гену TEF-1α Fig. 3. Aligned TEF-1α gene sequences

Diaporthe, выбранных для исследования, представлен в таблице.

В литературных источниках США и Австралии упоминается о 17 видах рода *Diaporthe*, поражающих подсолнечник. Многие из этих видов поражают широкий круг растений. Все эти виды имеют сходные морфологические и культуральные признаки. Из 17 видов в нашей стране зарегистрированы пока только 6 видов. Генетические особенности 17 видов изучены в разной степени. Как видно из таблицы, некоторые виды имеют большое количество нуклеотидных последовательностей в GenBank NCBI, узкоспециализированный патоген подсолнечника *Diaporthe weieri* не имеет ни одной последовательности, большинство видов имеет небольшое число нуклеотидных последовательностей. Таким образом, генетические особенности внутри рода еще мало изучены.

Для поиска уникальных участков генов внутри рода *Diaporthe* нами были выбраны: ген внутренней транскрибируемой области спейсера (ITS), ген β-тубулина (BT), ген фактора элонгации трансляции 1-α (TEF-1α), ген, кодирующий белок кальмодулин (CALM), и ген актина (ACT).

Анализ последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, основываясь на наименьшей комплементарности конкретного участка гена аналогичным участкам других видов *Diaporthe* (рис. 1, 2, 3).

В результате проведенных исследований выяснили, что ген фактора элонгации трансляции 1-α (TEF-1α) имеет большее число вариабельных участков по сравнению с остальными генами.

extents. According to the table, some species have a large number of nucleotide sequences in GenBank NCBI, the highly specialized sunflower pathogen *Diaporthe weieri* has no sequence, most species have a small number of nucleotide sequences. Thus, the genetic peculiarities within the genus are still poorly studied.

To find unique genetic regions among *Diaporthe* species we selected internal transcribed spacer (ITS), β-tubulin gene (BT), translation elongation factor gene 1-α (TEF-1α), gene encoding calmodulin protein (CALM), and the actin gene (ACT).

Sequence analysis was performed using the BioEdit software, based on the least complementarity of a particular gene region to similar regions of other *Diaporthe* species (Fig. 1, 2, 3).

The conducted research showed that the gene for translation elongation factor 1-α (TEF-1α) has a greater number of variable regions than other genes.

CONCLUSION

According to the research, the genus *Diaporthe* and its species associated with sunflower are poorly studied. In Russia, the composition of species within the genus on the sunflower has been studied little. The further research on this topic is necessary.

Таблица
 Виды рода *Diaporthe*, отобранные для изучения генетических особенностей и поражающие подсолнечник

№	Название вида	Растение-хозяин	Распространение в РФ	Количество нуклеотидных последовательностей в GenBank NCBI
1.	<i>Diaporthe ambigua</i>	Более 15 видов		311
2.	<i>Diaporthe arctii</i>	Более 100 видов	+	12
3.	<i>Diaporthe eres</i>	Более 100 видов	+	2321
4.	<i>Diaporthe goulteri</i>	<i>Helianthus annuus</i>		7
5.	<i>Diaporthe gulyae</i>	<i>Glycine max</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Heracleum sphondylium</i> <i>Vitis vinifera</i>	+	98
6.	<i>Diaporthe helianthi</i>	<i>Arctium lappa</i> <i>Fraxinus excelsior</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Helianthus</i> sp. <i>Lagerstroemia indica</i> <i>Vitis</i> sp. <i>Vitis vinifera</i> <i>Xanthium italicum</i> <i>Xanthium</i> sp. <i>Xanthium strumarium</i>	+	3026
7.	<i>Diaporthe kochmanii</i>	<i>Helianthus annuus</i>		6
8.	<i>Diaporthe kongii</i>	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Ipomoea batatas</i> <i>Portulaca grandiflora</i>		21
9.	<i>Diaporthe longicolla</i>	<i>Chamaesyce nutans</i> <i>Cucumis melo</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine soja</i> <i>Glycine</i> sp. <i>Helianthus annuus</i> <i>Ipomoea lacunosa</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Pyrus pyrifolia</i> <i>Pyrus</i> sp.	+	601
10.	<i>Diaporthe masirevicii</i>	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Camellia sinensis</i> <i>Chrysanthemoides monilifera</i> <i>Gloriosa superba</i> <i>Glycine max</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Physalis peruviana</i> <i>Zea mays</i>		38
11.	<i>Diaporthe miriciae</i>	<i>Glycine max</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Vigna radiata</i>		54
12.	<i>Diaporthe novem</i>	Более 30 видов		213
13.	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Более 50 видов	+	486
14.	<i>Diaporthe sackstonii</i>	<i>Helianthus annuus</i>		14
15.	<i>Diaporthe serafiniae</i>	<i>Helianthus annuus</i> <i>Lupinus albus</i> <i>Malus domestica</i>		19
16.	<i>Diaporthe stewartii</i>	<i>Cosmos bipinnatus</i> <i>Cosmos sulphureus</i> <i>Helianthus annuus</i>		25
17.	<i>Diaporthe weieri</i>	<i>Helianthus annuus</i>		0

Table
 Species of *Diaporthe* genus selected for the study genetic peculiarities and damaging sunflower

№	Species name	Host plant	Distribution in Russia	The number of nucleotide sequences in GenBank NCBI
1.	<i>Diaporthe ambigua</i>	Over 15 species		311
2.	<i>Diaporthe arctii</i>	Over 100 species	+	12
3.	<i>Diaporthe eres</i>	Over 100 species	+	2321
4.	<i>Diaporthe goulteri</i>	<i>Helianthus annuus</i>		7
5.	<i>Diaporthe gulyae</i>	<i>Glycine max</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Heracleum sphondylium</i> <i>Vitis vinifera</i>	+	98
6.	<i>Diaporthe helianthi</i>	<i>Arctium lappa</i> <i>Fraxinus excelsior</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Helianthus</i> sp. <i>Lagerstroemia indica</i> <i>Vitis</i> sp. <i>Vitis vinifera</i> <i>Xanthium italicum</i> <i>Xanthium</i> sp. <i>Xanthium strumarium</i>	+	3026
7.	<i>Diaporthe kochmanii</i>	<i>Helianthus annuus</i>		6
8.	<i>Diaporthe kongii</i>	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Ipomoea batatas</i> <i>Portulaca grandiflora</i>		21
9.	<i>Diaporthe longicolla</i>	<i>Chamaesyce nutans</i> <i>Cucumis melo</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine soja</i> <i>Glycine</i> sp. <i>Helianthus annuus</i> <i>Ipomoea lacunosa</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Pyrus pyrifolia</i> <i>Pyrus</i> sp.	+	601
10.	<i>Diaporthe masirevicii</i>	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Camellia sinensis</i> <i>Chrysanthemoides monilifera</i> <i>Gloriosa superba</i> <i>Glycine max</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Physalis peruviana</i> <i>Zea mays</i>		38
11.	<i>Diaporthe miriciae</i>	<i>Glycine max</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Vigna radiata</i>		54
12.	<i>Diaporthe novem</i>	Over 30 species		213
13.	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Over 50 species	+	486
14.	<i>Diaporthe sackstonii</i>	<i>Helianthus annuus</i>		14
15.	<i>Diaporthe serafiniae</i>	<i>Helianthus annuus</i> <i>Lupinus albus</i> <i>Malus domestica</i>		19
16.	<i>Diaporthe stewartii</i>	<i>Cosmos bipinnatus</i> <i>Cosmos sulphureus</i> <i>Helianthus annuus</i>		25
17.	<i>Diaporthe weieri</i>	<i>Helianthus annuus</i>		0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что род *Diaporthe* и его виды, ассоциируемые с подсолнечником, мало изучены. На территории РФ на подсолнечнике состав видов внутри рода изучен в небольшом объеме. Необходимо продолжить исследования в этом направлении.

Анализ нуклеотидных последовательностей позволил выявить ген фактора элонгации трансляции 1-α (TEF-1α), на основе которого будут разрабатываться оригинальные тест-системы для диагностики фомопсиса подсолнечника методом ПЦР в режиме реального времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Masirevic S., Gulya T.J. *Sclerotinia* and *Phomopsis* – two devastating sunflower pathogens // Field Crops Research. – 1992. – № 30. – P. 271–300.
- Thompson S.M., Tan Y.P., Young A.J., Neate S.M., Aitken E.A.B., Shivas R.G. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species // Persoonia. – 2011. – № 27. – P. 80–89.
- Долженко Е.Г. Биология гриба *Phomopsis helianthi* и меры борьбы с ним в условиях Краснодарского края. Автореферат дисс. канд. биол. наук. Краснодар, Кубан. гос. аграрн. ун-т, 2000. – 25 с.
- Пивень В.Т., Алифинова Т.П., Шуляк И.И., Мурадасилова Н.В., Саенко Г.М. Семена подсолнечника – источник сохранения и распространения фомопсиса // Защита и карантин растений. – 2010. – № 1. – С. 36–40
- Гомжина М.М., Ганнибал Ф.Б. Первая находка гриба *Diaporthe phaseolorum* на подсолнечнике в России. – 2018. – Том 5. – № 1. – С. 59–64.
- Carbone I., Kohn L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes // Mycologia. – 1999. – Vol. 91. – № 3. – P. 553–556.
- Glass N.L., Donaldson G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – № 4. – P. 1323–1330.
- O'Donnell K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Vol. 95. – № 5. – P. 2044–2049.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. – 1990. – V. 18. – P. 315–322.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Сурина Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, начальник – старший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Скрипка Ольга Валентиновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Ручков Егор Романович, младший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

The analysis of nucleotide sequences revealed the gene for translation elongation factor 1-α (TEF-1α), on the basis of which original test systems will be developed for the diagnosis of stem canker of sunflower by real-time PCR.

REFERENCES

- Masirevic S., Gulya T.J. *Sclerotinia* and *Phomopsis* – two devastating sunflower pathogens // Field Crops Research. 1992; 30: 271–300.
- Thompson S.M., Tan Y.P., Young A.J., Neate S.M., Aitken E.A.B., Shivas R.G. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species // Persoonia. 2011; 27: 80–89.
- Dolzhenko E.G. Biology of the fungus *Phomopsis helianthi* and its control measures in Krasnodar Krai [Biologiya griba *Phomopsis helianthi* i mery bor'by s nim v usloviyakh Krasnodarskogo kraya]. Author's abstract for the degree of PhD in Biology. Krasnodar, Kuban State Agrarian University, 2000. 25 pp.
- Piven V.T., Alifirova T.P., Shulyak I.I., Murasadilova N.V., Saenko G.M. The sunflower seeds as the source of preservation and spreading of phomopsis [Semena podsolnechnika – istochnik sokhraneniya i rasprostraneniya fomopsisa]. *Plant protection and quarantine*. 2010; 1: 36–40 (in Russian).
- Gomzhina M.M., Gannibal F.B. The first detection of the fungus *Diaporthe phaseolorum* on sunflower in Russia [Pervaya nakhodka griba *Diaporthe phaseolorum* na podsolnechnike v Rossii]. *Microbiology Research Independent Journal*. 2018; 5–1: 59–64 (in Russian).
- Carbone I., Kohn L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 1999; 91–3: 553–556.
- Glass N.L., Donaldson G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol*. 1995; 61–4: 1323–1330.
- O'Donnell K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95–5: 2044–2049.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990; 18: 315–322.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tatyana Surina, PhD in Biology, head and senior researcher of Research Department for Molecular Genetic Methods of Diagnosis, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia.

Olga Skripka, PhD in Biology, senior researcher of Research and Methodology Department for Mycology and Helminthology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia.

Egor Ruchkov, junior researcher of Research and Methodology Department for Mycology and Helminthology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia.

УДК 581.9 (581.527.7)

Гербологическая экспедиция в Томскую область и Алтайский край

Т.В. ЭБЕЛЬ¹, А.Л. ЭБЕЛЬ², С.И. МИХАЙЛОВА³

- Томский филиал ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), г. Томск, Россия
- ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия
- Томский филиал ФГБУ «ВНИИКР», г. Томск, Россия; ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия
- ORCID 0000-0002-6356-7077, e-mail: t-ebel@sibmail.com
- ORCID 0000-0002-7889-4580, e-mail: alex-08@mail2000.ru
- ORCID 0000-0003-4595-2032, e-mail: mikhailova.si@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

В статье сообщается о гербологической экспедиции в районы Томской области и Алтайский край, которая состоялась в августе 2020 г. в рамках выполнения научно-исследовательской работы (НИР), и о результатах данной экспедиции. В полевых условиях проводилось изучение распространения и эколого-биологических особенностей сорных, в том числе карантинных и инвазивных, видов растений, выполнялись геоботанические описания агроценозов, собирался гербологический материал. Проведены наблюдения в природе за видами повилик и циклахой дурнишниковистой.

Ключевые слова. Сорные растения, инвазивные виды, агроценозы, карантинные виды растений, Томская область, Алтайский край.

Для корреспонденции. Эбель Татьяна Валерьевна, научный сотрудник испытательной лаборатории Томского филиала ФГБУ «ВНИИКР», 634021, Россия, г. Томск, e-mail: t-ebel@sibmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

2018–2021 гг. Томским филиалом Всероссийского центра карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») в рамках научно-исследовательской темы «Изучение особенностей развития, оценка распространения особо опасных вредных организмов на территории Российской Федерации» выполняется научная работа «Изучение распространения и эколого-биологических

UDC 581.9 (581.527.7)

Herbological Expedition to Tomsk Oblast and Altai Krai

T.V. EBEL¹, A.L. EBEL², S.I. MIKHAILOVA³

- Tomsk Branch of FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIIKR”), Tomsk, Russia
- National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia
- Tomsk Branch of FGBU “VNIIKR”, Tomsk, Russia; FGAOU National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia
- ORCID 0000-0002-6356-7077, e-mail: t-ebel@sibmail.com
- ORCID 0000-0002-7889-4580, e-mail: alex-08@mail2000.ru
- ORCID 0000-0003-4595-2032, e-mail: mikhailova.si@yandex.ru

ABSTRACT

The article describes a herbological expedition to the districts of Tomsk Oblast and Altai Krai which took place in August 2020 within the research project, as well as the results of this expedition. In field conditions, the researchers studied the spreading, ecological and biological characteristics of weed plants, including the quarantine and invasive plant species, described the geobotany of agrocenoses and collected herbarium materials. Observations of *Cuscuta* spp. and *Cyclachaena xanthiifolia* (Nutt.) Fresen. were carried out in nature.

Key words. Weeds, invasive species, agrocenoses, quarantine plant species, Tomsk Oblast, Altai Krai.

For correspondence. Tatyana Ebel, Researcher of the Testing Laboratory, Tomsk Branch of FGBU “VNIIKR”, 634021, Russia, Tomsk, e-mail: t-ebel@sibmail.com.

INTRODUCTION

In 2018–2021 the Tomsk branch of FGBU “VNIIKR” carried out a research project called “Study of Distribution and Ecological and Biological Characteristics of Quarantine and Invasive Plant Species in Siberian Federal District”