

Культурально-морфологические особенности возбудителя *Diaporthe vaccinii* в подкарантинной продукции – растениях клюквы

А.А. КУЗНЕЦОВА¹, Ю.В. ЦВЕТКОВА²,
А.В. КАМЧЕНКОВ³

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

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

¹ e-mail: kyyznec@bk.ru

² ORCID 0000-0002-4334-9224, SPIN-код 2744-1123, e-mail: yutska@mail.ru

³ e-mail: akamchenkov@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В ходе работы лаборатории микологии ФГБУ «ВНИИКР» при исследованиях подкарантинной продукции образцов саженцев клюквы из Республики Беларусь был выявлен и изучен грибок *Diaporthe vaccinii* Shear – возбудитель вязкой гнили черники. В исследовании описаны биологические особенности патогена, основные симптомы поражения на ягодных культурах рода *Vaccinium* и, в частности, на растениях клюквы, методы выделения и идентификации патогена с помощью культурально-морфологических и молекулярно-генетических методов; представлена сравнительная характеристика роста и развития гриба на двух питательных средах: картофельно-глюкозном и солодовом агаре; описаны культурально-морфологические признаки гриба, а также проведена морфометрия структур – пикнидий и пикноспор. На основе предварительных симптоматических и морфологических признаков была проведена идентификация патогена. Для подтверждения видовой принадлежности был проведен анализ нуклеотидных последовательностей по участку внутреннего транскрибируемого спейсера.

Ключевые слова. Вязкая гниль черники, *Phomopsis vaccinii*, ПЦР, диагностика фитопатогена.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в сельском хозяйстве все большее распространение получают промышленные плантации редких ягодных культур, таких как голубика, клюква, черника. Почвенно-климатические условия средней полосы России позволяют выращивать растения рода *Vaccinium* с высокими показателями урожайности.

Culture morphological characteristics of the pathogen *Diaporthe vaccinii* in regulated products – cranberry plants

A.A. KUZNETSOVA¹, YU.V. TSVETKOVA²,
A.V. KAMCHENKOV³

^{1,2,3} FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIICR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

¹ e-mail: kyyznec@bk.ru

² ORCID 0000-0002-4334-9224, SPIN-code 2744-1123, e-mail: yutska@mail.ru

³ e-mail: akamchenkov@mail.ru

ABSTRACT

In the course of the work of the Mycology Laboratory of FGBU “VNIICR”, while studying the regulated products of cranberry seedlings samples from the Republic of Belarus, the fungus *Diaporthe vaccinii* Shear was detected and studied, which is a causative agent of blight of blueberry. The study describes the biological characteristics of the pathogen, the main damage symptoms on the *Vaccinium* genus berry crops and, in particular, on cranberry plants, methods of isolating and identifying the pathogen using culture morphological and molecular genetic methods; presents a comparative characteristic of the growth and development of the fungus on two nutrient media: potato dextrose and malt agar; the culture morphological characteristics of the fungus are described, as well as the morphometry of the structures – pycnidia and pycnospores. The identification of the pathogen was carried out on the basis of preliminary symptomatic and morphological characteristics. To confirm the species, the analysis of nucleotide sequences was carried out for the site of the internal transcribed spacer.

Keywords. Blight of blueberry, *Phomopsis vaccinii*, PCR, phytopathogen diagnostics.

INTRODUCTION

Currently, industrial plantations of rare berry crops, such as blueberries, cranberries, and bilberries, are becoming more widespread in agriculture. The soil and climatic

Закладываются промышленные маточники ягодных культур в Калининградской, Ленинградской, Нижегородской, Тамбовской, Пензенской областях и др., а также активно происходит выращивание растений в Краснодарском крае (Латков и др., 2020). Производство ягодных культур является перспективной отраслью, но для получения качественного посадочного материала и высокого урожая требуется проведение эффективного комплекса мероприятий, основу которых составляет фитосанитарный контроль состояния маточных растений. Зачастую с приобретением посадочного материала новых и продуктивных сортов иностранного происхождения существует риск проникновения и распространения инвазивных видов грибов и грибоподобных организмов.

Одним из таких видов является новый для РФ вид *Diaporthe vaccinii* Shear (бесполовая стадия – *Phomopsis vaccinii* Shear, N.E. Stevens & H.F. Bain) – возбудитель вязкой гнили черники, поражающий преимущественно культивируемые виды рода *Vaccinium*: американские и европейские виды клюквы (*V. macrocarpon*, *V. oxycoccoides*, *V. oxycoccoides* var. *intermedium* и др.), голубику высокорослую (*V. corymbosum*), голубику прутьевидную (*V. ashei*), бруснику (*V. vitis-idaea*) и чернику (*V. myrtillus*). Дикорастущие виды рода *Vaccinium* могут быть резервуарами инфекции *D. vaccinii* (EPPO Standard, 2009). Возбудитель вязкой гнили черники *D. vaccinii* является карантинным вредным организмом, отсутствующим на территории РФ и Евразийского экономического союза; для стран Европейского союза с 2019 г. – регулируемый вредный организм. По данным ЕОКЗР (2020-03-02), патоген распространен в Европе (Латвия), Азии (Китай), Северной Америке (Канада, США) и Южной Америке (Чили) (<https://gd.eppo.int/taxon/DIAPVA/distribution>).

Вредоносность патогена проявляется в интенсивном отмирании ветвей растений, приводящем к значительным потерям урожайности – до 65%, в некоторых случаях к полной гибели ягодных культур (EFSA PLH Panel, 2014; Friend, Boone, 1968). Основным способом проникновения инфекции на новую территорию является несертифицированный пораженный посадочный материал. Естественным путем патоген может распространяться с помощью ветра, капельной влаги, инвентаря, необработанной сельскохозяйственной техники и т. д. *D. vaccinii* зимует на побегах и на лежащих на поверхности почвы растительных остатках (стеблях, листьях, плодах). Оптимальная температура как для роста мицелия, так и для прорастания конидий составляет 21–24 °C (EFSA PLH Panel, 2014; EPPO Standard, 2009).

Первые симптомы *D. vaccinii* появляются на кончиках молодых побегов в виде вытянутых язв, которые со временем разрастаются и вызывают усыхание веточек и листьев растений. Патоген проникает через ранки и устьица и распространяется к основанию растений по сосудистым тканям стеблей, вызывая бурое обесцвечивание ксилемы. На инфицированных стеблях под поверхностью коры появляются плодовые тела – темные пикниды, с выходящими из поросов многочисленными спорами кремовато-молочного цвета. Гриб также поражает плоды, которые становятся красновато-коричневыми, мягкими, приобретают кашеобразную консистенцию, часто растрескиваются

conditions of central Russia make it possible to grow plants of the genus *Vaccinium* with high yields. Industrial mother-plantation of berry crops are laid in Kaliningrad Oblast, Leningrad Oblast, Nizhny Novgorod Oblast, Tambov Oblast, Penza Oblast, etc., and plants are being actively cultivated in Krasnodar Krai (Latkov et al., 2020). The production of berry crops is a promising industry, but to obtain high-quality planting material and a high yield, an effective set of measures is required, the basis of which is phytosanitary control of the mother plants state. Often, with the acquisition of planting material for new and productive varieties of foreign origin, there is a risk of introduction and spreading of invasive species of fungi and fungi-like organisms.

One of these types is a species new for the Russian Federation – *Diaporthe vaccinii* Shear (asexual stage – *Phomopsis vaccinii* Shear, N.E. Stevens & H.F. Bain), the agent of blight of blueberry mostly affecting cultivated species of the genus *Vaccinium*: American and European cranberries (*V. macrocarpon*, *V. oxycoccoides*, *V. oxycoccoides* var. *intermedium*, etc.), northern highbush blueberry (*V. corymbosum*), rabbiteye blueberry (*V. ashei*), cranberry (*V. vitis-idaea*) and bilberry (*V. myrtillus*). Wild species of the genus *Vaccinium* can be reserves of the infection *D. vaccinii* (EPPO Standard, 2009). The agent of blight of blueberry *D. vaccinii* is a quarantine pest absent in the Russian Federation and the Eurasian Economic Union; since 2019 it has been a regulated pest for the European Union countries. According to EPPO data (2020-03-02), the pathogen is spread in Europe (Latvia), Asia (China), North America (Canada, USA) and South America (Chile) (<https://gd.eppo.int/taxon/DIAPVA/distribution>).

The harmfulness of the pathogen is manifested in the intense death of plant branches, leading to significant losses in yield – up to 65%, in some cases to the complete death of berry crops (EFSA PLH Panel, 2014; Friend, Boone, 1968). The main pathway of the infection into a new territory is uncertified diseased planting material. The pathogen can naturally spread by wind, dripping moisture, implements, untreated agricultural machinery, etc. *D. vaccinii* overwinters on shoots and plant debris (stems, leaves, fruits) lying on the soil surface. The optimum temperature for both mycelium growth and conidial germination is 21–24 °C (EFSA PLH Panel, 2014; EPPO Standard, 2009).

The first symptoms of *D. vaccinii* appear on the tips of young shoots in the form of elongated cankers, which grow over time and cause the twigs and leaves of plants to dry out. The pathogen penetrates through wounds and stomata and spreads to the base of plants along the vascular tissues of the stems, causing brown discoloration of the xylem. On the infected stems under the surface of the bark, fruiting bodies appear – dark pycnidia, with numerous spores of a creamy-milky color emerging from the pores. The fungus also affects fruits that become reddish-brown, soft, mushy, and often crack with sap during harvest (EFSA PLH Panel, 2014; Weingartner and Klos, 1975) (Fig. 1).

In some cases, *Vaccinium* plants have no visible symptoms of *D. vaccinii* in the vegetative and generative parts. In this case, the pathogen can exist in a state of latent infection until the end of the growing season and



Рис. 1. Симптомы поражения растений грибом *D. vaccinii*:
а – отмирание ветвей на растении голубики;
б – пораженная ягода голубики (фото Ю.В. Цветковой)



Fig. 1. Symptoms of damage to plants by the fungus *D. vaccinii*:
a – dying off of branches on a blueberry plant; b – affected blueberry (photo by Yu.V. Tsvetkova)

с вытеканием сока при сборе урожая (EFSA PLH Panel, 2014; Weingartner, Klos, 1975) (рис. 1).

В ряде случаев у растений рода *Vaccinium* на вегетативных и генеративных частях отсутствуют видимые симптомы поражения *D. vaccinii*. При этом патоген может существовать в состоянии латентной инфекции до конца вегетационного периода и проявляться только при созревании плодов. На растениях-хозяевах могут присутствовать близкородственные виды грибов рода *Diaporthe*, такие как *D. columnaris* (D.F. Farr & Castl.) Udayanga & Castl., *D. conorum* (Desm.) Niessl, *D. eres* Nitschke и др., которые вызывают похожие симптомы поражения и формируют трудноотличимые морфологические структуры. Скрытая форма инфекции и присутствие близкородственных видов грибов на одном растении-хозяине усложняют диагностику заболевания (EFSA PLH Panel, 2014; EPPO Standard, 2009).

Для предотвращения проникновения возбудителя на новые территории необходимо точное и быстрое выявление на точках досмотра растительной продукции и надежная идентификация в лабораторных условиях, включающая проведение исследований импортируемого посадочного материала, основанных на комплексном подходе с использованием общепринятых классических (биологических) и современных (молекулярно-генетических) методов (Farr et al., 2002; Michalecka et al., 2017).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся подкарантинный посадочный материал растений клюквы (*Vaccinium* subgen. *Oxycoccus*) импортного происхождения (Республика Беларусь).

На первом этапе исследования использовали классические методы диагностики: выделение патогена на питательную среду, микроскопирование и морфометрию.

При визуальном осмотре растений клюквы были отобраны небольшие фрагменты пораженных частей (листья, стебли), которые промывали в проточной воде, стерилизовали и закладывали на чашки Петри с подготовленной питательной средой (2%-й картофельно-глюкозный агар, pH 5,5). Чашки инкубировали при температуре 25 °C в течение 7 дней с ежедневным просмотром развившегося мицелия гриба. Выросший мицелий микроскопировали, при наличии подозрительных и сходных

manifest itself only when the fruits ripen. Host plants may contain closely related species of fungi of the genus *Diaporthe*, such as *D. columnaris* (DF Farr & Castl.) Udayanga & Castl., *D. conorum* (Desm.) Niessl, *D. eres* Nitschke, etc., which cause similar damage symptoms and form morphological structures that are difficult to distinguish. The latent form of infection and the presence of closely related fungal species on the same host plant complicate the diagnosis of the disease (EFSA PLH Panel, 2014; EPPO Standard, 2009).

To prevent the penetration of the pathogen into new territories, accurate and quick identification of plant products at inspection points and reliable identification in laboratory conditions are required, including research on imported planting material based on an integrated approach using generally accepted classical (biological) and modern (molecular genetic) methods (Farr et al., 2002; Michalecka et al., 2017).

MATERIALS AND METHODS

The object of the study was regulated planting stock of cranberry plants (*Vaccinium* subgen. *Oxycoccus*) of imported origin (Republic of Belarus).

At the first stage of the study, classical diagnostic methods were used: isolation of the pathogen on a nutrient medium, microscopy and morphometry.

During visual inspection of cranberry plants, small fragments of the affected parts (leaves, stems) were selected, washed in running water, sterilized, and placed on Petri dishes with a prepared nutrient medium (2% potato dextrose agar, pH 5.5). The dishes were incubated at 25 °C for 7 days with daily viewing of the developed mycelium of the fungus. The grown mycelium was microscopied, in the presence of suspicious and similar to the target species of the fungus microscopic signs, were sifted into a pure culture.

To clarify the species identification, classical PCR was performed using universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3') (EPPO Standard, 2009; White et al., 1990).

To isolate DNA, a portion of the fungal mycelium (1 cm²) was selected in a 1.5 ml tube, 200 µl of lysis



Рис. 2. Симптомы поражения растений клюквы грибом *D. vaccinii*: а – усыхание ветвей растения клюквы; б – некроз листа с образовавшимися пикнидами (фото Ю.В. Цветковой)



Fig. 2. Symptoms of damage to cranberry plants by the fungus *D. vaccinii*: а – drying out of the branches of the cranberry plant; б – leaf necrosis with formed pycnidia (photo by Yu.V. Tsvetkova)

с целевым видом гриба микроскопических признаков, отсеивали в чистую культуру.

Для уточнения видовой идентификации проводили классическую ПЦР с применением универсальных праймеров ITS5 (5' -GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3') и ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') (EPPO Standard, 2009; White et al., 1990).

Для выделения ДНК отбирали участок мицелия гриба (1 см²) в 1,5 мл пробирки, добавляли 200 мкл лизирующего буфера и растирали пестиком до однородного состояния. Выделение ДНК проводили с использованием готового набора «Фитосорб» (ООО «НПФ Синтол», Москва), основанного на использовании магнитных частиц.

ПЦР проводили в термоциклере T100 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad. Смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл содержала 5 мкл 5X ПЦР-буфера Mas DDMix 2025 (ООО «Диалат Лтд.», Москва), 1 мкл каждого праймера, 2 мкл целевой ДНК и 16 мкл стерильной воды.

Условия амплификации на приборе: 3 мин. – 94 °C; 30 циклов: 30 с. – 94 °C, 30 с. – 52 °C, 90 с. – 72 °C; 1 цикл 7 мин. – 72 °C.

buffer was added and triturated with a pestle until smooth. DNA isolation was carried out using a ready-made kit “Fitosorb” (“NPF Syntol”, Moscow), based on the use of magnetic particles.

PCR was performed in a T100 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad. A mixture of reagents for staging one reaction with a volume of 25 µL contained 5 µL of 5X PCR buffer Mas DDMix 2025 (Dialat Ltd., Moscow), 1 µL of each primer, 2 µL of target DNA, and 16 µL of sterile water.

Amplification conditions on the device: 3 min. – 94 °C; 30 cycles: 30 s. – 94 °C, 30 s. – 52 °C, 90 s. – 72 °C; 1 cycle 7 min. – 72 °C.

After the amplification, 4 µl of the PCR product was dropped into the wells of a 1.0% agarose gel with ethidium bromide in 0.5 × TBE buffer and separated by electrophoresis. Subsequently, the obtained amplicons were visualized using a gel-documenting system manufactured by Bio-Rad (USA). The samples were then purified using a commercial Thermo Fisher kit GeneJET PCR Purification Kit) and sequenced on an Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. The obtained portions of the nucleotide sequences were processed using the BioEdit and MegaX programs. Comparative analysis was performed using the sequences of isolates deposited in the GenBank NCBI database.

The work compared the growth and development of the pathogen on two types of nutrient media – potato dextrose agar (2% CHA) and malt agar (2% MA) – and cultivated at 25 °C. Studied the cultural and morphological characteristics of the fungus on the 4th, 9th, 14th and 21st days. The study determined the features of the morphogenesis of the pathogen, the formation of fruiting bodies (pycnidia), sporulation, assessed the nature of growth, structure, surface, color, shape of the colony. Conidia morphometry was performed using an Olympus BX43 microscope and QuickPHOTO MICRO 3.2 software.

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of visual inspection of cranberry plants, symptoms of shoot drying and dark blackening spots on the leaf blades were found, the surface of the stems was dark brown, in the upper part of the petioles there



Рис. 3. Серо-оливковый слабоопушенный прижатый воздушный мицелий *D. vaccinii* на 2%-м КГА (фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 3. Gray-olive slightly pubescent compressed aerial mycelium of *D. vaccinii* at 2% PDA (photo by Yu.V. Tsvetkova)

После амплификации 4 мкл ПЦР-продукта раскапывали в лунки 1,0%-го агарозного геля с бромистым этидием в 0,5 × ТВЕ-буфере и разделяли с помощью электрофореза. В дальнейшем проводили визуализацию полученных ампликонов с использованием гель-документирующей системы производства Bio-Rad (США). Затем образцы очищали с помощью коммерческого набора Thermo Fisher (GeneJET PCR Purification Kit) и проводили секвенирование на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems. Полученные участки нуклеотидных последовательностей обрабатывали с использованием программ BioEdit и MegaX. Сравнительный анализ проводили с использованием последовательностей изолятов, депонированных в базу данных GenBank NCBI.

В работе сравнивали рост и развитие патогена на двух видах питательных сред – картофельно-глюкозном агаре (2%-й КГА) и солодовом агаре (2%-й МА) – и культивировали при температуре 25 °С. Изучали культурально-морфологические признаки гриба на 4, 9, 14 и 21-е сутки. В исследовании определяли особенности морфогенеза патогена, образования плодовых тел (пикнид), спорообразование, оценивали характер роста, строение, поверхность, цвет, форму колонии. Морфометрию конидий проводили с помощью микроскопа Olympus BX43 и программного обеспечения QuickPHOTO MICRO 3.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В результате визуального осмотра растений клубки были обнаружены симптомы усыхания побегов, темные, чернеющие пятна на листовых пластинках, поверхность стеблей имела темно-коричневый цвет, в верхней части черешков отмечались мелкие, продолговатые, черные некрозы (рис. 2). Плоды на растениях отсутствовали.

Через 7 дней после начала инкубации на питательной среде КГА с фрагментами растительной ткани сформировался серо-оливковый слабоопушенный прижатый воздушный мицелий (рис. 3).

Микроскопирование образцов на наличие морфологических структур гриба показало, что пикниды и споронотение отсутствовали. Дальнейшая видовая идентификация проводилась с использованием молекулярно-генетического метода.

На основании сравнительного анализа последовательностей участка внутреннего транскрибируемого спейсера была построена дендрограмма, в которой близкородственные виды рода *Diaporthe* кластеризуются в 6 групп, одна из которых представлена двумя видами: *D. conorum* и *D. columnaris* (рис. 4). Было показано, что исследуемый

were small, oblong, black necrosis (Fig. 2). There were no fruits on the plants.

7 days after the start of incubation on the PDA nutrient medium with fragments of plant tissue, a gray-olive, slightly pubescent, compressed aerial mycelium was formed (Fig. 3).

Microscopic examination of the samples for the presence of morphological structures of the fungus showed that pycnidia and sporulation were absent. Further species identification was carried out using the molecular genetic method.

Based on a comparative analysis of the sequences of the internal transcribed spacer, a dendrogram was constructed in which closely related species of the genus *Diaporthe* are clustered into 6 groups, one of which is represented by two species: *D. conorum* and *D. columnaris* (Fig. 4). It was shown that the studied isolate (MW969734 *D. vaccinii*_vniikr_isolate_495_1) belongs to the group including *D. vaccinii*. Intraspecific diversity was noted within this group.

The closest to the studied species is *Diaporthe eres* Nitschke. When studying sequences with a length of 578 bp, 7 sites were found that allow to separate these

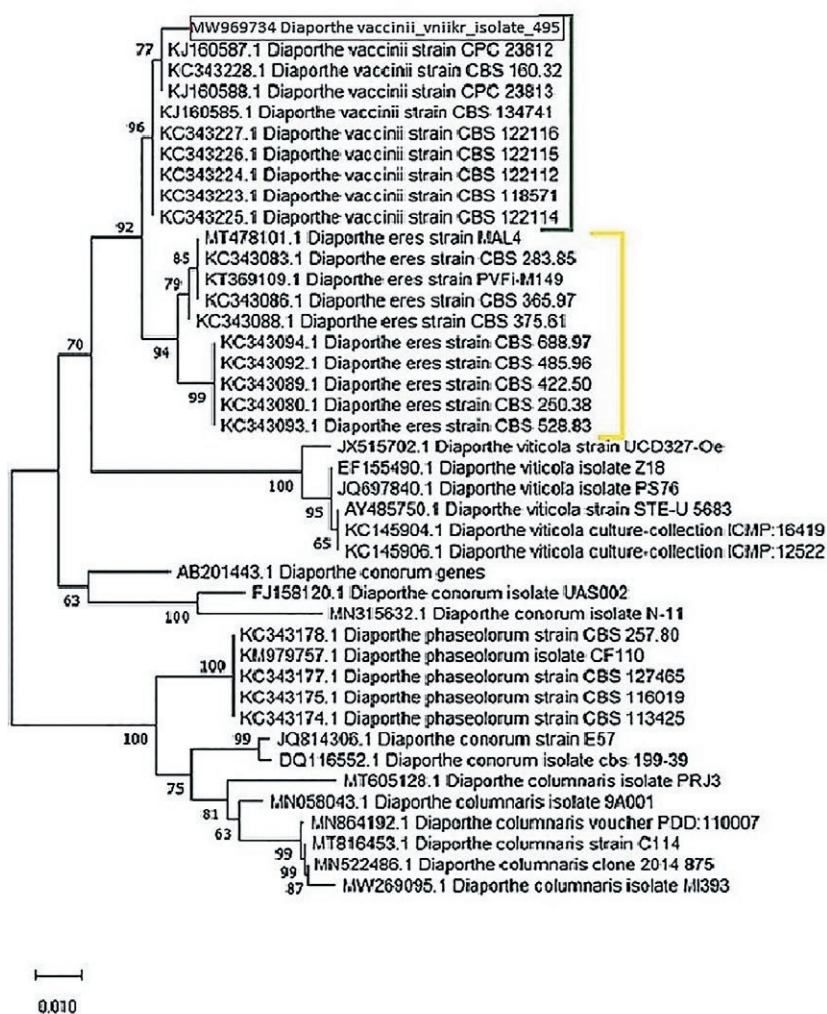


Рис. 4. Дендрограмма сравнения видов рода *Diaporthe*, ассоциированных с растениями рода *Vaccinium*

Fig. 4. Dendrogram for comparing species of the genus *Diaporthe* associated with plants of the genus *Vaccinium*

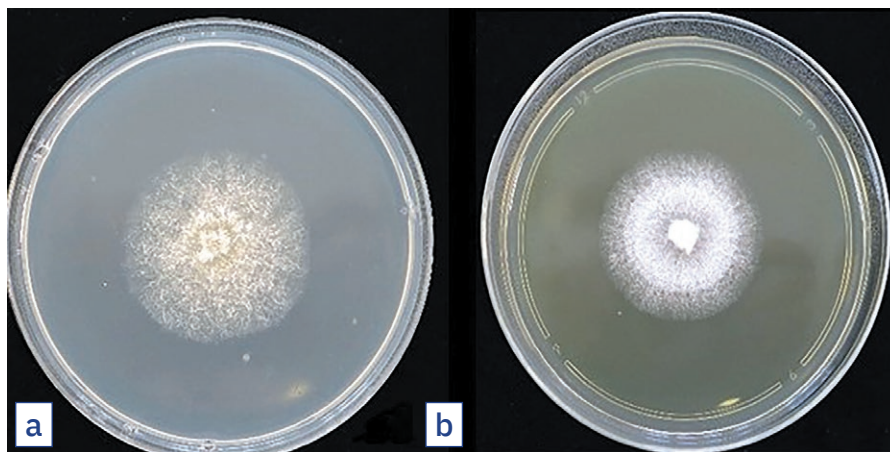


Рис. 5. Колония *D. vaccinii* на 4-е сутки:
а – на КГА; б – на МА
(фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 5. Colony of *D. vaccinii* on the 4th day:
а – on PDA; б – on MA
(photo by Yu.V. Tsvetkova)

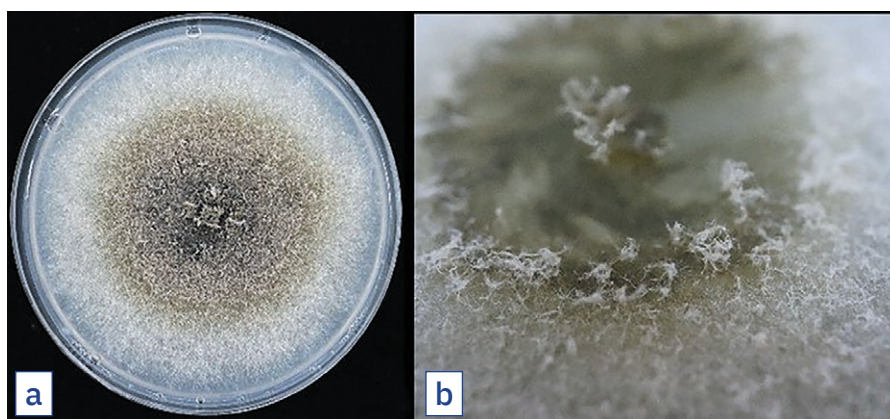


Рис. 6. *D. vaccinii* на КГА на 9-е сутки:
а – колония; б – центр колонии
(фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 6. *D. vaccinii* on PDA on the 9th day:
а – colony; б – center of the colony
(photo by Yu.V. Tsvetkova)

изолят (MW969734 *D. vaccinii*_vniikr_isolate_495_1) относится к группе, включающей *D. vaccinii*. Внутри данной группы было отмечено внутривидовое разнообразие.

Наиболее близким к исследуемому виду является *Diaporthe eres* Nitschke. При изучении последовательностей длиной 578 п. о. было обнаружено 7 участков, позволяющих разделить данные виды: 5 транзаций и 2 инсерции у *D. eres*. При этом в одной из инсерций у части изолятов *D. eres* присутствовал гуанин, а у остальных изолятов – аденин. У тех изолятов, у которых присутствовал аденин, инсерция была фрагментом tandemного повтора.

В анализируемом участке также были обнаружены фрагменты, которые, наоборот, свидетельствуют о сходстве видов. Так, у части изолятов вида *D. eres* во фрагменте имеется тимин, у части – цитозин, а у *D. vaccinii* – тимин. Было обнаружено 7 аналогичных замен, 6 из которых представляют собой транзакции и 1 – трансверсию.

species: 5 transitions and 2 insertions in *D. eres*. At the same time, guanine was present in one of the insertions in some *D. eres* isolates, and adenine in the remaining isolates. In those isolates in which adenine was present, the insertion was a fragment of a tandem repeat.

In the analyzed area, fragments were also found, which, on the contrary, indicate the similarity of species. Thus, some isolates of the species *D. eres* have thymine in the fragment, some have cytosine, and *D. vaccinii* have thymine. 7 similar substitutions were found, 6 of which represent transitions and 1 – transversion.

Considering that insertions occur less frequently than single nucleotide substitutions and are more significant for the DNA region, the universal primers ITS5/ITS4 can be used for preliminary identification of *D. vaccinii*.

After species identification, a comparative analysis of the culture morphological features of the species *D. vaccinii* was carried out on nutrient media PDA and MA.

The initial growth of the fungus culture on the 4th day on potato dextrose and malt agars differed in color and growth of aerial mycelium. On PDA, the isolate was characterized by a light brown colony, a slightly pubescent mycelium structure, a uniform flat surface, and pycnidia were absent. On MA, the fungus had a light beige mycelium color, a medium pubescent structure, an inhomogeneous concentric surface, and also the absence of fruiting bodies. The diameter of the colonies

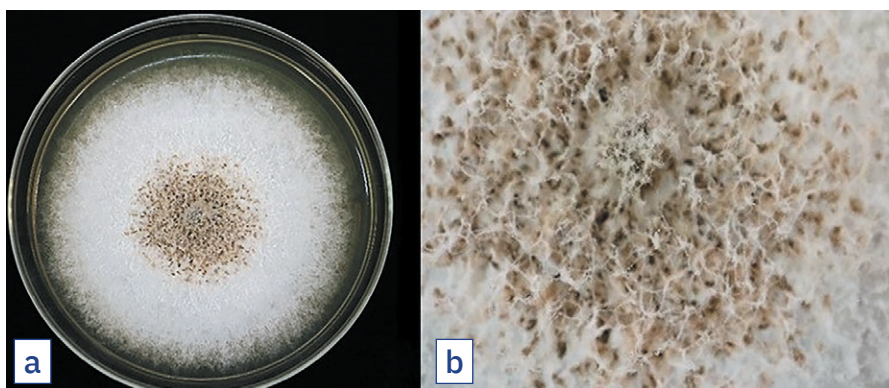


Рис. 7. *D. vaccinii* на МА на 9-е сутки:
а – колония; б – центр колонии
(фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 7. *D. vaccinii* on MA on the 9th day:
а – colony; б – center of the colony
(photo by Yu.V. Tsvetkova)

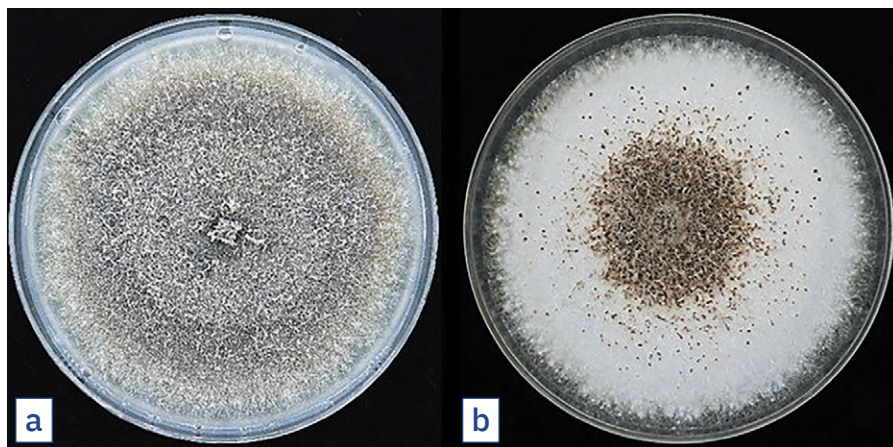


Рис. 8. Колония *D. vaccinii* на 14-е сутки:
а – на КГА; б – на МА
(фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 8. Colony of *D. vaccinii* on the 14th day:
а – on PDA; б – on MA
(photo by Yu.V. Tsvetkova)

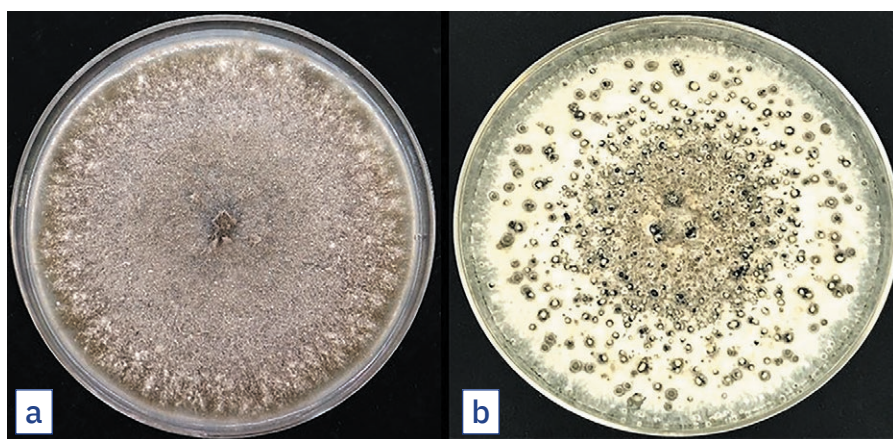


Рис. 9. Колония *D. vaccinii* на 21-й день:
а – на КГА; б – на МА
(фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 9. Colony of *D. vaccinii* on the 21st day:
а – on the PDA; б – on MA
(photo by Yu.V. Tsvetkova)

Учитывая, что инсерции происходят реже од-
нонуклеотидных замен и являются более значи-
мыми для участка ДНК, универсальные праймеры
ITS5/ITS4 можно использовать для предвари-
тельной идентификации вида *D. vaccinii*.

После видовой идентификации был проведен
сравнительный анализ культурально-морфологи-
ческих особенностей вида *D. vaccinii* на питательных
средах КГА и МА.

Начальный рост культуры гриба на 4-й день на
картофельно-глюкозном и солодовом агаре разли-
чался по окраске и росту воздушного мицелия. На
КГА изолят характеризовался светло-коричневым
цветом колонии, слабоопушенным строением ми-
целия, однородной ровной поверхностью, пикниды
отсутствовали. На МА гриб имел светло-бежевый
цвет мицелия, среднеопушенное строение, неод-
нородную концентрическую поверхность, также
отсутствие плодовых тел. Диаметр колоний на КГА
составил $2 \pm 0,05$ см, на МА – $1,9 \pm 0,1$ см (рис. 5).

На 9-й день активный рост изолята замедлил-
ся. Диаметр колонии на КГА составил $8 \pm 0,2$ см, на
МА – $7,5 \pm 0,3$ см. Изолят *D. vaccinii* на КГА характе-
ризовался среднеопушенным строением, темно-се-
рым цветом воздушного мицелия с переходящим
бежевым краем, без образования пикнид, обратная
сторона (реверзум) – серой окраски с бежевым кра-
ем (рис. 6).

on PDA was 2 ± 0.05 cm, on MA –
 1.9 ± 0.1 cm (Fig. 5).

On the 9th day, the active
growth of the isolate slowed
down. The diameter of the colony
on CHA was 8 ± 0.2 cm, on MA –
 7.5 ± 0.3 cm. The isolate of *D. vac-*
cinii on PDA was characterized by
a medium pubescent structure,
a dark gray color of aerial myce-
lium with a passing beige edge,
without pycnidia formation, re-
verse side (reverser) – gray with
a beige edge (Fig. 6).

The isolate behaved diffe-
rently on malt agar. The colony
of the fungus was characteri-
zed by a slightly pubescent struc-
ture with a brown-pink raised center
with an even white filamentous
mycelium, the reversum was
poorly visible. The formation of
dense mycelial structures in the
middle of the fungal colony was
noted (Fig. 7).

On the 14th day, the growth
of the fungus colony on nutri-
ent media was completed and
reached the edge of the plate. On
the PDA, the aerial mycelium of
the *D. vaccinii* colony had a dark
gray-olive color in the center,
turning into a light olive edge, a
medium pubescent structure, a
homogeneous structure, and a
dark gray reversum. There were
no dense mycelial structures on
this medium.

On malt agar, the colony of
the fungus had a beige-brown raised center with a rol-
ling milky edge, a slightly pubescent structure, an in-
homogeneous structure, and a beige-yellow reversum.
The initial development of pycnidial structures of the
fungus in the center of the colony was observed (Fig. 8).

On the 21st day, the color and structure of the fun-
gus colonies on two nutrient media did not change.
On malt agar, numerous developments of pycnidia
semi-submerged into the substrate was noted, with the
release of the milky mass of fungal spores from the center
of the pycnidia (Fig. 9).

Thus, in the study, *D. vaccinii* isolate had a devel-
oped aerial mycelium and an average growth rate on
two nutrient media – PDA and MA (1 cm per day). For
the development of pycnidia and conidia, MA medium
turned out to be preferable, which is an important fac-
tor for quick and reliable identification of the pathogen
during the initial diagnosis of regulated plant produc-
tion in laboratory conditions.

Further microscopic examination of pure cul-
tures of the fungus on malt agar revealed pycnidia:
dark, spherical, flat at the base, semi-submerged, lo-
cated over the entire surface, with a decrease in their

На солодовом агаре изолят проявлял себя иначе. Колония гриба характеризовалась слабоопушенным строением с коричнево-розовым приподнятым центром с ровным белым нитевидным мицелием, реверзум слабо просматривался. Отмечалось образование плотных мицелиальных структур в середине колонии гриба (рис. 7).

На 14-е сутки рост колонии гриба на питательных средах завершился и достиг края чашки. На КГА воздушный мицелий колонии *D. vaccinii* имел в центре темно-серо-оливковый цвет, переходящий в светло-оливковый край, среднеопушенное строение, однородную структуру, реверзум темно-серой окраски. Плотные мицелиальные структуры на данной среде отсутствовали.

На солодовом агаре колония гриба имела бежево-коричневый приподнятый центр с переходящим молочным краем, слабоопушенное строение, неоднородную структуру, реверзум бежево-желтой окраски. Наблюдалось начальное развитие пикнидиальных структур гриба в центре колонии (рис. 8).

На 21-й день цвет и строение колоний гриба на двух питательных средах не изменились.

number in the direction from the center to the edge of the cup, single-layer, 0.5–3 mm in diameter, emitting a mass of cream-colored conidia (Fig. 10–11).

After the 21st day of incubation, 2 types of conidia were formed in pycnidia: alpha-conidia (α) – hyaline, unicellular, oblong, ellipsoidal – and beta-conidia (β) – unicellular with bends or almost straight, filiform, hooked, hyaline. Dimensions α -conidia varied within $6.6\text{--}10.6 \times 2.6\text{--}4.1 \mu\text{m}$, on average $8.2 \pm 0.8 \times 3.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$. The size of β -conidia was $12.7\text{--}24.6 \times 1.3\text{--}1.7 \mu\text{m}$, on average $17.9 \pm 2.7 \times 1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (Fig. 12).

Thus, the species *D. vaccinii* is characterized by pycnidia containing 2 types of hyaline non-septic alpha and beta conidia. Since beta-conidia are not always formed, the diagnosis of the pathogen is difficult and requires additional confirmation using molecular genetic methods.

CONCLUSION

In the course of laboratory studies, in the regulated production of cranberry seedlings samples, the pathogen of blight of blueberry *D. vaccinii* was isolated and identified.



Рис. 10. Полупогруженные пикниды *D. vaccinii* на среде МА, выделяющие массу конидий (увеличение в 4 раза) (фото А.В. Камченкова)



Fig. 10. Semi-submerged pycnidia of *D. vaccinii* on MA medium, emitting a mass of conidia. 4x (photo by A.V. Kamchenkov)

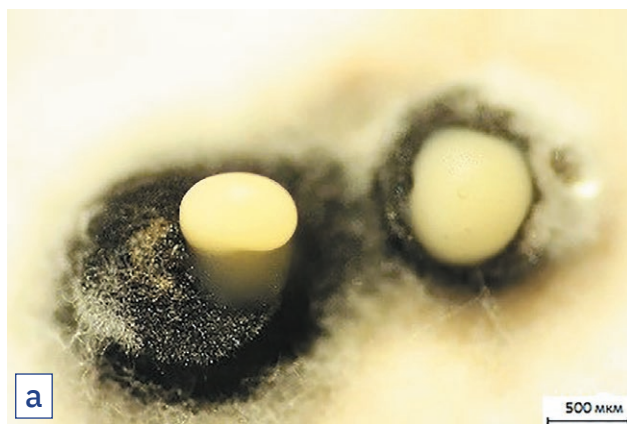


Рис. 11. Полупогруженные пикниды *D. vaccinii* на среде МА: а – пикниды, выделяющие массу конидий; б – незрелая пикнида (увеличение в 4 раза) (фото А.В. Камченкова)



Fig. 11. Semi-submerged pycnidia of *D. vaccinii* on MA medium: a – pycnidia, emitting a mass of conidia; b – immature pycnidia. 4x (photo by A.V. Kamchenkov)

На солодовом агаре отмечалось многочисленное развитие полупогруженных в субстрат пикнид, с выделением из центра пикнид молочной массы спор гриба (рис. 9).

Таким образом, в исследовании изолят *D. vaccinii* имел развитый воздушный мицелий и среднюю скорость роста на двух питательных средах – КГА и МА (1 см в сутки). Для развития пикнид и конидий предпочтительней оказалась среда МА, что является важным фактором для быстрой и надежной идентификации патогена при начальной диагностике подкарантинной продукции растений в лабораторных условиях.

При дальнейшем микроскопировании чистых культур гриба на солодовом агаре выявлены пикниды: темные, сферические, плоские у основания, полупогруженные, расположенные по всей поверхности, с уменьшением их числа по направлению от центра к краю чашки, однослойные, диаметром 0,5–3 мм, выделяющие массу конидий кремового цвета (рис. 10–11).

После 21-го дня инкубирования в пикнидах формировались 2 типа конидий: альфа-конидии (α) – гиалиновые, одноклеточные, продолговатые, эллипсоидные – и бета-конидии (β) – одноклеточные с изгибами или почти прямые, нитевидные, крючковатые, гиалиновые. Размеры α-конидий варьировали в пределах 6,6–10,6 × 2,6–4,1 мкм, в среднем 8,2 ± 0,8 × 3,4 ± 0,4 мкм. Размер β-конидий составил 12,7–24,6 × 1,3–1,7 мкм, в среднем 17,9 ± 2,7 × 1,5 ± 0,2 мкм (рис. 12).

Таким образом, вид *D. vaccinii* характеризуется пикнидами, содержащими 2 типа гиалиновых неспитированных альфа- и бета-конидий. Так как бета-конидии образуются не всегда, диагностика патогена затруднена и требует дополнительного подтверждения с использованием молекулярно-генетических методов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе лабораторных исследований в подкарантинной продукции образцов саженцев клюквы был выделен и идентифицирован возбудитель вязкой гнили черники *D. vaccinii*.

После предварительной идентификации, основанной на симптоматических и морфологических признаках, было проведено секвенирование участка ITS с подтверждением видовой принадлежности патогена. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей исследуемых и близкородственных видов представлены в виде дендрограммы, включающей 6 групп фомопсисных грибов, связанных с растениями рода *Vaccinium*.

В процессе изучения патогена была определена оптимальная питательная среда для роста и споруляции – солодовый агар (МА). При наблюдении за чистой культурой на 21-й день инкубации было выявлено образование плодовых тел гриба – пикнид с массой слизистых α- и β-конидий.

В результате проведенных исследований можно сделать вывод о необходимости продолжения изучения культурально-морфологических признаков *D. vaccinii* и близкородственных видов рода *Diaporthe* с применением различных питательных сред, а также способов воздействия факторами среды, с целью быстрого формирования диагностически значимых структур гриба для достоверной идентификации.

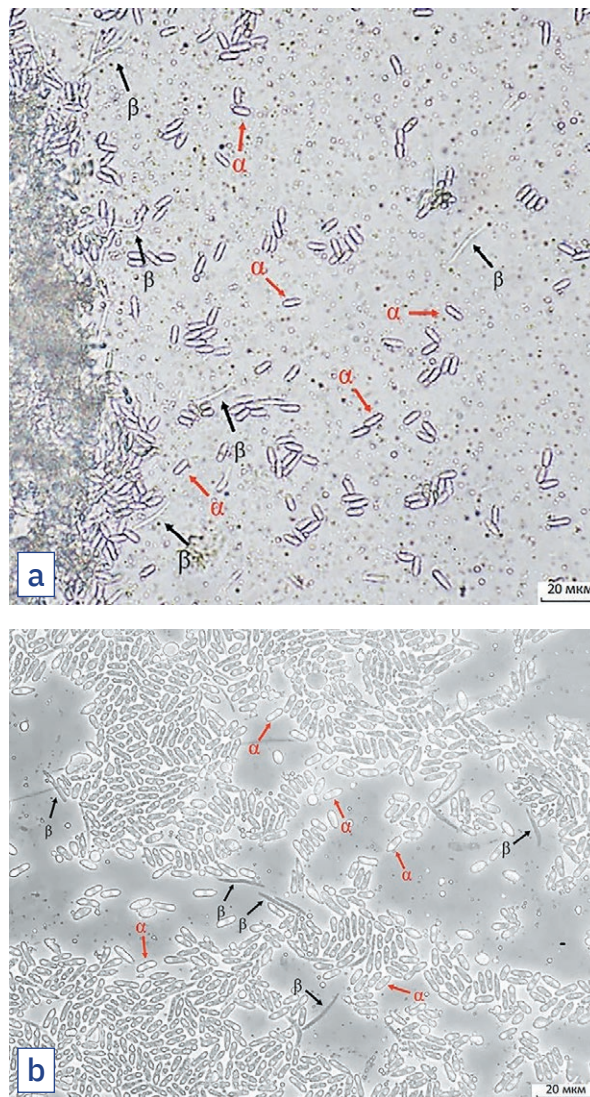


Рис. 12. Конидии *D. vaccinii*: а – альфа (α); б – бета (β) (увеличение в 40 раз) (фото А.В. Камченкова)
Fig. 12. Conidia of *D. vaccinii*: a – alpha (α); b – beta (β). 40x (photo by A.V. Kamchenkov)

After preliminary identification based on symptomatic and morphological signs, the ITS site was sequenced to confirm the species of the pathogen. The results of the nucleotide sequences analysis of the studied and closely related species are presented in the form of a dendrogram, including 6 groups of *Phomopsis* fungi associated with plants of the genus *Vaccinium*.

In the process of studying the pathogen, the optimal nutrient medium for growth and sporulation was determined – malt agar (MA). When observing a pure culture on the 21st day of incubation, the formation of fruiting bodies of the fungus – pycnidia with a mass of mucous α- and β-conidia.

As a result of the conducted studies, it can be concluded that it is necessary to continue the study of the culture morphological characters of *D. vaccinii* and closely related species of the genus *Diaporthe* using various nutrient media, as well as methods of exposure to environmental factors, in order to quickly form

Исследование показало, что для своевременного обнаружения и точной диагностики вида *D. vaccinii* рекомендуется использовать комплексный подход, основанный на применении визуального, биологического и молекулярно-генетического методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Латков Н., Видякин А., Коржук А., Латкова Е., 2020. Анализ и перспективы развития ягодного растениеводства в РФ. – International agricultural journal, № 6: 47–58.
2. EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Diaporthe vaccinii* Shear. – EFSA Journal, 12 (7): 3774, 28. DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3774.
3. EPPO Standard PM 7/86 (1) “*Diaporthe vaccinii*”, 2009. – EPPO Bulletin, 39: 18–24. DOI: org/10.1111/j.1365-2338.2009.02245.x.
4. Farr D., Castlebury L., Rossman A., 2002. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. – Mycologia, 94 (3): 494–504. DOI: 10.2307/3761783.
5. Friend R. and Boone D., 1968. *Diaporthe vaccinii* associated with dieback of cranberry in Wisconsin. – Plant Disease Reporter, 52: 341–344.
6. Michalecka M., Bryk H., Seliga P., 2017. Identification and characterization of *Diaporthe vaccinii* Shear causing upright dieback and viscid rot of cranberry in Poland. – Eur. J. Plant Pathol., 148: 595–605. DOI: org/10.1007/s10658-016-1114-4.
7. Weingartner D., Klos E., 1975. Etiology and symptomatology of canker and dieback diseases on highbush blueberries caused by *Godronia (Fusicoccum) cassandrae* and *Diaporthe (Phomopsis) vaccinii*. – Phytopathology, 65: 105–110. DOI 10.1094/Phyto-65-105.
8. White T., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T. (eds.). Pcr protocols, a guide to methods and applications. – San Diego: Academic Press: 315–322. DOI: org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
9. EPPO, 2020. – URL: <https://gd.eppo.int/taxon/DIAPVA/distribution> (дата обращения: 02.03.2020).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кузнецова Анна Александровна, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: kyyznec@bk.ru.

Цветкова Юлия Владиславовна, младший научный сотрудник лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; аспирант биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия; ORCID 0000-0002-4334-9224, SPIN-код 2744-1123, e-mail: yutska@mail.ru.

Камченков Александр Владимирович, агроном лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: akamchenkov@mail.ru.

diagnostically significant fungal structures for reliable identification.

The study showed that for the timely detection and accurate diagnosis of *D. vaccinii*, it is recommended to use an integrated approach based on the use of visual, biological and molecular genetic methods.

REFERENCES

1. Latkov N., Vidyakin A., Korzhuk A., Latkova E. Analysis and prospects for the development of berry crop production in the Russian Federation [Analiz i perspektivy razvitiya yagodnogo rasteniyevodstva v RF]. *International agricultural journal*. 2020; 6: 47–58 (in Russian).
2. EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). Scientific Opinion on the pest categorisation of *Diaporthe vaccinii* Shear. *EFSA Journal*, 2014; 12 (7): 3774, 28. DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3774.
3. EPPO Standard PM 7/86 (1) “*Diaporthe vaccinii*”. *EPPO Bulletin*, 2009; 39: 18–24. DOI: org/10.1111/j.1365-2338.2009.02245.x.
4. Farr D., Castlebury L., Rossman A. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia*, 2002; 94 (3): 494–504. DOI: 10.2307/3761783.
5. Friend R. and Boone D. *Diaporthe vaccinii* associated with dieback of cranberry in Wisconsin. *Plant Disease Reporter*, 1968; 52: 341–344.
6. Michalecka M., Bryk H., Seliga P. Identification and characterization of *Diaporthe vaccinii* Shear causing upright dieback and viscid rot of cranberry in Poland. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2017; 148: 595–605. DOI: org/10.1007/s10658-016-1114-4.
7. Weingartner D., Klos E. Etiology and symptomatology of canker and dieback diseases on highbush blueberries caused by *Godronia (Fusicoccum) cassandrae* and *Diaporthe (Phomopsis) vaccinii*. *Phytopathology*, 1975; 65: 105–110. DOI 10.1094/Phyto-65-105.
8. White T., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T. (eds.). Pcr protocols, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press: 1990; 315–322. DOI: org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
9. EPPO, 2020. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/DIAPVA/distribution> (last accessed: 02.03.2020).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna Kuznetsova, Senior Researcher, Head of Mycology Laboratory, Testing Laboratory Center, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: kyyznec@bk.ru.

Yulia Tsvetkova, Junior Researcher, Mycology Laboratory, Testing Laboratory Center, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; postgraduate student of the Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; ORCID 0000-0002-4334-9224, SPIN-code 2744-1123, e-mail: yutska@mail.ru.

Alexander Kamchenkov, Agronomist, Mycology Laboratory, Testing Laboratory Center, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: akamchenkov@mail.ru.