

## ПЕРВОЕ СООБЩЕНИЕ О *CERPHALOTRICHUM ASPERULUM* КАК ПАТОГЕНЕ КАРТОФЕЛЯ В РОССИИ

И.В. ТУЧКОВ, Р.И. ТАРАКАНОВ, О.О. БЕЛОШАПКИНА, Ф.С.У. ДЖАЛИЛОВ

(Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева)

При проведении фитосанитарной экспертизы в партии хранящегося картофеля сорта Жуковский ранний в Орловской области России обнаружены клубни с признаками поражений в виде локального потемнения мякоти без ее явного размягчения и коремий гриба на поверхности. Проведено выделение в чистую культуру патогена, и у выделенного изолята описаны морфологические особенности структур конидиального спороношения; приведены усредненные размеры вегетативного мицелия, конидий, конидиеносцев и коремий. Проверка патогенности изолята на листьях и ломтиках клубней показала наличие симптомов в виде локальных хлорозов и некрозов. Последующая идентификация изолята методами ПЦР и секвенирования показала, что анализируемый изолят наиболее близок к роду *Cerphalotrichum*, виду *C. asperulum*. Полученная последовательность была депонирована в GenBank (регистрационный № ON364353). Несмотря на то, что выделенные грибы упоминаются в литературе как эндофитные, в данных исследованиях приоритетно показано их паразитическое воздействие на растение картофеля с определенной симптоматикой. Предположительно это первое сообщение о том, что *C. asperulum* вызывает локальный некроз листьев и клубней картофеля при хранении в России.

**Ключевые слова:** *Cerphalotrichum*, грибы, патогены картофеля, эндофиты, первое обнаружение, искусственное заражение

### Введение

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является четвертой по значимости культурой для питания человека в мире после кукурузы, пшеницы и риса. Кроме того, значительное количество картофеля используется для корма скота и в семенных целях [1]. Россия, производящая около 20 млн т картофеля ежегодно, входит в топ-5 стран с наибольшим объемом производства картофеля. В связи с активизацией растениеводства происходит изменение патокомплекса, встречающегося на картофеле. В частности, в последние годы в России были диагностированы новые возбудители болезней этой культуры, которые ранее отсутствовали в стране либо не проявляли патогенность и вызывали поражение малой и средней тяжести. Имеются сообщения об обнаружении бактериальных возбудителей мокрой гнили и черной ножки, вызванных новыми видами *Pectobacterium* spp. [2–3], о возбудителе кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [4]. Относительно новыми грибными болезнями являются антракноз (возбудитель – *Colletotrichum coccodes* [5]) и *Septotinia populi-perda* [6]; из фитоплазменных заболеваний, усиливших свою вредоносность на картофеле, это столбур (возбудитель – *Tomato stolbur phytoplasma* [7]); из вириодных это веретенковидность клубней (возбудитель *Potato spindle tuber viroid* [8]).

Появление новых патогенов растений в ряде случаев связано с переходом к паразитизму эндофитных грибов [9], а некоторые эндофиты, возможно, мутировали из патогенов дикого типа [10]. Таким образом, некоторые из грибов, которые считаются эндофитами, на самом деле могут быть скрытыми патогенами [11], и наоборот, потенциальные

мутуалисты растений могут стать патогенными для своего хозяина. Патогенность или мутуализм могут зависеть от многих факторов включая генотип растений и микроорганизмов, численность микроорганизмов и условия окружающей среды [12].

Эндофитные грибы, заселяющие внутренние ткани живых растений, фактически не наносят им никакого вреда. Эти грибы являются в основном специализированными биотрофами. В то же время растения могут в определенной степени извлекать из них пользу, повышая уровни необходимых фитогормонов, активнее поглощая и усваивая минеральное питание, что в целом способствует лучшей адаптации растений к абиотическим стрессовым факторам [13]. В этой ситуации эндофитная микобиота может оказывать широкий спектр полезного воздействия на своего хозяина, поскольку такого рода ассоциации усиливают иммунологическую защиту растения-хозяина [14], ограничивают поражение патогенами на разных стадиях развития [15] и вызывают стрессоустойчивость как к биотическим, так и к абиотическим факторам [16]. Однако вероятно, что грибы-эндофиты могут при определенных условиях вступать с растением-хозяином и в иные отношения, частично или полностью переходя к паразитическому образу жизни. Отдельные грибные эндофиты на самом деле могут быть вредными для своего хозяина, вызывая симптомы заболевания в условиях стресса [17], или являться патогенными для видов растений, отличных от их типичного хозяина [18].

Род *Cephalotrichum* (Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Нурореомыцетидеае, Microascascales, Microascaceae) включает в себя синематозные виды сапротрофных грибов с обширным распространением, которые выделяются в основном из воздуха и почвы, урбосреды [19], а также из разрушающихся растительных остатков, соломы, навоза, древесины [20]. Существуют частые упоминания об ассоциации отдельных представителей рода *Cephalotrichum* с конкретными растениями. В частности, из листового опада яблони и платана, остатков стеблей тростниковых растений выделяли представителей вида *C. asperulum*, из побегов яблони и остатков листьев яблони и ясеня выделяли *C. nanum* [21], а *C. oligotrichum* был выделен из ложноакации, или робинии [22].

**Цель исследований:** идентификация нового заболевания клубней картофеля в период хранения на основе морфологических и молекулярных характеристик возбудителя, ассоциированного с родом *Cephalotrichum*.

### Материал и методы исследований

*Изоляция и характеристика чистой культуры.* Для оценки фитосанитарного состояния партии картофеля сорта Жуковский ранний, хранящегося в подвальном помещении при температуре 2–4°C в частном хозяйстве в Орловской области, были отобраны клубни, которые визуально обследовали снаружи и внутри на разрезе. Впоследствии фрагменты отобранных клубней с признаками поражения в виде локального потемнения мякоти помещали во влажную камеру. Выделение чистой культуры проводили методом предельных разведений. Для этого под стереомикроскопом Carl Zeiss Stemi 508 отбирали 1 коремню и помещали в микропробирку, содержащую 1 мл стерильной воды. Микропробирку тщательно перемешивали на микроцентрифуге – вортексе-901 (Циклотемп, Россия) для получения маточного раствора. Далее производили десятикратное разведение суспензии в воде. Процедуру повторяли до достижения концентрации  $10^{-3}$  КОЕ/мл 25 мкл раствора переносили на среду Чапека с добавлением антибиотика Гентамицин (Дальхимфарм, Россия) в концентрации 1 г/л и равномерно распределяли шпателем Дригальского, инкубировали при температуре 20°C до прорастания отдельных единичных спор. Единичные споры переносили

на среду Чапека для дальнейшего культивирования. Описывали морфологические признаки изолятов гриба с использованием общепринятых сред Чапека, картофельно-глюкозного агара (КГА) и картофельно-морковного агара [20].

Морфологические особенности структур конидиального спороношения гриба были описаны с использованием светового микроскопа Carl Zeiss Primo Star. Принадлежность роду *Cephalotrichum* определяли при помощи определителя Вебстера [23] с последующей поправкой на новейшую систематику.

*Выделение ДНК и молекулярно-генетическая характеристика.* Один репрезентативный потенциальный изолят kolpna3 был выделен из пораженных клубней картофеля и очищен до единичных колоний при культивировании на среде Чапека при 20°C в течение 7 дней. Мицелий отмывали от среды дистиллированной водой и готовили для выделения ДНК. Общую геномную ДНК экстрагировали с помощью набора для извлечения ДНК «Цитосорб» (Синтол, Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific; Уолтем, Массачусетс, США).

Реакцию ПЦР проводили с использованием универсальной пары праймеров с внутренним транскрибируемым спейсером (ITS) [24]. Была приготовлена реакционная смесь, содержащая 5X MasDDTaqMIX-2025 (Dialat, Москва, Россия) – 5 мкл; 10 мкМ каждого праймера – 1,5 мкл; 25 нг ДНК-мишени – 5 мкл; воду для ПЦР – 12 мкл. Конечный объем смеси составил 25 мкл.

Аmplification проводили в термоциклере T100 (Bio-Rad Laboratories, Калифорния, США). Условия ПЦР были следующими: предварительная денатурация при 96°C в течение 15 мин; денатурация при 95°C в течение 30 сек.; отжиг при 52°C в течение 30 сек.; элонгация при 72°C в течение 90 сек. 39 циклов; окончательная элонгация при 72°C в течение 6 мин. Визуализацию продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с бромистым этидием. Секвенирование ампликона проводили на базе ООО «Синтол» (Москва, Россия). Сборку и анализ последовательностей, полученных в результате секвенирования, проводили с использованием BioEdit v. 7.2.

Эволюционная история была выведена методом минимальной эволюции [25]. Показано оптимальное филогенетическое дерево. Процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (500 повторов), показан рядом с ветвями [26]. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального составного правдоподобия [27] и выражены как количество замен оснований на сайт.

Поиск в дереве ME производился с использованием алгоритма обмена близкими соседями (CNI) [28] на уровне поиска 1. Алгоритм соединения соседей [29] был использован для создания исходного дерева. Этот анализ включал в себя 19 нуклеотидных последовательностей. Включенные позиции кодонов были следующими: 1-й + 2-й + 3-й + не кодирующий. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (с использованием опции попарного удаления). Эволюционный анализ был проведен в MEGA 11, а филогенетическое дерево отображено в iTOL v5 [30].

*Проверка патогенности.* Патогенность выделенного гриба была проверена в соответствии с традиционной методикой путем инокуляции [31] отдельных листьев и ломтиков клубня картофеля сорта Жуковский ранний. Для этого растения картофеля предварительно выращивали до фазы S1, повреждали стерильной иглой и наносили на рану 50 мкл суспензии конидий с концентрацией 10<sup>5</sup> конидий/мл. Суспензию конидий готовили следующим образом: из 2-недельной колонии гриба отбирали 5 коремий и переносили в стерильную микропробирку, содержащую 1 мл дистиллированной воды.

Суспензию перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе «Циклотемп-901», фильтровали через марлю для удаления коремий и определяли концентрацию конидий в гемоцитометре. Растения в контрольном варианте также подвергали ранениям, но вместо суспензии конидий наносили 50 мкл стерильной воды.

После инокуляции растения накрывали полиэтиленовым пакетом и содержали при температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  с относительной влажностью от 95 до 100% и световом дне 16 ч. Через 7 сут. наблюдали симптомы. Для подтверждения постулатов Коха проводили повторное выделение в чистую культуру *S. asperulum* с инокулированных частей растения, затем проводили морфологическое сравнение микроструктур с исходным изолятом.

Для инокуляции клубней их очищали от кожуры, нарезали на ломтики толщиной 10 мм, которые затем стерилизовали в 70%-ном этиловом спирте, и асептически высушивали в течение 5 мин на бумажном фильтре в чашках Петри. Далее в условиях ламинарного бокса перемещали одну коремию с 2-недельной культуры изолята, выращенной на среде Чапека, на середину ломтика картофеля, накрывали чашку крышкой и инкубировали при  $22^\circ\text{C}$  без доступа света, периодически смачивая фильтровальную бумагу стерильной водой. В экспериментах использовали по 5 листьев в двух повторениях и по 4 ломтика клубней картофеля в четырех повторениях.

Вирулентность и агрессивность изолята также были проверены на четырех распространенных в России отечественных и зарубежных сортах картофеля: Королева Анна, Жуковский ранний, Ред Леди и Невский. Подготовка ломтиков и заражение инокулятом были аналогичны вышеупомянутой методике. Повторяли опыт в четырех повторностях по 4 ломтика в каждом. Статистическую обработку анализируемых данных проводили методом дисперсионного анализа в программе Statistica 12.0 (StatSoft, TIBCO, Palo Alto, CA, USA), сравнивая средние значения по критерию Дункана. Процентные данные были преобразованы в арксинусы перед обработкой. Графики были созданы с помощью GraphPad Prism 9.2.0

*Выделение и характеристика чистой культуры.* Исследования в данном направлении были начаты после обнаружения в партии хранящегося картофеля в хранилище в Орловской области клубней с потемнением мякоти внутри неизвестной этиологии (рис. 1А). Анализируемый картофель был собран в Колпнянском районе Орловской области ( $52.22^\circ\text{N}$ ,  $37.00^\circ\text{E}$ ) в 2021 г.

После инкубации фрагментов пораженной ткани во влажной камере на поверхности отмирающей потемневшей ткани визуально обнаружили структуры грибов, которые впоследствии были определены как конидиальное спороношение грибов – коремии (рис. 1В).

Первоначально изолят культивировали на трех питательных средах: Чапека, КМА и КГА (рис. 1С-1Е). Колонии на среде Чапека (рис. 1С) образовывались пушистые концентрические с неровными краями от светло-серого в центре до темно-коричневого к периферии, характеризовались образованием коремий и относительно медленным ростом мицелия.

На КМА (рис. 1D) и КГА (рис. 1Е) колонии были плотные порошковидные с неровными краями, от светло-серой до темно-серой окраски, впоследствии приобретали более темный и насыщенный цвет. Было отмечено, что коремии образуются только при высыхании среды.

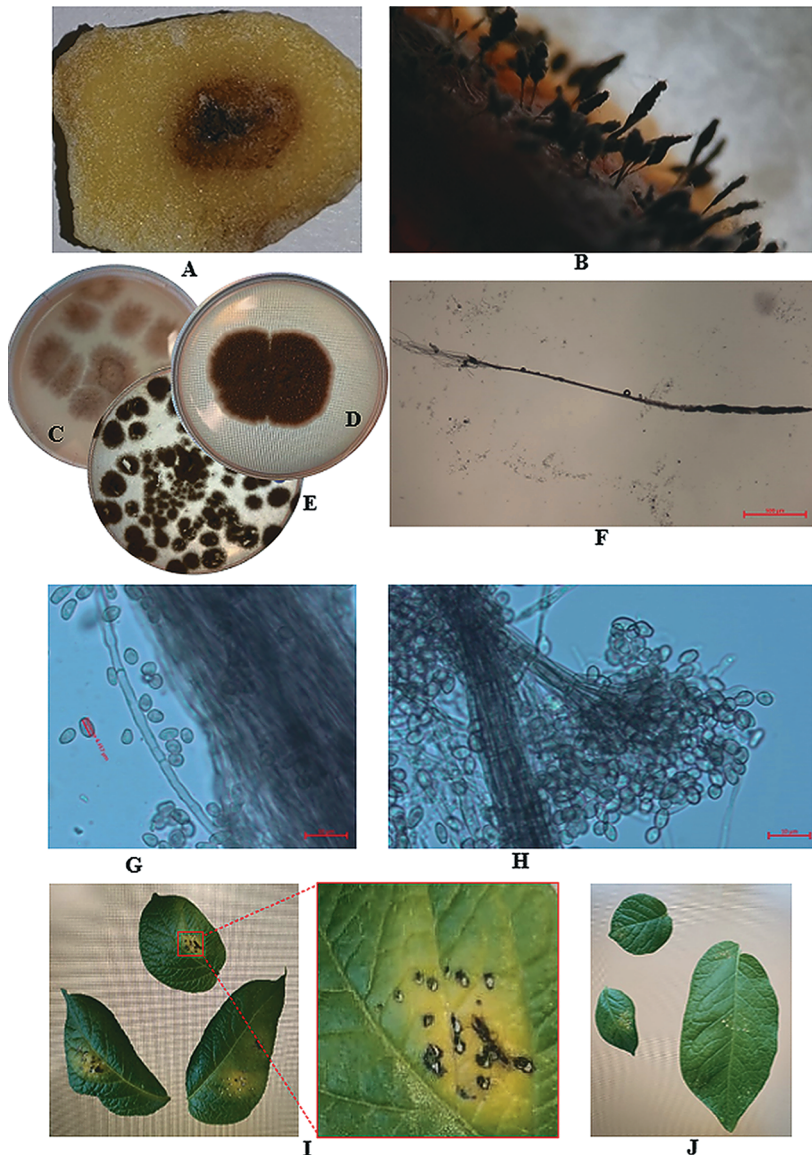
Морфологическое описание структур изолята провели с использованием светового микроскопа (рис. 1F-1H). Гифы мицелия членистые, шириной  $2,17\text{--}2,96 \mu\text{m}$ , перегородки четкие.

Конидии одноклеточные, овальные, овально-вытянутые и суженные с одного конца, реже шаровидные, бесцветные, в массе дымчато-серые, в длину  $4,39\text{--}4,46 \mu\text{m}$ , в ширину  $3,02\text{--}3,05 \mu\text{m}$ ; фиалиды на концах конидиеносцев вытянуто-изогнутые



длиной 3,01–3,12  $\mu\text{m}$ , шириной 2,12–2,14  $\mu\text{m}$ . Тип конидиогенеза – бластический. Конидиеносцы неветвящиеся, длиной до 2830  $\mu\text{m}$  (на КГА), собраны в пучки (коремии) шириной 42,0–42,3  $\mu\text{m}$ . Структуры сумчатого спороношения не обнаружены.

По строению конидиеносцев и конидий полученный изолят гриба был идентифицирован как представитель рода *Cephalotrichum*. Наши данные о морфологии микроструктур выявленного гриба данного рода незначительно отличаются от описанных на культуре картофеля в Иране [32].

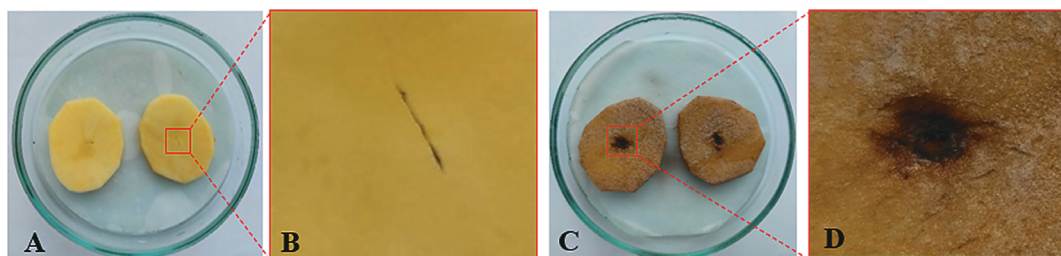


**Рис. 1.** Морфологические, культуральные и патогенные свойства изолята *C. asperulum* kolpaz. Симптомы поражения на клубне картофеля Жуковский ранний (первичное обнаружение) (А). Коремии на срезе картофеля (В). Колонии через 14 дней культивирования при 20°C на средах Чапека (С), КМА (D) и КГА (E). Морфологическое строение микроструктур *C. asperulum* (F), (G), (H). Симптомы на листьях картофеля Жуковский ранний через 7 дней после инокуляции *C. asperulum* (I) и стерильной водой (J) методом раневой инокуляции конидиальной суспензией

*Проверка патогенности.* Через 3 сут. после инокуляции листьев наблюдали типичный локальный хлороз и черно-коричневые некрозы в месте укола иглой листьев картофеля, в то время как контрольные листья оставались бессимптомными (рис. 1I, 1J). Симптомы появились на всех органах, зараженных конидиями, на листьях и клубнях картофеля. Патоген был повторно выделен в чистую культуру из пораженных участков инокулированных органов растений и проверен при помощи выделения чистой культуры и секвенирования по вышеуказанной методике.

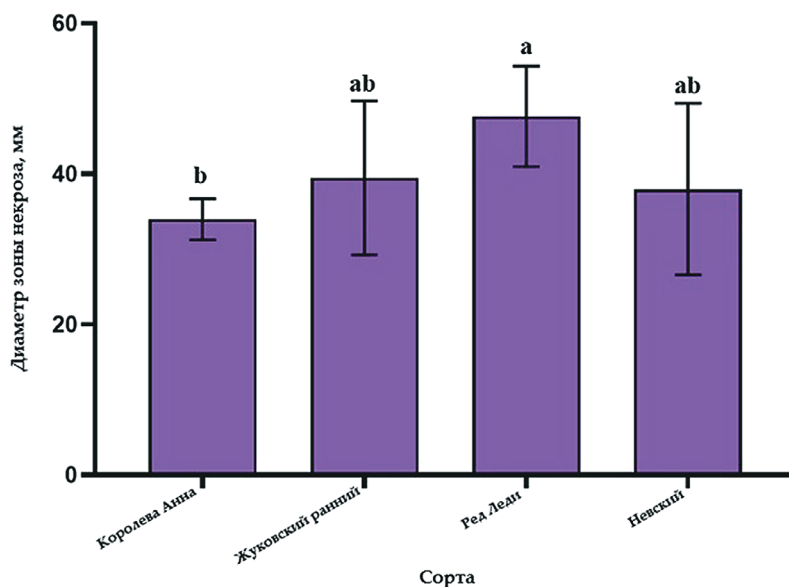
Изolat при инокуляции единичной коремией ломтиков картофеля также показал патогенность, которая проявлялась в виде некрозов бурого цвета, диаметр которых достигал 47 мм (рис. 2).

Проверка агрессивности изолята по отношению к ломтикам разных сортов картофеля показала, что сорта отличаются друг от друга по интенсивности поражения. Таким образом, диаметр некроза был максимальным у сорта Ред Леди (в среднем 47 мм), тогда как у сорта Королева Анна он достигал всего 34 мм (рис. 3).



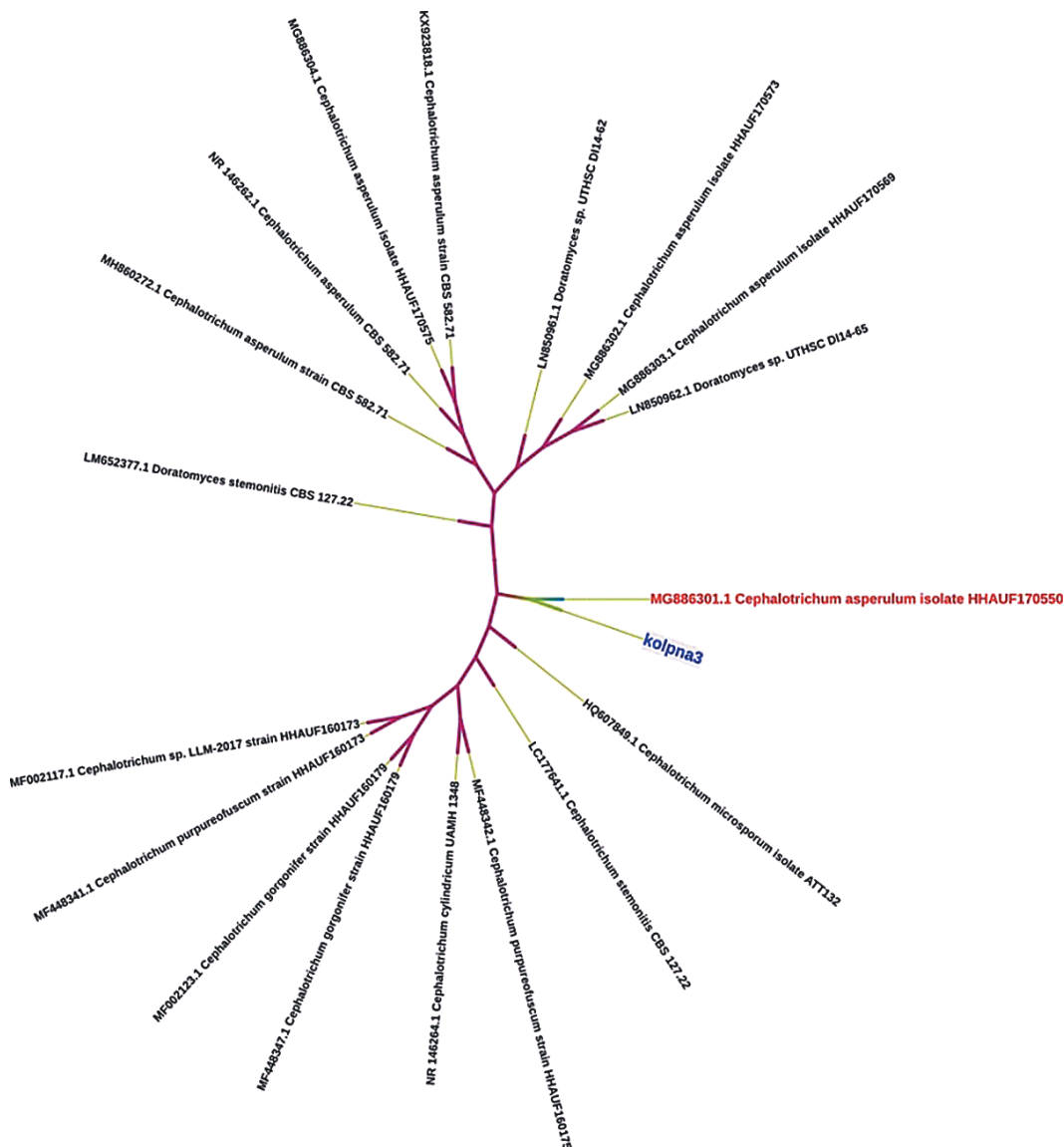
**Рис. 2.** Проверка патогенности изолята k0rпa3 *C. asperulum* на ломтиках картофеля с. Жуковский ранний. Коремия на ломтике в 0 день (сразу после инокуляции) (A, B).

Некрозы через 7 дней после инокуляции единичной коремией (C, D). Чашки с ломтиками содержались во влажной камере без доступа света с температурой 22°C на увлажненной фильтровальной бумаге



**Рис. 3.** Диаметр зоны некроза на ломтиках картофеля разных сортов через 7 дней после инокуляции одной коремией изолята k0rпa3 *C. asperulum*.

Значения в столбцах показывают среднее значение соответствия четырех независимых повторностей, а столбцы ошибок представляют стандартное отклонение



**Рис. 4.** Филогенетическое дерево, созданное с использованием последовательностей генов ITS из видов *Cephalotrichum*.

Идентифицированный штамм kolpna3 выделен синим цветом.

Эволюционный анализ проводился в MEGA 11, а изображение дерева создавали с использованием интерактивного дерева iTOL v5

*Молекулярная идентификация.* Уточняющую идентификацию изолята гриба провели методом ПЦР с использованием универсальной пары праймеров на ген внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) ITS1 /ITS4. Результаты секвенирования по Сэнгеру показали, что длина соответствующего продукта ПЦР для ITS гена составила 560 п.н.

Результаты поиска BLASTn показали, что последовательность ITS штамма kolpna3 была наиболее идентичной роду *Cephalotrichum*, виду *Cephalotrichum asperulum* (MG886301.1) с идентичностью генома 99,33%. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей генов ITS (рис. 3), показало,

что штамм колрпа3 наиболее близок к изоляту *C. asperulum* HNAUF170550. Полученная последовательность была депонирована в GenBank (регистрационный № ON364353).

Таким образом, выделенный гриб, вызывающий при искусственном заражении локальные некрозы и хлоротичные участки на листьях, а также при естественном и искусственном заражении некрозы в мякоти клубней картофеля, был идентифицирован как *C. asperulum* (Wright et Marchand) Sandoval-Denis et al.

## Результаты и их обсуждение

Эндофитные грибы помогают растениям противостоять как биотическим, так и абиотическим стрессам благодаря их способности регулировать иммунный ответ на взаимодействие растений и микробов и стимулировать выработку метаболитов. При этом не все эндофитные грибы являются полезными [33].

Эндофитов принято подразделять на 2 большие группы, в первую из которых входят виды грибов-полифагов, а во вторую, меньшую по численности, – специализированные виды грибов, колонизирующие однодольные растения. Грибы родов *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma* и *Trichoderma* неоднократно отмечали в мировой науке как эндофиты [11]. В соответствии с изученной нами научной литературы отмечено, что в последнее время участились случаи обнаружения перехода эндофитов к паразитическому типу питания. Например, грибы рода *Trichoderma*, ранее известные своей антагонистической активностью и широко используемые в биологической защите растений, были зарегистрированы как фитопатогены на кукурузе (*Zea mays* L.). Данные немецких ученых показывают, что гриб *T. afroharzianum* способен снизить содержание сухого вещества на 27% [34]. Аналогичная ситуация для группы видов *Alternaria* описана Б. Томасом [35]. В частности, показано, что некоторые виды приобрели патогенные способности с увеличением биосинтеза меланина и фитотоксинов [36], которые помогают спорам преодолеть иммунитет растения и вызвать заболевание. Другим способом эволюции патогенеза, описанного Брейзером, является гибридизация между близкородственными, но ранее географически изолированными патогенами *Ophiostoma ulmi*, возбудителями голландской болезни вяза [37]. Теоретически этот процесс дает возможность быстрого появления новых или модифицированных патогенов через межвидовой генный поток и через межспецифический генный поток [38].

В ходе исследовательской работы нами были получены новые знания о том, что грибы-эндофиты могут при определенных условиях частично или полностью переходить к паразитическому образу жизни, непосредственно нанося вред растению-хозяину, вызывая у него симптомы заболевания в условиях стресса. В исследованиях было доказано, что гриб-аскомицет рода *Cephalotrichum* вида *C. asperulum* (семейство Microascaceae, порядок Microascales), идентифицированный с помощью микробиологического и молекулярно-генетического методов диагностики, является новым неизученным патогеном картофеля (*Solanum tuberosum*), вызывающим локальный некроз клубней в период хранения.

При изучении погодных условий вегетационного периода 2021 г. было выявлено, что за первую и вторую декады августа сумма выпавших осадков составила 44% от средней месячной нормы, а температура воздуха поднималась до 34°C. Вероятно, именно эти условия послужили стрессом для растений картофеля, в результате чего был ослаблен неспецифический иммунитет.

Наши исследования можно сопоставить с результатами ученых из Ирана [32], которые сделали выводы о том, что *C. asperulum* и *C. tenuissimum* распространяются

в сухом и жарком климате. Ввиду сходства наших результатов можно предположить, что стресс, вызванный недостатком влаги и повышенными температурами воздуха, является отправной точкой для перехода гриба *C. asperulum* к паразитизму.

### Выводы

Установленный факт патогенности изучаемого гриба рода *Cephalotrichum* показывает необходимость дальнейшего мониторинга, выяснения влияния абиотических факторов на переход его к паразитическому образ жизни, уточнения филогенетической специализации, оценки вредоносности болезни на разных сортах картофеля и разработки защитных мероприятий для уменьшения ущерба.

*Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2022–317 от 20 апреля 2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего»*

### Библиографический список

1. FAOSTAT. Food Balance Sheet. Available online. – URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> (accessed: on 2 June 2022).
2. Voronina M.V., Lukianova A.A., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Miroshnikov K.A., Vasiliev D.M. and Ignatov A.N. First Report of Pectobacterium Polaris Causing Soft Rot and Blackleg of Potato in Russia // Plant. – Dis. 2021. – № 105. – С. 6. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09–20–1864-PDN>.
3. Voronina M.V., Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Miroshnikov K.K., Miroshnikov K.A. and Ignatov A.N. First Report of Pectobacterium Carotovorum Subsp. Brasiliense Causing Blackleg and Stem Rot Disease of Potato in Russia // Plant Dis. – 2019. – № 103. – С. 2. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03–18–0456-PDN>.
4. Ignatov A.N., Spechenkova N.A., Taliansky M. and Kornev K.P. First Report of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis Infecting Potato in Russia // Plant Dis. – 2019. – № 103 (1). <https://doi.org/10.1094/PDIS-04–18–0691-PDN>.
5. Belov G.L., Belosokhov A.F., Kutuzova I.A., Statsyuk N.V., Chudinova E.M., Alexandrova A.V., Kokaeva L.Y., Elansky S.N. Colletotrichum Coccodes in Potato and Tomato Leaves in Russia // J Plant Dis Prot. – 2018. – № 125. – Pp. 311–317. <https://doi.org/10.1007/s41348–017–0138–0>.
6. Chudinova E.M. and Elansky S.N. First report of Septotinia populiperda on potato tubers in Russia // J Plant Pathol. – 2021. – № 103. – P. 665. <http://dx.doi.org/10.1007/s42161–021–00751–2>.
7. Girsova N., Bottner K.D., Mozhaeva K.A., Kastalyeva T.B., Owens R.A. and Lee I. – M. Molecular Detection and Identification of Group 16SrI and 16Sr XII Phytoplasmas Associated with Diseased Potatoes in Russia // Plant Dis. – 2008. – № 92. – P. 4. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92–4–0654A>.
8. Owens R.A., Girsova N.V., Kromina K.A., Lee I.M., Mozhaeva K.A. and Kastalyeva T.B. Russian Isolates of Potato spindle tuber viroid Exhibit Low Sequence Diversity // Plant Dis. – 2009. – 93. – 7. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93–7–0752>.
9. Carroll G. Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont // Ecology. – 1988. – № 69 (1). – Pp. 2–9. <https://doi.org/10.2307/1943154>.
10. Redman R.S., Freeman S., Clifton D.R., Morrel J., Brown G., Rodriguez R.J. Biochemical Analysis of Plant Protection Afforded by a Nonpathogenic



- Endophytic Mutant of *Colletotrichum Magna* // *Plant Physiol.* – 1999. – № 119. – Pp. 795–804. DOI:10.1104/pp.119.2.795.
11. *Tadych M., White J.* Endophytic Microbes // In Reference Module in Life Sciences. – 2019. – Pp. 123–136.
12. *Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A.* The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2015. – № 79. – Pp. 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>.
13. *Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M.* The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms // *Annu Rev Plant Biol.* – 2006. – № 57. – Pp. 233–266. – URL: DOI:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.
14. *Clay K.* Defensive symbiosis: A microbial perspective // *Funct Ecol.* – 2014. – № 28 (2). – Pp. 293–298. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12258>.
15. *Arnold A.E., Mejía L.C., Kyllö D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A.* Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – № 100. – Pp. 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>.
16. *Lata R., Chowdhury S., Gond S.K., White J.F.* Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes // *Lett Appl Microbiol.* – 2018. – № 66. – Pp. 268–276. <https://doi.org/10.1111/lam.12855>.
17. *Schulz B. and Boyle C.* The endophytic continuum // *Mycol Research.* – 2005. – 5109. – 6. – 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>.
18. *Schulz B., Guske S., Dammann U., Boyle C.* Endophytehost interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte host interaction // *Symbiosis.* – 1998. – № 25. – Pp. 213–227.
19. *Woudenberg J.H.C., Sandoval-Denis M., Houbraken J., Seifert K.A., Samson R.A.* *Cephalotrichum* and related synnematosous fungi with notes on species from the built environment // *Stud in Mycol.* – 2017. – № 88. – Pp. 137–159. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.001>.
20. *Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H.* *Compendium of soil fungi*, 2<sup>nd</sup> Ed. IHW Verlag, Eching, Germany, 2007.
21. *Ghosta Y., Azizi R., Poursafar A.* New species of synnematosous fungi for Iran mycobiota // *J of Plant Research* 2020. – № 33. – Pp. 998–1009.
22. *Paripour Z., Davari M. and Asgari B.* A new record of *Cephalotrichum oligotrichum* for mycobiota of Iran and *Robinia pseudoacacia* as a new host for this fungus. Proceedings of 4th Iranian Mycological Congress, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. – Iran, 2019
23. *Webster J., Weber R.* *Introduction to Fungi* (3<sup>rd</sup> ed.) Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2007.
24. *Kusaba M. and Tsuge T.* Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA // *Curr Genet.* – 1995. – № 28. – Pp. 491–498.
25. *Rzhetsky A., Nei M.* A Simple Method for Estimating and Testing Minimum-Evolution Trees // *Mol. Biol. Evol.* – 1992. – № 9. – P. 945.
26. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution.* – 1985. – № 39. – Pp. 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
27. *Tamura K., Nei M., Kumar S.* Prospects for Inferring Very Large Phylogenies by Using the Neighbor-Joining Method // *Proc. Natl. Acad. Sci. – USA.* – 2004. – № 101. – Pp. 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
28. *Nei M. and Kumar S.* *Molecular Evolution and Phylogenetics*; Oxford University Press: Oxford, UK.

29. Saitou N. and Nei M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – № 4. – C. 406–425.
30. Letunic I. and Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* – 2021. – № 2 (49). – Pp. 293–296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
31. Zhang M., Sun X., Cui L., Yin Y., Zhao X., Pan S., Wang W. The Plant Infection Test: Spray and Wound-Mediated Inoculation with the Plant Pathogen Magnaporthe Grisea // *J Vis Exp.* – 2018. – № 138. – 57675. <https://dx.doi.org/10.3791/57675>.
32. Alijani N., Mamaghani A., Javan-Nikkhah M., De Respinis S., Pianta E. Endophytic *Cephalotrichum* spp. from *Solanum tuberosum* (potato) in Iran – a polyphasic analysis // *Sydowia.* – 2022. – № 74. – C. 287–302. <http://dx.doi.org/10.12905/0380.sydowia74-2022-0287>.
33. Lu H., Wei T., Lou H., Shu X., Chen Q. A Critical Review on Communication Mechanism within Plant-Endophytic Fungi Interactions to Cope with Biotic and Abiotic Stresses // *J Fungi.* – 2021. – № 7. – C. 719. <https://doi.org/10.3390/jof7090719>.
34. Pfordt A., Schiwiek S., Karlovsky P. and von Tiedemann A. Trichoderma Afroharzianum Ear Rot-A New Disease on Maize in Europe // *Front. Agron.* – 2020. – № 2. – 547758. <https://doi.org/10.3389/fagro.2020.547758>.
35. Thomma B.P.H.J. *Alternaria* Spp.: From General Saprophyte to Specific Parasite // *Mol Pl Path.* – 2003. – № 4 (4). – C. 225–236. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>.
36. Meena M., Gupta S.K., Swapnil P., Zehra A., Dubey M.K., Upadhyay R.S. *Alternaria* Toxins: Potential Virulence Factors and Genes Related to Pathogenesis // *Front in Microbiol.* – 2017. – № 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01451>.
37. Brasier C.M. Rapid Evolution of Introduced Plant Pathogens via Interspecific Hybridization: Hybridization Is Leading to Rapid Evolution of Dutch Elm Disease and Other Fungal Plant Pathogens // *BioScience.* – 2001. – № 51. – Pp. 123–133. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0123:REOIPP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0123:REOIPP]2.0.CO;2).
38. Brasier C.M. Episodic selection as a force in fungal microevolution, with special reference to clonal speciation and hybrid introgression // *Canad J of Botany.* – 73. – Pp. 1213–1221. <https://doi.org/10.1139/b95-381>.

## FIRST REPORT ON *CEPHALOTRICHUM ASPERULUM* AS A POTATO PATHOGEN IN RUSSIA

I.V. TUCHKOV, R.I. TARAKANOV, O.O. BELOSHAPKINA, F.S. – U. DZHALILOV

(Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

*During the phytosanitary inspection of a lot of stored potatoes of cv. Zhukovskiy ranni in the Orel region of Russia, tubers showed signs of lesions in the form of local darkening of the flesh without apparent softening and fungal structures on the surface (coremia). A pure culture of the pathogen was isolated and the morphological characteristics of the conidial sporulation structures in the extracted isolate were described; the average sizes of vegetative mycelium, conidia, conidiophores and coremia were given. Pathogenicity testing of the isolate on leaves and tuber discs showed symptoms in the form of localised chlorosis and necrosis. Subsequent identification of the isolate by PCR and sequencing showed that the isolate analysed was most closely related to the species *Cephalotrichum asperulum* of the genus *Cephalotrichum*. The resulting sequence was deposited in GenBank (accession number ON364353). Although these fungi are described in the literature as endophytic, this study emphasises their parasitic effect on the potato plant with*

certain semeiologies. This is probably the first report of *C. asperulum* causing local necrosis of potato leaves and tubers during storage in Russia.

**Key words:** *Cephalotrichum*, fungi, pathogen of potato, endophyte, the first detection, artificial infection.

## References

1. FAOSTAT. Food Balance Sheet. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> (Access date: 02.06.2022).
2. Voronina M.V., Lukianova A.A., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Miroshnikov K.A., Vasiliev D.M. and Ignatov A.N. First Report of *Pectobacterium Polaris* Causing Soft Rot and Blackleg of Potato in Russia. *Plant Dis.* 2021; 105; 6. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1864-PDN>
3. Voronina M.V., Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Miroshnikov K.K., Miroshnikov K.A. and Ignatov A.N. First Report of *Pectobacterium Carotovorum* Subsp. *Brasilense* Causing Blackleg and Stem Rot Disease of Potato in Russia. *Plant Dis.* 2019; 103; 2. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0456-PDN>
4. Ignatov A.N., Spechenkova N.A., Taliansky M. and Kornev K.P. First Report of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Infecting Potato in Russia. *Plant Dis.* 2019; 103; 1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0691-PDN>
5. Belov G.L.; Belosokhov A.F., Kutuzova I.A., Statsyuk N.V., Chudinova E.M., Alexandrova A.V., Kokaeva L.Y., Elansky S.N. *Colletotrichum Coccodes* in Potato and Tomato Leaves in Russia. *J Plant Dis Prot.* 2018; 125: 311–317. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0138-0>
6. Chudinova E.M. and Elansky S.N. First report of *Septotinia populi-perda* on potato tubers in Russia. *J Plant Pathol.* 2021; 103; 665. <http://dx.doi.org/10.1007/s42161-021-00751-2>
7. Girsova N., Bottner K.D., Mozhaeva K.A., Kastalyeva T.B., Owens R.A. and Lee I. – M. Molecular Detection and Identification of Group 16SrI and 16SrXII Phytoplasmas Associated with Diseased Potatoes in Russia. *Plant Dis.* 2008; 92; 4. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0654A>
8. Owens R.A., Girsova N.V., Kromina K.A., Lee I.M., Mozhaeva K.A. and Kastalyeva T.B. Russian Isolates of Potato spindle tuber viroid Exhibit Low Sequence Diversity. *Plant Dis.* 2009; 93; 7. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-7-0752>
9. Carroll G. Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology.* 1988; 69;1: 2–9. <https://doi.org/10.2307/1943154>
10. Redman R.S., Freeman S., Clifton D.R., Morrel J., Brown G., Rodriguez R.J. Biochemical Analysis of Plant Protection Afforded by a Nonpathogenic Endophytic Mutant of *Colletotrichum Magna*. *Plant Physiol.* 1999; 119: 795–804, doi:10.1104/pp.119.2.795
11. Tadych M., White J. Endophytic Microbes. In Reference Module in Life Sciences. 2019: 123–136. ISBN978-0-12-811737-8
12. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015; 79: 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
13. Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 2006; 57: 233–266. DOI:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
14. Clay K. Defensive symbiosis: A microbial perspective. *Funct Ecol.* 2014; 28; 2: 293–298. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12258>

15. Arnold A.E., Mejía L.C., Kyllö D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>
16. Lata R., Chowdhury S., Gond S.K, White J.F. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Lett Appl Microbiol*. 2018; 66: 268–276. <https://doi.org/10.1111/lam.12855>
17. Schulz B. and Boyle C. The endophytic continuum. *Mycol Research*. 2005; 5109; 6: 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
18. Schulz B., Guske S., Dammann U., Boyle C. Endophytehost interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte host interaction. *Symbiosis*. 1998; 25: 213–227.
19. Woudenberg J.H.C., Sandoval-Denis M., Houbraken J., Seifert K.A., Samson R.A. *Cephalotrichum* and related synnematosous fungi with notes on species from the built environment. *Stud in Mycol*. 2017; 88: 137–159. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.001>
20. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. *Compendium of soil fungi*, 2<sup>nd</sup> Ed. IHW Verlag, Eching, Germany, 2007.
21. Ghosta Y., Azizi R., Poursafar A. New species of synnematosous fungi for Iran mycobiota. *J of Plant Research*. 2020; 33: 998–1009.
22. Paripour Z., Davari M. and Asgari B. A new record of *Cephalotrichum oligotrichum* for mycobiota of Iran and *Robinia pseudoacacia* as a new host for this fungus. *Proceedings of 4th Iranian Mycological Congress, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran*, 2019.
23. Webster J., Weber R. *Introduction to Fungi* (3<sup>rd</sup> ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2007.
24. Kusaba M. and Tsuge T. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr Genet*. 1995; 28: 491–498.
25. Rzhetsky A., Nei M. A Simple Method for Estimating and Testing Minimum-Evolution Trees. *Mol. Biol. Evol*. 1992; 9: 945.
26. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
27. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for Inferring Very Large Phylogenies by Using the Neighbor-Joining Method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
28. Nei M. and Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*; Oxford University Press: Oxford, UK. ISBN0–19–513584–9, 2000.
29. Saitou N. and Nei M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol*. 1987; 4: 406–425.
30. Letunic I. and Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021; 2; 49: 293–296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
31. Zhang M., Sun X., Cui L., Yin Y., Zhao X., Pan S., Wang W. The Plant Infection Test: Spray and Wound-Mediated Inoculation with the Plant Pathogen *Magnaporthe Grisea*. *J Vis Exp*. 2018; 138; 57675. <https://dx.doi.org/10.3791/57675>
32. Alijani N., Mamaghani A., Javan-Nikkhah M., De Respinis S., Pianta E. Endophytic *Cephalotrichum* spp. from *Solanum tuberosum* (potato) in Iran – a polyphasic analysis. *Sydowia*. 2022; 74: 287–302. <http://dx.doi.org/10.12905/0380.sydowia74-2022-0287>
33. Lu H., Wei T., Lou H., Shu X., Chen Q. A Critical Review on Communication Mechanism within Plant-Endophytic Fungi Interactions to Cope with Biotic and Abiotic Stresses. *J Fungi*. 2021; 7; 719. <https://doi.org/10.3390/jof7090719>

34. *Pfordt A., Schiwek S., Karlovsky P. and von Tiedemann A.* Trichoderma Afroharzianum Ear Rot—A New Disease on Maize in Europe. *Front. Agron.* 2020; 2; 547758. <https://doi.org/10.3389/fagro.2020.547758>

35. *Thomma B.P.H.J.* Alternaria Spp.: From General Saprophyte to Specific Parasite. *Mol Pl Path.* 2003; 4; 4: 225–236 <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>

36. *Meena M., Gupta S.K., Swapnil P., Zehra A., Dubey M.K., Upadhyay R.S.* Alternaria Toxins: Potential Virulence Factors and Genes Related to Pathogenesis. *Front in Microbiol.* 2017; 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01451>

37. *Brasier C.M.* Rapid Evolution of Introduced Plant Pathogens via Interspecific Hybridization: Hybridization Is Leading to Rapid Evolution of Dutch Elm Disease and Other Fungal Plant Pathogens. *BioScience.* 2001; 51: 123–133. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0123:REOIPP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0123:REOIPP]2.0.CO;2)

38. *Brasier C.M.* Episodic selection as a force in fungal microevolution, with special reference to clonal speciation and hybrid introgression. *Canad J of Botany.* 1995; 73: 1213–1221. <https://doi.org/10.1139/b95-381>

**Тучков Иван Валерьевич**, студент бакалавриата кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: [tuchkov\\_2002@mail.ru](mailto:tuchkov_2002@mail.ru)

**Тараканов Рашит Ислямович**, аспирант кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: [tarakanov.rashit@mail.ru](mailto:tarakanov.rashit@mail.ru)

**Белешапкина Ольга Олеговна**, д-р с.-х. наук, профессор, профессор кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: [beloshapkina58@mail.ru](mailto:beloshapkina58@mail.ru)

**Джалилов Февзи Сеид-Умерович**, д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: [dzhililov@rgau-msha.ru](mailto:dzhililov@rgau-msha.ru)

**Ivan V. Tuchkov**, BSc student, Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: [tuchkov\\_2002@mail.ru](mailto:tuchkov_2002@mail.ru))

**Rashit I. Tarakanov**, post-graduate student, Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: [tarakanov.rashit@mail.ru](mailto:tarakanov.rashit@mail.ru))

**Olga O. Beloshapkina**, DSc (Ag), Professor, Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: [beloshapkina58@mail.ru](mailto:beloshapkina58@mail.ru))

**Fevzi S.-U. Dzhililov**, DSc (Bio), Professor, Head of Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: [dzhililov@rgau-msha.ru](mailto:dzhililov@rgau-msha.ru))