

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ СТАТЬЯ

## Первая находка гриба *Diaporthe phaseolorum* на подсолнечнике в России

М. М. Гомжина<sup>#</sup>, Ф. Б. Ганнибал

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>#</sup> Для корреспонденции: Мария Гомжина, e-mail: gomzhina91@mail.ru**Ключевые слова:** *Diaporthe*, *Phomopsis*, подсолнечник, молекулярная филогения, таксономия.**DOI:** 10.18527/2500-2236-2018-5-1-59-64

Получена 21 августа 2018 г.

Принята к печати 25 октября 2018 г.

Опубликована 23 ноября 2018 г.

### АННОТАЦИЯ

Грибы рода *Diaporthe* широко распространены по всему миру, многие виды являются патогенами экономически значимых культур, в том числе и подсолнечника. Традиционно идентификацию видов *Diaporthe* осуществляли по морфологическим, морфолого-культуральным признакам и связи с питающим растением. Достоверную идентификацию до уровня вида представителей этого рода на настоящий момент рекомендуется осуществлять, основываясь на изучении молекулярно-генетических признаков. Комплексное изучение видов *Diaporthe* в России с применением методов молекулярной филогении не проводилось.

Представленная работа посвящена идентификации изолята *Diaporthe* sp., выделенного из подсолнечника, собранного в Краснодарском крае. Согласно полученным результатам изучения молекулярно-генетических (нуклеотидные последовательности области внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальной ДНК, генов  $\beta$ -тубулина и фактора элонгации трансляции-1 $\alpha$ ) и морфологических признаков, изолят MF 16-010 был идентифицирован как вид *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. На территории России этот изолят является первой достоверной находкой данного вида на подсолнечнике. В результате искусственной инокуляции было показано, что изолят MF 16-010 является для подсолнечника патогенным.

## First report of the fungus *Diaporthe phaseolorum* on sunflower in Russia

М. М. Gomzhina<sup>#</sup>, Ph. B. Gannibal

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>#</sup> Corresponding author: Maria Gomzhina, e-mail: gomzhina91@mail.ru**Keywords:** *Diaporthe*, *Phomopsis*, sunflower, molecular phylogeny, taxonomy.

### ABSTRACT

Fungi of the ascomycete genus *Diaporthe* have been identified worldwide. Typically, *Diaporthe* species are saprobes, endophytes, or plant pathogens. The distinction between the species of this genus has historically been based on the combination of the morphological information, cultural characteristics, and host affiliation. The correct identification of the *Diaporthe* species should be carried out based on a combination of molecular genetic traits. A comprehensive analysis of *Diaporthe* species in the Russian Federation using molecular phylogeny methods has never been accomplished.

The goal of this study was the identification of the isolate *Diaporthe* sp. MF 16-010, extracted from stems of *Helianthus annuus* L. that was collected in the Krasnodar region of the Russian Federation. According to the morphology data and DNA sequence analyses of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as well as of the translation elongation factor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), and  $\beta$ -tubulin genes, the isolate MF 16-010 was identified as *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. To the best of our knowledge, this isolate represents the first report of *Diaporthe phaseolorum* associated with sunflower in the Russian Federation. The development of the stem lesions as a result of the artificial inoculation of MF 16-010 to sunflower proved that this isolate is pathogenic for sunflower.

## ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Diaporthe* Nitschke широко распространены по всему миру. Известны они как сапротрофы, эндофиты и фитопатогены [1], вызывающие заболевания широкого круга экономически значимых сельскохозяйственных культур; несколько видов, в частности, вызывают фомопсис подсолнечника.

Изучение фитопатогенных видов этого рода обладает несомненной практической значимостью, поскольку точная идентификация видов грибов необходима для понимания эпидемиологии и для принятия корректных мер борьбы с заболеваниями [1]. Приуроченность к растению-хозяину и географическое распространение большинства видов рода *Diaporthe* на настоящий момент неизвестны.

В стадии бесполого размножения эти микромицеты ранее именовались как виды рода *Phomopsis*. В настоящее время приоритетным родовым эпитетом следует считать *Diaporthe*, поскольку этот род был описан ранее, чем род *Phomopsis* [2]. Традиционно таксономически значимым признаком, использовавшимся для разграничения видов *Diaporthe*, считались связь с питающим растением и микроморфологические признаки спораносных структур. Поскольку микроморфологические признаки нестабильны и их диапазон варьирования может перекрываться для представителей разных видов, а связи с питающим растением могут не ограничиваться одним видом, на настоящий момент рекомендуется осуществлять достоверную идентификацию представителей рода *Diaporthe* до уровня вида с применением методов молекулярной филогении и сравнения нуклеотидных последовательностей филогенетически информативных локусов ДНК области внутреннего транскрибируемого спейсера ITS (internal transcribed spacer) рибосомальной ДНК (рДНК), генов  $\beta$ -тубулина, кальмодулина и фактора элонгации трансляции EF-1 $\alpha$  (elongation factor) [1, 3].

Ревизия рода, проведенная за последние несколько лет в рамках полифазного подхода к систематике микроорганизмов и основанная на комплексном анализе молекулярно-генетических, микроморфологических, морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков, позволила в корне изменить взгляды на таксономический статус и границы видов рода *Diaporthe* [1]. Кроме того, в результате проведенной ревизии рода были уточнены ареалы некоторых фитопатогенных видов, обладающих большим экономическим значением.

Изучение биоразнообразия и географии видов *Diaporthe* в России с применением методов молекулярной филогении и с учётом современной систематики рода не проводилось. Данные о видовом составе и распространении на территории России отдельных видов, особенно обладающих экономической значимостью, требуют уточнения. Согласно доступной нам литературе, на территории России в настоящий момент известны достоверные находки двух видов *Diaporthe*, подтвержденные молекулярными исследованиями: *D. eres* на солянке (*Salsola tragus*) [4]

и *D. phaseolorum* на томате (Т. А. Гуркина, Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018»).

Представленная работа посвящена идентификации изолята *Diaporthe* sp., выделенного из подсолнечника, собранного на территории России в Краснодарском крае.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Выделение изолятов

В результате фитосанитарного мониторинга подсолнечника, проведенного в 2016 году на территории Краснодарского края, из стеблей подсолнечника с симптомами пятнистости, типичной для поражения грибом *Plenodomus lindquistii*, было выделено 65 изолятов. Из них по морфологическим признакам 64 оказались видом *Pl. lindquistii*, а один – MF 16-010 – был предварительно идентифицирован как *Diaporthe* sp. Этот изолят и послужил материалом для выполнения работы.

Для выделения грибов из стеблей подсолнечника в чистую культуру поражённый материал был подвергнут поверхностной стерилизации. Фрагменты растений последовательно промывали 20 мл раствора, содержащего 2% гипохлорита натрия (NaClO) и 0.1% натрия додецилсульфата (SDS), далее 5% гипохлоритом натрия, три раза стерильной водой, каждый раз активно встряхивая в течение 2 мин и сливая без остатка использованный промывочный раствор. Поверхностно стерилизованные образцы были разложены на картофельно-сахарозную питательную среду (КСА) [5] с добавлением антибиотиков (ампициллин, стрептомицин, пенициллин) и вещества, ограничивающего рост грибов (Triton X-100). Чашки Петри инкубировали при 24°C в темноте. Учёт производили на 7-10 сутки культивирования. Монопикнидиальные изоляты сохраняли в пластиковых микропробирках на косяках КСА при +4°C. Изолят MF 16-010 задепонирован в коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР.

### Экстракция и амплификация ДНК

Выделение ДНК из чистой культуры осуществляли согласно стандартному протоколу с использованием цетилтриэтиламмоний бромид (ЦТАБ) и хлороформа [6].

Для последующего секвенирования таксономически информативных локусов и идентификации изолята *Diaporthe* sp. были амплифицированы: область внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК (ITS-локус), гены  $\beta$ -тубулина и EF-1 $\alpha$  с соответствующими парами праймеров: ITS1F [7]/ITS4 [8];  $\beta$ tub2Fw/ $\beta$ tub4Rd [9]; EF1-728F/EF1-986R [10].

Реакции были проведены согласно следующему протоколу: каждая ПЦР-смесь (25 мкл) содержала 0.5 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (200 мкМ), 0.5 мкл каждого праймера (ITS1F/ITS4,  $\beta$ tub2Fw/ $\beta$ tub4Rd, EF1-728F/EF1-986R) (25 мкМ), 0.2 мкл Taq-полимеразы (5 ед./мкл) (Евроген, Россия),

10-кратный буфер для полимеразы и 1 мкл раствора ДНК.

ДНК амплифицировали согласно следующему циклу: предденатурация ДНК при 94°C, 2 мин.; денатурация при 92°C, 50 с; отжиг праймеров при 55°C, 40 с (ITS1F/ITS4), или при 52°C, 40 с ( $\beta$ tub2Fw/ $\beta$ tub4Rd), или при 55°C, 60 с (EF1-728F/EF1-986R); элонгация при 72°C в течение 75 с; финальный синтез 3-5 мин при 72°C; количество циклов – 30.

Визуализацию продуктов ПЦР производили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием.

### Секвенирование ДНК и анализ нуклеотидных последовательностей

Для секвенирования производили очистку ДНК, полученной после ПЦР, согласно стандартному протоколу [11]. Очищенные фрагменты секвенировали по методу Сэнгера [12] на секвенаторе ABIPrism 3500 в соответствии с протоколами производителя (Applied Biosystems – Hitachi, Япония) с использованием набора реактивов, включающего флуоресцентно меченные дезоксинуклеозидтрифосфаты (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, ABI, США).

Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalX 1.8 [13], после чего при необходимости корректировали выравнивание вручную. Дендрограммы сходств были построены методом максимального правдоподобия (maximum likelihood – ML) с использованием программного обеспечения RAxML (randomized accelerated maximum likelihood) v. 7.2.8 [14]. Надёжность топологии дендрограммы была оценена с помощью бутстреп-анализа с 1000 случайных повторных выборок. В качестве референсных были использованы полученные из базы данных GenBank [15] последовательности ITS-области рДНК, генов  $\beta$ -тубулина и EF-1 $\alpha$  (Таблица 1).

### Изучение морфологических признаков

Для изучения морфологических признаков изолят выращивали на КСА. Инокулированные чашки Петри инкубировали в темноте при 20-22°C в течение 7 дней. Следующие 7 дней чашки инкубировали в режиме «день/ночь»: 13 ч в сутки при ультрафиолетовом

излучении (УФ) (эритемные лампы ЛЭ-30, максимум излучения 310-320 нм), 11 ч инкубация в темноте [16]. Учёт признаков проводили на 14-е сутки роста колонии.

Таксономически значимые признаки пикнид и конидий, полученных на КСА, анализировали с помощью методов световой микроскопии с использованием микроскопа Olympus BX53 и бинокулярной лупы Olympus SZX16 (Olympus, Япония).

### Оценка патогенности

Оценку патогенности проводили в отношении гибрида подсолнечника Тунка (селекция компании Limagren, Франция) согласно стандартной методике [17, 18, 19]. Инокуляция интактных растений была осуществлена на стадии развития R1-R2 (6-8 пар настоящих листьев, начало бутонизации) [18] в трёхкратной повторности.

В качестве инокулюма использовали агаровые блоки размером 5 мм, высеченные из 10-дневной чистой культуры гриба, выращенной на КСА. Агаровые блоки были помещены на листья и стебли, как с предварительным ранением, так и без него. В качестве отрицательного контроля были взяты растения, инокулированные блоками, высеченными из чистой питательной среды. Учёт размеров некрозов производили на 4-5 сутки после инокуляции. Впоследствии для подтверждения постулатов Коха из заражённых растений был выделен возбудитель и произведена его идентификация.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Молекулярная филогения

Полученные продукты амплификации изолята *Diaporthe* sp. MF 16-010 имели следующие размеры: фрагмент ITS-области – около 600 пар нуклеотидов (п. н.), гена  $\beta$ -тубулина – 550 п. н., гена EF-1 $\alpha$  – 350 п. н. После объединения данных по составу были получены матрицы данных для последующего филогенетического анализа. Длина выровненных последовательностей фрагмента ITS-области составляла 555 п. н., генов  $\beta$ -тубулина – 549 п. н. и EF-1 $\alpha$  – 313 п. н. Номера

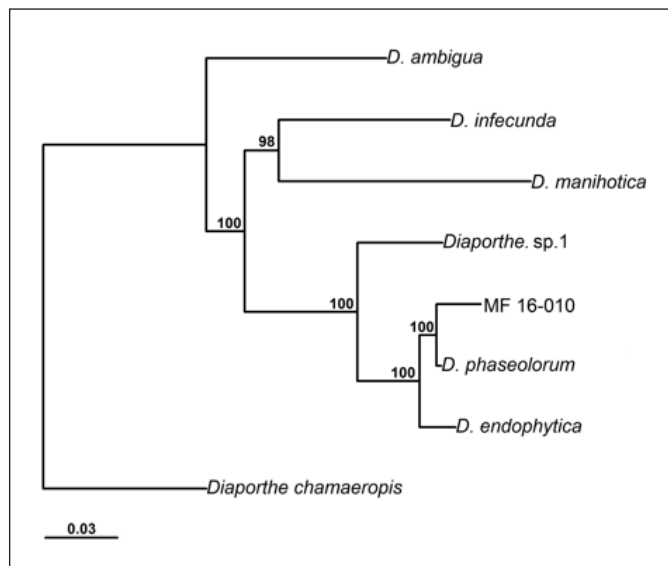
**Таблица 1.** Референсные виды и штаммы *Diaporthe* и номера доступа их нуклеотидных последовательностей (GenBank®).

Вид <i>Diaporthe</i>	Номер штамма	Локус, номера доступа в базе данных GenBank		
		ITS	$\beta$ -тубулин	TEF
<i>D. ambigua</i>	CBS 114015	KC343010.1	KC343978.1	KC343736.1
<i>D. chamaeropis</i>	CBS 454.81	KC343048.1	KC344016.1	KC343774.1
<i>D. endophytica</i>	CBS 133811	KC343065.1	KC344033.1	KC343791.1
<i>D. infecunda</i>	CBS 133812	KC343126.1	KC344094.1	KC343852.1
<i>D. manihotia</i>	CBS 505.76	KC343138.1	KC344106.1	KC343864.1
<i>D. phaseolorum</i>	CBS 116019	KC343175.1	KC344143.1	KC343901.1
<i>Diaporthe</i> sp. 1	CBS 119639	KC343202.1	KC344170.1	KC343928.1

доступа нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank: MH732990, MH734197 и MH768350 соответственно.

В результате молекулярно-филогенетического анализа было построено четыре филограммы: отдельно по каждому локусу и комбинированная для всех трёх локусов.

На всех филогенетических деревьях изолят MF 16-010 с высокой степенью бутстреп-поддержки (96-100%) формировал общую кладу с референсным изолятом *Diaporthe phaseolorum* CBS 116019 (Рис. 1).



**Рис. 1.** Комбинированное филогенетическое дерево для видов и штаммов *Diaporthe*, полученное на основе нуклеотидных последовательностей ITS-локуса рДНК и генов  $\beta$ -тубулина и EF-1 $\alpha$ .

## Морфология

Изолят MF 16-010 на КСА формировал колонию, характеризующуюся быстрым ростом, обилием светлого воздушного мицелия и многочисленными пикнидами (Рис. 2). В пикнидах размерами 370-480×340-370 мкм располагались конидии трёх типов:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  (Рис. 3). Конидии типа  $\alpha$  – бобовидные 6.5-7.25×2.25-2.75 мкм. Конидии типа  $\beta$  – вытянутые нитевидные 15-20×0.75-1 мкм. Конидии типа  $\gamma$  имели промежуточные размеры между  $\alpha$  и  $\beta$ .

## Оценка патогенности

В результате искусственной инокуляции подсолнечника было показано, что изученный изолят MF 16-010 вызывает некрозы на стеблях и листьях в 100% случаев при инокуляции с предварительным ранением и не вызывает их при инокуляции без ранения. Средние размеры некрозов через 7 суток после инокуляции составляли: на листьях – 4.00±4.90 мм, на стеблях – 2.33±1.47 мм.

Для подтверждения триады Коха из образовавшихся некрозов был получен реизолят *Diaporthe phaseolorum*, обладающий морфологическими признаками, идентичными изоляту MF 16-010.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Длительное время считалось, что на подсолнечнике развивается единственный вид рода *Diaporthe* – *D. helianthi*, встречающийся повсеместно в местах возделывания подсолнечника. Этот вид входит в список карантинных объектов, ограниченно распространённых на территории России [20]. Однако все эти данные о распространении основаны на идентификации возбудителя исключительно по симптомам на растении или по морфологическим признакам, формируемым изолятами в чистой культуре.

На настоящий момент известно, что достоверная идентификация видов *Diaporthe* может быть осуществлена только с применением методов молекулярной филогении. В результате проведённых исследований, посвящённых ревизии и реидентификации гербарных образцов поражённого подсолнечника и штаммов *Diaporthe*, выделенных из подсолнечника, было показано, что на этом растении могут развиваться 14 видов *Diaporthe*: *D. ambigua* [21], *D. goulteri* [19], *D. gulyae* [19, 22, 23, 24, 25, 26], *D. helianthi* [19, 22, 23, 24, 25, 26, 27], *D. kochmanii* [19], *D. kongii* [19, 26], *D. masirevicii* [26], *D. miriciae* [26], *D. novem* [28], *D. sackstonii* [26], *D. serafiniae* [26], *D. sojae* [22], *D. stewartii* [23, 29] и *D. phaseolorum* [1].

Изолят *Diaporthe* sp. MF 16-010, выделенный из поражённого стебля подсолнечника, собранного в Краснодарском крае, по молекулярно-генетическим признакам был идентифицирован как вид *Diaporthe phaseolorum*, поскольку на всех филограммах, как по ITS-локусу, гену  $\beta$ -тубулина, гену EF-1 $\alpha$ , так и на комбинированной, он с максимальными степенями бутстреп-поддержки входил в одну кладу с референсным штаммом *D. phaseolorum*. В чистой культуре на КСА этот изолят формировал только структуры бесполого размножения – пикниды, содержащие три характерных для представителей рода типа конидий:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . В результате искусственной инокуляции подсолнечника этим изолятом было показано, что он является патогенным для данного растения.

Вид *D. phaseolorum*, согласно информации из литературы, достоверно был обнаружен на растениях семейств *Fabaceae*: *Glycine max* [27], *Phaseolus vulgaris* [22], *Euphorbiaceae*: *Caperonia palustris* [27], *Cactaceae*: *Hylocerus undatus* [8], *Solanaceae*: *Lycopersicon esculentum* (Т.А. Гуркина, Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018»), *Asteraceae*: *Helianthus annuus* [1], *Olearia* cf. *rani*, *Aster exilis* [23]. При эпифитотийном развитии этот фитопатоген может вызывать существенные потери урожая, например, сои – до 70-100% [29]. Известно, что этот вид может также вызывать микозы у людей с ослабленным иммунитетом [30].

Согласно полученным результатам и доступным в литературе данным, изолят *Diaporthe phaseolorum* MF 16-010 является первой достоверной находкой этого вида на подсолнечнике на территории России.

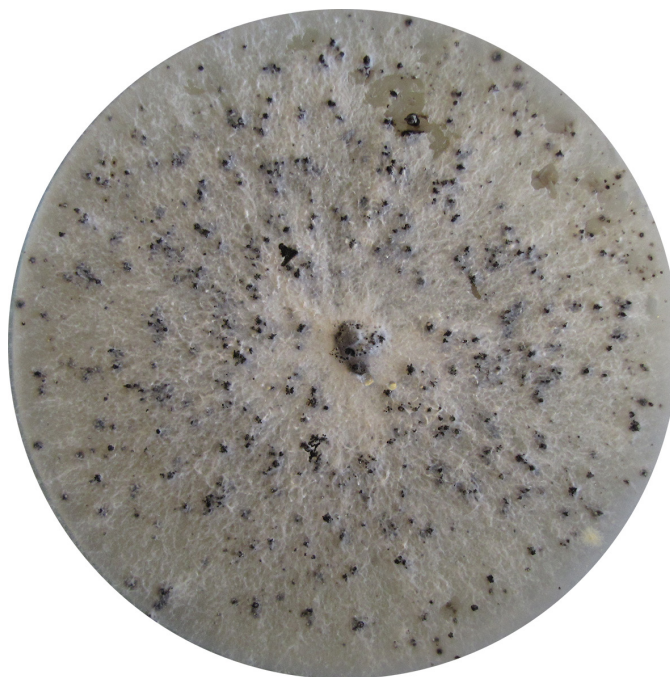


Рис. 2. Изолят *Diaporthe phaseolorum* MF 16-010 на КСА, 14-е сутки роста.

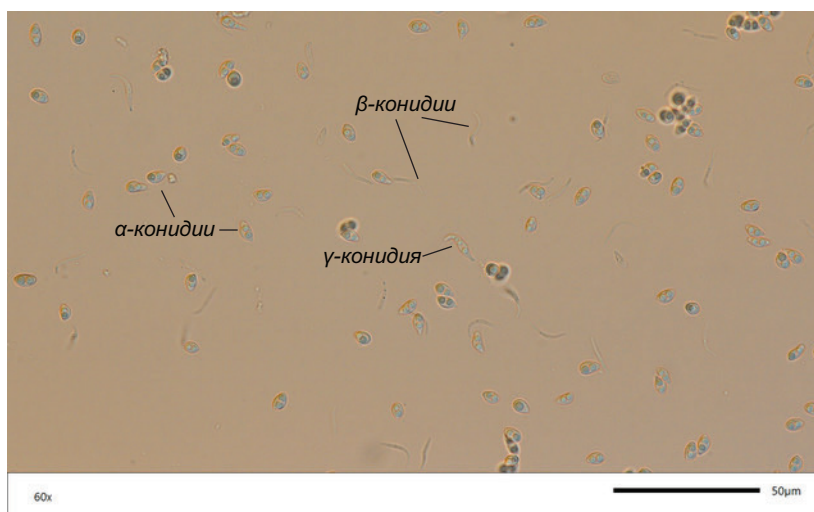


Рис. 3. Конидии изолята *Diaporthe phaseolorum* MF 16-010 на КСА, 14-е сутки роста.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-26-00067). Часть работы проводилась с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

## ЦИТИРОВАНИЕ

М. М. Гомжина, Ф. Б. Ганнибал. Первая находка гриба *Diaporthe phaseolorum* на подсолнечнике в России. *MIR J*, 2018; 5(1), 59-64, doi: 10.18527/2500-2236-2018-5-1-59-64.

## АВТОРСКИЕ ПРАВА

© 2018 Гомжина и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Udayanga D, Liu X, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Bahkali АНА, Hyde KD. The genus *Phomopsis*: Biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal diversity* 2011; 50(1), 189-225. doi: 10.1007/s13225-011-0126-9.

2. Santos JM, Correia VG, Phillips AJL. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology* 2010; 114(2-3), 255-70. doi: 10.1016/j.funbio.2010.01.007.
3. Santos L, Alves A, Alves R. Evaluating multi-locus phylogenies for species boundaries determination in the genus *Diaporthe*. *PeerJ* 2017, 1-26. doi: 10.7717/peerj.3120.
4. Kolomiets T, Mukhina Z, Matveeva T, Bogomaz D, Berner DK, Cavin CA, Castlebury LA. First Report of Stem Canker of *Salsola tragus* Caused by *Diaporthe* spp. in Russia. *Plant disease* 2009; 93 (1), 110. doi: 10.1094/PDIS-93-1-0110B.
5. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. Introduction to food- and airborne fungi. 6<sup>th</sup> edition. Utrecht: Centraal bureau voor schimmel cultures; 2000. ISBN-10: 9070351420.
6. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1990; 12, 13-15.
7. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 1993; 2, 113–18. doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
8. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA et al. (eds.), *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, USA. 1990, 315-322.
9. Aveskamp MM, Verkley GJM, de Gruyter J, Murace MA, Perelló A, Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Crous PW. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 2009; 101(3), 363-82. doi: 10.3852/08-199.
10. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 1999; 9, 553–56. doi: 10.2307/3761358.
11. Boyle JS, Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* 1995, 11(1), 8. doi: 10.1016/S0168-9525(00)88977-5.
12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Biochemistry* 1977; 74(12), 5463-67. PMID: 271968.
13. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res* 1997; 24, 4876-82. PMID: 9396791.
14. Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 2006; 22(21), 2688-90. doi: 10.1093/bioinformatics/btl446.
15. National center for biotechnology information. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
16. Boerema GH, de Gruyter J, Noordeloos ME, Hamers MEC. *Phoma identification Manual*. Wallingford: CABI Publishing; 2004. ISBN-10: 0851997430.
17. Miric E, Aitken EAB, Goulter KC. Identification in Australia of the quarantine pathogen of sunflower *Phoma macdonaldii* (Teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*). *Australian Journal of Agricultural Research* 1999; 50, 325-32. doi: 10.1071/A98072.
18. Schneiter AA, Miric JF, Berglund DR. Description of sunflower growth stages. *Crop. Sci.* 1981; 21(6), 901-3. doi: 10.2135/cropsci1981.0011183X002100060024x.
19. Thompson SM, Tan YP, Young AJ, Neate SM, Aitken EAB, Shivas RG. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. *Persoonia* 2011; 27, 80-89. doi: 10.3767/003158511X617110.
20. Перечень карантинных объектов (вредителей растений, возбудителей болезней растений и растений (сорняков)). Доступен: <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/238.html#2>.
21. Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 2013; 31, 1-41. doi: 10.3767/003158513X666844.
22. Dissanayake AJ, Camporesi E, Hyde KD, Zhang W, Yan JY, Li XH. Molecular phylogenetic analysis reveals seven new *Diaporthe* species from Italy. *Mycosphere* 2017; 8(5), 853-77. doi: 10.5943/mycosphere/8/5/4.
23. Mathew F, Alananbeh K, Balbyshev N, Heitkamp E, Castlebury L, Gulya T, Markell S. Reevaluation of *Phomopsis* species affecting sunflowers in the United States. *Phytopathology* 2011, 101(S115).
24. Mathew FM, Alananbeh KM, Jordah JG, Meyer SM, Castlebury LA, Gulya TJ, Markell SG. *Phomopsis* Stem Canker: A Reemerging Threat to Sunflower (*Helianthus annuus*) in the United States. *Phytopathology* 2015; 105(7), 990-7. doi: 10.1094/PHYTO-11-14-0336-FI.
25. Mathew FM, Rashid KY, Gulya TJ, Markell SG. First Report of *Phomopsis* Stem Canker of Sunflower (*Helianthus annuus*) Caused by *Diaporthe gulyae* in Canada. *Disease notes* 2015; 99(1), 160. doi: 10.1094/PDIS-08-14-0858-PDN.
26. Thompson SM, Tan YP, Shivas RG, Neate SM, Morin L, Bissett A, Aitken EAB. Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. *Persoonia* 2015; 35, 39-49. doi: 10.3767/003158515X687506.
27. Udayanga D, Liu X, Crous PW, McKenzie EHC, Chuksatiro E, Hyde KD. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal diversity* 2012; 56(1), 157-71. doi: 10.1007/s13225-012-0190-9.
28. Santos JM, Vrandečić K, Čosić J, Duvnjak T, Phillips AJL. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia* 2011; 27, 9–19. doi: 10.3767/003158511X603719.
29. Olson TR, Kontz B, Markell SG, Gulya TJ, Mathew FM. First Report of *Diaporthe stewartii* Causing *Phomopsis* Stem Canker of Sunflower (*Helianthus annuus*) in Minnesota. *Disease notes* 2017; 101(2), 382. doi: 10.1094/PDIS-08-16-1122-PDN.
30. Mattei AS, Severo CB, Guazzelli LC, Oliveira FM, Gené J, Guarro J, Cano J, Severo LC. Cutaneous infection by *Diaporthe phaseolorum* in Brazil. *Medical Mycology Case Reports* 2013; 2, 85-7. doi: 10.1016/j.mmcr.2013.03.001.