

На правах рукописи

Орина Александра Станиславовна

**ВИДОВОЙ СОСТАВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АЛЬТЕРНАРИОЗА
ПАСЛЕНОВЫХ КУЛЬТУР НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ**

Шифр и наименование специальности:
03.02.12 – Микология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2011

Работа выполнена в Государственном научном учреждении
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты
растений Российской академии сельскохозяйственных наук
(ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии)

Научный руководитель:

академик РАСХН, доктор биологических наук, профессор
Левитин Марк Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Коваленко Александр Елисеевич

доктор биологических наук, доцент

Власов Дмитрий Юрьевич

Ведущая организация:

Московский государственный университет им. М.В. Ломоно-
сова

Защита состоится «30» июня 2011 г. в 14 часов на засе-
дании диссертационного совета Д 006.015.01 во Всеросий-
ском научно-исследовательском институте защиты растений
по адресу: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Под-
бельского, дом 3, факс (812) 470-51-10, e-mail:
vizrspb@mail333.com, web-сайт: vizrspb.narod.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всерос-
сийского научно-исследовательского института защиты рас-
тений.

Автореферат разослан «25» мая 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

кандидат биологических наук
Г.А.Наседкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Представители рода *Alternaria* широко распространены в природе и встречаются на разнообразных субстратах. Многие виды являются возбудителями заболеваний растений, в т.ч. важных сельскохозяйственных культур из семейства пасленовых: картофеля, томата, баклажана, перца и табака. Альтернариоз поражает листья, стебли, клубни и плоды и обладает высокой вредоносностью. Потери урожая картофеля составляют 10-50% (Дорожкин и др., 1973; Воловик, Литун, 1975; Иванюк и др., 2003), потери урожая томатов могут достигать 78%-90% (Сайчук, 1989; Grogan et al., 1975; Rotem, 1994; Chaerani, Voorrips, 2006).

В систематике и номенклатуре рода *Alternaria* существует множество проблем. В отечественной литературе долгое время поддерживалось и встречается до сих пор мнение о существовании двух самостоятельных заболеваний: альтернариоза и макроспориоза, вызываемых *Alternaria solani* Sorauer и *Macrosporium solani* Ellis et Martin соответственно (Горденко, Абросимова, 1971; Дорожкин и др. 1973; Анненков, 1987), хотя эти видовые эпитеты были признаны синонимами в середине XX века (Neergaard, 1945; Ellis, 1971). Кроме того, в работах прикладного характера, связанных с *Alternaria*, часто можно обнаружить результаты неточной идентификации: исследователи определяют вид возбудителя на основе малоинформативных культуральных и морфологических признаков или оценивая только симптомы заболевания. Такое положение порождает заблуждения о реальном видовом составе возбудителей, их специализации и распространенности.

В последние годы была проведена таксономическая ревизия рода *Alternaria* и было описано много новых видов, в т.ч. встречающихся на пасленовых. В настоящий момент систематики считают, что с картофелем и томатом консортивно связаны 14 видов *Alternaria* (Simmons, 1999, 2000, 2007). Известно, что разные виды *Alternaria* могут существенно отличаться по физиологическим, экологическим свойствам и хозяйственному значению. Однако в России анализ видового состава возбудителей альтернариоза пасленовых с учетом современных таксономических концепций почти не проводился.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы - инвентаризация видового состава возбудителей альтернариоза пасленовых культур в России и анализ разнообразия видов *Alternaria* по комплексу морфологических признаков, пато-

генности и молекулярным маркерам.

В задачи исследований входило:

1. Описание микро- и макроморфологии изолятов *Alternaria*.

2. Определение видового состава грибов рода *Alternaria*, ассоциированных с культурными растениями семейства пасленовых.

3. Усовершенствование диагностики возбудителей альтернариоза с использованием молекулярно-генетических методов. Подбор ДНК-маркеров для идентификации разных видов *Alternaria*.

4. Молекулярно-генетический анализ видового и внутри-видового разнообразия крупноспоровых видов *Alternaria*, доминирующих на картофеле и томатах.

5. Оценка патогенности и специализации доминирующих видов-возбудителей альтернариоза пасленовых культур.

Научная новизна. Впервые в России на обширном материале различного географического происхождения и согласно современным представлениям о систематике рода проведена идентификация видов *Alternaria*, ассоциированных с пасленовыми культурами. Установлены границы ареалов видов на территории России. Из шести обнаруженных видов два идентифицированы в России впервые: *A. arborescens* E.G.Simmons и *A. tomatophila* E.G.Simmons.

Впервые проведен детальный анализ разнообразия крупноспоровых видов *Alternaria* на картофеле и томате по комплексу морфологических признаков, агрессивности и молекулярным маркерам.

Впервые изучена роль мелкоспоровых видов *Alternaria* в развитии заболевания. Установлено, что при совместном заражении с патогенным видом *Alternaria* мелкоспоровые виды значительно усиливают развитие некрозов.

Практическая значимость. Создана коллекция штаммов *Alternaria* с пасленовых культур различного происхождения (467 штаммов). Сконструирована пара праймеров AslR/AslF для идентификации комплекса видов '*A. solani*'. Усовершенствован метод молекулярной диагностики альтернариоза пасленовых культур, который позволяет в 90% случаев обнаружить и идентифицировать возбудителей альтернариоза непосредственно в растительной ткани.

Апробация работы. Результаты исследований обсуждались на ежегодных методических комиссиях ГНУ ВИЗР Россельхоза-

кадемии по аттестации аспирантов (Санкт-Петербург, 2008–2011), а также были представлены на конференциях: Конференция профессорско-преподавательского состава Санкт-Петербургского государственного Аграрного Университета «Обеспечение развития АПК в условиях реформирования» (Санкт-Петербург, 2009); V Международная конференция «Изучение грибов в биогеоценозах» (Пермь, 2009); Всероссийская научно-практическая конференция «Современные иммунологические исследования, их роль в создании новых сортов и интенсификации растениеводства» (Голицино, 2009); IV Региональная молодежная экологическая конференция «Экологическая школа в Петергофе – наукограде Российской Федерации»: «Биоразнообразие и биоиндикация в естественных и трансформированных экосистемах Северо-западного региона» (Санкт-Петербург, 2009); Научная конференция аспирантов и молодых ученых «Генетика и селекция» (Санкт-Петербург, 2010); Второй Междисциплинарный микологический форум (Москва, 2010); Всероссийская научная конференция «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в агропромышленном комплексе России» (Москва, 2010).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ: проекты № 07-04-00096 и № 09-04-13753-офи_ц; Правительства Санкт-Петербурга (комитета по науке и высшей школе): ПСП № 10506; фонда ООО «Технологии. Внедрение. Наука»: проект № 12650.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 в изданиях, рекомендуемых ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы, 3 приложений, содержит 23 таблицы, 11 рисунков. Список библиографических источников включает 206 наименования, в том числе 159 на иностранных языках.

Место проведения работы. Научно-исследовательская работа проводилась в лаборатории микологии и фитопатологии ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ВИЗР) в 2008–2011 гг.

Автор выражает искреннюю благодарность доктору Э. Симмонсу (США) за предоставленные штаммы, доктору биологиче-

ских наук Н. В. МIRONENKO за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований, кандидату биологических наук Ф. Б. ГАННИБАЛУ за общую методическую поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе приведены сведения о современном состоянии исследований по таксономии грибов рода *Alternaria*, встречающихся на пасленовых культурах. Представлены данные по распространенности отдельных видов, их патогенности и внутривидовому разнообразию.

Обобщена существующая информация по проблеме молекулярной диагностики альтернариоза и о подходах к изучению взаимоотношений в патосистеме *Alternaria spp.* – пасленовые культуры.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом исследований являлись 293 образца листьев и плодов пасленовых растений (картофель, томат, перец, баклажан и декоративные культуры) с симптомами альтернариоза, собранных в 22 регионах России, в Белоруссии и Украине в 2008-2010 гг., а также штаммы грибов рода *Alternaria* из коллекции Э. Симмонса (США) и из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР.

2.1 Изоляция грибов в чистую культуру. Для оценки зараженности растений и выделения чистых культур возбудителей было проанализировано по 5-7 отрезков листьев из каждого образца пасленовых с симптомами альтернариоза. Изоляцию грибов осуществляли во влажных камерах, помещая туда поверхность-стерилизованный материал.

2.2 Идентификация и исследование макро- и микроморфологии изолятов. Для анализа микроморфологии изоляты культивировали на картофельно-морковном агаре (КМА) и агаризованной среде V4 (Михайлова и др., 2002) под люминесцентными лампами с соблюдением режима 16 часов «день» – 8 часов «ночь». Для описания культуральных свойств изоляты выращивали в темноте на среде Чапека и на среде YES с дрожжевым экстрактом и сахарозой (Samson et al., 2000). Идентификацию проводили по определителю Э. Симмонса (Simmons, 2007).

2.3 Молекулярно-генетические методы. Для получения мицелия колонии грибов выращивали на среде Чапека. Экстракцию ДНК из воздушного мицелия проводили с использованием экстрагирующего буфера, содержащего цетилтриметиламмония бромид (Ausubel et al., 2002).

Для выделения ДНК грибов из пораженных растительных тканей применяли тот же метод с добавлением в буфер поливинилпирролидона (Cubero et al., 1999).

Специфичные к комплексу видов '*A. solani*' праймеры были сконструированы на основе 10 секвенированных нуклеотидных последовательностей гена глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (gpd), размещенных в базе данных Генбанка (NCBI-GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Дизайн ПЦР-праймеров осуществляли с использованием online программы Primer3 (Rozen, Skaletsky, 1998). Специфичность разработанных праймеров была определена с использованием ДНК 68

изолятов разных видов *Alternaria* и представителей родственных родов.

Для идентификации видового состава возбудителей альтернариоза в растительной ткани проводили ПЦР с видоспецифичными праймерами AAF2/AAR3 для комплекса видов '*A. alternata*' (Konstantinova et al., 2002), Ain3F/Ain4R для комплекса видов '*A. infectoria*' (Gannibal, Yli-Mattila, 2007) и разработанной нами парой праймеров AslR/AslF для комплекса видов '*A. solani*'.

Уточнение таксономии и определение внутривидового разнообразия комплекса видов '*A. solani*' проводили методами UP-PCR праймерами L45, 15/19, AS4 и AS15inv (Булат и др., 1995; Lubeck et al., 1999; Bulat et al., 2000) и RAPD-PCR с праймером A10.

Разделение смеси ПЦР продуктов проводили методом горизонтального электрофореза в 1% или 1,5% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. Все эксперименты проводили в двух повторностях. Результаты анализа записывали в виде бинарных матриц.

2.4 Оценка агрессивности видов *Alternaria*. Для получения инокулюма изоляты *Alternaria* выращивали на среде V4 под эритемными лампами. Затем для формирования спороношения у изолятов комплекса '*A. solani*' стерильным скальпелем удаляли с колоний воздушный мицелий и чашки с колониями помещали в холодильник на 2 суток.

Определение патогенности и агрессивности проводили в лабораторных условиях на листовых дисках диаметром 10 мм. Для заражения брали листья среднего яруса томата сорта «Балтийский» и картофеля сорта «Невский». Для смачивания фильтровальной бумаги, уложенной на дно влажных камер, использовали воду для дисков томата и 4 мМ раствор 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) для дисков картофеля (Bussey, Stevenson, 1991). На листовые диски с механическими повреждениям и без повреждений наносили каплю инокулюма с концентрациями 5×10^3 конидий/мл для изолятов видов комплекса '*A. solani*' и от 1×10^2 до 1×10^5 конидий/мл для изолятов мелкоспоровых видов. Затем инкубировали в климатостате с соблюдением следующего режима: 16 ч. +24°C с освещением и 8 ч. 18°C без освещения. Оценку результатов проводили через 5 сут. после инокуляции.

2.5 Обработка и анализ данных. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программ MS Ex-

cel 2005 и Statistica 6.0. Кластерный анализ проводили методом невзвешенного попарного арифметического среднего (UPGMA). Для построения дендрограмм использовали программу Treecon 3.1b.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 3. БИОРАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA* НА ПАСЛЕНОВЫХ КУЛЬТУРАХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ3.1 Разнообразие мелкоспоровых видов *Alternaria* по микро- и макроморфологическим признакам.

На пасленовых культурах нами выявлены 4 мелкоспоровых вида *Alternaria*: *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. alternata*, и *A. infectoria*. Вид *A. arborescens* впервые обнаружен нами на пасленовых культурах в России.

Виды *A. alternata*, *A. tenuissima* и *A. arborescens* составляют комплекс видов '*A. alternata*'. Под комплексом видов у *Alternaria* понимают группу видов, имеющих сходные культуральные признаки, образующих близкие по форме, строению и размеру споры и отличающиеся только габитусом формирования цепочек конидий (Simmons, 2007). Так, вид *A. tenuissima* образует простые длинные цепочки конидий без ветвлений, вид *A. alternata* формирует компактные «кустики» из цепочек конидий с множеством боковых веточек на коротких конидиеносцах. Вид *A. arborescens* является «промежуточной» формой и образует «деревце» из нескольких, ветвящихся у основания, цепочек конидий (рис. 1).

Вид *A. infectoria* существенно отличается от представителей комплекса '*A. alternata*', поскольку формирует разветвленные цепочки из конидии с длинными апикальными вторичными конидиеносцами.

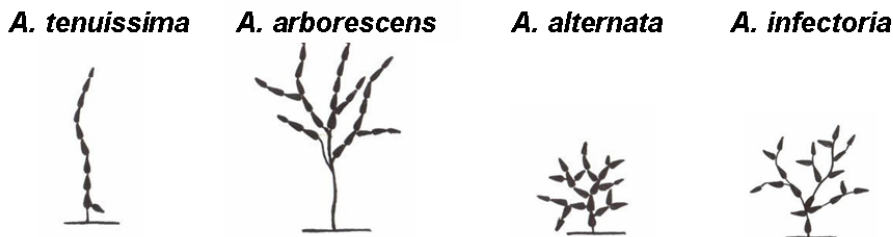


Рис.1. Микроморфология мелкоспоровых видов *Alternaria*.

Детальный анализ микроморфологических параметров изолятов комплекса видов '*A. alternata*' позволил соотнести видовую принадлежность с конкретными числовыми параметрами (рис.2). Цепочки конидий изолятов *A. arborescens* образуют больше ветвлений, что выражается в высокой доле конидий с апикальным вторичным конидиеносцем с двумя локусами. Для изолятов *A. tenuissima* характерна небольшая степень ветв-

ления, в основном за счет вторичных боковых конидиеносцев. Хотя изоляты видов *A. tenuissima* и *A. arborescens* образуют две обособленные группы, пределы варьирования микроморфологических параметров перекрываются, что указывает на близкое родство этих видов и наличие переходных форм.

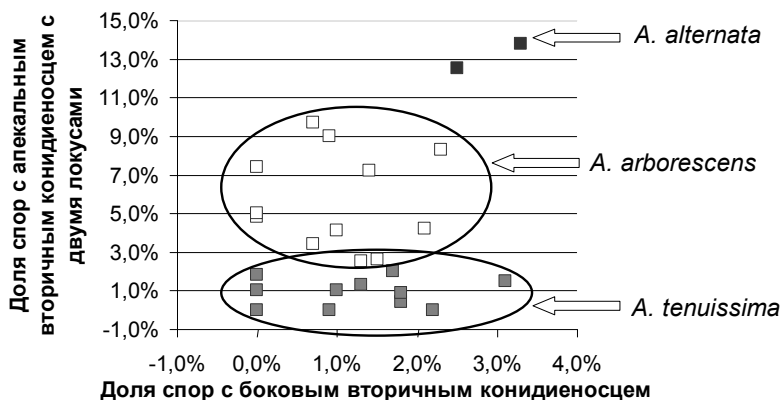


Рис. 2. Распределение изолятов мелкоспоровых видов комплекса '*A. alternata*' в зависимости от двух микроморфологических параметров.

3.2 Разнообразие крупноспоровых видов *Alternaria* по микро- и макроморфологическим признакам.

Анализ культуральных признаков изолятов видов комплекса '*A. solani*', которые включали типовые штаммы видов *A. solani* и *A. tomatophila*, не выявил очевидных различий между изолятами. В стандартных условиях все изоляты образовывали колонии диаметром 45–50 мм, темно-серого цвета в центре, переходящего в светло-оливковый, с бархатистой поверхностью, ровным краем, иногда с сегментированием, с радиальными кругами.

Изоляты показывали широкие пределы колебания размеров спор: длина корпуса в диапазоне 58–107 мкм, длина апикального выроста в диапазоне 98–194 мкм; доля спор с разветвленным апикальным выростом составляла от 0% до 50%. Широкое и непрерывное варьирование микроморфологических признаков не позволило разделить исследованные изоляты на дискретные группы.

3.3 Распространение видов *Alternaria* на пасленовых

культурах на территории России.

Во всех проанализированных образцах пасленовых культур были выявлены мелкоспоровые виды *Alternaria*, причем большая часть изолятов относилась к видам *A. tenuissima* и *A. arborescens*. Виды же *A. alternata* и *A. infectoria* встречались редко (рис. 3). В среднем за 3 года, встречаемость вида *A. tenuissima* составила 55%, *A. arborescens* – 30%, '*A. solani*' – 12%, остальные виды (*A. alternata* и '*A. infectoria*') – 3%.

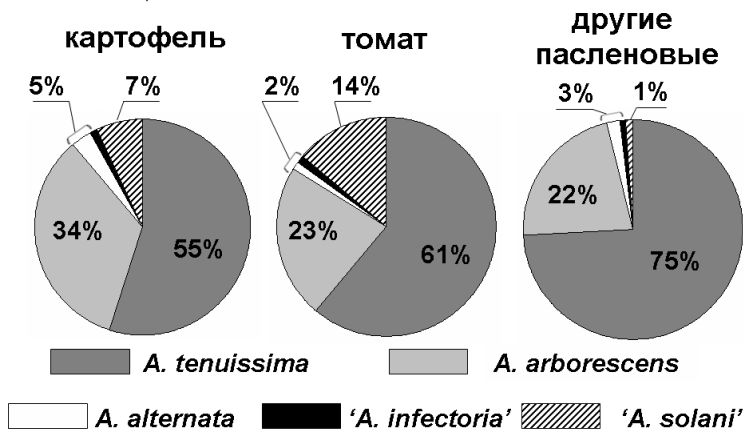


Рис. 3. Соотношение видов *Alternaria* на пасленовых культурах в образцах 2008-2010 годов.

Соотношение двух самых распространенных видов *A. tenuissima* и *A. arborescens* сильно отличалось в образцах, собранных в разных регионах и с разных растений-хозяев, причем в некоторых случаях *A. arborescens* по численности преобладал над *A. tenuissima*. Таким образом, встречаемость вида *A. arborescens*, впервые найденного нами на пасленовых культурах на территории России, не зависит от климатических условий зоны и специализации, поэтому вид *A. arborescens* наравне с видом *A. tenuissima* можно считать широко распространенным неспециализированным возбудителем альтернариоза пасленовых культур.

Крупноспоровые виды комплекса '*A. solani*' встречались только в 20% образцов, а доля изолятов этих видов составила 7% на картофеле и 14% на томатах. Очевидно, что крупноспоровые виды комплекса '*A. solani*' имеют ограниченную зону распространения (центр Европейской части России, Северный Кавказ, юг Западной Сибири, Прибайкалье и

Приморье), что обусловлено узкой специализацией и значительной чувствительностью к климатическим условиям.

Глава 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA*

4.1 Молекулярная идентификация видов *Alternaria* в пораженных растительных тканях.

Сконструирована пара праймеров AslR/AslF, которая амплифицировала ДНК изолятов комплекса '*A. solani*', а также штаммов других крупноспоровых видов *Alternaria*, приуроченных к поражению растений других семейств. Следовательно, праймеры обладают частичной групповой специфичностью к крупноспоровым видам. Праймеры не амплифицировали ДНК штаммов мелкоспоровых видов *Alternaria*, поэтому могут быть использованы для идентификации комплекса видов '*A. solani*' на картофеле и томате.

Результаты идентификации видового состава возбудителей альтернариоза в пораженных растительных тканях с помощью ПЦР со специфичными праймерами на 82% совпадали с результатами определения видов-возбудителей в тех же образцах традиционным методом во влажных камерах. Причем, молекулярный метод позволил обнаружить и идентифицировать возбудителей альтернариоза в 90% случаев. Таким образом, молекулярный метод с использованием специфичных праймеров позволяют быстро и с высокой достоверностью идентифицировать видовой состав возбудителей альтернариоза.

ДНК мелкоспоровых видов комплекса '*A. alternata*' присутствовала во всех образцах, тогда как ДНК видов комплекса '*A. solani*' встречалась только в части образцов, что согласуется с полученными нами ранее результатами об ограниченной зоне распространения видов комплекса '*A. solani*'.

4.2 Дифференциация изолятов комплекса видов '*A. solani*' по молекулярным маркерам.

По молекулярным маркерам изоляты крупноспоровых видов комплекса '*A. solani*' разделились на 2 больших кластера и, в общей сложности, относились к 18 гаплотипам. Группировка изолятов по кластерам не зависела от географического происхождения.

На рис. 4 сопоставлено генетическое сходство изолятов, выделенных с разных растений-хозяев. Один из кластеров полностью составляют изоляты, выделенные с томата. Другой кластер представлен преимущественно изолятами с картофе-

ля, но также включает несколько «томатных» изолятов. Эти изоляты выделены из томатов открытого грунта, выращиваемых в непосредственной близости от картофеля. В отсутствии строгой специализации изолятов к определенному хозяину, вероятно, эти изоляты являются «картофельными», а заражение ими томатов – это результат территориальной близости «картофельной» популяции.

Распределение на кладограмме типовых штаммов также коррелировало с субстратным происхождением. Штамм вида *A. solani* оказался в «картофельном» кластере, а штаммы вида *A. tomatophila* распределились соответственно в «томатный» кластер. Можно предположить, что эти два кластера представляют разные виды: «томатный» кластер представлен видом *A. tomatophila*, «картофельный» – видом *A. solani*. Так как «томатный» кластер представлен только изолятами с томата, а «картофельный» включает изоляты с разных растений-хозяев, возможно, вид *A. tomatophila* обладает более узкой специализацией, чем *A. solani*. Генетическое различие между видами невелико и составляет 30%. Возможно, вид *A. tomatophila* является более «молодым» и появился в результате специализации отдельных клонов из популяций *A. solani* к паразитированию на томате.

Таким образом, мы впервые показали присутствие на территории России нового вида-возбудителя альтернариоза томатов – *A. tomatophila*.

Генетическое
сходство
0 10%

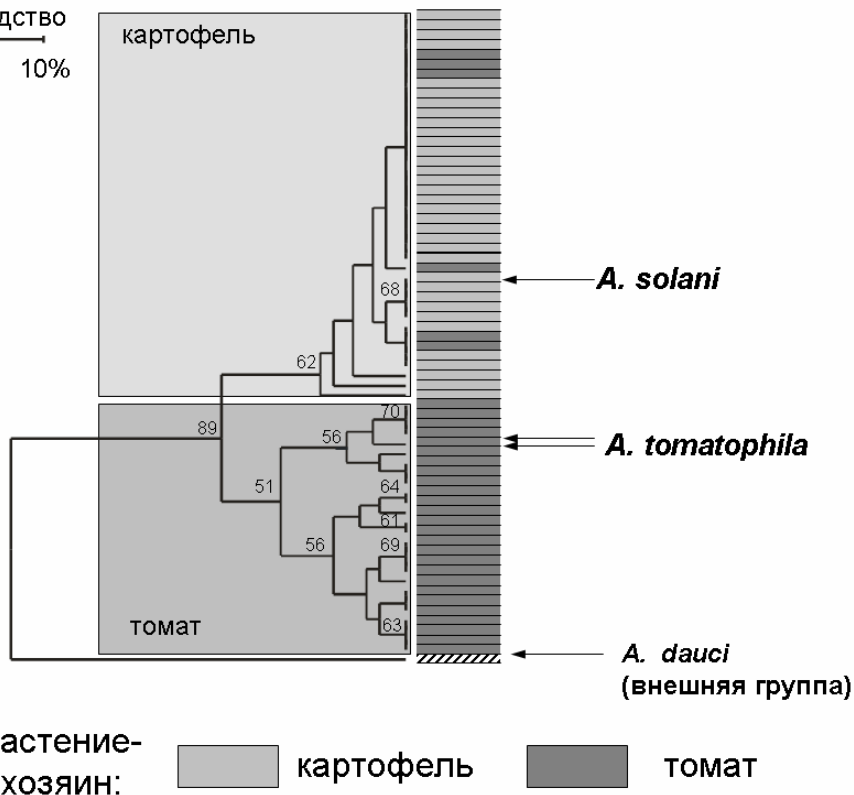


Рис. 4. Дендрограмма сходства крупноспоровых изолятов *Alternaria*, выделенных с разных растений-хозяев, построенная на основе данных UP-PCR и RAPD-PCR. Стрелками отмечены эталонные штаммы.

4.3 Сравнительный анализ результатов морфологического и молекулярного исследования изолятов комплекса видов '*A. solani*'.

Анализ размера конидий изолятов *A. solani* и *A. tomatophila*, идентифицированных с помощью молекулярно-генетических методов, позволил уточнить описания видов и провести условную границу между морфологическими параметрами видов (рис. 5).

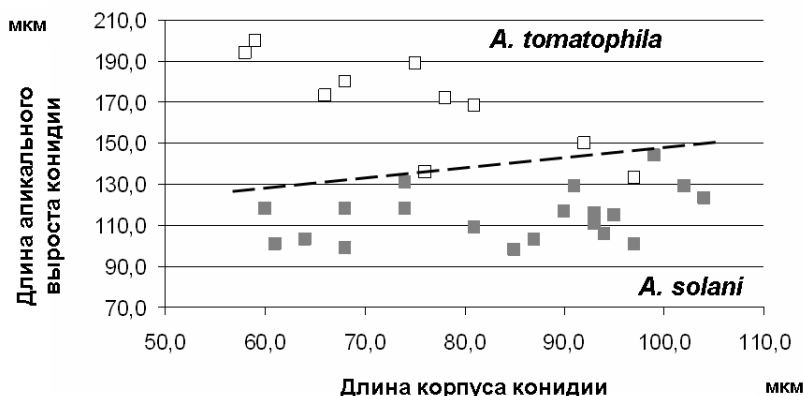


Рис. 5. Морфологические параметры изолятов *A. solani* и *A. tomatophila*, идентифицированных с помощью молекулярно-генетических методов.

Изоляты обоих видов образуют конидии с близкой длиной корпуса, однако конидии вида *A. tomatophila* имеют более длинные апикальные выросты. Тем не менее, диапазоны варьирования морфологических параметров видов *A. solani* и *A. tomatophila* перекрываются, поэтому для надежной идентификации изолятов комплекса '*A. solani*' целесообразно использовать молекулярно-генетические методы.

Глава 5. ПАТОГЕННОСТЬ ВИДОВ *ALTERNARIA* ПО ОТНОШЕНИЮ К КАРТОФЕЛЮ И ТОМАТУ

5.1 Патогенность крупноспоровых видов *Alternaria*.

Все исследованные изоляты видов *A. solani* и *A. tomatophila* оказались патогенными по отношению к картофелю и томату и значительно отличались по агрессивности. Зона некроза после заражения варьировала от 2% до 41% от общей площади листовых дисков (табл. 1).

По отношению к картофелю наиболее полиморфными по агрессивности оказались изоляты *A. solani*. По отношению к томату наибольшее разнообразие по этому признаку демонстрировали изоляты *A. tomatophila*. Средние показатели площади некроза, вызываемые изолятами *A. solani* при заражении картофеля и при заражении томата, не имели статистически достоверных различий. Средняя площадь некроза, вызываемая изолятами вида *A. tomatophila*, при заражении томата и при заражении картофеля статистически достоверно отличались – изоляты вида *A. tomatophila* в среднем в 2 раза агрессивнее по отношению к томату, чем к картофелю.

Таблица 1. Агрессивность изолятов крупноспоровых видов *Alternaria* по отношению к пасленовым культурам

Виды	Площадь некроза листовых дисков, %			
	Картофель		Томат	
	Средняя	Пределы варьирования	Средняя	Пределы варьирования
<i>A. solani</i>	11,0±0,3	1,7÷21,7	11,2±0,0	1,5÷20,0
<i>A. tomato-</i>	6,9±0,2	1,9÷15,8	13,1±0,0	2,8÷41,0

Таким образом, изоляты вида *A. solani* агрессивны по отношению к картофелю и томатам в равной степени, тогда как изоляты *A. tomatophila* значительно агрессивнее по отношению к своему хозяину (томату) и характеризуются более узкой специализацией.

5.2 Патогенность мелкоспоровых видов *Alternaria*.

При заражении механически поврежденных и неповрежденных листовых дисков томатов инокулюмом изолятов видов *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* и *A. alternata* в разных концентрациях на 5 сутки видимых симптомов инфицирования не наблюдалось. Таким образом, мелкоспоровые виды, которые чаще всего выделяются из пораженных листьев и плодов пасленовых, сами по себе не являются патогенными.

Для выяснения роли мелкоспоровых видов *Alternaria* в развитии комплексной инфекции было проведено совместное заражение листовых дисков томата смешанным инокулюмом наиболее распространенного мелкоспорового вида *A. tenuissima* и патогенного вида *A. solani*.

Таблица 2. Агрессивность изолятов *A. solani* и *A. tenuissima* при совместном заражении

Концентрации инокулюма <i>A. tenuissima</i> , конидий/мл	Площадь некроза листовых дисков (%) при раз- ной концентрации инокулюма <i>A. solani</i> (кони- дий/мл)			
	0	5×10^2	1×10^3	5×10^3
0	0	$0,6 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,6$	$9,0 \pm 1,6$
1×10^2	0	$2,0 \pm 0,4$	$6,9 \pm 1,2$	$19,5 \pm 3,5$
1×10^3	0	$2,4 \pm 0,4$	$7,3 \pm 1,3$	$20,1 \pm 3,6$
1×10^4	0	$2,0 \pm 0,4$	$10,1 \pm 1,8$	$20,3 \pm 3,6$
1×10^5	0	$2,1 \pm 0,4$	$9,1 \pm 1,6$	$23,3 \pm 4,2$

Использование инокулюма вида *A. tenuissima* даже в малой концентрации на фоне присутствия конидий *A. solani* увеличивало интенсивность поражения в среднем в 2,5 раза (табл. 2). Увеличение инфекционной нагрузки *A. tenuissima* на фоне той же концентрации *A. solani* не вызывало увеличение интенсивности поражения.

Механическое повреждение растительных тканей значительно влияло на интенсивность поражения видами *Alternaria* и увеличивало площадь некроза в 3 раза (рис. 6). Включение в инокулюм помимо конидий *A. solani* конидий *A. tenuissima* увеличивало площадь поражения в среднем в 2 раза, причем интенсивность поражения не зависела от инфекционной нагрузки *A. tenuissima*. При этом на поверхности листовых дисков формировалось интенсивное спороношение *A. tenuissima*.

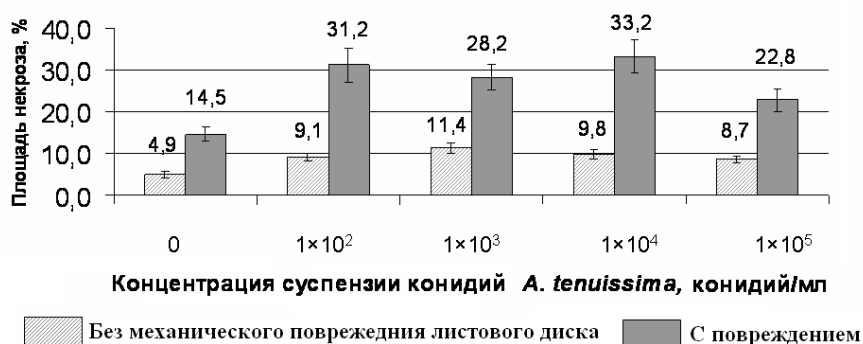


Рис. 6. Влияние концентрации инокулюма *A. tenuissima* на развитие некрозов листовых дисков томатов при совместном заражении с *A. solani* (1×10^3 конидий/мл).

Таким образом, факультативный паразит *A. tenuissima* при совместном заражении с *A. solani* значительно усиливал по-

ражение листьев. Вероятно, вид *A. tenuissima* не способен самостоятельно преодолевать защитные барьеры растения и проникать в здоровые ткани даже при наличии механических повреждений. Однако на фоне других патогенов он быстро развивается в качестве вторичного патогена и формирует спороношение. Этот факт в совокупности с нетребовательностью *A. tenuissima* к условиям окружающей среды объясняет значительное распространение этого и, вероятно, других мелкоспоровых видов *Alternaria* на пасленовых культурах.

ВЫВОДЫ

1. На пасленовых культурах выявлено 6 видов рода *Alternaria*: 4 мелкоспоровых вида *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. alternata* и *A. infectoria* и 2 крупноспоровых вида *A. solani* и *A. tomatophila*. Виды *A. arborescens* и *A. tomatophila* идентифицированы нами впервые в России.

2. Установлено, что наиболее распространенными видами являются *A. tenuissima* и *A. arborescens*, которые встречались на пасленовых культурах повсеместно и составляли 85% среди всех изученных нами изолятов *Alternaria*. Крупноспоровые виды *A. solani* и *A. tomatophila* встречались только в 20% образцов. Доля изолятов этих видов составила 7% на картофеле и 14% на томате. Виды *A. alternata* и *A. infectoria* являлись редкими.

3. Морфологический анализ показал, что мелкоспоровые виды имеют сходные признаки и отличаются только габитусом споронотения. Крупноспоровые виды различаются по размеру спор, но диапазоны варьирования этого признака перекрываются, что не позволяет разделить изоляты на дискретные группы традиционными микологическими методами.

4. Сконструирована пара праймеров AslR/AslF, которая может быть использована для идентификации видов комплекса '*A. solani*', паразитирующих на картофеле и томате.

5. Усовершенствован метод диагностики видового состава возбудителей альтернариоза, который заключается в выделении ДНК патогена непосредственно из растительной ткани с использованием поливинилпирролидона и проведении ПЦР с праймерами, специфичными к комплексам видов '*A. alternata*', '*A. infectoria*' и '*A. solani*'.

6. По молекулярным маркерам изоляты комплекса '*A. solani*' были разделены на 2 кластера, один из которых представлял вид *A. solani*, а другой – вид *A. tomatophila*. Нами высказывается гипотеза о происхождении вида *A. tomatophila* путем отбора из популяций *A. solani* отдельных клонов – специализированных патогенов томата.

7. Изоляты *A. solani* агрессивны в отношении картофеля и томата в равной степени. Изоляты *A. tomatophila* патогенны для обеих культур, однако более агрессивны в отношении своего хозяина – томата. Мелкоспоровые виды *Alternaria* являются факультативными паразитами и не способны самостоятельно заражать картофель и томат.

8. Вид *A. tenuissima* при совместном заражении с *A. solani* усиливает развитие некрозов на листовых дисках тома-

та в среднем в два раза и образует интенсивное спороношение на поверхности пораженной ткани. Подобный синергизм может объяснить широкое распространение мелкоспоровых видов на пасленовых культурах.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Ганнибал Ф.Б., **Орина А.С.**, Левитин М.М. Альтернариозы сельскохозяйственных культур на территории России // Защита и карантин растений. – М. – 2010. – Вып. 5. – С. 30-32.

2. **Орина А.С.**, Ганнибал Ф.Б. Внутривидовой полиморфизм фитопатогенного гриба *Alternaria solani* по морфологическим и молекулярным маркерам // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – М. – 2010. – № 1. – С. 10.

3. **Орина А.С.**, Ганнибал Ф.Б., Левитин М.М. Видовое разнообразие, биологические особенности и география грибов рода *Alternaria*, ассоциированных с растениями семейства *Solanaceae* // Микология и фитопатология. – СПб. – 2010. – Т. 44. – Вып. 2. – С. 150-159.

4. **Орина А.С.** Разнообразие грибов рода *Alternaria* – патогенов картофеля в Ленинградской области // Сборник материалов IV региональной молодежной экологической конференции "Биоразнообразие и биоиндикация в естественных и трансформированных экосистемах Северо-Западного региона", 26-27 ноября 2009 г. – СПб. – 2009. – С. 86-89.

5. **Орина А.С.**, Ганнибал Ф.Б. Видовое разнообразие грибов рода *Alternaria* на пасленовых культурах // Материалы конференции профессорско-преподавательского состава «Научное обеспечение развития АПК в условиях реформирования». – СПб: СПбГАУ. – 2009. – С. 42-44.

6. **Орина А.С.**, Ганнибал Ф.Б. Видовой состав грибов рода *Alternaria* на пасленовых культурах в России // Сборник материалов V международной конференции «Изучение грибов в биогеоценозах», 7-13 сентября 2009. – Пермь: ПГПУ. – 2009. – С. 178-182.

7. **Орина А.С.**, Ганнибал Ф.Б. Проблемы идентификации возбудителей альтернариоза пасленовых // Материалы Всероссийской научно-производственной конференции "Современные иммунологические исследования, их роль в создании новых сортов и интенсификации растениеводства", 18 ноября 2009 г., ВНИИФ. – Большие Вяземы. – 2009. – С. 200-203.

8. **Орина А.С.**, Ганнибал Ф.Б. Видовой состав и патогенность возбудителей альтернариоза пасленовых культур // Материалы научной конференции аспирантов и молодых ученых "Генетика и селекция", 15 – 16 марта 2010 г., ВИР им. Н.И. Вавилова. – СПб. – 2010. – С. 156-162.

9. Левитин М.М., Ганнибал Ф.Б., Баранова О.А., Гасич Е.Л., Мироненко Н.В., **Орина А.С.**, Прокофьев П.С., Хлопу-

нова Л.Б. Биоразнообразие грибов рода *Alternaria* и устойчивость сельскохозяйственных культур к альтернариозам (09-04-13753) // Материалы Всероссийской научной конференции «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в агропромышленном комплексе России». - М.: РАСХН. - 2010. - С. 29-34.

10. Левитин М.М., Ганнибал Ф.Б., Гасич Е.Л., Баранова О.А., **Орина А.С.** Использование закономерностей иммуногенеза при разработке методов оценки устойчивости растений к альтернариозу // Материалы Международной научной конференции «Значение научного наследия академика ВАСХНИЛ и Россельхозакадемии М.С.Дунина в современных работах ученых». - М. - 2011. - Т.4, Ч.1. - С.39-43.

Alexandra Orina

SPECIES COMPOSITION CAUSING EARLY BLIGHT OF SOLANACEOUS CROPS IN RUSSIA

Abstract of Ph.D. thesis. Scientific supervisor - Prof.
Dr. Mark Levitin

Early blight is a widespread economically important disease of solanaceous crops, caused by *Alternaria* fungi. In recent years the taxonomic revision of this fungal genus has been carried out and many new *Alternaria* species were described on plants of family Solanaceae. However precise detection of *Alternaria* species composition on solanaceous hosts in Russia hasn't yet been performed.

The aims of this study were the inventory of species composition causing early blight of solanaceous crops in Russia and assessment of diversity of *Alternaria* species on morphological characteristics, aggressiveness and molecular markers.

Almost 300 samples of solanaceous crops with early blight symptoms were collected in 2008-2010 in 22 regions of Russia. Six *Alternaria* species were revealed: four small-spored species *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. alternata*, *A. infectoria* and two large-spored species *A. solani* and *A. tomatophila*. Species *A. arborescens* and *A. tomatophila* were identified for the first time in Russia.

Morphological analysis showed that small-spored species differ only in sporulation habit. Characteristics of large-spored isolates varied widely that didn't allow to

divide them into discrete groups using traditional mycological methods.

Prevailing species *A. tenuissima* and *A. arborescens* occurred ubiquitously and amounted to 85% of studied isolates. Large-spored species *A. solani* and *A. tomatophila* were found only in 20% of samples and their rate was 7% on potato and 14% on tomato. About 3% of isolates belonged to *A. alternata* and *A. infectoria*.

PCR primers AslR/AslF have been designed to be used for detection of *A. solani* and *A. tomatophila* in infected potato and tomato leaves.

Using molecular methods such as UP-PCR and RAPD-PCR large-spored isolates were divided into two clusters one of which included *A. solani* isolates and another one consisted of *A. tomatophila* isolates. We suggest a hypothesis that *A. tomatophila* was descended from individual clones of *A. solani* by specialization to parasitism on tomato.

Evaluation of pathogenicity showed that *A. solani* isolates were equally aggressive for potato as well as for tomato. *A. tomatophila* isolates pathogenic for both crops were more aggressive to tomato. Small-spored *Alternaria* species are facultative parasites and aren't able to infect potato and tomato alone under normal conditions.

It was found that *A. tenuissima* when coinfect with *A. solani* can increase size of necroses on tomato leaf discs as twice as necroses induced by *A. solani* alone. Coinfection is accompanied by intensive sporulation of *A. tenuissima*. Such synergism can explain wide distribution of small-spored *Alternaria* species on solanaceous crops.

Научное издание. RIZO-печать
ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ
Лицензия ПЛД № 69-253. Подписано к печати 12 мая 2011 г., тир. 100 экз.