

УДК 635.21:631.524.86:631.527.8

Д. В. Башко, научный сотрудник

В. А. Козлов, доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
заведующий лабораторией генетики картофеля

А. В. Чашинский, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент,
ведущий научный сотрудник

Н. В. Русецкий, кандидат биологических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»,
аг. Самохваловичи, Минский район

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АЛЬТЕРНАРИОЗА КАРТОФЕЛЯ В БРЕСТСКОЙ И ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

РЕЗЮМЕ

*Представлены результаты изучения распространенности возбудителей альтернариоза картофеля в посадках Брестской и Гомельской областей на основе молекулярно-генетического скрининга с применением видоспецифичных ДНК-маркеров к *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria infectoria* и *Alternaria brassicae*.*

Ключевые слова: картофель; альтернариоз; ПЦР; ДНК-маркер; *Alternaria alternata*; *Alternaria solani*; *Alternaria infectoria*; *Alternaria brassicae*; Брестская и Гомельская области; Республика Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается изменение климата в сторону потепления. В теплое сухое лето с частыми кратковременными дождями или ночными росами отмечается активное распространение в посадках картофеля возбудителей альтернариоза. Болезнь вызывается грибами рода *Alternaria*, относящимися к формальной группе анаморфные грибы [1]. Н. М. Зотеева и др. [2] с картофелем ассоциируют виды *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Alternaria arborescens* E.G. Simmons, *Alternaria grandis* E.G. Simmons, *Alternaria protenta* E.G. Simmons, *Alternaria solani* Sorauer и *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire. Л. Ю. Кокаева и др. [3] выявили в пораженных тканях листьев картофеля вид *Alternaria infectoria*.

Первыми симптомами альтернариоза являются поражения листьев, которые сначала проявляются в виде коричневых пятен с характерными концентрическими кольцами, что в конечном итоге приводит к серьезной дефолиации и значительной потере урожая [4]. Пятна могут достигать крупных размеров (иногда до 2 см в диаметре) [5]. Постепенно пораженная ткань некротизируется, пятна разрастаются вдоль жилок листьев в форме язычков или подтеков. Здоровая ткань долей желтеет и отмирает. При сильном поражении в период пониженной влажности больные листья закручиваются в форме лодочки, дольками вверх [6]. Развивается заболевание с нижнего яруса листьев, подвергающихся поражению грибом, и затем поднимается на вышележащие ярусы листьев растения [7].

Конидиеносцы формируются ночью при наличии влаги, а конидии – на следующий день, в засушливых условиях, после солнечной инсоляции. Распространяются конидии ветром, а также брызгами дождя и при поливе. Минимальная температура для развития альтернариоза – 7 °С и влажность порядка 70 %. Оптимальная температура для эпифитотийного развития болезни составляет 22–30 °С, влажность – 90–100 %. Развитие спороношения может происходить при смене влажных и засушливых периодов [7].

Проникновение в ткани хозяина осуществляется либо путем проникновения в раны, проникновения гиф между границами эпидермальных клеток через апрессории, либо путем прямого проникновения в эпидермис с использованием ферментов, разрушающих клеточную стенку [4].

В Беларуси болезнь обнаруживается ежегодно. Степень развития альтернариоза определяется географическим положением района, почвенно-климатическими, погодными условиями и устойчивостью районированных сортов [8]. В последние годы в связи с потеплением климата наблюдается увеличение ареала и зон вредоносности альтернариоза как в Беларуси, так и за рубежом [9].

Вредоносность патогена проявляется в снижении урожая из-за уменьшения фотосинтетической поверхности листьев, в плесневении клубней и в загрязнении сельскохозяйственной продукции метаболитами гриба, которые могут являться фитотоксинами, микотоксинами, аллергенами или ферментами [1, 10]. Наиболее вредоносно заболевание при раннем появлении и высокой скорости развития в течение вегетационного периода [11]. В сельскохозяйственной продукции, зараженной видами *Alternaria*, может накапливаться значительное количество микотоксинов – грибных метаболитов, опасных для человека и животных. Конидии мелкоспоровых видов *Alternaria* – один из наиболее обильных аллергенов в воздухе на открытых пространствах и в помещениях. Споры *Alternaria* являются причиной аллергических реакций, ринитов и тяжелых обострений бронхиальной астмы, приводящих к смертельным исходам [5].

В среднем потери картофеля от альтернариоза составляют 20–30 %, однако при отсутствии химических обработок или в сочетании с другими болезнями могут достигать 70–80 % [2]. Альтернариоз может вызываться несколькими видами *Alternaria* на одном растении одновременно. Чаще всего они по симптомам неотличимы друг от друга и от некоторых других болезней. Поэтому зачастую при проведении мониторинга альтернариозов необходимо исследование в лабораторных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Молекулярный анализ проводили в 2024 г. Для скрининга использовали ДНК из растительного материала картофеля 37 образцов, отобранного в посадках Брестской и Гомельской областей.

Выделение геномной ДНК из листовой пластины картофеля осуществляли с помощью набора реагентов для колоночного выделения нуклеиновых кислот «АртСпин» фирмы «АртБиоТех» (Республика Беларусь) согласно протоколу производителя с незначительными модификациями [12].

ПЦР-реакции проводили на амплификаторах Veriti (Applied Biosystems, США) и Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США). Визуализацию продуктов амплификации осуществляли разделением в 2 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с последующей регистрацией результатов с помощью оборудования системы геледокументирования DOC-PRINT-VX2 (Германия) в ультрафиолетовом свете.

При приготовлении реакционной смеси объемом 25 мкл использовали готовую смесь для ПЦР-анализа Quick-load Taq 2X Master Mix (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь), соответствующие праймеры (прямой и обратный), матрицу ДНК и деионизированную воду в количестве, необходимом до конечного объема смеси. В состав Quick-load Taq 2X Master Mix входят все необходимые компоненты ПЦР: ДНК-полимераза, dNTPs, Mg²⁺ и реакционный буфер, а также красители для непосредственного нанесения реакционной смеси на гель при проведении электрофоретического анализа [13]. В работе применяли 7 пар видоспецифичных ДНК-маркеров. Протоколы амплификации и последовательность нуклеотидов в праймерах использовали из литературных источников, представленных в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведенный нами молекулярно-генетический анализ ДНК, выделенной из листьев картофеля, позволил установить наличие возбудителей альтернариоза *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria infectoria* и *Alternaria brassicae* с различной частотой встречаемости (табл. 2).

Alternaria infectoria была обнаружена у 97 % образцов и показала наибольшую частоту встречаемости.

Специфичные для *Alternaria alternata* участки ДНК были отмечены в двух исследованных областях. Они присутствовали у 93 % изученных образцов листьев.

Видоспецифичные маркеры к виду *Alternaria brassicae* присутствовали в 84 % отобранных образцов. Наши предположения по высокому проценту распространения на картофеле вида *A. brassicae*, паразитирующего на крестоцветных растениях, основаны на том, что частым предшественником картофеля является рапс. Мицелий, конидии, хламидоспоры альтернариоза зимуют в почве, в отмерших листьях, а также на семенах, которые могут сохраняться в почве и растительных остатках до двух лет и при благоприятных погодных условиях заражать картофель.

Крупноспоровый вид *Alternaria solani* выявлен у 16 % образцов и не был обнаружен в пробах, отобранных в Брестской области. Также видоспецифичный маркер к виду *A. solani* не выявлен в образцах из Гомельского, Жлобинского, Добрушского и Речицкого районов Гомельской области. Необходимо отметить, что, по данным В. Г. Иванюка и др. [8], в XX в. наибольшее распространение в Республике Беларусь имел именно вид *A. solani*, но в последнее время в связи с изменением климата наблюдается тенденция его снижения в видовом составе патогена, что и подтверждается нашими исследованиями.

Три исследуемых образца (Рогачевский район – 2 и Житковичский район – 1) отмечаются наличием 7 видоспецифичных ДНК-маркеров, использованных в работе.

Из 18 проб, отобранных в Брестской области, комплексы *A. alternata* + *A. brassicae* и *A. alternata* + *A. infectoria* отмечены у 15 образцов, а комплекс *A. brassicae* + *A. infectoria* – у 14 образцов. Совместное присутствие 3 видов *A. alternata* + *A. brassicae* + *A. infectoria* обнаружено у 13 проб.

В Гомельской области было отобрано 19 образцов с симптомами альтернариоза. Комплекс *A. alternata* + *A. solani* идентифицировали у 6 образцов, а *A. alternata* + *A. brassicae* и *A. brassicae* + *A. infectoria* – в 16 пробах. Наличие *A. alternata* + *A. infectoria* выявлено во всех исследуемых образцах. Совместное присутствие 3 видов *A. alternata* + *A. brassicae* + *A. infectoria* обнаружено в 16 пробах. Пять образцов характеризуются наличием совместного присутствия 4 видов *A. alternata* + *A. solani* + *A. brassicae* + *A. infectoria*.

Таблица 1 – Характеристика ДНК-маркеров для амплификации участков генома *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria infectoria* и *Alternaria brassicae*

Праймер	Последовательность (5'–3')	Специфичность	Размер целевого ампликона, п. н.	Условия отжига праймеров	Литературный источник
AAF2 AAR3	TGC AAT CAG CGT CAG TAA CAA AT	<i>A. alternata</i>	340	65 °C, 40 с	
	ATG GAT GCT AGA CCT TTG CTG AT				
Ain3F Ain4R	CTC GAT GTC CGC CTC AGT AG	<i>A. infectoria</i>	327	60 °C, 40 с	Ф. Б. Ганибал [5]
	GAG GAT AGC ACG GCT GGT AG				
ABCsens F ABCrev R	CTG GTG AAA AGG TTG CGA TCG T	<i>A. brassicae</i>	780	60 °C, 40 с	
	GTG ACT TTC ATG AAA TGA CAT TGA TG				
ABRE1 F ABRE3 R	AAG GCG AGT CTC CAG CAA ACT A	<i>A. brassicae</i>	366	60 °C, 40 с	
	TGA AAT CTC TCG AGA CGA CG				
ITS5 MR	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	<i>A. alternata</i>	505	50 °C, 40 с	
	GAC CTT TGC TGA TAG AGA GTG				
ITS5 SR	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	<i>A. solani</i>	460	56 °C, 40 с	Л. Ю. Кокаева и др. [3]
	CTT GGG GCT GGA AGA GAG CGC				
Inf. Pr Inf. Obr	GAC ACC CCC CGC TGG GGC ACT GC	<i>A. infectoria</i>	127	56 °C, 40 с	
	GGT TGG TCC TGA GGG CGG GCG A				

**РАЗДЕЛ 1. СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО
КАРТОФЕЛЯ И ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР**

Таблица 2 – Встречаемость видов возбудителей альтернариоза на листьях картофеля по результатам молекулярно-генетического анализа

Образец	<i>A. alternata</i>		<i>A. solani</i>	<i>A. brassicae</i>		<i>A. infectoria</i>		Количество положительных маркеров
	ITS5 MR	AAF2 AAR3	ITS5 SR	ABRE1 F ABRE3 R	ABCsens F ABCrev R	Inf. Pr Inf. Obr	Ain3F Ain4R	
1. Ивацевичский	+	+	–	+	+	+	+	6
2. Ивацевичский	+	+	–	+	–	+	+	5
3. Ивацевичский	+	+	–	+	+	+	+	6
4. Ивацевичский	+	+	–	+	+	+	+	6
5. Ивацевичский	+	+	–	+	–	+	+	5
6. Ивацевичский	+	+	–	+	+	+	+	6
7. Ивацевичский	+	+	–	+	–	+	+	5
8. Ивацевичский	+	–	–	+	–	+	+	4
9. Ивацевичский	–	–	–	–	–	+	–	1
10. Ивацевичский	+	+	–	+	–	+	+	5
11. Пружанский	+	+	–	+	–	+	+	5
12. Пружанский	+	+	–	–	–	+	+	4
13. Пружанский	+	+	–	+	–	+	+	5
14. Пружанский	+	+	–	+	+	+	+	6
15. Пружанский	–	–	–	–	–	+	–	1
16. Ивановский Д3	+	–	–	–	+	–	–	2
17. Ивановский Д6	+	+	–	–	+	+	+	5
18. Ивановский Д42	+	+	–	+	+	+	+	6
19. Жлобинский Д43	+	+	–	–	+	+	+	5
20. Жлобинский Д44	+	–	–	–	–	+	+	3
21. Добрушский Д45	+	+	–	+	+	+	+	6
22. Добрушский Д46	+	+	–	+	+	+	+	6
23. Добрушский Д47	+	+	–	+	–	+	+	5
24. Гомельский Д48	+	+	–	–	+	+	+	5
25. Рогачевский Д49	+	+	+	–	–	+	+	5
26. Рогачевский Д62	+	+	–	+	+	+	+	6
27. Рогачевский Д63	+	+	+	+	+	+	+	7
28. Рогачевский Д64	+	+	–	+	+	+	+	6
29. Рогачевский Д65	+	+	+	+	+	+	+	7
30. Житковичский Д50	+	+	–	+	+	+	+	6
31. Житковичский Д51	+	+	–	–	+	+	+	5
32. Житковичский Д57	+	+	+	+	+	+	+	7
33. Речицкий Д52	+	+	–	+	+	+	+	6
34. Речицкий Д53	+	+	–	+	+	+	+	6
35. Мозырский Д54	+	+	+	+	–	+	+	6
36. Мозырский Д55	+	+	+	+	–	+	+	6
37. Мозырский Д56	+	+	–	–	–	+	+	4
Частота встречаемости: маркера, количество	35	32	6	27	21	36	34	–
маркера, %	93	86	16	73	57	97	92	
вида, %	93		16	84		97		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате молекулярного скрининга установлено наличие возбудителей альтернариоза *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria infectoria* и *Alternaria brassicae* с различной частотой встречаемости на территории Гомельской области. На территории Брестской области также присутствовали все перечисленные возбудители болезни, за исключением *Alternaria solani*.

Наибольшую частоту встречаемости показал вид *Alternaria infectoria*, который выявлен у 97 % образцов. Специфичные для *Alternaria alternata* участки ДНК присутствовали у 93 % изученных образцов. Видоспецифичные маркеры к виду *Alternaria brassicae* идентифицировали в 84 % отобранных образцов. Крупноспоровый вид *Alternaria solani* выявлен у 16 % образцов из Гомельской области.

Список литературы

1. Кривченко, О. А. Биологическое обоснование применения новых средств для защиты картофеля от вредителей и болезней на Северо-Западе Российской Федерации : дис. ... канд. биол. наук : 06.01.07 / Кривченко Ольга Александровна ; Санкт-Петербургский гос. аграр. ун-т. – СПб., 2021. – 179 л.
2. Зотеева, Н. М. Устойчивость диких видов и гибридов картофеля к альтернариозу и фитофторозу / Н. М. Зотеева, В. В. Васипов, А. С. Орина // Вестник защиты растений. – 2020. – Т. 103. – Вып. 2. – С. 99–104.
3. Кокаева, Л. Ю. Распространение возбудителей альтернариоза картофеля и томата в Европейской части России / Л. Ю. Кокаева, А. Ф. Белосохов, С. Н. Еланский // Защита картофеля. – 2019. – № 1. – С. 9–13.
4. *Alternaria* diseases on potato and tomato / T. Schmey, C. S. Tominello-Ramirez, C. Brune, R. Stam // Molecular Plant Pathology. – 2024. – Vol. 25 (3). – DOI: 10.1111/mp.13435.
5. Ганнибал, Ф. Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria* : метод. пособие / Ф. Б. Ганнибал. – СПб. : ВНИИ защиты растений, 2011. – 71 с.
6. АГРОМОН: российская система для цифровизации агрономии : [сайт]. – URL: https://direct.farm/knowledge/plant/potato_disease_mycota/109 (дата обращения: 06.11.2024).
7. The Potato Crop / B. Adolf [et al.] ; ed.: H. Campos, O. Ortiz. – Cham : Springer Nature Switzerland AG, 2020. – P. 318–325.
8. Иванюк, В. Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В. Г. Иванюк, С. А. Банадысев, Г. К. Журомский. – Минск : Белпринт, 2005. – 696 с.
9. Смук, В. В. Изучение влияния минерального питания на развитие и вредоносность альтернариоза картофеля на Северо-Западе России / В. В. Смук, А. М. Шпанев // Агрохимический вестник. – 2020. – № 6. – С. 43–47.
10. Далинова, А. А. Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов (обзор) / А. А. Далинова, Д. Р. Салимова, А. О. Берестецкий // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – № 3. – С. 223–241.
11. Полевая оценка устойчивости разных сортов картофеля раннего к альтернариозу в условиях Центрального региона / Н. Ф. Денискина [и др.]. – М. : Изд-во РГАУ-МСХА, 2023. – С. 85–90.
12. АртБиоТех : [сайт]. – URL: <https://qpcr.by/reagenty-dlya-vydeleniya-artspin/> (дата обращения: 29.04.2024).

13. Праймтех : [сайт]. – URL: <http://primetech.by/instrukcii-po-ispolzovaniyu> (дата обращения: 29.04.2024).

Поступила в редакцию 12.12.2024 г.

D. V. BASHKO, V. A. KOZLOV, A. V. CHASHINSKIY,
N. V. RUSETSKIY

**STUDY OF THE DISTRIBUTION OF POTATO EARLY BLIGHT
PATHOGENS IN THE BREST AND GOMEL REGIONS USING
SPECIES-SPECIFIC DNA-MARKERS**

SUMMARY

The results of studying the distribution of potato early blight pathogens in plantings of the Brest and Gomel regions are presented, based on molecular-genetic screening using species-specific DNA-markers for Alternaria alternata, Alternaria solani, Alternaria infectoria, and Alternaria brassicae.

Key words: potato; early blight; PCR; DNA-marker; Alternaria alternata; Alternaria solani; Alternaria infectoria; Alternaria brassicae; Brest and Gomel regions; Republic of Belarus.