

## Альтернариозные пятнистости гуара

Е.Е. Радченко<sup>1</sup>✉, Р.А. Абдуллаев<sup>1</sup>, Н.В. Алпатьева<sup>1</sup>, О.В. Путина<sup>2</sup>, Е.Л. Гасич<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Крымская опытно-селекционная станция – Филиал Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Крымск, Россия

<sup>3</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: eugene\_radchenko@rambler.ru

Однолетняя бобовая культура гуар (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) перспективна для выращивания на юге России. В 2018 г. были проведены фитосанитарные обследования посевов гуара (13 коллекционных образцов) в пяти филиалах ВИР (Краснодарский край, Дагестан, Астраханская и Волгоградская области). Во всех пунктах на листьях гуара отмечено несколько типов листовых пятнистостей, среди которых преобладали симптомы поражения растений грибами рода *Alternaria* Nees. Видовой состав микромицетов идентифицировали с помощью микробиологических методов и высокопроизводительного секвенирования последовательности межгенного спейсера гена ядерной рибосомальной РНК (ITS2). Установлено, что грибы *Alternaria* spp. в различных эколого-географических условиях юга России вызывают два основных типа пятнистостей листьев: типичную (бежевые и бурые округлые пятна, обычно сопровождающиеся концентрической зональностью) и коричневую пятнистость (мелкие бурые выпуклые сливающиеся пятна). В большинстве случаев поражение тканей листа вызвано грибом *A. tenuissima* (Nees & T. Nees : Fr.) Wiltshire. Выявлена также сопутствующая микофлора (прежде всего, грибы рода *Fusarium* Link). Один из самых вредоносных патогенов гуара в странах, где сосредоточены основные посевные площади (Индия, Пакистан, США), – специализированный микромицет *A. cyamopsidis* Rangaswami & A.V. Rao на посевах в России не обнаружен. Образцы гуара различаются по степени поражения возбудителем альтернариоза *A. tenuissima*. Показано дифференциальное взаимодействие паразита и хозяина. Соответственно, для предотвращения эпифитотий следует выращивать сорта, защищенные нетождественными генами устойчивости. Во всех пунктах изучения слабо поразились альтернариозом образцы к-52568 (Аргентина) и к-52569 (Пакистан), ряд образцов был устойчив только в условиях одной или двух опытных станций. Изученные формы гетерогенны по устойчивости к патогену, что предоставляет возможность отбора резистентных к болезни линий из большей части коллекционных образцов. Так, в различных филиалах ВИР из образцов к-52571, к-52573 и к-52580 отобраны растения без симптомов поражения, собран семенной материал, который может быть использован для создания новых доноров устойчивости к болезни.

Ключевые слова: гуар; фитосанитарный мониторинг; альтернариоз; высокопроизводительное секвенирование (NGS); устойчивость; взаимодействие паразит–растение–хозяин.

**Для цитирования:** Радченко Е.Е., Абдуллаев Р.А., Алпатьева Н.В., Путина О.В., Гасич Е.Л. Альтернариозные пятнистости гуара. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(6):641-649. DOI 10.18699/VJ19.536

## Alternaria leaf blight of clusterbean

Е.Е. Radchenko<sup>1</sup>✉, R.A. Abdullaev<sup>1</sup>, N.V. Alpatieva<sup>1</sup>, O.V. Putina<sup>2</sup>, E.L. Gasich<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Krymsk Experiment Breeding Station – Branch of Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Krymsk, Russia

<sup>3</sup> All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

✉ e-mail: eugene\_radchenko@rambler.ru

The annual legume crop clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) is a promising crop for cultivation in the south of Russia. In 2018, phytosanitary examinations of clusterbean fields (13 collection accessions) were conducted in five VIR branches (Krasnodar Territory, Dagestan, Astrakhan and Volgograd Regions). At all points, several types of leaf spots were observed on clusterbean leaves and symptoms of plant damage by fungi of the genus *Alternaria* Nees prevailed. Using microbiological methods and Next-Generation Sequencing (NGS) of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer two (ITS2), the species composition of micromycetes was identified. It was found that the micromycetes *Alternaria* spp. in different ecological and geographical conditions of the south of Russia cause two main types of leaf spots: the typical (beige and brown round spots, usually accompanied by concentric zonality) and brown spot (small brown bulging merging spots). Overwhelmingly the damage to leaf tissues is caused by the fungus *A. tenuissima* (Nees & T. Nees : Fr.) Wiltshire. A quite numerous accompanying mycoflora (first of all, fungi of the genus *Fusarium* Link) was also detected. *A. cyamopsidis* Rangaswami & A.V. Rao, one of the most harmful guar pathogens in the countries where the main acreage is located (India, Pakistan, USA), was not found on clusterbean fields in Russia. The accessions of clusterbean differ in degree of damage by *A. tenuissima* that causes Alternaria leaf

blight. Differential interaction of parasite and plant host was revealed. Therefore, to prevent epiphytotic, varieties protected by non-identical resistance genes should be grown. At all VIR branches, accessions k-52568 (Argentina) and k-52569 (Pakistan) were weakly damaged by *Alternaria* leaf blight, and some accessions were resistant only in the environmental conditions of one or two experimental stations. The accessions studied were heterogeneous in pathogen resistance, which allows selecting disease-resistant lines from most of the collection accessions. Thus, in various VIR branches, plants without symptoms of disease were selected from accessions k-52571, k-52573 and k-52580, and seeds were collected to create new donors of disease resistance.

Key words: clusterbean; phytosanitary monitoring; *Alternaria* leaf blight; next-generation sequencing (NGS); resistance; parasite – host-plant interaction.

**For citation:** Radchenko E.E., Abdullaev R.A., Alpatieva N.V., Putina O.V., Gasich E.L. *Alternaria* leaf blight of clusterbean. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(6):641-649. DOI 10.18699/VJ19.536 (in Russian)

## Введение

Гуар *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. – новая для России однолетняя бобовая культура многоцелевого использования. Его используют в пищу и на корм скоту, однако наиболее ценный продукт переработки семян – гуаровая камедь, которую применяют в качестве стабилизатора консистенции, увеличивающего вязкость и желирующие свойства, в косметологии, пищевой, бумажной, текстильной, угольной и нефтебуровой промышленности (Pathak, 2015). Актуальность проблемы импортозамещения гуаровой камеди промышленного назначения обусловила необходимость изучения перспектив выращивания тропической культуры в условиях России.

Основные направления селекционно-генетических работ – улучшение продуктивности, качества и устойчивости к вредным организмам. Гуар характеризуется широкой вариацией морфологических признаков (Malaghan et al., 2013; Boghara et al., 2016), однако разнообразие возделываемых сортов по генам устойчивости к фитопатогенам невысоко (Kumar et al., 2017).

На гуаре питаются насекомые и клещи; выявлены многочисленные бактериальные, вирусные, грибные и нематодные заболевания, среди которых наиболее широко распространены и вредоносны бактериоз (возбудитель – *Xanthomonas axonopodis* pv. *cyamopsidis* (Patel) Vauterin) и альтернариозная пятнистость (возбудитель – *Alternaria cyamopsidis* Rangaswami & A.V. Rao) (Gandhi, Chand, 1985; Woudenberg et al., 2014). Повсеместному и быстрому распространению болезней способствует сохранение инфекции в семенах.

Всероссийским институтом генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) в 2017–2018 гг. организовано экологическое испытание коллекционных образцов гуара на юге России. В результате фитосанитарного обследования посевов в 2017 г. на Кубанской опытной станции ВИР (Гулькевичский район Краснодарского края), а также лабораторного анализа инфицированного растительного материала выявлены два наиболее распространенных заболевания: бактериоз и альтернариоз. Для бактериоза было характерно эпифитотийное развитие, отмечали массовое усыхание и даже гибель растений некоторых образцов. С помощью балловой шкалы была оценена степень поражения растений возбудителем заболевания и выделены устойчивые формы (к-52569, к-52575 и к-52580) (Радченко, Соколова, 2018).

В августе 2018 г. фитосанитарные обследования посевов гуара проведены в пяти южных филиалах ВИР. В от-

личие от предыдущего полевого сезона, в условиях повсеместной засухи обнаружены лишь единичные случаи поражения растений возбудителем бактериоза. Во всех пунктах на листьях гуара отмечено несколько типов листовых пятнистостей, среди которых преобладали симптомы поражения растений грибами рода *Alternaria* Nees (бежевые и бурые округлые пятна, часто с концентрической зональностью). В ряде случаев альтернариозные пятнистости напоминали солнечные ожоги, а также сопровождалась деформацией листьев. Наблюдали и «коричневую пятнистость» (мелкие бурые выпуклые пятна) неясной этиологии.

Цель настоящей работы – с помощью микологических и молекулярно-генетических методов идентифицировать видовой состав грибов рода *Alternaria* на гуаре и оценить степень поражения этими патогенами коллекционных образцов, испытываемых в различных эколого-географических условиях юга России.

## Материалы и методы

В 2018 г. были обследованы посевы экологического испытания 13 образцов гуара различного происхождения на Крымской опытно-селекционной (КОСС ВИР), Кубанской (КОС ВИР), Дагестанской (ДОС ВИР), Волгоградской (ВОС ВИР) и Астраханской (АОС ВИР) опытных станциях ВИР. Целесообразность промышленного возделывания гуара определяет, прежде всего, сумма эффективных температур воздуха выше 10°, которая должна составлять около 3400–3500 °С (Лебедь и др., 2017). Климатические условия южных филиалов ВИР вполне отвечают данному требованию. ДОС ВИР расположена в южной плоскостной зоне Дагестана у Каспийского моря, в 10 км от г. Дербента. Почвы каштановые, тяжелосуглинистые. Близость моря, искусственное орошение обуславливают постоянно высокую относительную влажность воздуха, которая в июле (средняя температура 24.9 °С), как правило, не ниже 67%. КОС ВИР расположена в степной части Прикубанской равнины. Почвенный покров представлен мощным предкавказским черноземом. Климат умеренно континентальный, с жарким летом. Среднегодовая температура воздуха 10.6 °С, среднемесячная температура июля 23.3 °С. Среднегодовое количество осадков составляет 545 мм, однако в разные годы колеблется от 400 до 770 мм. КОСС ВИР находится в г. Крымске, в западной части предгорной зоны Краснодарского края. Почвы – слитые и деградированные черноземы глинистого механического состава. Среднегодовая температура

воздуха 10.6 °С. Летом обычны засушливые периоды, которые прерываются ливнями. ВОС ВИР расположена на землях Волго-Ахтубинской поймы. Почвы – аллювиальные суглинки. Климат резко континентальный. Весна сухая, с быстрым нарастанием дневных температур и частыми ветрами. Лето сухое, знойное. В дельте Волги, недалеко от г. Астрахани находится АОС ВИР. Климат здесь самый континентальный и засушливый на всей европейской части России. Средняя многолетняя температура воздуха составляет 10.5 °С, среднесуточная температура июля – 25.6 °С.

Образцы высевали во второй половине мая на делянках длиной 3–3.5 м в двух повторностях. В 2018 г. на юге России повсеместно наблюдалась засуха, после посева вплоть до периода проведения фитосанитарного мониторинга (конец июля – начало августа) осадков практически не было. В условиях ДОС ВИР растения поливали дважды, на ВОС ВИР и АОС ВИР использовали систему капельного орошения растений. Для проведения лабораторной экспертизы пораженные листья собирали в бумажные пакеты, подсушивали и хранили в бытовом холодильнике.

На питомниках экологического испытания филиалов ВИР изучали перспективные для выращивания в России образцы гуара различного происхождения. В этот набор вошли местные образцы без названий из Аргентины (к-52568) и Пакистана (к-52569), отбор из пакистанского местного образца, сделанный в Крыму АО «Таврида» (к-52571), селекционные сорта из США Santa Cruz (к-52584), Kinman (к-52585) и Lewis (к-52586), индийские образцы, полученные из Ростовского университета (к-52580 и к-52581), сорта селекции КОС ВИР Вавиловский 130 (к-52572, отбор из к-52568), Кубанский (к-52573, отбор из к-52571), Кубанский юбилейный (к-52742, отбор из к-52581), сорта Вектор (к-52574) и Синус (к-52575).

Проведен микологический анализ образцов растений гуара с разными симптомами поражения фитопатогенами. Фрагменты пораженных тканей помещали в марлевые мешочки, промывали 2 ч под струей водопроводной воды, поверхностно дезинфицировали в течение 1 мин 0.1 % раствором нитрата серебра, промывали несколько раз стерильной водой со стрептомицином и раскладывали в чашки Петри на поверхность агаризованной картофельно-сахарозной среды. Чашки инкубировали в термостате при 24 °С в течение 7 сут, а затем при эритемном освещении. После появления мицелия на или вокруг растительной ткани его переносили на свежую питательную среду и получали колонии (изоляты) фитопатогенных грибов. После количественного учета видового разнообразия микромицетов выделяли группу грибов рода *Alternaria*.

Для идентификации грибов рода *Alternaria* по морфологическим признакам моноспорные изоляты выращивали на картофельно-морковной питательной среде при 24 °С и переменном освещении (16 ч свет : 8 ч темнота). Идентификацию изолятов осуществляли на 5–7-е сутки, просматривая спороношение на поверхности колоний под бинокляром, с использованием определителя (Simmons, 2007).

Грибы рода *Alternaria* в листьях гуара идентифицировали также с помощью высокопроизводительного секвенирования последовательности межгенного спейсера гена

ядерной рибосомальной РНК (ITS2). При этом был выбран вариабельный участок ядерного генома 5.8S rRNA – ITS2 – 28S rRNA, позволяющий, согласно литературным данным, дифференцировать виды *Alternaria* из секции *Porri*, к которой относится опасный специализированный патоген гуара *A. cyamopsidis*, от других представителей рода (Pavón et al., 2011; Woudenberg et al., 2013).

Анализировали листья гуара с различными типами пятнистостей, которые были собраны в пяти филиалах ВИР. Листья высушивали в естественных условиях и растирали в жидком азоте. ДНК выделяли из 10–20 пораженных листьев с помощью набора реактивов NucleoSpin Soil (MACHEREY-NAGEL, Германия) согласно инструкции производителя. Качество и концентрацию ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000C. Из листьев, собранных на ДОС ВИР, не удалось выделить ДНК удовлетворительного качества, поэтому образец был исключен из анализа.

В исследуемых образцах была проведена амплификация фрагментов рибосомальных оперонов грибов (ITS2) методом ПЦР с использованием праймеров *ITS1F/ITS2* (GCATCGATGAAGAACGCAGC/TCCTCCGCTTATTG ATATGC) (White et al., 1990). Секвенирование выполняли на платформе MiSeq с помощью набора реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (Illumina, США). Полученные последовательности обрабатывали с помощью программного пакета PIPITS для библиотек ITS (Gweon et al., 2015). Работу проводили с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Идентификацию организмов осуществляли с помощью информационно-поисковой системы BLAST базы данных GenBank NCBI путем поиска последовательностей по подобию (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Редкие сайты, замены в которых встречались в одной-пяти последовательностях, были исключены из анализа.

Во всех зонах изучения на гуаре наблюдали умеренное развитие альтернариозных пятнистостей. Поражение растений на естественном инфекционном фоне оценивали по шкале (Вишнякова и др., 2010): 1 – поражено до 10 % листовой поверхности (очень слабое); 2 – поражено 11–25 % (слабое); 3 – поражено 26–50 % (среднее); 4 – поражено 51–75 % (сильное); 5 – поражено 76–100 % (очень сильное).

На КОСС ВИР осматривали и оценивали по 15 растений каждого из тринадцати образцов, на ДОС ВИР и АОС ВИР – по 20, на ВОС ВИР – по 40 и на КОС ВИР – по 60 растений. Учет развития коричневой (предположительно альтернариозной) пятнистости выполняли на трех станциях: КОСС ВИР, АОС ВИР и ВОС ВИР. Учет степени поражения растений восьми образцов на КОСС ВИР с интервалом 10 дней продолжили до 20 сентября.

## Результаты

На листьях гуара выявлены различные пятнистости, в большинстве случаев без развитого спороношения (табл. 1). В образце из Астрахани на одном пятне отмечено очень скудное спороношение грибов рода *Ascochyta* Lib. На нескольких образцах обнаружен налет сапротрофных видов родов *Cladosporium* Link и *Alternaria*. Из пора-

**Table 1.** Micromycetes detected on clusterbean plants

Experimental station	Description of the sample	Micromycetes	
		detected by microscopic examination of herbarium material	isolated from damaged tissue
Dagestan Experimental Station of VIR	Bordered spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Infectoriae</i> , <i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i>
	Sunburn-like fringing spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> , <i>Trichoderma</i> sp.
	Small convex brown spots	–	<i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> , <i>Stemphylium</i> sp.
Kuban Experimental Station of VIR	Brown spots	<i>Alternaria</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> ( <i>A. tenuissima</i> )
	Small convex brown spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> ( <i>A. tenuissima</i> ), <i>Alternaria</i> sect. <i>Infectoriae</i>
	Large fringing brown spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium equiseti</i> , <i>F. acuminatum</i>
Krymsk Experimental and Breeding Station of VIR	Bordered spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium equiseti</i>
	Small convex brown spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> ( <i>A. tenuissima</i> ), <i>A. arborescens</i> , <i>Fusarium equiseti</i> , <i>Phoma</i> sp.
Astrakhan Experimental Station of VIR	Bordered and albescent spots	<i>Alternaria</i> sp., <i>Ascochyta</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp.
	Small convex brown spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> ( <i>A. tenuissima</i> ), <i>Alternaria</i> sect. <i>Infectoriae</i> , <i>Ulocladium</i> sp.
Volograd Experimental Station of VIR	Bordered spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium equiseti</i>
	Small convex brown spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> ( <i>A. tenuissima</i> ), <i>Fusarium equiseti</i>
	Rounded fawn spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> ( <i>A. tenuissima</i> ), <i>Fusarium equiseti</i>
	Fringing brown spots	–	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i> ( <i>A. tenuissima</i> ), <i>Ulocladium</i> sp., <i>Fusarium equiseti</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. acuminatum</i>

женных тканей листьев были выделены микромицеты, являющиеся в основном сапротрофами или слабыми патогенами: *Alternaria* sect. *Infectoriae*, *Alternaria* sect. *Alternaria* (*A. tenuissima* (Nees & T. Nees : Fr.) Wiltshire, *A. arborescens* E.G. Simmons, *Alternaria* sp.), *Stemphylium* sp., *Trichoderma* sp., *Ulocladium* sp., *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., *F. acuminatum* Ellis & Everh., *F. sporotrichioides* Sherb., *Phoma* sp., *Rhizopus* sp.

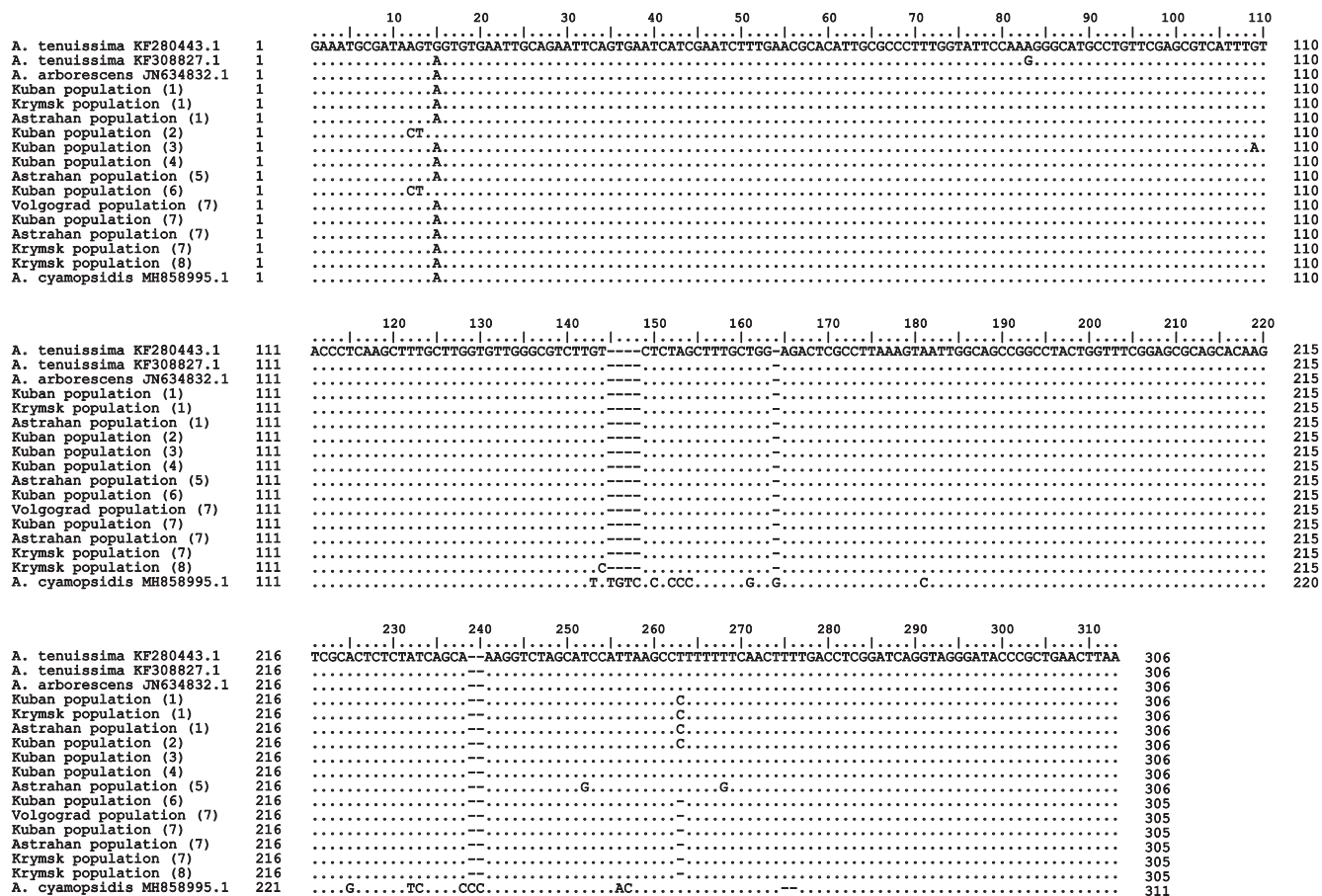
Следует особо отметить, что грибы рода *Alternaria* (преимущественно *A. tenuissima*) были обнаружены и доминировали во всех анализированных образцах, в том числе с нетипичным симптомом «коричневая пятнистость» (мелкие выпуклые бурые пятна). Так, при анализе 97 фрагментов пораженных тканей с типичными симптомами альтернариоза и краевыми пятнами типа солнечных ожогов выделено 89 изолятов микромицетов, среди которых 71 – грибы рода *Alternaria*, 16 – *Fusarium*, 1 – *Trichoderma*, 1 – *Ulocladium*. При экспертизе 62 фрагментов тканей с коричневой пятнистостью среди 43 выделенных колоний идентифицирован 31 изолят грибов рода *Alternaria*, 8 – *Fusarium*, 2 – *Phoma*, 1 – *Ulocladium*, 1 – *Stemphylium*.

С помощью микологической экспертизы из пораженных тканей листьев, собранных во всех филиалах ВИР, были выявлены лишь мелкоспоровые грибы *Alternaria*

и не найден крупноспоровый специализированный вид *A. cyamopsidis*. Этот патоген из секции *Porri* хорошо отличается от мелкоспоровых видов по морфологическим признакам, однако в силу случайных причин (например, слабая представленность в исследованных образцах) мог быть не детектирован.

С целью идентификации *A. cyamopsidis* проанализированы четыре ампликонные библиотеки фрагментов рибосомальных оперонов грибов (ITS2). В качестве матрицы использовали очищенный препарат суммарной ДНК, которая была выделена из пораженных листьев гуара, собранных на посевах четырех филиалов ВИР. Метод высокопроизводительного секвенирования (NGS – New Generation Sequences), в отличие от традиционного секвенирования по Сэнгеру, позволяет получить и проанализировать тысячи последовательностей и выявить варианты, представленные даже в следовых количествах. Известно, что SNP и делеции в исследуемом фрагменте дают возможность дифференцировать виды из секции *Porri* от других представителей рода *Alternaria* (Pavón et al., 2011; Woudenberg et al., 2013, 2014).

Для каждой из четырех проб ДНК было получено и проанализировано около 50000 нуклеотидных последовательностей. Доля *Alternaria* spp. достигала 53.6 % от общего числа выявленных организмов. Ни в одном из



**Fig. 1.** Sequence alignment of the *Alternaria* spp. nuclear rRNA intergenic spacer (ITS2) 5.8SrRNA – ITS2 – 28SrRNA. Kuban, Krymsk, Astrakhan, and Volgograd designate micromycetes revealed in leaf samples collected in VIR branches KES VIR, KEBS VIR, AES VIR, and VES VIR, respectively.

Genbank accessions KF280443.1 and KF308827.1 (*A. tenuissima*), JN634832.1 (*A. arborescens*) and MH858995.1 (*A. cyamopsis*) are chosen as reference sequences (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). 1–8: sequence variants found in the samples examined.

исследованных образцов не обнаружен специализированный патоген *A. cyamopsis*. Все найденные последовательности *Alternaria* spp. оказались на 98–100 % сходны с мелкоспоровыми видами *A. tenuissima* и *A. arborescens* из секции *Alternaria* (рис. 1).

Помимо *Alternaria* были обнаружены последовательности *Cladosporium* Link, *Toxicocladosporium* Crous & U. Braun, *Phoma* Saccardo, *Stemphylium* Wallr, *Botrytis* P. Micheli ex Pers, *Fusarium* Link, *Rachicladosporium* Crous, U. Braun & C.F. Hill, *Pyrenochaeta* De Not, *Sclerotogonospora* Höhn, *Chalara* Rabenh, *Phacidium* Fries, *Typhula* (Pers.) Fr. и *Peyronellaea* Goid. ex Togliani, emend. Aveskamp, Gruyter & Verkley, т. е. 13 родов, которые могут содержать слабопатогенные и сапротрофные грибы. Присутствие ДНК микромицетов разных типов связано с тем, что ДНК выделяли из суммарной навески 10–20 листьев, характеризующихся максимальным разнообразием типов листовых пятнистостей.

В пяти филиалах ВИР оценили пораженность 13 образцов гуара «типичной» альтернариозной пятнистостью. Образцы к-52568 (Аргентина) и к-52569 (Пакистан) характеризовались устойчивостью к альтернариозу во всех пунктах изучения (табл. 2). Остальные формы, про-

явившие устойчивость в одном или двух пунктах, оказались восприимчивы на других опытных станциях. Так, наиболее устойчивый на АОС ВИР образец к-52584 проявил резистентность и в условиях КОСС ВИР и ВОС ВИР, однако был восприимчив в Дагестане и на КОС ВИР.

Обнаружены различия между образцами и по устойчивости к коричневой альтернариозной пятнистости (табл. 3). В условиях КОСС ВИР наиболее высокий уровень резистентности выявлен у образца к-52568, который в средней степени поражался в Астрахани и Волгограде. Наиболее восприимчивыми во всех эколого-географических зонах оказались образцы гуара из США.

Динамика развития двух типов альтернариозных пятнистостей (рис. 2, а, б) различалась: наблюдали существенное усиление симптомов «типичной» альтернариозной пятнистости, незначительное и плавное – коричневой пятнистости. Тем не менее уровень поражения растений к концу сезона в обоих случаях оказался схож: 1.6–2.8 балла.

Результаты мониторинга степени поражения образцов гуара свидетельствуют о возможном дифференциальном взаимодействии генотипов возбудителей альтернариоза и растений. Для проверки этого предположения полученные

**Table 2.** Damage score of clusterbean accessions by typical *Alternaria* leaf blight in five VIR branches

VIR accession number	Name	Origin	Mean damage score				
			DES VIR	KES VIR	KEBS VIR	VES VIR	AES VIR
52568	No	Argentina	0.60 a*	0.73 abc	0.40 ab	1.20 b	0.65 bc
52569	No	Pakistan	0.65 ab	0.72 abc	0.67 ab	1.08 ab	0.80 cde
52571	No	Crimea	0.75 abc	0.87 bcd	0.80 b	2.08 e	0.80 cde
52572	Vavilovskiy 130	Krasnodar Kray	1.30 d	0.77 abcd	0.67 ab	1.60 cd	0.85 cde
52573	Kubanskiy		1.10 cd	0.63 a	0.67 ab	1.05 ab	0.95 de
52574	Vector		1.00 bcd	0.63 a	0.47 ab	1.43 c	0.95 de
52575	Sinus		0.80 abc	0.80 abcd	0.60 ab	1.00 ab	0.70 bcd
52580	No	Rostov oblast	1.00 bcd	0.72 abc	0.47 ab	1.45 c	0.90 cde
52581	No		1.05 cd	0.67 ab	0.33 a	1.08 ab	1.05 e
52584	Santa Cruz	United States	1.35 d	0.90 cd	0.47 ab	1.03 ab	0.30 a
52585	Kinman		1.25 d	0.97 d	0.40 ab	0.98 a	0.50 ab
52586	Lewis		1.30 d	0.83 abcd	0.47 ab	1.78 d	0.65 bc
52742	Kubanskiy Yubileynyy	Krasnodar Kray	1.05 cd	0.72 abc	0.53 ab	0.98 a	1.0 e

\* Here and below, the differences between the variants marked with identical letters within the columns are nonsignificant (Duncan's multiple range test,  $p < 0.05$ ).

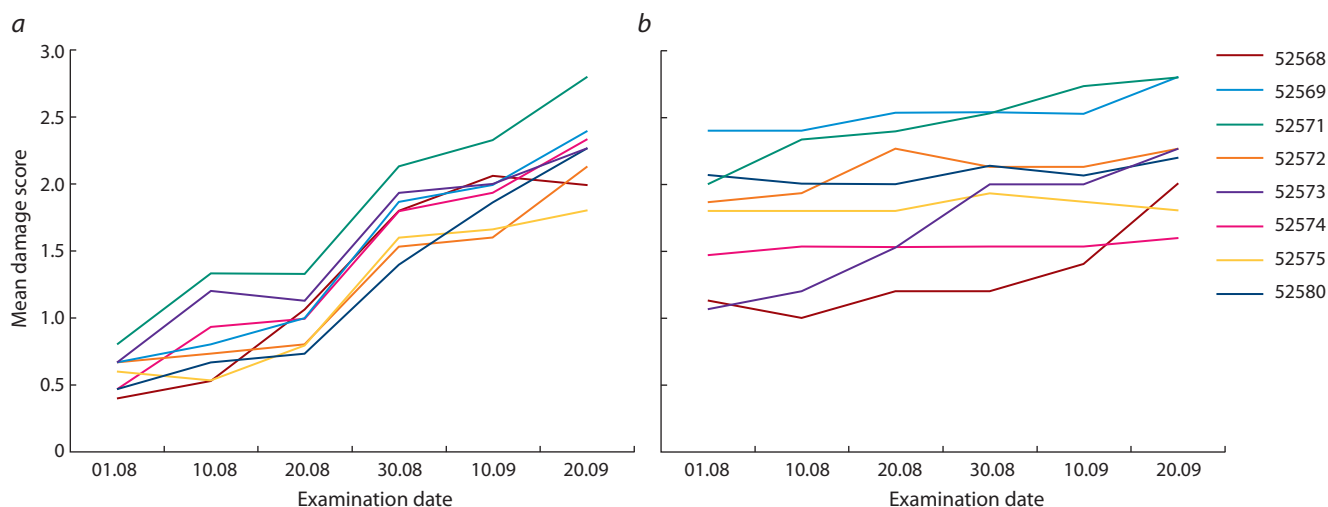
**Table 3.** Damage score of clusterbean accessions by brown *Alternaria* leaf blight in three VIR branches

VIR accession number	Name	Origin	Mean damage score		
			KEBS VIR	VES VIR	AES VIR
52568	No	Argentina	1.13 a	2.35 c	1.15 cde
52569	No	Pakistan	2.40 c	1.85 ab	1.40 ef
52571	No	Crimea	2.00 bc	1.75 ab	0.75 abc
52572	Vavilovskiy 130	Krasnodar Kray	1.87 bc	1.80 ab	1.25 def
52573	Kubanskiy		1.07 a	2.33 c	0.50 ab
52574	Vector		1.47 ab	2.90 e	1.70 f
52575	Sinus		1.80 bc	1.95 b	1.50 ef
52580	No	Rostov oblast	2.07 bc	2.65 de	0.40 a
52581	No		1.93 bc	2.28 c	1.10 cde
52584	Santa Cruz	United States	1.93 bc	2.75 e	0.90 bcd
52585	Kinman		2.47 c	2.50 cd	1.75 f
52586	Lewis		2.13 bc	2.88 e	2.50 g
52742	Kubanskiy Yubileynyy	Krasnodar Kray	2.00 bc	1.68 a	1.55 ef

данные были обработаны с помощью дисперсионного анализа. Анализировали двухфакторный комплекс: варьирование по генотипам патогенов (пять пунктов изучения) и по генотипам растений (13 образцов). Наиболее интересный результат дисперсионного анализа – дифференциальное взаимодействие генотипов растений и грибов (табл. 4). Дисперсия для взаимодействия в нашем случае в 5.41 раза превышает случайную. Попарное сравнение степени поражения образцов гуара в филиалах ВИР выявило аналогичные различия в четырех случаях из пяти:  $F_{\text{факт.}} = 3.76\text{--}13.86$ ,  $F_{0.5} = 1.78$ . Не различались по ви-

рулентности лишь патогены на КОС ВИР и КОСС ВИР ( $F_{\text{факт.}} = 1.32$ ,  $F_{0.5} = 1.78$ ).

Предположили также различия по вирулентности между грибами, которые вызывают коричневую альтернариозную пятнистость, в трех филиалах ВИР. В данном случае анализировали варьирование по генотипам растений (13 образцов) и по генотипам патогенов из трех пунктов изучения. Дисперсия для взаимодействия в 8.14 раза превышает случайную, что убедительно доказывает специфичность отношений паразит–растение–хозяин (табл. 5). Дифференциальное взаимодействие выявлено и при



**Fig. 2.** Dynamics of clusterbean accession damage by (a) typical and (b) brown *Alternaria* leaf blight in Krymsk.

**Table 4.** Analysis of variance for damage of clusterbean accessions by typical *Alternaria* leaf blight in five VIR branches

Variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Dispersion	F <sub>fakt</sub>	F <sub>0.5</sub>
In plant genotype	14.98	12	1.25	5.47	1.76
In pathogen genotype	59.88	4	14.97	65.62	2.38
In the interaction between plant and pathogen genotypes	59.29	48	1.24	5.41	1.37
Residual	207.60	910	0.23	–	–
Total	341.75	974	–	–	–

**Table 5.** Analysis of variance for damage of clusterbean accessions by brown *Alternaria* leaf blight in three VIR branches

Variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Dispersion	F <sub>fakt</sub>	F <sub>0.5</sub>
In plant genotype	56.59	12	4.72	9.77	1.77
In pathogen genotype	109.58	2	54.79	113.49	3.01
In the interaction between plant and pathogen genotypes	94.29	24	3.93	8.14	1.54
Residual	263.60	546	0.48	–	–
Total	524.06	584	–	–	–

попарном сравнении степени поражения образцов гуара в филиалах ВИР во всех анализировавшихся случаях ( $F_{\text{факт.}} = 4.47\text{--}12.14$ ,  $F_{0.5} = 1.78$ ).

### Обсуждение

На листьях гуара во всех пунктах изучения отмечено умеренное развитие пятнистостей. В большинстве случаев симптомы поражения были характерны для альтернариоза (округлые бежевые пятна с концентрической зональностью), выявлены случаи поражения растений грибами из родов *Ascochyta*, *Cladosporium* и др. Повсеместно была распространена «коричневая пятнистость» (мелкие выпуклые бурые сливающиеся пятна), у ряда образцов поражение достигало трех баллов (до 50 % площади листовой

поверхности). Результаты микологической экспертизы «проблемных» образцов листьев, собранных в филиалах ВИР, несколько неожиданно показали, что в основном поражение тканей листа обусловлено грибом *A. tenuissima* (см. табл. 1). Выявлена и сопутствующая микрофлора (прежде всего, грибы рода *Fusarium*), причем фитопатогенный ландшафт во всех зонах выращивания гуара весьма схож. В полевых условиях степень поражения растений коричневой пятнистостью в начале августа превышала пораженность гуара «типичным» альтернариозом, однако к концу сезона эти различия нивелировались.

Известно, что виды комплекса *A. alternata*, к которому относится и наиболее распространенный вид *A. tenuissima*, существуют в природе преимущественно как са-

протрофы и часто бессимптомно присутствуют в семенах растений. Однако иногда они вызывают сильные массовые заболевания различных растений, в том числе пшеницы, подсолнечника и др. Вероятно, такие заболевания связаны с определенным сочетанием погодных, эдафических и агротехнических факторов, снижающих иммунитет растений и благоприятствующих развитию патогенов (Ганнибал, 2011). Видимо, в нашем случае повсеместное развитие *A. tenuissima* было спровоцировано засушливыми условиями.

С помощью высокопроизводительного секвенирования, которое позволяет идентифицировать организмы, представленные даже в следовых количествах, удалось идентифицировать патогенные грибы, относящиеся к 14 родам. Все найденные последовательности *Alternaria* оказались на 98–100 % сходны с мелкоспоровыми видами *A. tenuissima* и *A. arborescens*. К сожалению, анализированный фрагмент ядерного генома 5.8SrRNA – ITS2 – 28SrRNA не позволяет дифференцировать эти виды.

Интересно, что последовательности крупноспорового вида *A. cyamopsidis* нами не обнаружены. В то же время имеются многочисленные публикации, где обсуждается взаимодействие гуара только с этим специализированным патогеном (Saharan et al., 2001; Joshi et al., 2004; Meena et al., 2012), вредоносность которого высока во всех зонах выращивания (Kumar, 2005; Woudenberg et al., 2014). Результаты нашей работы свидетельствуют об отсутствии этого патогена в России, однако можно ожидать заноса инфекции с интродуцируемым семенным материалом.

## Заключение

Эксперименты показали, что образцы гуара различаются по устойчивости к альтернариозным пятнистостям, причем эта устойчивость специфична. Это означает, что для предотвращения эпифитотий следует создавать сорта, защищенные разными генами устойчивости. Очевидно, выявленное нами дифференциальное взаимодействие с растением-хозяином характерно для доминировавшего вида *A. tenuissima*. В литературе есть сведения лишь о специфичности отношений гуара и возбудителя бактериоза *X. axonopodis* pv. *cyamopsidis* (Vijayanand et al., 1999; Kaur et al., 2005), однако дифференциальное взаимодействие гуара и *A. cyamopsidis* не обсуждается.

Образцы к-52568 (Аргентина) и к-52569 (Пакистан) характеризовались более или менее выраженной устойчивостью к альтернариозу во всех пунктах изучения. В условиях КОСС ВИР наиболее высоким уровнем резистентности к коричневой альтернариозной пятнистости отличался образец к-52568, который в средней степени поражен в Астрахани и Волгограде.

Практически все изученные формы гетерогенны по устойчивости к альтернариозу, и резистентные к болезни линии могут быть отобраны из большей части коллекционных образцов. Так, нами собраны семена растений образца к-52573, которые не имели симптомов поражения на КОС ВИР, АОС ВИР (к-52580) и ВОС ВИР (к-52571). Полученные линии будут испытаны на юге России. К сожалению, срок «полезной жизни» источников устойчивости ограничен в силу специфичности отношений паразит–хозяин. Необходимо вовлечение в селекцию

возможно большего числа генетически разнородных образцов и рациональное их использование.

## Список литературы / References

- Вишнякова М.А., Буравцева Т.В., Булынецов С.В., Бурляева М.О., Семенова Е.В., Сеферова И.В., Александрова Т.Г., Яньков И.И., Егорова Г.П., Герасимова Т.В., Другова Е.В. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение. Методические указания. СПб.: ВИР, 2010.
- [Vishnyakova M.A., Buravtseva T.V., Bulyntsev S.V., Burlayeva M.O., Semenova E.V., Seferova I.V., Aleksandrova T.G., Yankov I.I., Egorova G.P. Gerasimova T.V., Drugova E.V. The VIR Collection of Genetic Resources of Grain Legumes: Replenishment, Preservation, and Study Guidelines. St. Petersburg: VIR, 2010. (in Russian)]
- Ганнибал Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. СПб., 2011.
- [Gannibal Ph.B. Monitoring of Crop Infections by *Alternaria* and Identification of Fungi of the Genus. St. Petersburg, 2011. (in Russian)]
- Лебедь Д.В., Костенкова Е.В., Волошин М.И. Агротехническое обоснование размещения посевов *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) на юге европейской части России. Тавр. вестн. аграр. науки. 2017;1(9):53-64.
- [Lebed D.V., Kostenkova E.V., Voloshin M.I. Agronomic rationale for the growing of *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) in southern European Russia. Tavricheskiy Vestnik Agrarnoi Nauki = Taurida Herald of Agrarian Sciences. 2017;1(9):53-64. (in Russian)]
- Радченко Е.Е., Соколова Д.В. Устойчивость гуара *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Тауб. к вредным организмам. С.-х. биология. 2018; 53(5):897-906. DOI 10.15389/agrobiology.2018.5.897rus.
- [Radchenko E.E., Sokolova D.V. Resistance of guar *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. to harmful organisms. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2018;53(5):897-906. DOI 10.15389/agrobiology.2018.5.897eng. (in Russian)]
- Boghara M.C., Dhaduk H.L., Kumar S., Parekh M.J., Patel N.J., Sharma R. Genetic divergence, path analysis and molecular diversity analysis in cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub.). Ind. Crops Prod. 2016;89:468-477. DOI 10.1016/j.indcrop.2016.05.049.
- Gandhi S.K., Chand J.N. Yield losses in guar due to bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *cyamopsidis*. Indian Phytopathol. 1985;38:516-519.
- Gweon H.S., Oliver A., Taylor J., Booth T., Gibbs M., Read D.S., Griffiths R.I., Schonroge K. PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. Methods Ecol. Evol. 2015;6(7):973-980. DOI 10.1111/2041-210X.12399.
- Joshi U.N., Gupta P.P., Gupta V., Kumar S. Biochemical factors in cluster bean that impart *Alternaria* blight resistance. J. Mycol. Plant Pathol. 2004;34(2):581-583.
- Kaur B., Purkayastha S., Dilbaghi N., Chaudhury A. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *cyamopsidis*, the bacterial blight pathogen of cluster bean using PCR-based molecular markers. J. Phytopathol. 2005;153(7-8):470-479.
- Kumar D. Status and direction of arid legumes research in India. Indian J. Agric. Sci. 2005;75(7):375-391.
- Kumar S., Modi A.R., Parekh M.J., Mahla H.R., Sharma R., Fougat R.S., Yadav D., Yadav N.R., Patil G.B. Role of conventional and biotechnological approaches for genetic improvement of cluster bean. Ind. Crops Prod. 2017;97:639-648. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.01.008.
- Malaghan S.N., Madalageri M.B., Ganiger V.M., Bhuvaneshwari G., Kotikal Y.K., Patil H.B. Genetic variability and heritability in cluster bean [*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.] for vegetable pod



- yield and its component characters. *Int. J. Agric. Sci.* 2013;9(2): 765-768.
- Meena A.K., Godara S.L., Gangopadhyay S., Ram J. Changes in biochemical constituents in cluster bean due to *Alternaria cucumerina* var. *cyamopsidis*. *Ann. Plant Prot. Sci.* 2012;20(2):386-388.
- Pathak R. Clusterbean: Physiology, Genetics and Cultivation. Springer Science + Business Media Singapore, 2015. DOI 10.1007/978-981-287-907-3\_2.
- Pavón M.Á., González I., Rojas M., Pegels N., Martín R., García T. PCR detection of *Alternaria* spp. in processed foods, based on the internal transcribed spacer genetic marker. *J. Food Prot.* 2011;74(2): 240-247. DOI 10.4315/0362-028X.JFP-10-110.
- Saharan M.S., Saharan G.S., Gupta P.P., Joshi U.N. Phenolic compounds and oxidative enzymes in cluster bean leaves in relation to *Alternaria* blight severity. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica.* 2001;36(3/4):237-242.
- Simmons E.G. *Alternaria*. An identification manual. CBS Biodiversity Series 6. Utrecht, Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007.
- Vijayanand G.K., Shylaja M.D., Krishnappa M., Shetty H.S. An approach to obtain specific polyclonal antisera to *Xanthomonas campestris* pv. *cyamopsidis* and its potential application in indexing of infected seeds of guar. *J. Appl. Microbiol.* 1999;87(5):711-717.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Acad. Press, 1990;315-322.
- Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M., Crous P.W. *Alternaria* redefined. *Stud. Mycol.* 2013;75(1):171-212. DOI 10.3114/sim0015.
- Woudenberg J.H.C., Truter M., Groenewald J.Z., Crous P.W. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Stud. Mycol.* 2014;79:1-47. DOI 10.1016/j.simyco.2014.07.003.

---

#### ORCID ID

E.E. Radchenko [orcid.org/0000-0002-3019-0306](https://orcid.org/0000-0002-3019-0306)  
R.A. Abdullaev [orcid.org/0000-0003-1021-7951](https://orcid.org/0000-0003-1021-7951)  
N.V. Alpatieva [orcid.org/0000-0002-5531-2728](https://orcid.org/0000-0002-5531-2728)  
O.V. Putina [orcid.org/0000-0003-1013-7273](https://orcid.org/0000-0003-1013-7273)  
E.L. Gasich [orcid.org/0000-0002-3342-6775](https://orcid.org/0000-0002-3342-6775)

**Acknowledgments.** This study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, project RFMEFI60417X0168, agreement 14.604.21.0168. The authors are grateful to Dr. A.S. Orina, Laboratory of Mycology and Plant Pathology, All-Russia Institute of Plant Protection, for identification of *Alternaria* species.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received April 26, 2019. Revised July 15, 2019. Accepted July 16, 2019.