

УДК 577.2.08:632.4.01/.08+582.288

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA* СЕКЦИИ *ALTERNARIA* С ПОМОЩЬЮ ПЦР

Ф.Б. Ганнибал¹, Д.А. Новичкова²

¹Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

²Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина

Мелкоспоровые виды *Alternaria* – широко распространённая группа грибов. Около 60 видов из этой группы недавно были объединены в секцию *Alternaria* рода *Alternaria*. В сельскохозяйственной продукции, например, в зерне, заражённом этими видами, могут накапливаться значительные количества микотоксинов. Для более результативного изучения биологических различий и хозяйственной значимости видов *Alternaria* секции *Alternaria* необходимо разрабатывать молекулярные методы идентификации, по точности и надёжности превосходящие традиционные. Нами сконструировано пять пар праймеров, из которых три пары показали удовлетворительную или высокую специфичность к трём группам видов *Alternaria*. Для разделения штаммов *Alternaria* двух групп *A. alternata/A. tenuissima* и *A. arborescens* возможно использование ПЦР с праймерами AAT-F/AAT-R и Aarb-F2/AltATP-R в форматах «multiplex» и «touchdown». Надёжность проведенной таким образом идентификации составила около 84%. Дополнительно для идентификации более редкого вида *A. longipes* можно использовать ПЦР с праймерами Alon-F/Alon-R, специфичность которой несколько ниже.

Среди 34 изолятов с зерновых культур из России в результате совместного применения традиционных микологических методов и разработанных нами методик, основанных на ПЦР, были идентифицированы изоляты трёх видов *Alternaria* из секции *Alternaria*: *A. tenuissima*, *A. arborescens* и *A. alternata*. Девять изолятов с томата были отнесены к *A. tenuissima* и *A. alternata*.

Ключевые слова: токсигенные грибы, праймеры, молекулярная диагностика, зерновые культуры, томат, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. longipes*.

Одной из наиболее распространённых групп микромицетов являются грибы рода *Alternaria*. Чаще других встречаются так называемые мелкоспоровые виды, нередко обозначаемые одним очень широко понимаемым названием *A. alternata*. Недавно эти виды были объединены в секции *Alternaria* и *Infectoria* [Lawrence et al., 2013; Woudenberg et al., 2013]. Заражение семян растений грибами *Alternaria* из данных секций, особенно в тех случаях, когда семена не окружены толстой оболочкой, например, сочным околоплодником, является весьма обычным. Наиболее часто обнаруживается присутствие *Alternaria* в семенах злаков, крестоцветных, зонтичных растений, подсолнечника, льна и др. [Ганнибал, 2011].

Столь же распространено поражение мелкоспоровыми видами *Alternaria* листьев растений, особенно старых или повреждённых. Например, эти грибы часто вызывают поражение листьев паслёновых культур – томата и картофеля [Орина и др., 2010].

Серьёзное снижение урожая мелкоспоровые виды *Alternaria* вызывают редко. Ущерб от жизнедеятельности этих грибов может заключаться в плесневении и гниении семян, плодов и корнеплодов. В сельскохозяйственной продукции, зараженной этими видами *Alternaria*, могут накапливаться значительные количества микотоксинов – грибных метаболитов, опасных для человека и животных. Токсичность метаболитов видов *Alternaria* для различных организмов, включая растения, бактерии, птиц и млекопитающих, показана целым рядом исследователей [Stack, Prival, 1986; Visconti, Sibilia, 1994; Yekeler et al., 2001 и др.].

В секцию *Alternaria* включено около 60 видов [Gannibal, in press]. Значительно чаще других встречается *A. tenuissima*, реже, но также повсеместно, выявляются *A. alternata* и *A. arborescens* [Pryor, Michailides, 2002; Serdani et al., 2002; Kosiak et al., 2004]. Из-за значительного морфологического сходства и в то же время нестабильности признаков опирающаяся на морфологию систематика *Alternaria* секции

Alternaria считается спорной, а идентификация весьма проблематичной [Gannibal, in press]. Молекулярно-филогенетическими методами границы видов в секции *Alternaria* чётко не были установлены [Andrew et al., 2009]. Тем не менее, на филогенетических деревьях просматриваются несколько клад (филогенетических групп), состоящих из нескольких морфологических видов каждая [Lawrence et al., 2013; Woudenberg et al., 2013]. На эти клады в настоящий момент целесообразно ориентироваться при проведении молекулярно-генетических исследований.

Столь же неясным остаётся деление на виды в секции *Infectoria*. Очевидно противоречие между морфологическими и молекулярными маркерами [Gannibal, Yli-Mattila, 2007; Andersen et al., 2009].

Мелкоспоровые виды *Alternaria*, несмотря на сходство по морфологическим признакам и близость по одним экологическим свойствам, могут существенно отличаться по другим экологическим характеристикам, и токсигенности. Следствием этого является их разное практическое значение. Очевидно, что для дальнейшего изучения биологических и хозяйственных различий между видами *Alternaria*, а также проведения более информативного фитосанитарного мониторинга необходимо разрабатывать методы идентификации, по точности и надёжности превосходящие существующие.

Для определения представителей секции *Infectoria* можно использовать разработанную ранее методику, основанную на ПЦР [Gannibal, Yli-Mattila, 2007]. Для выявления и определения грибов из секции *Alternaria* таких методик не существует. Также имеет смысл проводить определение точнее, чем только до уровня секции у представителей последней секции ввиду большего распространения и большей их токсигенности. Поэтому целью данной работы стала разработка методик идентификации видов или групп видов *Alternaria* из секции *Alternaria* с помощью ПЦР.

Материалы и методы

В начале исследования были выбраны 6 генов, сиквенсы которых наиболее массово представлены в базе данных Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) и которые обладают наибольшей филогенетической информативностью [Lawrence et al., 2013; Woudenberg et al., 2013]. Таким образом, для анализа были отобраны последовательности шести генов 20 видов *Alternaria* секции *Alternaria*: гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (gpd), основного аллергена *A. alternata* (Alt a1), актина (act), АТФазы плазматической мембраны (PM ATPase), кальмодулина (cald) и бета-тубулина (β -tub). Список видов и учётные номера последовательностей указаны в таблице 1.

Поскольку из-за наличия большого количества близкородственных видов довольно сложно сконструировать праймеры с очень узкой специфичностью, были созданы праймеры, специфичные к группам видов. Целевые группы были определены по результатам анализа дендрограммы (данные не представлены), построенной для 20 видов *Alternaria*. Для построения дендрограммы предварительно загруженные из GenBank нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalX 1.8 [Thompson et al., 1997] и затем реконструировали фи-

логению с использованием метода ближайшего соседа (neighbor-joining – NJ; Saitou, Nei, 1987) и программного обеспечения TreeCon 3.1b [Van de Peer, De Wachter, 1994]. Надёжность топологии дендрограммы была оценена с помощью бутстреп-анализа с 1000 повторностей. Групп, включающих интересующие виды, было три (табл. 1). В число интересующих видов были включены наиболее часто встречающиеся *A. alternata* и *A. tenuissima* (группа 1), *A. arborescens* (5), а также вид *A. longipes* (6), который очень сходен с *A. tenuissima*, из-за чего его распространение может неверно оцениваться.

Праймеры конструировали при помощи онлайн-компьютерной программы Primer3Plus [Untergasser et al., 2007]. Специфичность каждой пары праймеров сначала определяли in silico, используя алгоритм primer-BLAST [Ye et al., 2012] на портале NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Последовательности первых трёх пар праймеров и их ключевые характеристики представлены в таблице 2.

Для первичного тестирования специфичности праймеров и подбора оптимальных условий амплификации была использована ДНК репрезентативных штаммов *A. alternata* (417-011, 495-011),

Таблица 1. Перечень видов *Alternaria* секции *Alternaria*, разбитых на группы в соответствии с их филогенией, и номера использованных нуклеотидных последовательностей из базы данных Genbank

Группа	Вид	Номера последовательностей					
		Gpd	Alt a1	Act	PM ATPase	Cald	β -tub
1	<i>A. alternata</i>	AY278808	AY563301	JQ671702	JQ671874	JQ646208	JQ672039
	<i>A. perangusta</i>	JQ646319	JQ646403	JQ671706	JQ671881	JQ646215	JQ672043
	<i>A. turkisafria</i>	JQ646320	JQ646404	JQ671707	JQ671882	JQ646216	JQ672044
	<i>A. tenuissima</i>	AY278809	AY563302	JQ671703	JQ671875	JQ646209	JQ672040
	<i>A. malvae</i>	JQ646314	JQ646397	JQ671696	JQ671878	JQ646212	JQ672033
	<i>A. nelumbii</i>	JQ646318	JQ646401	JQ671700	JQ671872	JQ646206	JQ672037
	<i>A. daucifolii</i>	KC584112	–	–	–	–	–
2	<i>A. citrimacularis</i>	JQ646323	JQ646407	JQ671710	JQ671885	JQ646219	–
	<i>A. limoniasperae</i>	AY562411	AY563306	JQ671704	JQ671879	JQ646213	JQ672041
3	<i>A. gaisen</i>	JQ646317	JQ646393	JQ671691	JQ671866	JQ646205	JQ672036
4	<i>A. rhadina</i>	JQ646316	JQ646399	JQ671698	JQ671870	JQ646204	JQ672035
5	<i>A. angustivoidea</i>	JQ646315	JQ646398	JQ671697	JQ671869	JQ646203	JQ672034
	<i>A. arborescens</i>	AY278810	AY563303	JQ671705	JQ671880	JQ646214	JQ672042
	<i>A. maritima</i>	JQ646307	JQ646390	JQ671687	JQ671862	JQ646196	JQ672024
	<i>A. cerealis</i>	JQ646321	JQ646405	JQ671708	JQ671883	JQ646217	JQ672045
6	<i>A. longipes</i>	AY278811	AY563304	JQ671689	JQ671864	JQ646198	JQ672026
	<i>A. tangelonis</i>	JQ646309	JQ646392	JQ671690	JQ671865	JQ646199	JQ672027
	<i>A. grisea</i>	JQ646310	JQ646393	JQ671691	JQ671866	JQ646200	JQ672028
	<i>A. grossulariae</i>	JQ646311	JQ646394	JQ671692	JQ671867	JQ646201	JQ672029
	<i>A. gossypina</i>	JQ646312	JQ646395	JQ671693	JQ671868	JQ646202	JQ672030

Примечание: полужирным шрифтом выделены виды и соответствующие им группы видов, нуждающиеся в молекулярной идентификации.

Таблица 2. Праймеры, предназначенные для специфической амплификации ДНК некоторых видов рода *Alternaria*

Объект	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Ген	Размер ожидаемого фрагмента, п.о.
<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i>	AAT-F	CCAAGGAGCTAGGTACCGTTATG	Cald	428
	AAT-R	CGTTGTCTGGTGTGATTAGCATTG		
<i>A. longipes</i>	Alon-F	TGCGCCCTTCGTACCAG	Cald	231
	Alon-R	AGCCTCCCGGATCATCTCA		
<i>A. arborescens</i>	Aarb-F2	CATGCACCTCAATCACATCG	PM ATPase	201
	AltAtp-R	CTGCAGAAGCGGGTAGTTTG		

A. tenuissima (494-011), *A. longipes* (334-011), *A. arborescens* (339-011), которыми располагает коллекция чистых культур ВИЗР. Для более тщательной проверки специфичности была поставлена ПЦР с ДНК 33 штаммов (преимущественно репрезентативных и типовых из коллекции E.G. Simmons, США) 30 видов, из которых 19 относились к секции *Alternaria* (табл. 3).

Экстракцию ДНК из мицелия грибов проводили по стандартному «ЦТАБ-хлороформ» протоколу [Doyle, Doyle, 1987]. Каждая реакционная смесь (25 мкл) содержала 0.5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Хеликон, Россия), буфер для Taq полимеразы с хлоридом аммония без солей магния (Хеликон, Россия), по 200 мкм трифосфатов каждого нуклеотида (dNTP), по 0.5 мкМ прямого и обратного праймеров (Евроген, Россия). Для повышения чувствительности и специфичности анализа были поставлены ПЦР с разными концентрациями ионов магния (Mg^{2+}) в ПЦР-пробе (1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5 мМ) и с разной концентраций

диметилсульфоксида – ДМСО (0; 5; 10%). Амплификацию проводили в термоциклере С-1000 (Bio-Rad, США). Продукты ПЦР были разделены при помощи электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием.

Для определения оптимальной температуры амплификацию проводили при следующих условиях: предденатурация – 95 °С в течение 2 минут; денатурация – 92 °С, 50 секунд; отжиг – от 53 °С до 72 °С, 40 секунд; элонгация – 72 °С, 30 секунд для праймеров AAT-F/AAT-R и 20 секунд для праймеров Aarb-F2/AltAtp-R и AlonF/AlonR) – 30 циклов; финальный синтез – 72 °С, 5 минут.

Эффективность разработанных ПЦР-тестов была опробована на ДНК 44 изолятов (табл. 4) преимущественно российского происхождения, выделенных из зерновых культур и томата и ранее идентифицированных по морфологии как *A. alternata*, *A. arborescens* и *A. tenuissima*.

Результаты

Сконструировано пять пар олигонуклеотидных праймеров, предположительно позволяющих проводить специфическую амплификацию ДНК наиболее часто встречающихся видов *Alternaria*. Из-за генетической близости мелкоспоровых видов *Alternaria* создать праймеры с исключительно узкой видовой специфичностью не оказалось возможным. Согласно Primer-BLAST праймеры должны были амплифицировать следующие группы ви-

дов: 1) *A. alternata*, *A. tenuissima* (*A. nelumbii*, *A. malvae*, *A. turkisafria*, *A. perangusta*); 2) *A. longipes* (*A. tangelonis*, *A. grisea*, *A. gossypina*, *A. grossulariae*, *A. dumosa*); 3) *A. arborescens* (*A. cerealis*, *A. maritima*); 4) *A. alternata* (*A. resedae*, *A. turkisafria*, *A. perangusta*, *A. destruens*); 5) *A. tenuissima*. В скобках указаны нецелевые объекты – редко встречающиеся виды *Alternaria*, ДНК которых также может быть амплифицирована с помощью приведенных

Таблица 3. Специфичность сконструированных праймеров для разных видов *Alternaria*

Номер штамма	Вид <i>Alternaria</i> (идентификация по морфологии)	Субстрат (растение-хозяин)	Происхождение	Результат амплификации с разными парами праймеров		
				AAT-F / AAT-R	Alon-F /Alon-R	Aarb-F2 / AltAtp-R
Секция <i>Alternaria</i> – типовые и репрезентативные штаммы, специфичность праймеров для которых показана in silico						
417-011*	<i>A. alternata</i>	бобовое	Индия	+	–	–
495-011*	– « –	арахис	Индия	+	–	–
494-011*	<i>A. tenuissima</i>	гвоздика	Англия	±	–	–
435-011*	<i>A. perangusta</i>	танжело	Турция	+	–	–
436-011*	<i>A. turkisafria</i>	танжело	Турция	±	–	–
334-011*	<i>A. longipes</i>	табак	США	+	+	–
423-011*	<i>A. tangelonis</i>	танжело	США	±!	+	–
434-011*	<i>A. dumosa</i>	танжело	Израиль	±!	–!	–
339-011*	<i>A. arborescens</i>	томат	США	–	–	+
Секция <i>Alternaria</i> – прочие типовые и репрезентативные штаммы						
419-011*	<i>A. pellucida</i>	?	?	+	–	–
433-011*	<i>A. interrupta</i>	танжело	Израиль	+	–	–
039-011**	Яблоневый патотип <i>A. alternata</i>	яблоня	Япония	++	–	–
040-011**	– « –	– « –	– « –	–	+	–
415-011*	<i>A. yaliinficiens</i>	груша Бредштейндера	Китай	+	±	–
429-011*	<i>A. citrimaculata</i>	лимон грубокожистый	США	±	±	–
421-011*	<i>A. limoniasperae</i>	– « –	– « –	–	±	–
422-011*	<i>A. citriarabustii</i>	мандарин	– « –	–	±	–
431-011*	<i>A. colombiana</i>	танжело	Колумбия	–	+	–
418-011*	<i>A. rhadina</i>	груша песчаная	Япония	–	–	+
496-011*	<i>A. mali</i>	яблоня	США	–	–	+
420-011*	<i>A. destruens</i>	повилика	–	–	–	–
426-011*	<i>A. toxicogenica</i>	мандарин	США	–	–	–
Секция <i>Brassicicola</i>						
055-011	<i>A. brassicicola</i>	капуста	Приморский край	–	–	–
Секция <i>Infectoria</i>						
491-011*	<i>A. tritricina</i>	пшеница	Индия	–	–	–
492-011*	<i>A. infectoria</i>	– « –	Англия	–	–	–
493-011*	<i>A. oregonensis</i>	– « –	США	–	–	–
Секция <i>Panax</i>						
071-021	<i>A. avenicola</i>	ячмень	Ленинградская обл.	–	–	–
499-011*	<i>A. eryngii</i>	синеголовник	Новая Зеландия	–	–	–
Секция <i>Porri</i>						
024-011	<i>A. simmonsii</i>	осот	Воронежская обл.	–	–	–
029-011	<i>A. cirsinoxia</i>	бодяк	Киргизия	–	–	–
043-011	<i>A. solani</i>	картофель	Приморский край	–	–	–
182-021	<i>A. dauci</i>	морковь	Московская обл.	–	–	–
Секция <i>Radicina</i>						
190-031	<i>A. radicina</i>	морковь	Беларусь	–	–	–

Примечания. *Штаммы из коллекции E.G. Simmons (США). **Штаммы 039-011(TU O-159) и 040-011 (NA-1) получены от А. Tanaka (Япония). Штаммы, не отмеченные звездочкой, получены авторами. Восклицательным знаком отмечены результаты, противоречащие предсказанным с помощью программы primer-BLAST.

праймеров. Четвёртая и пятая пары праймеров не подтвердили своей специфичности даже на ДНК типовых штаммов (данные не представлены) и не были включены в дальнейшие эксперименты.

Амплификация ДНК с помощью всех трёх пар праймеров проходила успешно в широком диапазоне температур. Оптимальной для отжига пары праймеров AAT-F/AAT-R оказалась температура 60–64 °С; для AlonF/AlonR – 60–64 °С, для Aarb-F2/AltAtp-R – 55–63 °С.

При постановке ПЦР с праймерами AAT-F/AAT-R и AlonF/AlonR не выявлено четких различий между результатами реакций с разными использованными концентра-

циями ионов магния. При проведении ПЦР с парой праймеров Aarb-F2/AltAtp-R при концентрации Mg^{2+} 2 мМ были получены удовлетворительные результаты. Несколько большая специфичность наблюдалась при повышении концентрации Mg^{2+} до 2.5–3.0 мМ. Наиболее высокая чувствительность реакции с участием любых пар праймеров отмечалась при проведении ПЦР без ДМСО.

Сходные регламенты проведения ПЦР с парами праймеров AAT-F/AAT-R и Aarb-F2/AltAtp-R, но при этом существенные различия по размеру целевого ампликона, дали возможность провести ПЦР в формате «multiplex». Для усиления специфичности анализа был также исполь-

Таблица 4. Результаты идентификации полученных авторами изолятов *Alternaria* с помощью ПЦР

Номер штамма	Субстрат (растение-хозяин)	Происхождение	Результат амплификации с разными парами праймеров		
			AAT-F /AAT-R	Alon-F /Alon-R	Aarb-F2 /AltAtp-R
<i>A. alternata</i>					
106-021	томат	Приморский край	+	–	–
106-031	– « –	– « –	+	–	–
148-011	пшеница	Индия	+	±	–
148-021	– « –	– « –	+	+	–
363-051	ячмень	Санкт–Петербург	±	–	–
393-051	рожь	Беларусь	+	–	–
547-031	пшеница	Приморский край	++	–	–
363-171	ячмень	Санкт–Петербург	±	–	+
363-211	– « –	– « –	–	–	+
452-041	пшеница	Ленинградская область	–	+	+
455-041	– « –	– « –	–	±	+
356-021	– « –	Китай	±	–	+
356-031	– « –	– « –	–	–	+
<i>A. arborescens</i>					
108-010	почва	Россия	–	–	+
157-011	ячмень	Иркутская область	+	+	±
158-011	– « –	– « –	–	–	+
336-011	пшеница	Краснодарский край	±	–	+
466-011	– « –	Ленинградская область	–	±	+
529-051	– « –	Северная Осетия	–	–	+
<i>A. tenuissima</i>					
109-011	томат	Приморский край	+	±	–
134-011	тритикале	Санкт–Петербург	±	±	–
134-021	– « –	– « –	±	±	–
138-011	томат	Хабаровский край	+	–	–
138-021	– « –	– « –	+	–	–
138-031	– « –	– « –	+	–	–
138-041	– « –	– « –	+	–	–
138-051	– « –	– « –	±	–	–
141-031	– « –	Киргизия	+	–	–
148-031	пшеница	Индия	–	+	–
148-041	– « –	– « –	–	±	–
362-021	ячмень	Санкт–Петербург	++	–	–
362-051	– « –	– « –	++	–	–
362-061	– « –	– « –	+	–	–
362-071	– « –	– « –	±	±	–
362-081	– « –	– « –	+	–	–
362-101	– « –	– « –	±	–	+
362-121	– « –	– « –	+	–	–
362-131	– « –	– « –	+	–	–
363-121	– « –	– « –	+	+	–
452-050	пшеница	Ленинградская область	+	–	–
455-011	– « –	– « –	+	–	–
455-020	– « –	– « –	+	–	–
478-031	– « –	Краснодарский край	±	–	–
480-011	– « –	Приморский край	±	–	–

зован формат «touchdown». Температура отжига в течение первых десяти циклах составляла 66.5 °С, 30 секунд в течение 10 циклов, затем – 64.5 °С на протяжении 30 циклов. В результате для шести образцов ДНК были получены фрагменты одного из двух ожидаемых размеров (рис.).

Результаты проверки специфичности разработанных методик представлены в табл. 3. Первая пара праймеров (AAT-F/AAT-R) позволяла амплифицировать ДНК большинства изолятов секции *Alternaria*. Помимо целевых видов (*A. alternata* и *A. tenuissima*) была успешно амплифицирована ДНК *A. turkisafria*, *A. perangusta* и ДНК нескольких

нецелевых видов и видов, про родственные отношения которых заранее не удалось получить информацию, анализируя базу данных Genbank. Причём синтез фрагмента ДНК у разных штаммов шёл с разной интенсивностью. Достаточно ярко окрашенные фрагменты наблюдались после амплификации ДНК репрезентативного штамма *A. longipes*, что несколько усложняет интерпретацию данных, полученных с помощью разработанных методик.

Вторая пара праймеров (Alon-F/Alon-R), разработанная для выявления *A. longipes*, позволяла получать ампликон нужного размера при амплификации ДНК *A. longipes*,

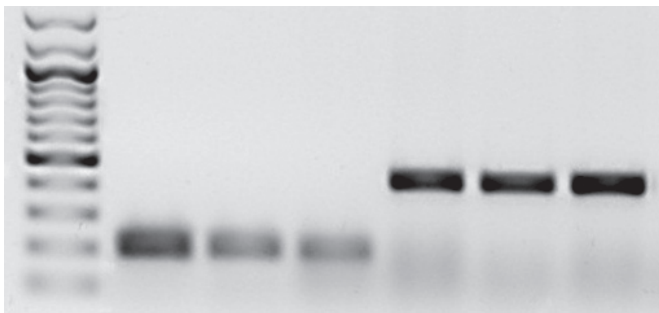


Рисунок. Результаты ПЦР с праймерами AAT-F/AAT-R и Aarb-F2/AltATP-R в формате «touchdown». Обозначения рядов: М – маркер молекулярной массы; 1 – *A. arborescens* 339-011, 2 и 3 – штаммы 356-021 и 356-031 предварительно идентифицированные как *A. alternata*, 4–6 штаммы 362-021, 362-051 и 362-061 предварительно идентифицированные как *A. tenuissima* (происхождение штаммов приведено в табл. 3 и 4) а также *A. tangelonis*, *A. colombiana* и одного из изолятов яблоневого патотипа *A. alternata*. Для ДНК *A. dumosa* был получен отрицательный результат, несмотря на наличие сайтов праймирования для данной пары праймеров. Слабая кросс-реакция наблюдалась при проведении ПЦР с ДНК четырёх других штаммов.

Третья пара праймеров (Aarb-F2/AltAtp-R), специфичная для *A. arborescens*, позволяла амплифицировать ДНК целевого вида, а также *A. rhadina* и *A. mali*.

Для разделения штаммов *Alternaria* двух групп *A. alternata/A. tenuissima* и *A. arborescens* возможно использование ПЦР с 2.5 мМ Mg²⁺ и с праймерами AAT-F/AAT-R и Aarb-F2/AltATP-R по следующей программе: 94 °С, 2 мин.; 92 °С 50 с; 66.5 и 64.5 °С, 30 с (10 и 30 циклов); 72 °С, 25 с; 72 °С, 5 мин. (размер целевых ампликонов 428, 201 п.о., соответственно). Надёжность проведенной таким образом идентификации составляла около 84%. Дополнительно для идентификации более редкого вида *A. longipes* можно использовать ПЦР с праймерами Alon-F/Alon-R (температура отжига 62 °С, целевой ампликон – 321 п.о.). Надёжность идентификации этого вида была ниже.

Не абсолютная специфичность сконструированных пар праймеров может объясняться генетическим полиморфизмом и отсутствием чётких видовых границ у этих клонально размножающихся грибов, а также, возможно, тем, что установленные параметры ПЦР являются субоптимальными.

Разработанные методики могут использоваться для выявления и идентификации мелкоспоровых видов *Alternaria* секции *Alternaria* в чистой культуре и во многих субстратах растительного происхождения. Область применения

ДНК всех 44 мелкоспоровых не типовых изолятов, полученных авторами, дала положительную реакцию с одной или несколькими парами праймеров (табл. 4). Тридцать один изолят был однозначно идентифицирован с помощью ПЦР. ДНК 13 изолятов (30%) амплифицировалась двумя, а в одном случае даже тремя парами праймеров. Однако чаще всего в таких случаях одна пара праймеров приводила к появлению небольшого количества продукта реакции. Только в 7 случаях (16%) для ДНК одного изолята по две пары праймеров приводили к получению ПЦР-продуктов в одинаковом количестве, что полностью исключало возможность предположения о видовой принадлежности. Чаще других двойственные результаты давало использование пары праймеров Alon-F/Alon-R, разработанной для выявления *A. longipes*.

Из 13 изолятов, предварительно идентифицированных по морфологии как *A. alternata* (филогенетически близки *A. tenuissima*, но образуют разветвлённые цепочки спор, как *A. arborescens*), после проведения ПЦР 6 были отнесены к группе *A. alternata/A. tenuissima*, 5 – к *A. arborescens*, а 2 определить не удалось. Из шести изолятов *A. arborescens* один не был идентифицирован, для остальных ранее сделанная идентификация была подтверждена. Среди 25 изолятов *A. tenuissima* 18 оказались определёнными верно. Для 4 были получены ПЦР-продукты, показывающие их равновероятную принадлежность как к *A. tenuissima/A. alternata* комплексу, так и к *A. longipes*. Два изолята были переопределены как *A. longipes*, а один – как *A. arborescens*.

Обсуждение

– в первую очередь научные исследования. Целесообразность использования методик для рутинной фитосанитарной диагностики должна быть оценена дополнительно.

С помощью разработанных методик проведено уточнение видовой принадлежности изолятов *Alternaria*, выделенных авторами из зерновых культур и томата. Для большинства изолятов *A. arborescens* и *A. tenuissima* видовая идентификация, сделанная по морфологическим признакам, была подтверждена при помощи ПЦР. В то же время около половины изолятов, ранее определённых как *A. alternata* (по наличию разветвлённых цепочек спор), были переопределены как *A. arborescens*. ДНК двух изолятов с пшеницы из Индии, взятых в эксперимент как *A. tenuissima*, амплифицировалась только с праймерами, специфичными к *A. longipes*.

Таким образом, в результате совместного применения традиционных микологических методов и ПЦР среди изолятов с зерновых культур из России были идентифицированы изоляты трёх видов *Alternaria* из секции *Alternaria*: *A. alternata*, *A. arborescens* и *A. tenuissima*. Изоляты с томата российского происхождения были отнесены к *A. alternata* и *A. tenuissima*.

IDENTIFICATION OF FUNGI OF THE GENUS *ALTERNARIA* SECT. *ALTERNARIA* USING PCR

Ph.B. Gannibal¹, D.A. Novichkova²

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²Pushkin Leningrad State University, St. Petersburg, Russia

Small-spored *Alternaria* species are very common group of fungi. Approximately 60 species from this group have been recently combined in the section *Alternaria*. These fungi are usually insignificant pathogens, but they can contaminate agricultural products with high amounts of mycotoxins. To study thoroughly biological and practical characters of fungi of *Alternaria* sect.

Alternaria, it is necessary to develop new molecular identification methods that can excel traditional mycological methods by reliability and accuracy. Five primer pairs have been designed; three of them have revealed satisfactory or good specificity for three groups of *Alternaria* species. To differentiate strains of two *Alternaria* groups, *A. alternata*/*A. tenuissima* and *A. arborescens*, PCR is proposed to use with 2.5 mM Mg²⁺ and primers AAT-F/AAT-R (CCAAGGAGCTAGGTACCGTTATG, CGTTGTCTGGTGTGATTAGCATTG, gene for calmodulin) and Aarb-F2/AltATP-R (CATGCACCTCAATCACATCG, CTGCAGAAGCGGGTAGTTTG, plasma membrane ATPase gene) using following program: 94 °C, 2 min.; 92 °C 50 s; 66.5 and 64.5 °C, 30 s (10 and 30 cycles); 72 °C, 25 s; 72 °C, 5 min. (expected amplicon size is 428 and 201 b.p., respectively). Reliability of identification carried out with the described multiplex touchdown PCR is approximately 84%. To identify more rare species *A. longipes*, PCR is used with primers Alon-F/Alon-R (TGCGCCCTTCGTACCAG, AGCCTCCCGATCATCTCA, gene for calmodulin; annealing temperature 62 °C, expected amplicon size 321 b.p.). Reliability of identification of the last species is lower. Using traditional mycological and newly developed PCR-based methods 44 small spored isolates have been identified from Russia. Isolates from cereals have been identified as *A. tenuissima*, *A. arborescens*, and *A. alternata*. Isolates from tomato have been attributed to *A. tenuissima* and *A. alternata*.

Keywords: toxigenic fungi; primers; molecular diagnostics; cereal crops; tomato; *A. alternata*; *A. tenuissima*; *A. arborescens*; *A. longipes*.

Библиографический список (References)

- Ганнибал Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. Методическое пособие. Под ред. Левитина М.М. СПб.: ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, 2011. 70 с.
- Орина А.С. Видовое разнообразие, биологические особенности и география грибов рода *Alternaria*, ассоциированных с растениями семейства Solanaceae / Орина А.С., Ганнибал Ф.Б., Левитин М.М. // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. Вып. 2. С. 150–159.
- Andersen B. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria* infectoria species-group / Andersen B., Sørensen E.L., Nielsen K.F., van den Ende B.G., de Hoog S. // Fungal Genetics and Biology. 2009. V. 46. P. 642–656.
- Andrew M. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex / Andrew M., Peever T.L., Pryor B.M. // Mycologia. 2009. V. 101. Iss. 1. P. 95–109.
- Doyle J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / Doyle J.J., Doyle J.L. // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11–15.
- Gannibal Ph.B. Morphological and UP-PCR analyses and design of a PCR assay for differentiation of *Alternaria* infectoria species-group / Gannibal Ph.B., Yli-Mattila T. // Mikologiya i Fitopatologiya. 2007. V. 41. Iss. 4. P. 313–322.
- Gannibal Ph.B. Distribution of *Alternaria* species among sections. 1. Section *Alternaria* // Mycotaxon. In press.
- Kosiak B. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality – a matched pair sample study / Kosiak B., Torp M., Skjerve E., Andersen B. // Int. J. Food Microbiol. 2004. V. 93. P. 51–62.
- Lawrence D.P. The Sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts / Lawrence D.P., Gannibal Ph.B., Peever T.L., Pryor B.M. // Mycologia. 2013. V. 105, N 3. P. 530–546.
- Pryor B.M. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio / Pryor B.M., Michailides T.J. // Phytopathology. 2002. V. 92. Iss. 4. P. 406–416.
- Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees Saitou N., Nei M. // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.
- Serdani M. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa / Serdani M., Kang J.-C., Andersen B., Crous P.W. // Mycol. Res. 2002. V. 106. Iss. 5. P. 561–569.
- Stack M.E. Mutagenicity of the *Alternaria* Metabolites Alternotoxins I, II, and III / Stack M.E., Prival M.J. // Appl. Environm. Microbiol. 1986. V. 52. Iss. 4. P. 718–722.
- Thompson J.D. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools / Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 24. P. 4876–4882.
- Untergasser A. : Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 / Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A.M. // Nucl. Acids Res. 2007. 35 (suppl. 2). P. W71–W74.
- Van de Peer Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Van de Peer Y., De Wachter R. // Comput. Applic. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.
- Visconti A. *Alternaria* toxins / Visconti A., Sibilina A. // In: Mycotoxins in grains, compounds other than aflatoxins. Eds J. D. Miller, H. L. Trenholm. St. Paul: Eagan Press, 1994. P. 315–336.
- Woudenberg J.H.C. *Alternaria* redefined / Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M., Crous P.W. // Studies in Mycology. 2013. V. 75. P. 171–212.
- Ye J. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. // BMC Bioinformatics. 2012. V. 13. P. 134.
- Yekeler H. Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy / Yekeler H., Bitmis K., Ozbek N., Doymaz M.Z., Calta M. // Toxicol. Pathol. 2001. V. 29. P. 492–497.

Translation of Russian References

- Gannibal F.B. Monitoring of alternarioses of crops and identification of fungi of the genus *Alternaria*. A manual. Ed. Levitin M.M. St. Petersburg: VIZR, 2011. 70 p. (In Russian).
- Orina A.S., Gannibal F.B., Levitin M.M. Specific diversity, biological characters and geography of *Alternaria* fungi associated with solanaceous plants. Mikologiya i Fitopatologiya. 2010. V. 44. Iss. 2. P. 150–159. (In Russian).

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация
*Ганнибал Филипп Борисович. Зав. лабораторией, кандидат биологических наук, e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru
Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина, Петербургское шоссе, д.10, 196605, Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация
Новичкова Дарья Андреевна. Магистрант.

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation
*Gannibal Philipp Borisovich. Head of Laboratory, Ph.D. in Biology. e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru
Pushkin Leningrad State University, Peterburgskoe shosse, 16, 196605, St. Petersburg – Pushkin, Russia
Novichkova Darya Andreevna. Master student.

* Ответственный за переписку

* Responsible for correspondence