

УДК 582.288.43 : 634.11

© Ф. Б. Ганнибал, И. В. Бильдер, Т. Ули-Маттила

ВИДЫ РОДА *ALTERNARIA* НА ЯБЛОНЕGANNIBAL Ph. B., BILDER I. V., YLI-MATTILA T. SPECIES OF THE GENUS
ALTERNARIA ON APPLE TREES

Грибы рода *Alternaria* на яблоне вызывают листовую пятнистость (leaf blotch), гниль поверхности плодов (cork rot) и сердцевинную гниль (core rot). Широкое распространение альтернариоза листьев яблони было отмечено в Японии (Sawamura, 1962), США (Taylor, 1966; Kuss, Hamish, 1972; Filajadic, Sutton, 1991), Югославии (Bulajic et al., 1996), Корею (Uhm, 2004), на территории бывшего СССР, особенно на юге европейской части России (Гагкаева, Левитин, 2000) и в других странах. В США (Tweedy, Powell, 1962) и ЮАР (Serdani et al., 2002) зафиксировано массовое появление сердцевинной гнили яблок. При поражении листьев виды *Alternaria* способны снижать количество урожая, а возбудители гнили плодов представляют опасность как продуценты токсичных для человека метаболитов (Stinson et al., 1981). Известны случаи обнаружения в яблоках и яблочном соке таких токсинов *Alternaria*, как альтернариол и монометилвый эфир альтернариола (Delgado et al., 1998).

Запутанность систематики рода *Alternaria* неоднократно побуждала исследователей проводить таксономические и номенклатурные ревизии, которые коснулись и возбудителей альтернариоза яблони (Roberts, 1914, 1924; Simmons, Kusaba, Tsuge, 1994, 1995, 1997, 1999). За изменениями, происходившими в таксономии рода, следовали реидентификации комплексов видов, встречающихся на яблоне (Tweedy, Powell, 1962; Filajadic, Sutton, 1991; Гагкаева, Левитин, 2000; Serdani et al., 2002).

В качестве патогенов яблони в литературе упоминается не менее девяти видов *Alternaria*. В контексте данной статьи наиболее интересны два названия, используемые чаще других, — *A. mali* Roberts и «яблоневого патотипа *A. alternata*». Иногда их считают синонимами, однако за этими двумя названиями стоят разные концепции вида. Вид *A. mali* был описан на плодах яблони в США (Roberts, 1914, 1924). Японскими исследователями, изучавшими агрессивные узко специализированные мелкоспоровые виды *Alternaria*, это название (*A. mali*) было использовано в отношении изолятов, способных к синтезу фитотоксинов, специфичных для некоторых сортов яблони (Kohmoto et al., 1974). Позже шесть мелкоспоровых видов рода, у которых был выявлен высокий уровень субстратной специализации, было предложено считать патотипами *A. alternata* и именовать согласно названиям их растений-хозяев (Nishimura, Kohmoto, 1983). Нововведение коснулось и *A. mali*, который стали называть «яблоневого патотипа *A. alternata*». Разделение на «сапротрофный» *A. alternata* и «патотипы» осуществляется в первую очередь на основе информации о субстрате изолята и наличия у гриба хозяинспецифического токсина (ХСТ). Для обоснования принадлежности «патотипов» виду *A. alternata* были использованы, данные физиологии, биохимии и молекулярной биологии, но мало внимания было уделено морфологической фактологии.

Концепция патотипов неоднократно подвергалась критике (Simmons, 1999; Roberts et al., 2000; Лёвкина, 2000). Сами адепты этого подхода также признали, что вид *A. alternata* в таком широком понимании, вероятно, является сборным (Kohmoto et al., 1995). Несмотря на это, использование «патотипов» активно продолжается и сейчас.

Недавно Симмонс (Simmons, 1999) повторно описал морфологию *A. mali* с использованием типового образца и штамма, выделенного из типового материала. При этом в качестве основного критерия для разделения видов использовались признаки, относящиеся к форме конидий и габитусу споруляции (three-dimensional sporulation pattern; Simmons, 1992; Simmons, Roberts, 1993). *A. mali* sensu Simmons был отнесен к видовой группе (комплекс видов, species-group) '*A. tenuissima*', объединяющей виды с длинными неветвящимися цепочками конидий. По мнению Симмонса, «настоящий» *A. mali* близок *A. tenuissima*, но отличается немного более длинными и узкими конидиями. Изучив несколько изолятов с яблони из Японии, Симмонс сделал заключение, что *A. mali*, как его обычно понимают фитопатологи, в первую очередь японские, представляет собой несколько видов, не тождественных ни *A. mali*, ни *A. alternata* sensu stricto (Simmons, 1999).

У изолятов *Alternaria* с яблони были детально изучены ХСТ — АМ-токсины I, II и III (Ueno et al., 1975a, 1975b). Был установлен ген, продукт которого участвует в катализе синтеза АМ-токсинов (Johnson et al., 2000a) и сконструированы праймеры для избирательной амплификации фрагментов ДНК, локализованных в этом гене (Johnson et al., 2000b), что позволяет проводить видоидентификацию с помощью ПЦР. Другим коллективом (Andersen et al., 2006) разработан альтернативный метод количественной ПЦР для выявления ДНК видов, имеющих ген АМ-токсина (АМТ), а также методика определения АМ-токсинов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ген АМТ расположен в минихромосоме, которая является необязательной (Johnson et al., 2001). Спонтанная утрата лабораторным штаммом этой хромосомы привела к потере способности грибом синтезировать АМ-токсины и вызывать характерные симптомы заболевания на яблоне. Однако штамм сохранил жизнеспособность и обладал всеми характеристиками «сапротрофного *A. alternata*», в связи с чем авторы предположили существование горизонтального переноса минихромосом у видов *Alternaria*, подкрепив свою догадку фактами подобного переноса, описанными у других видов несовершенных грибов. Если это предположение верно, то обнаружение гена АМТ и АМ-токсинов возможно у нескольких видов *Alternaria*. Также вероятно, что яблоневый патотип *A. alternata* — это какой-либо мелкоспоровый вид *Alternaria*, например *A. tenuissima*, имеющий одну дополнительную хромосому. В этом случае обозначение такой вариации, как патотипа, может оказаться оправданной.

Изоляты *Alternaria*, обладающие геном АМТ, были выделены из листьев, цветков и плодов яблони в Японии, США и Дании (Johnson et al., 2000b; Andersen et al., 2006). Андерсен с соавторами (Andersen et al., 2006) показала, что эти изоляты по морфологическим признакам не идентичны какому-либо виду *Alternaria*, но должны быть отнесены к той же видовой группе, что и *A. mali* — к '*A. tenuissima*'. Кроме АМ-токсинов, у данных изолятов были обнаружены неспецифические токсины, характерные для *A. tenuissima* и некоторых других близких ему видов.

Помимо *A. mali* и яблоневого патотипа *A. alternata* во флористических списках, составленных по результатам изучения микромицетов яблони, часто можно встретить вид *A. alternata* sensu lato. Поскольку данный таксон — сборный, его упоминание обычно является малоинформативным. Известно, что этот вид, понимаемый более узко (*A. alternata* sensu Simmons), по данным ряда исследователей (Simmons, 1993; Roberts et al., 2000; Ганнибал, 2004), встречается относительно редко. Достоверные факты обнаружения *A. alternata* sensu Simmons на яблоне отсутствуют, однако, учитывая широкую специализацию вида, можно предположить, что яблоня также входит в круг его растений-хозяев.

Итогом исследования сердцевинной гнили яблок в Южной Африке стало обнаружение представителей трех видовых групп: '*A. arborescens*', '*A. infectoria*' и '*A. tenu-*

issima' (Serdani et al., 2002). Все три группы широко распространены, многие виды, входящие в них, не имеют субстратной специализации и могут быть обнаружены помимо яблони на многих других растениях-хозяевах.

Также на яблоне было зарегистрировано несколько видов, названия которых не являются легитимным или таксономический статус которых неясен. К таким находкам можно отнести: *A. circinans* (Berk, et M. A. Curtis) P. C. Bolle (Мартирисян, Шамирханян, 1975), *A. grossulariae* Jacz. и *A. pomicola* A. S. Home (Ноте, 1920). Эпитет *A. tenuis* Nees, часто упоминавшийся в старой литературе, является синонимом *A. alternata* и обычно использовался для обозначения этого вида в его широком понимании. Еще два названия видов *Alternaria* с яблони, *A. pluriseptata* (P. Karst. et Nag.) Jorst и *A. solani* Sorauer (Raudoniene, Lagauskas, 2005), появились, вероятно, в результате ошибочной идентификации.

Таким образом, с уверенностью можно говорить о распространении на яблоне ряда неспециализированных полусапротрофных видов *Alternaria*, относящихся к трем видовым группам, '*A. arborescens*', '*A. infectoria*' и '*A. tenuissima*', а также приуроченного к некоторым сортам яблони токсигенного вида из комплекса '*A. tenuissima*', обычно обозначаемого как яблоневый патотип *A. alternata*, точная таксономическая принадлежность которого пока не ясна. Целью нашей работы являлась идентификация видов рода *Alternaria*, консортивно связанных с яблоней на юге европейской части России. Своевременность постановки цели продиктована частым обнаружением альтернариозной пятнистости на данной территории, а также накоплением данных по таксономии и генетике мелкоспоровых видов рода и появлением упомянутых выше молекулярных методов идентификации.

Материалы и методы

Для изоляции грибов в чистую культуру отрезки листьев промывали в проточной воде в течение одного часа. Затем их помещали в 0.1%-й водный раствор нитрата серебра на 1 мин. для стерилизации поверхности, трижды ополаскивали стерильной водой с 0.005 % стрептомицина и переносили в чашки Петри с картофельно-морковным агаром (КМА; Simmons, 1992). Всего в ходе изучения микобиоты листьев разных сортов яблони на юге европейской части России в 2001—2004 гг. было выделено 129 изолятов рода *Alternaria*. Большинство изолятов было получено из шести регионов России, которые перечислены в табл. 1. Кроме того, шесть изолятов были выделены из материала, полученного из Киргизии.

Таблица 1

Изоляты *Alternaria* spp., выделенные из листьев яблони на юге европейской части России

Год	Место сбора	Количество изолятов	
		<i>A. tenuissima</i>	Комплекс видов ' <i>A. infectoria</i> '
2001	Краснодарский край	20	3
	Белгородская обл.	1	2
2002	Краснодарский край	40	5
	Ростовская обл.	5	0
2004	Краснодарский край	29	1
	Воронежская обл.	5	3
	Орловская обл.	4	0
	Республика Северная Осетия—Алания	2	0
	Республика Адыгея	9	0
Всего		115(89.1%)	14(10.9%)

Идентификацию изолятов рода *Alternaria* проводили, используя описания и рекомендации Симмонса (Simmons, 1986, 1990, 1992, 1999). Для анализа микроморфологии изоляты культивировали на КМА под флуоресцентными лампами (ЛБ-20—4, длина волны 400—500 нм) при 25±2°C. На 5—10-е сутки органы спороношения протравивали под микроскопом (ЮОХ) непосредственно в чашках Петри.

Для тестирования фитотоксичности культуральной жидкости изоляты *Alternaria* культивировали в течение 2 недель в 12-миллилитровых пробирках, содержащих 5 мл жидкой среды Чапека с 1.5% сахарозы. Пробирки находились в наклонном состоянии в темноте при температуре 24°C. Из молодых листьев яблони сорта Антоновка пробочным сверлом вырезали диски 1 см в диам. Каждый изолят тестировали на 10 дисках, на которых предварительно иглой делали проколы. В центр диска наносили каплю (10 мкл) культуральной жидкости. Учет симптомов (диаметр некрозов) проводили через 3 суток после инокуляции. Опыт проводили в трех повторностях.

Семнадцать изолятов, показавших наибольшую токсигенность, далее были использованы для ПЦР со специфичными праймерами. Помимо этих изолятов в эксперимент было включено два штамма яблоневого патотипа *A. alternata* из Японии (O-159 и NA-1) и семь репрезентативных штаммов *Alternaria* из коллекции Симмонса (E. G. Simmons; номера штаммов имеют акроним EGS), в том числе штамм EGS 38—029 *A. mali*, выделенный из типового материала.

Экстракцию ДНК проводили согласно протоколам, предложенным С. А. Булатом с сотрудниками (Bulat et al., 1998), с некоторыми модификациями (Paavainen-Huhtala et al., 1999). Регламенты ПЦР с праймерами, специфичными для *A. alternata sensu lato* (AAF2/AAR3; Konstantinova et al., 2002) и для АМТ генов *A. mali sensu auct.* (LinFl/LinR; Johnson et al., 2000b), соответствовали рекомендациям авторов. В качестве контроля проводили ПЦР с праймерами, специфичными для ITS-областей рДНК грибов (ITS1/ITS4; White et al., 1990). Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1%-м агарозном геле, окрашенном бромидом этидия (0.2 мкг/мл), и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

подавляющее большинство изолятов с юга европейской части России было идентифицировано как *A. tenuissima*, и лишь около 11% изолятов мы отнесли к комплексу '*A. infectoria*' (табл. 1). Из шести киргизских изолятов три были идентифицированы как *A. tenuissima* и три — как представители группы '*A. infectoria*'.

Габитус споруляции штаммов яблоневого патотипа *A. alternata* (O-159, NA-1) был сходен с морфологией *A. tenuissima*. На 5-суточных колониях конидии располагались в простых, иногда слабоветвистых цепочках по 3—8 в ряд. В то же время различные изоляты *A. tenuissima* формировали простые, редко слабоветвистые цепочки, включающие от 5—8 до 8—12 конидий. Эти данные подтверждают мнение Андерсен с соавторами (Andersen et al., 2006) о том, что яблоневый патотип *A. alternata* относится к группе видов '*A. tenuissima*', но не имеет каких-либо характерных морфологических маркерных признаков.

Штаммы яблоневого патотипа *A. alternata* оказались умеренно токсигенными — диаметр некроза составил в среднем 1.5 мм. Культуральная жидкость штамма *A. mali* (EGS 38—029) не оказала выраженного фитотоксического действия на листовые диски яблони. Среди выделенных нами большинство изолятов *A. tenuissima* и все изоляты, относящиеся к группе '*A. infectoria*' оказались нетоксигенными или слаботоксигенными. Культуральная жидкость только 17 изолятов (все — *A. tenuissima*) из 129 вызывала появление на листовых дисках некрозов, средний диаметр которых превышал 1 мм (максимум 7.5 мм). В дальнейшем в геноме этих изолятов определяли присутствие гена АМТ.

ПЦР-продукты ожидаемого размера (около 500 п. н.) в результате амплификации с праймерами LinFl/LmR были получены только для ДНК штаммов яблоневого патотипа *A. alternata* (табл. 2). ДНК всех остальных изолятов, включая репрезентативный

Амплификация ДНК изолятов *Alternaria*, выделенных из листьев яблони, с праймерами различной специфичности

Вид	Комплексе видов	Номер штамма	Амплификация с различными праймерами		
			LinF1/LinR (<i>A. mali</i>)	AAF2/AAR3 (<i>A. alternata</i> s. l.)	ITS1/ITS4 (все грибы)
Яблоневый патотип <i>A. alternata</i>	' <i>A. tenuissima</i> '	0-159 и NA-1	+	+	+
<i>A. mali</i> sensu Simmons	То же	EGS 38—029	-	+	+
<i>A. tenuissima</i>	» »	EGS 34—015	-	+	+
	» »	17 штаммов, полученных авторами	-	+	+
<i>A. alternata</i>	' <i>A. alternata</i> '	EGS 34—016	-	+	+
<i>A. arborescens</i>	' <i>A. arborescens</i> '	EGS 39—128	-	+	+
<i>A. infectoria</i>	' <i>A. infectoria</i> '	EGS 27—193	-	-	+
<i>A. triticimaculans</i>	То же	EGS41—050	-	-	+
<i>A. triticina</i>	» »	EGS 17—061	-	-	+

штамм *A. mali*, не амплифицировалась данной парой праймеров. ПЦР с праймерами AAF2/AAR3 дала положительный результат с ДНК изолятов, относящихся к комплексам видов '*A. tenuissima*', '*A. alternata*' и '*A. arborescens*', и отрицательный — для видов группы '*A. infectoria*', что согласуется с ранее полученными данными (Gannibal, Yli-Mattila, 2005). Амплификация ДНК с праймерами ITS1/ITS4, использованная в качестве позитивного контроля, оказалась успешной для всех штаммов.

Таким образом, можно констатировать, что среди видов *Alternaria* на листьях яблони на юге европейской части России доминирует неспециализированный космополитный вид *A. tenuissima*. Этот гриб был описан на многих видах растений в разных частях света (Gannibal et al., 2007). По всей видимости, *A. tenuissima* чаще всего является вторичным патогеном либо вызывает заболевание ослабленных и поврежденных растений при благоприятных погодно-климатических условиях.

Представители комплекса '*A. infectoria*' — слабые патогены, что было показано при исследовании листовых пятнистостей фисташки (Pryor, Michailides, 2002). инокуляция плодов яблони изолятами '*A. infectoria*', выделенными из яблок, не приводила к образованию симптомов (Serdani et al., 2002). По мнению авторов, изоляты '*A. infectoria*' напоминали настоящих эндофитов.

Нами установлено, что *A. mali* sensu Simmons не несет в своем геноме ген АМТ и не способен к синтезу АМ-токсинов. Не были обнаружены и какие-либо другие молекулярные и морфологические маркеры, однозначно отличающие его от *A. tenuissima* (Peever et al., 2004). Незначительные отличия в морфологии конидий у видов *Alternaria* могут быть связаны с различной интенсивностью продуцирования некоторых метаболитов. Например, *A. radicina* Meier, Drechsler et Eddy и *A. carotiincultae* Simmons, поражающие одних и тех же хозяев, имеют небольшие отличия в морфологии конидий и культуральных свойствах. Более детальные исследования показали, что причина морфологических различий состоит только в разном уровне синтеза радицинина. *A. radicina* продуцирует этот токсин в больших количествах, чем *A. carotiincultae*. При искусственном добавлении радицинина в питательную среду морфологические и культуральные характеристики последнего вида становятся практически идентичны таковым *A. radicina* (Pryor, Gilbertson, 2002).

Основываясь на анализе литературы и результатах экспериментов, можно сделать следующие заключения.

Вид *A. mali* имеет законное название и подробное морфологическое описание. Однако достоверная информация о распространении *A. mali* (в его строгом понимании)

отсутствует. По своим экологическим свойствам, вероятнее всего, этот вид крайне близок сапротрофному виду *A. tenuissima*.

Таксономическая принадлежность «яблоневого патотипа *A. alternata*» остается неясной и требует дополнительных исследований. Очевидно, при определенных условиях он может представлять серьезную угрозу для яблоневых садов благодаря способности к образованию АМ-токсинов, играющих важную роль в патогенезе.

Штаммы *Alternaria*, продуцирующие АМ-токсины, в южных районах европейской части РФ нам обнаружить не удалось. Однако присутствие этого патогена в Северной Европе и Японии указывает на возможность его нахождения и на территории России. Доминирует на листьях яблони на юге страны вид *A. tenuissima*, реже встречаются представители комплекса '*A. infectoria*'.

Авторы признательны А. Танака (A. Tanaka) и Э. Г. Симмонсу (E. G. Simmons) за предоставленные штаммы.

Работа профинансирована фондом NordForsk (проект № 040291) и РФФИ (проект № 07-04-00096-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гагкаева Т. Ю., Левитин М. М. Идентификация возбудителя листовой пятнистости яблони из садов Краснодарского края // Микология и фитопатология. 2000. Т. 34, вып. 3. С. 58—62.

Ганнибал Ф. Б. Мелкоспоровые виды рода *Alternaria* на злаках // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38, вып. 3. С. 19—28.

Ганнибал Ф. Б., Ул и-Маттила Т. Дифференциация мелкоспоровых видов рода *Alternaria* со злаков по культуральным признакам и молекулярным данным // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, вып. 4. С. 13—23 (на англ. яз.).

Лёвкина Л. М. Несостоятельность концепции патотипов *Alternaria alternata* // Микология и криптогамная ботаника в России: традиции и современность. СПб., 2000. С. 177—178.

Мартirosян И. А., Шамирханян Р. Т. Обзор грибной флоры яблонь в Армянской ССР // Уч. зап. Ереванского гос. ун-та. Естеств. науки. 1975. Т. 3. С. 139—140.

Andersen B., Smedsgaard J., Jorring I., Skouboe P., Pedersen L. H. Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples // Int. J. Food Microbiol. 2006. Vol. 111. P. 105—111.

Bulajic A., Filajadic N., Babovic M., Sutton T. B. First report of *Alternaria mali* in Yugoslavia // Plant Dis. 1996. Vol. 80, N 6. P. 709.

Bulat S. A., Lubeck M., Mironenko N. V., Jensen D. F., Lubeck P. S. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium* // Mycol. Res. 1998. Vol. 102, N 8. P. 933—943.

Delgado T., Gomez-Cordova C, Scott P. M. Determination of alternariol and alternariol monomethyl ether in apple juice using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 731. P. 109—114.

Filajadic N., Sutton T. B. Identification and distribution of *Alternaria mali* on apples in North Carolina and susceptibility of different varieties of apples to *Alternaria* blotch // Plant Dis. 1991. Vol. 75, N 10. P. 1045—1048.

Gannibal Ph. B., Klemsdal S. S., Levitin M. M. AFLP analysis of Russian *Alternaria tenuissima* populations from wheat kernels and other hosts // Europ. J. Plant Pathol. 2007. Vol. 119, N2. С 175—182.

Home A. S. Diagnoses of fungi from «spotted» apples // J. Bot. For. 1920. Vol.58. P. 238—242.

Johnson R. D., Johnson L., Itoh Y., Kodama M., Otani H., Kohmoto K. Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity // Mol. Plant Microb. Interact. 2000a. Vol. 13, N7. P. 742—753.

Johnson R. D., Johnson L., Kohmoto K., Itoh Y., Otani H., Lane C.R., Kodama M. A polymerase chain reaction-based method to specifically detect *Alternaria alternata* apple pathotype (A. mali), the causal agent of *Alternaria* blotch of apple // *Phytopathology*. 2000b. Vol. 90, N 9. P. 973—976.

Johnson L. J., Johnson R. D., Akamatsu H., Salamiah A., Otani H., Kohmoto K., Kodama M. Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from the *Alternaria alternata* apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity // *Curr. Genet.* 2001. Vol.40, N 1. P. 65—72.

Kohmoto K., Taniguchi T., Nishimura S. Correlation between the susceptibility of apple cultivars to *Alternaria mali* and their sensitivity to AM-toxin I // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 1974. Vol.43. P. 56—66.

Kohmoto K., Otani H., Tsuge T. *Alternaria alternata* pathogens // *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases* / Ed. U. S. Singh. Vol. 2: Eukaryotes. Elsevier, 1995. P. 51—63.

Konstantinova P., Bonants P. J. M., van Gent-Pelzer M. P. E., van der Zouwen P., van den Bulk R. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays // *Mycol. Res.* 2002. Vol. 106, N 1. P. 23—33.

Kusaba M., Tsuge T. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. Vol. 60, N 9. P. 3055—3062.

Kusaba M., Tsuge T. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA // *Curr. Genet.* 1995. Vol.28, N5. P. 491—198.

Kusaba M., Tsuge T. Mitochondrial DNA variation in host-specific toxin-producing pathogens in the genus *Alternaria* // *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1997. Vol. 63, N 3. P. 463—469.

Kuss F. R., Harnish W. N. *Alternaria* species associated with an apple leaf spot // *Plant Dis. Rep.* 1972. Vol. 56, N 8. P. 721—722.

Nishimura S., Kohmoto K. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1983. Vol. 21. P. 87—116.

Paavananen-Huhtala S., Hyvonen J., Bulat S. A., Yli-Matti la T. RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates // *Mycol. Res.* 1999. Vol. 103, N 5. P. 625—634.

Peever T. L., Su G., Carpenter-Boggs L., Timmer L. W. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species // *Mycologia.* 2004. Vol. 96, N 1. P. 119—134.

Pryor B. M., Gilbertson R. L. Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics // *Mycologia.* 2002. Vol. 94, N 1. P. 49—61.

Pryor B. M., Michailides T. J. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio // *Phytopathology.* 2002. Vol. 92, N4. P. 406—416.

Raudoniene V., Lagauskas A. Micromycetes on imported fruit and vegetables // *Botanica Lithuanica.* 2005. Suppl. 7. P. 55—64.

Roberts J. W. Experiments with apple leaf-spot fungi // *J. Agr. Res.* 1914. Vol.2, N 1. P. 57—66.

Roberts J. W. Morphological characters of *Alternaria mali* Roberts // *J. Agr. Res.* 1924. Vol. 27. P. 699—708.

Roberts R. G., Reymond S. T., Andersen B. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups // *Mycol. Res.* 2000. Vol. 104, N2. P. 151—160.

Sawamura K. Studies on spotted diseases of apples. 1. The causal agent of *Alternaria* blotch // *Bull. Tohoku Natl. Agr. Exp. Station.* 1962. Vol. 23. P. 163—175.

Serdani M., Kang J.-C., Andersen B., Crous P. W. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa // *Mycol. Res.* 2002. Vol. 106, N 5. P. 561—569.

- Simmons E. G. *Alternaria* themes and variations (22—26) // *Mycotaxon*. 1986. Vol. 25, N 1. P. 287—308.
- Simmons E.G. *Alternaria* themes and variations (27—53) // *Mycotaxon*. 1990. Vol.37. P. 79—119.
- Simmons E. G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In *Alternaria. Biology, plant diseases and metabolites* / Eds J. Chelkowski, A. Visconti. Amsterdam: Elsevier, 1992. P. 1—36.
- Simmons E.G. *Alternaria* themes and variations (63—72) // *Mycotaxon*. 1993. Vol.48. P. 91—107.
- Simmons E.G. *Alternaria* themes and variations (236—243). Host-specific toxin producers // *Mycotaxon*. 1999. Vol. 70. P. 325—369.
- Simmons E. G., Roberts R. G. *Alternaria* themes and variations (73) // *Mycotaxon*. 1993. Vol. 48. P. 109—140.
- Stinson E. E., Osman S. F., Heisler E. G., Siciliano J., Bills D. D. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons // *J. Agr. Food Chem*. 1981. Vol. 29, N4. P. 790—792.
- Taylor J. Ghost spot of apple leaves caused by *Alternaria tenuis* // *Phytopathology*. 1966. Vol. 56, N5. P. 553—555.
- Tweedy B. G., Powell D. Cork rot of apple and its causal organism, a pathogenic strain of *Alternaria mali* // *Phytopathology*. 1962. Vol. 52, N 10. P. 1073—1079.
- Ueno T., Nakashima T., Hayashi Y., Fukami H. Structure of AM-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria mali* // *Agr. Biol. Chem*. 1975a. Vol. 39, N5. P. 1115—1122.
- Ueno T., Nakashima T., Hayashi Y., Fukami H. Structure of AM-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria mali* // *Agr. Biol. Chem*. 1975b. Vol. 39, N8. P. 2081—2082.
- Uhm J. Y. Disease problem and its solutions in apple industry of Korea // *New Horizons in Plant Pathology: Biotechnology for Plant Health: The 2004 KSPP Annual Meeting and International Symposium*. Program and abstracts. 2004. P. 21—24.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / M. A. Innis et al. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Acad. Press, 1990. P. 315—322.

ВНИИ защиты растений
Санкт-Петербург
phbgannibal@yandex.ru
Университет Турку
Финляндия

Поступила 22 V 2007

SUMMARY

Alternaria spp. is a common pathogen of apple leaves. Among 129 *Alternaria* isolates from south of European part of Russia *A. tenuissima* was predominant. About 11% of a collection studied was comprised of *A. infectoria* species-group isolates. Cultural liquid of all *A. infectoria* sp.-gr. and many *A. tenuissima* isolates was low phytotoxic for apple leaves (cv. Antonovka). DNA of seventeen most toxigenic *A. tenuissima* sp.-gr. strains was amplified with primer set specific for AM-toxins gene. All of those reactions did not result in PCR-product synthesis. Representative strain of *A. mali* (EGS 38-029) also did not contain AMT gene, when both Japanese strains of «*A. alternata* apple pathotype» (O-159, NA-1) gave positive reaction. Thus the most dangerous *Alternaria* species for apple orchards, «*A. alternata* apple pathotype», was not found in south of European Russia. It has no definite taxonomic status. This fungus is a member of *A. tenuissima* sp.-gr., however it is not identical to *A. tenuissima* or *A. mali*.