

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»

На правах рукописи



Буровинская Маргарита Владимировна

**НЕКРОТИЧЕСКАЯ ПЯТНИСТОСТЬ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДА
(*ALTERNARIA SP.*) И МЕРЫ БОРЬБЫ С НЕЙ**

4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

диссертация на соискание ученой степени кандидата
сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
кандидат сельскохозяйственных наук,
заведующая научным центром «Защиты
и биотехнологии растений» ФГБНУ
СКФНЦСВВ
Юрченко Евгения Георгиевна

Краснодар – 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 АЛЬТЕРНАРИОЗЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ: ВИДЫ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ВРЕДНОСНОСТЬ, МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОНТРОЛЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1 Видовой состав возбудителей альтернариозов сельскохозяйственных культур и их вредоносность.....	12
1.2 Методы молекулярной и морфологической идентификации.....	22
1.3 Факторы патогенности грибов <i>Alternaria</i>	23
1.4 Методы контроля альтернариозов.....	26
2 УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	34
2.1 Условия проведения исследований.....	34
2.2 Объекты исследований.....	35
2.3 Методы исследований.....	35
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
3.1 Таксономическая структура микопатокомплекса некротической листовой пятнистости винограда.....	51
3.2 Биоэкологические особенности некротической листовой пятнистости листьев в агроценозах винограда Западного Предкавказья.....	56
3.3 Оценка патогенности изолятов грибов <i>Alternaria</i> sp., выделенных из патоконлекса некротической листовой пятнистости винограда.....	63
3.4 Культуральные и морфологические свойства патогенных и непатогенных изолятов <i>Alternaria</i> spp.	69
3.5 Молекулярно-генетическая идентификация патогенных видов <i>Alternaria</i>	85
3.6 Оценка полевой устойчивости сортов винограда к поражению некротической пятнистостью листьев.....	92
3.7 Выявление физиолого-биохимических барьеров неспецифической устойчивости сортов винограда к поражению некротической листовой пятнистостью.....	95

3.8	Разработка мер контроля некротической листовой пятнистости винограда..	103
3.8.1	Лабораторные исследования	103
3.8.1.1	Скрининг антимикотической активности химических фунгицидов в отношении наиболее агрессивных изолятов патокомплекса некротической листовой пятнистости винограда	103
3.8.1.2	Скрининг антимикотической активности штаммов-антагонистов в отношении изолятов <i>Alternaria</i> spp., выделенных из патокомплекса некротической листовой пятнистости винограда.....	112
3.9	Экологическая безопасность систем защиты.....	128
3.10	Полевые исследования	134
3.10.1	Оценка биологической эффективности экспериментальных фунгицидов различного происхождения в борьбе с некротической листовой пятнистостью винограда.....	134
3.10.2	Сравнительная оценка биологической эффективности различных схем защиты винограда в борьбе с некротической листовой пятнистостью.	139
3.11	Экономическая эффективность различных экспериментальных схем защиты от болезней с учетом некротической листовой пятнистости	141
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	145
	РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ	148
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	149
	ПРИЛОЖЕНИЯ	176
	Приложение 1	177
	Приложение 2	178

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований. Виноградарство является одной из приоритетных отраслей сельского хозяйства юга России. В Краснодарском крае (Западное Предкавказье) виноградники занимают 25 тыс. га. Намеченные Правительством РФ меры по увеличению производства качественной виноградо-винодельческой продукции требуют соответствующей научной поддержки и прогресса в инновационном развитии отрасли. Это и послужило обоснованием к выбору данной темы.

За 20 с лишним лет истории возделывания винограда на Кубани в функциональной структуре грибных сообществ виноградных насаждений произошли изменения, которые связаны с общими изменениями среды. Расширился видовой состав грибов, в том числе патогенных, появились новые хозяйственно значимые виды. К наиболее заметным изменениям относится возрастание вредоносности и расширение ареала полупаразитной микрофлоры, такой как альтернариевые грибы.

Некротическая листовая пятнистость винограда является новым хозяйственно значимым заболеванием для культуры, возбудитель которого обладает высоким биотическим потенциалом – первичным и вторичным паразитизмом, способностью формировать ассоциации с другими видами патогенов, широким абиотическим оптимумом и др., что затрудняет его контроль.

Приоритетом современного адаптивного виноградарства является максимальная биологизация технологий выращивания винограда, в частности таких как технологии защиты от болезней, что в свою очередь требует уточнения биологических, экологических и других свойств новых микопатогенов – грибов рода *Alternaria*, появившихся в последние годы.

Недостатком существующей химической защиты является ограниченный перечень фунгицидов, а также нестабильная эффективность применяемых пестицидов в борьбе с альтернариозом, обусловленная высокими адаптивными возможностями этого возбудителя. Кроме того, для осуществления современной

стратегии и тактики адаптивной защиты в промышленном виноградарстве недостаточно данных о возможности использования биопрепаратов против альтернариевых грибов.

Степень разработанности темы. Фитопатогенные микроорганизмы повсеместно являются одной из основных угроз для производства, хранения и использования продуктов питания. На смену известным и хорошо изученным возбудителям заболеваний, для многих из которых в той или иной степени разработаны стратегии контроля, приходят «новые», неконтролируемые группы фитопатогенов, вызывающие эпифитотии заболеваний культурных растений. К таким относительно «новым» фитопатогенам можно отнести патоконкомплекс некротической листовой пятнистости винограда. В зарубежных исследованиях альтернариевые грибы в основном описываются как послеуборочные патогены гроздей винограда.

Ранние исследования, посвященные листовым пятнистостям, вызванными видами *Alternaria*, не имели достаточных доказательств принадлежности патогенов к указанным в них видам из-за отсутствия методов идентификации и скудного описания морфологических признаков конидий. Описанные симптомы болезни либо не схожи с наблюдаемыми в настоящее время, либо вовсе отсутствуют. Так, Cavara F. (1888) приводит краткие сведения о возбудителе альтернариоза винограда *Alternaria vitis* (Cavara, 1888). Листья, пораженные *A. vitis*, покрывались серо-пепельными пятнами вдоль жилок с налетом коричневых пучкообразных конидиеносцев с цепочками конидий. Попушой со ссылкой на P. Joly (1964) отмечает, что вид *Alternaria vitis* не является специализированным видом, а фактически является видом *Alternaria tenuissima* (Попушой, 1989; Joly, 1964). Cavara F. в 1889 году делает ремарку, что вид с описанными признаками редко встречается на пораженных листьях, поэтому отнес его к виду *Macrosporium vitis* (род впоследствии переименован в *Alternaria*). Позже к этому же виду возбудителя болезни на листьях *Vitis vinifera* отнес Сорокин Н.В. (1892). О патогене *A. viticola* на листьях *Vitis vinifera* сообщал Brunaud P. (1897), но без подробного описания симптомов. Во всех

перечисленных выше работах не приведены данные о патогенности идентифицированных видов *Alternaria* для винограда. Тао W.-С. с соавторами в 2014 году выделили новый вид *A. viniferae* из цветоножек и рахисов виноградных гроздей, который принадлежит к группе видов *alternata* (A new *Alternaria* species..., 2014). С помощью филогенетического анализа исследователи выяснили, что девять изолятов *A. viniferae* имеют очень тесную филогенетическую связь с *A. longipes*. Морфология нового вида отличается от других из видовой группы *alternata* количеством поперечных перегородок и гладкой поверхностью конидий. И снова тесты на патогенность не проводились (A new *Alternaria* species..., 2014).

В России и во всем мире на различных сельскохозяйственных культурах наблюдается тенденция возрастания вредоносности и расширение ареала альтернариевых грибов (Ганнибал и др., 2010; Ганнибал, 2011; Thomma, 2003). С помощью современных методов идентификации стали обнаруживать новые виды *Alternaria*, являющиеся специализированными патогенами для растения, или известные, никогда ранее не поражающие данную культуру (Andrew et.al., 2009; Discrete lineages within *Alternaria alternata*..., 2015). Работы по идентификации видов *Alternaria* и их внутривидовому полиморфизму молекулярно-генетическими методами в России проводили Л.М. Левкина, Т.Ю. Гагкаева, Ф.Б. Ганнибал, А.С. Орина. Отдельно хотелось бы отметить исследование J.H.C. Woudenberg с соавт. (2013), которые сделали большой шаг к упорядочиванию систематики комплекса *Alternaria*, который в настоящее время включает девять родов и восемь секций (*Alternaria* redefined, 2013).

В связи с ростом экономического значения альтернариозов для сельскохозяйственного растениеводства активизировался поиск эффективных средств контроля. Так, на поражаемых культурах, таких как яблоня, картофель, томаты в качестве наиболее эффективных отмечены фунгициды на основе действующих веществ из химических классов: триазолы, анилинопиримидины, фенилпирролы, пиридил-этил бензамиды, дитиокарбаматы (Role of four *Alternaria* spp...., 1991; Якуба и др., 2020; Нкетсо и др., 2020; Assessing the Belgian potato..., 2017).

Масштабность проблемы вредоносности некротической листовой пятнистости на винограде (комплекс *Alternaria* sp.) определяется несколькими основными причинами. Во-первых, до сих пор отсутствуют технологии защиты от данного заболевания. Действие известных фунгицидов часто оказывается недостаточным, поскольку наиболее интенсивное развитие возбудителей этого заболевания происходит в период продолжительных высокотемпературных, часто засушливых условий июля, августа в виноградарских зонах Краснодарского края. Во-вторых, практически ничего не известно о физиолого-биохимических критериях иммунитета растений к возбудителям некротической листовой пятнистости, а также о таксономической структуре и динамике целевого патокомплекса, представляющего собой сложную совокупность разных таксонов, доминирование которых может меняться в зависимости от комплекса факторов. Отсутствие этой информации послужило стимулом для разработки эффективной стратегии контроля исследуемого заболевания.

Цель исследований. Выявить видовой состав грибов-возбудителей некротической листовой пятнистости винограда и на основании комплексной биоэкологической и экономической оценки болезни разработать эффективный биологизированный способ борьбы с ней.

Основные задачи исследований:

1. Установить видовой состав возбудителей некротической пятнистости листьев винограда с помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов и создать коллекцию чистых культур.

2. Охарактеризовать морфолого-культуральные особенности и подтвердить патогенные свойства основных штаммов *Alternaria*.

3. На основании регулярного фитосанитарного мониторинга установить особенности патогенеза некротической листовой пятнистости винограда и его вредоносность.

4. Провести оценку полевой устойчивости сортов винограда к некротической листовой пятнистости.

5. Уточнить физиолого-биохимические механизмы неспецифической устойчивости растений винограда к поражению альтернариевыми грибами.

6. Провести лабораторный и полевой скрининг фунгицидов на биологическую эффективность в отношении грибов-возбудителей некротической листовой пятнистости винограда.

7. Определить экономическую и экологическую эффективность экспериментальной схемы биологизированной защиты с новым заболеванием.

Научная новизна. Теоретического характера:

– выявлены новые закономерности в формировании микопатоксикозов ампелоценозов в условиях усиления абиотических и антропогенных воздействий;

– установлены некоторые механизмы физиолого-биохимического барьера к поражению растений винограда альтернариевыми грибами;

– выявлена зависимость урожайности винограда от степени развития нового заболевания – некротической листовой пятнистости;

– предложен обоснованный методический подход к разработке систем защиты винограда от болезней, основанный на усовершенствованном фитосанитарном мониторинге и биологизации контроля нового заболевания, позволяющий повысить урожайность, качество и экологическую безопасность продукции винограда;

Прикладного характера:

– впервые в условиях Западного Предкавказья на основе биоценологического методологического подхода выявлена видовая структура возбудителей некротической листовой пятнистости винограда;

– впервые с помощью современных молекулярно-генетических методов идентифицированы новые патогенные виды грибов рода *Alternaria* Nees, 1817 для культуры винограда в России;

– впервые доказана вредоносность новых видов возбудителей некротической листовой пятнистости винограда и обоснована необходимость специального контроля этих видов;

– сформирована база данных распространения и вредоносности некротической (альтернариозной) листовой пятнистости винограда в Западном Предкавказье;

– разработан биологизированный способ борьбы с новым вредоносным заболеванием винограда.

Методология исследований. В основе методологии проведенных исследований лежит обзор научной литературы, постановка проблемы, разработка цели, задач и программы исследований, закладка полевых опытов, проведение учетов и наблюдений, математическая обработка экспериментальных данных и анализ полученных результатов. Работа выполнена в соответствии с общепринятыми методиками, используемыми в фитопатологии, микробиологии и молекулярной биологии и авторской методикой фитосанитарного мониторинга нового заболевания (СТО № 00668034-128-2021 «Методика выявления некротической листовой пятнистости (*Alternaria* spp.) в виноградных насаждениях») (Приложение 1).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Некротическая пятнистость листьев винограда – болезнь грибной этиологии, вызванная грибами рода *Alternaria* Nees;

2. Некротическая пятнистость листьев наносит экономический ущерб производству виноградной продукции и требует специально разработанной технологии защиты;

3. Применение адаптивной биологизированной защиты (интегрированное применение химических и биологических фунгицидов) винограда от некротической пятнистости листьев экономически и экологически эффективно.

Степень достоверности. Достоверность и обоснованность полученных результатов подтверждается комплексным подходом к изучению систем защиты, снижающих распространение болезни и влияющих на урожайность и качество винограда, использованием современных методов статистической обработки экспериментальных данных в программах Microsoft Excel 2010, PAST 4.0.7, а

также сопоставлением результатов исследований с данными, полученными другими учеными.

Апробация. Результаты диссертационной работы были доложены, обсуждены и одобрены на IX Международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов» (Краснодар, 2019 г.), IX-й международной научно-практической конференции молодых ученых «Перспективные технологии в области производства, хранения и переработки продукции растениеводства» (Краснодар, 2019 г.), Всероссийской с международным участием конференции «Актуальные проблемы устойчивого развития агроэкосистем (почвенные, экологические, биоценоотические аспекты)» (Ялта, 2019 г.), V Международной научной конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» (Симферополь, 2020 г.), X Международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов» (Краснодар, 2021 г.), Международной научно-исследовательской конференции по продовольственной безопасности и сельскому хозяйству (CFSA 2021) (Ялта, 2021 г.), Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные научные исследования в биологии и сельском хозяйстве: актуальные вопросы, достижения и инновации» (ВНИИСПК, 2021 г.).

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликована 21 научная работа, в том числе 3 работы в изданиях, рекомендованном ВАК Минобрнауки РФ, база данных по распространению и вредоносности некротической листовой пятнистости в Западном Предкавказье (Приложение 2), 1 работа в издании, индексируемом в базе данных Scopus.

Личное участие автора. Соискателем проведены полевые и лабораторные опыты, осуществлен сбор и обработка исходной информации, а также интерпретация и оценка полученных данных. Автором лично получены результаты, доказывающие патогенность возбудителей некротической листовой пятнистости.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 178 страницах, содержит 32 таблицы, 43 рисунка, состоит из введения, 3 глав, заключения. Список литературы включает 230 наименований, в том числе 150 на иностранном языке.

Благодарности. Выражаю особую благодарность моему научному руководителю – Юрченко Евгении Георгиевне – за помощь на всех этапах выполнения работы, чуткое руководство и содействие в написании диссертации. От души благодарю доктора биологических наук – Любовь Васильевну Маслиенко за предоставленную возможность проведения работы с коллекцией штаммов-антагонистов лаборатории биометода ФНЦ ВНИИМК. Сотрудникам лаборатории биометода ФНЦ ВНИИМК – А.Х. Воронковой и М.А. Бречко за помощь в проведении лабораторного скрининга коллекции штаммов-антагонистов. Выражаю искреннюю признательность и благодарность сотрудникам ФИЦ Биотехнология РАН – к.б.н. С.В. Виноградовой, Е.В. Поротиковой и Д.А. Швеца за обучение методам молекулярно-генетического анализа микроорганизмов и помощь в проведении молекулярной идентификации грибов *Alternaria*. Также я крайне признательна своим коллегам – сотрудникам лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов: Савчук Надежде Васильевне за помощь разных этапах работы, Орлову Олегу Валерьевичу за помощь в математической обработке данных.

1 АЛЬТЕРНАРИОЗЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ: ВИДЫ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ВРЕДНОСНОСТЬ, МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОНТРОЛЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Видовой состав возбудителей альтернариозов сельскохозяйственных культур и их вредоносность

Виноград – одна из самых поражаемых сельхозкультур из-за особенностей возделывания и агротехники, сложности систем защиты от патогенов.

Для мирового виноградарства, также, как и для региона Западного Предкавказья наиболее вредоносными и экономически значимыми заболеваниями винограда являются: оидиум (телеморфа *Uncinula necator* (Schwein.) Burrill, 1892, анаморфа *Oidium tuckeri* Berk, 1847), милдью (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, 1888), серая гниль (*Botrytis cinerea* Pers., 1794), черная пятнистость (*Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc., 1915), антракноз (телеоморфа *Elsinoe ampelina* (de Bary) Shear, 1929, анаморфа *Gloeosporium ampelophagum* (Pass.) Sacc., 1878), черная гниль (*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz, 1892), краснуха (*Pseudopeziza tracheiphila* Müll.-Thurg., 1903) (Патент RU 2472337C2 A01G17/00 (2006.01) 20.02.2013; Юрченко и др., 2010, 2011). Перечисленные болезни поражают как листья, так и генеративные органы винограда.

Интенсификация производства и климатические изменения приводят к усилению агрессивности известных заболеваний. Возрастает экономическое значение полупаразитных грибов (гемибиотрофов), которые сильнее поражают подверженные стрессу растения (Юрченко и др., 2011).

Достаточно важную роль при заражении патогенами виноградных растений могут играть их возраст и степень ослабленности. Например, облигатные паразиты (биотрофы) – оидиум и милдью – предпочитают молодые, крепкие растения с активным метаболизмом, а представители полупаразитной микрофлоры чаще проявляют свои патогенные свойства при встрече с ослабленным растением-хозяином (Юрченко и др., 2010).

Большинство альтернариоидных видов считаются космополитными, могут занимать различные экологические ниши и выступать в качестве сапротрофов, эндофитов и патогенов. Сапротрофные виды обычно встречаются в почве или на разлагающихся тканях растений и получают энергию в результате целлюлазной активности. *Alternaria* spp. также хорошо известны как послеуборочные патогены. Альтернариоз поражает все части растения: листья, стебли, клубни, плоды и обладает высокой вредоносностью. В большинстве зарубежных источников авторы указывают, что патогены являются некротрофами, т.е. питаются погибшими клетками растения-хозяина (MacKinnon et.al., 1999; Production of a host-specific toxin..., 1998). Род *Alternaria*, относимый ранее к несовершенным грибам (пор. *Hyphomycetes*, сем. *Dematiaceae*), в соответствии с принятой в настоящее время системой считают анаморфой сумчатых грибов семейства *Pleosporaceae* порядка *Pleosporales* подкласса *Pleosporomycetidae* класса *Dothideomycetes* (Ainsworth and Bisby's Dictionary..., 2008). У некоторых видов *Alternaria* известна телеоморфа (половая стадия) из рода *Lewia*, однако подавляющее большинство видов её утратило (Ганнибал, 2011).

Общими симптомами альтернариозов являются некротические поражения на листьях, в виде крупных бурых или черных пятен с характерной концентрической зональностью, часто окруженных желтой хлоротической тканью. Эта зона создается диффузией грибных токсинов (Saharan G.S. et.al., 2016). Виды *Alternaria* в основном описываются как внекорневые патогены, но могут заражать клубни растений. Пораженные растения все еще имеют правильно функционирующие корни и сосуды и продолжают обеспечивать поглощение воды или транспортировку питательных веществ. По данным некоторых авторов, гриб развивается при температурах *Opgea* между 18-34 °С, при относительной влажности выше 72,4 % (Попушой, 1989; Resistance of some apricot varieties..., 1986). Впервые симптомы альтернариоза на винограде в Краснодарском крае были описаны Е.Г. Юрченко в 2006 году (Юрченко и др., 2011). На них возбудитель фиксировался как факультативный паразит, поражающий молодые листья и развивающийся в форме эпифитотии. Инфекция проявляется в виде

некротических очагов на листьях, которые имеют концентрическую зональность. Поражения окружают хлоротичные пятна, которые часто наблюдаются при инфицировании некротрофными паразитами.

К настоящему времени известно о чуть менее 300 видах, относящихся к роду *Alternaria*. Из них около 10 являются наиболее вредоносными на сельскохозяйственных культурах в России (Новое в систематике..., 2003; Ганнибал, 2011).

Возрастание экономического значения альтернариозов для сельскохозяйственного растениеводства наблюдается во всех регионах мира, в том числе и в Российской Федерации. Ниже перечислены некоторые виды альтернариозных заболеваний сельскохозяйственных культур, ущерб от которых становится серьезным.

Вид *Alternaria alternata* поражает широкий спектр сельскохозяйственных культур. Внутри вида выделяют несколько патотипов, продуцирующих хозяин-селективные токсины. Микологи и фитопатологи расходятся во мнениях относительно таксономии этих патогенов. Однозначная идентификация и классификация *A. alternata* всегда была трудной, и именно поэтому некоторые авторы пришли к выводу, что все виды *Alternaria*, патогенные для растений, на самом деле являются *A. alternata*, и далее предложили дифференцировать их друг от друга, используя термин «патотип», основанный на их специфичности к хозяину. По классификации Симмонса (1999) каждый патоген (за исключением патогена клубники) является морфоспецифическим видом, имеющим субстратную специализацию и отличимым от *A. alternata* и друг от друга на основе размера конидий и паттернов спорообразования: *A. mali* Roberts на яблоне, *A. gaisen* Nagano ex Vokura на японской груше, *A. toxicogenica* E.G. Simmons на мандарине, *A. limoniasperae* E.G. Simmons на грубокожистом лимоне, *A. arborescens* E.G. Simmons на томате и *A. longipes* (Ellis & Everh.) E.W. Mason на табаке (Simmons, 1999). Напротив, некоторые японские фитопатологи, выступающие за концепцию патотипа, считают, что *Alternaria*, продуцирующие селективные по хозяину токсины, являются внутривидовыми вариациями

A. alternata, поскольку морфологически они почти не отличаются друг от друга (Nishimura S. et.al., 1980, 1983) и большинство филогенетических исследований показали, что они неотличимы от *A. alternata* (Andrew et.al., 2009; Kusaba et.al., 1994, 1995, 1997; Citrus Black Rot..., 2005; Comparison of *Alternaria* spp...., 2012). Однако *A. arborescens*, *A. gaisen* и *A. longipes* распознаются как отдельные таксоны (Discrete lineages within *Alternaria alternata*..., 2015; Molecular systematics of citrus-associated..., 2004; Andersen et.al., 2001; Contrasting species boundaries..., 2018; Roberts et.al., 2000).

Черная пятнистость листьев земляники (*Fragaria ananassa* Duchesne ex Rozier), вызванная патотипом *A. alternata*, является экономически важным заболеванием, обнаруженным пока только в Японии, Новой Зеландии, Корее и Италии (Characteristics of *Alternaria alternata*..., 1997). Типичные поражения на листьях, вызванные болезнью, имеют круглую форму, иногда неправильную, диаметром 3-5 мм, красновато-коричневого цвета, иногда с желтоватым ореолом. Было установлено, что возбудителем является *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., продуцирующий селективный к хозяину токсин (HST), AF-токсин. Была пересмотрена таксономия земляничного патотипа *Alternaria alternata*. Исследованные изоляты были морфологически идентифицированы как *A. gaisen*, для возбудителя было предложено новое название – *Alternaria gaisen* f. sp. *fragariae*. Морфологические характеристики референсных изолятов идентичны таковым у *A. gaisen*, а не у *A. alternata*. По результатам построения филогенетического дерева, полученного путем анализа комбинированного набора последовательностей ITS, *gapdh*, *rpb2*, *tef1*, *Alt a1* и *endoPG*, оба патотипа относятся к одному и тому же виду – *A. gaisen*. Авторы повторно описали гриб как *A. gaisen* Nagano ex Vokura и предложили две специальные формы вида: *A. gaisen* f. sp. *fragariae*, продуцирующие AF-токсин, и f. sp. *pyri*, продуцирующие АК-токсин (Nishikawa et.al., 2019).

Грибы рода *Alternaria* на яблоне вызывают пятнистость листьев, поверхностную гниль плодов и гниль сердцевины плодов (Астапчук и др., 2021; Ганнибал и др., 2008; Якуба, 2013). На листьях заболевание представляет собой

бурые пятна. Они могут объединяться и покрывать всю листовую поверхность, что приводит к их пожелтению и опаданию, и, как следствие, снижению количества урожая. Возбудители гнили плодов могут выделять в ткани токсичные для человека вторичные метаболиты. Известны случаи обнаружения в яблочном соке альтернариола и монометилового эфира альтернариола. В качестве патогенов яблони в литературе упоминается не менее девяти видов *Alternaria*. Два названия, используемые чаще других – *A. mali* Roberts, именуемый также «яблоневого патотип *A. alternata*». Встречаются также неспециализированные полусапротрофные виды *Alternaria* из трех видовых групп: «*A. arborescens*», «*A. infectoria*» и «*A. tenuissima*» (Ганнибал и др., 2008; Якуба и др., 2010, 2019).

Листовая пятнистость подсолнечника, вызванная грибами *Alternaria*, в некоторых странах крайне вредоносна. В России альтернариозы подсолнечника встречаются на юге Европейской части и Дальнего Востока (Ганнибал и др., 2010; Ганнибал, 2011a; Левкина, 1984). Симптомы болезни в виде небольших, неправильной формы, темных некротических пятен появляются в первую очередь на нижних листьях, затем пятна постепенно распространяются на стебель, черешки листа, прицветники и соцветия. При тяжелых поражениях пятна сливаются, значительно уменьшается площадь фотосинтетической области, что приводит к дефолиации и гибели растений (Cho et.al., 2000). В результате болезни урожайность семян подсолнечника может сократиться в среднем на 80 %, по данным исследователей из Китая – на 10-50%, и до 90% в Индии (Control of *Alternaria* leaf blight..., 2020). Выход масла может сократиться до 34%. Первый зарегистрированный патоген на подсолнечнике был назван как *Helminthosporium helianthi* Hansf. (Hansford, 1943), который затем был переименован в *Alternaria helianthi* (Hansf.). В мире известно еще восемь видов *Alternaria*, вызывающих пятнистость листьев подсолнечника: *A. helianthicola* (Biochemical characterization of isolates..., 2016), *A. tenuissima* (Leaf blight of sunflower..., 2019), *A. helianthificiens* (Thomma, 2003; Simmons, 1986), *A. leucanthemi* (Carson et.al., 1987), *A. longissima* (Role of four *Alternaria* spp...., 1991), *A. zinniae* (Bhutta et.al.,

1997), *A. alternata* (Lagopodi t.al., 1998) и *A. protenta* (Cho et.al., 2000; Occurrence of *Alternaria* leaf blight..., 2021).

Груша, одна из самых важных плодовых культур во всем мире, выращивается в более чем 50 странах Азии, Австралии, Европы, Америки и Северной Африки (Genotyping-by-sequencing of pear..., 2017; Genetic diversity and population structure..., 2015; Liu et.al., 2018). Впервые болезнь обнаружена на песчаной груше (*Pyrus pyrifolia* Nakai) в Японии в 1933 году. Пятнистость листьев, вызываемая грибом *Alternaria alternata*, является одним из самых вредоносных заболеваний для этого вида груши (Transcriptome analysis of Callery pear..., 2017; Diversification and independent domestication..., 2018). Основным симптомом на листьях является появление точечных круглых черных пятен после первичного заражения. По мере прогрессирования болезни пятна постепенно увеличиваются и приобретают округлую или неправильную форму. Некротические пятна могут появляться на листьях, плодах и побегах, что приводит к ранней дефолиации и, таким образом, снижению урожайности и качества плодов. У восприимчивых сортов груши выделение в ткани токсичного вторичного метаболита, специфического для хозяина токсина (АК-токсина), приводит к некрозу и раннему опаданию листьев. Специализированным патогенным видом для данной культуры является *A. gaisen* (Physiological and transcriptional responses..., 2021; Screening of *Pyrus pyrifolia* genotypes..., 2020).

По результатам исследований, специализированными видами на пасленовых культурах являются *A. solani* и *A. tomatophila*. Ученые, проанализировав симптомы болезни на листьях картофеля и томата, пришли к выводу, что изоляты *A. solani* показали одинаковую агрессивность как у томата, так и у картофеля, в то время как вид *A. tomatophila* был очень агрессивным у томатов, но в меньшей степени у картофеля (Ганнибал и др., 2013). Основываясь на культуральных и морфологических различиях, Simmons E.G. (1992) назвал вид *Alternaria tomatophila* «широко распространенным возбудителем раннего фитофтороза томата». *A. solani* и *A. tomatophila* морфологически очень похожи. Измерение размера конидий и длины клюва в различных средах показало, что

A. tomatophila, как правило, короче и имеет более тонкое тело с более длинным клювом, чем *A. solani*. Однако из-за изменчивости в пределах одного вида не удалось сделать окончательных выводов. Совсем недавно Woudenberg с соавт. (2013) сгруппировали несколько крупноспоровых изолятов *Alternaria*, в том числе патогенных для растений из семейства *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* и *Scrophulariaceae* в новый вид, обозначенный *A. lineariae* (*Alternaria* redefined, 2013). Крупноспоровые виды отличались от мелкоспоровых, включая *A. alternata* и *A. arborescens* (*A. alternata* f.sp. *lycopersici*), которые также были выделены из пасленовых растений и, как сообщалось, вызывали схожие с альтернариозом симптомы в некоторых ситуациях. Другие мелкоспоровые виды *A. tenuissima* и *A. infectoria* на пасленовых встречаются редко (Орина и др., 2010).

Среди различных грибных заболеваний картофеля ранняя пятнистость, или альтернариоз листьев, считается одним из серьезных заболеваний, вызывающих серьезные потери в растениеводстве (Van der Waals et.al., 2001). *Alternaria solani* считается основным возбудителем. Кроме того, было также обнаружено, что *A. alternata* вызывает аналогичные симптомы болезни у растения картофеля (First Report of *Alternaria alternata*..., 2011). Ранняя пятнистость представляет собой самую серьезную угрозу для урожайности картофеля во всем мире и приводит к потере урожая от 5 до 70% (Assessment of mycogenic..., 2022). Альтернариоз картофеля широко распространен на территории Российской Федерации, особо высокий процент вредоносности наблюдается в Прибайкалье, на Дальнем Востоке и Ленинградской области. В Саратовской области данное заболевание не является новым, и с каждым годом возрастает процент его развития и распространения.

Alternaria alternata и *A. solani* вызывают стеблевую, плодовую гниль и пятнистость листьев томата (*Solanum lycopersicum* Mill.), болезнь прогрессирует и после сбора урожая. В некоторых зарубежных источниках болезнь именуется ранним фитофторозом, причиняет серьезные экономические убытки. Потери урожая томатов могут достигать 78-90 % (Орина, 2011). Симптомы инфекции характеризуются черными или коричневыми поражениями на листьях, приводящими к дефолиации (Thomma, 2003). Конидии *A. solani* образуют

некротические поражения через 2-3 дня после заражения и через 3-5 дней воспроизводятся новые. Это запускает полициклическую инфекцию и все надземные части растения, включая листья, стебель и плоды оказываются поражёнными. Кроме того, будучи некротрофным грибом, *A. solani* убивает ткани хозяина с помощью многочисленных токсинов и ферментов целлюлазы и пектинметилгалактуроназы (Bio-genetic analysis of resistance..., 2020; Exogenous hexanoic acid..., 2022; González-García et.al., 2021).

Альтернариоз листьев моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus*), вызываемый некротрофным грибом *Alternaria dauci*, является одним из наиболее разрушительных внекорневых заболеваний. Болезнь присутствует в районах выращивания моркови по всему миру. Иногда альтернариоз вызывает полную гибель корнеплодов, а выпады семенников могут достигать 40%. Болезнь приводит к подсыханию и отмиранию листьев на 70-80 %, вследствие чего снижается урожай корнеплодов на 35-50 %, а во время хранения гибель корнеплодов составляет от 30-60 %. В исследовании круга хозяев *A. dauci* учеными из Франции было определено, что патоген может поражать не только морковь, но и растения, не относящиеся к семейству *Apiaceae*. Высокая степень вредоносности заболевания зафиксирована для моркови, укропа (*Anethum graveolens*), фенхеля (*Foeniculum vulgare*), кервеля (*Cerfolium sativum*), кориандра (*Coriandrum sativum*). *A. dauci* может поражать черешковый (*Apium graveolens*) и корневой сельдерей (*Apium graveolens* var. *rapaceum*), петрушку (*Petroselinum crispum*), пастернак (*Pastinaca sativa*), валерьяницу (*Valerianella olitoria*), кресс-салат (*Nasturtium officinale*), редис (*Raphanus sativus*) и томаты (*Solanum lycopersicum*) (Evaluating aggressiveness and host range..., 2012). Еще одним патогенным видом для моркови видом является *Alternaria radicina* (Соколова Л.М., 2010). Патоген впервые зарегистрирован в 1933 г. в окрестностях Ленинграда на территории бывшего СССР. В настоящее время встречается почти на всей территории возделывания моркови и вызывает не только пятнистость листьев, но и черную гниль корнеплодов при хранении.

Пурпурная пятнистость лука (*Allium* spp.), вызванная *Alternaria porri*, остается серьезной проблемой в мире как для фермеров, так и для научного сообщества, поскольку она сильно повреждает посевы и резко снижает урожайность. Симптомы появляются через 1-4 дня после заражения, и начинается гниение луковицы, которое в конечном итоге превращается в темно-красновато-фиолетовые, а затем коричневато-черные поражения. На прогрессирование пурпурной пятнистости оказывают огромное влияние многие факторы: сезон, время посева, влажность и температура, стадия урожая, габитус растений (Overview of purple blotch disease..., 2020). В России *A. porri* отмечен в Иркутской, Московской областях и Приморском крае. Потери урожая луковиц и семян в Индии из-за этого заболевания могут составлять 96-97%. Отсутствие устойчивых сортов является одной из причин сохранения патогена в течение всего года и вызывает эпифитотии (Prakasam et.al., 2012).

Виды *Alternaria* поражают растения из семейства *Brassicaceae* практически повсеместно, где возделывают крестоцветные. Альтернариоз поражает листья и другие надземные органы растений. Происходит снижение урожая, ухудшение посевных качеств семян, загрязнение продукции (например, горчицы и рапсового масла) микотоксинами. На территории России встречается несколько патогенных видов: *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*. Поражение листьев капусты грибом *Alternaria brassicicola* может достигать от 5 до 30 %, что часто приводит к полному их отмиранию (Ганнибал и др., 2009). В 1976-1977 годах в Великобритании зарегистрирован случай заражения патогеном *Alternaria brassicicola* большой партии семян *Brassica oleracea*. Поверхность пораженных семян была загрязнена спорами и мицелием *A. brassicicola*, инфекция также находилась внутри – в семенной оболочке и тканях эмбриона. Патоген *A. brassicae* в эти годы встречался реже. Поверхностная контаминация грибами быстро снижается после 2 лет хранения семян капусты при 10°C, но внутренняя инфекция сохраняется до 12 лет. Семена, пораженные внутренней инфекцией, становятся мелкими и сморщенными. Инфицирование саженцев капусты

патогенами происходит больше из-за внутренней инфекции, чем поверхностного загрязнения (Maude et.al., 1980).

Вид *A. japonica* является патогеном растений из родов *Brassica*, *Mattiola* и *Raphanus* в странах северного полушария. Гриб может встречаться и на растениях из других семейств, однако высокую патогенность проявляет при заражении представителей семейства *Brassicaceae* (Идентификация и токсикологическая характеристика..., 2021; Nishikawa et.al., 2020). В России он был зафиксирован на редисе, редьке на Северном Кавказе, в центре европейской части России и Приморском крае. Реже встречается на капусте и левкое (Ганнибал и др., 2009). *A. japonica* прежде всего поражает стебли и стручки, реже листья, вызывая черную пятнистость (альтернариоз). Заболевание приводит к снижению всхожести семян. Иногда гриб вызывает повреждение корнеплодов во время хранения (First Report of *Alternaria raphani*..., 2005).

A. cucumerina (Ell et Ev.) Elliot. встречается в разных частях света на большей части площадей выращивания восприимчивых к болезням тыквенных культур. Альтернариоз листьев может привести к потере урожая до 30% (Latin, 1992). Гриб обнаруживался на Дальнем Востоке России на *Cucumis melo*, *Cucumis sativus* и *Citrullus lanatus* (Егорова и др., 1999); однако в других регионах о нем не сообщалось. В 2009 году Ганнибал Ф.Б. наблюдал некроз листьев тыквы (*Cucurbita maxima*) в частных садах Республики Дагестан. Ученый подтвердил патогенность *A. cucumerina* для листьев *Cucurbita moschata* культивара «Витаминная», выращенной в горшках в тепличных условиях (Gannibal, 2011). Альтернариозная пятнистость листьев огурца (*Cucumis sativus* L.), вызванная *A. cucumerina* (Ell et Ev.), в последние годы стала основным заболеванием огурцов в Китае. В тяжелых случаях болезнь пятнистости листьев огурца *Alternaria* снижает урожайность на 10-20%. Патоген поражает листья, особенно нижние, вызывая большие некротические участки (Alkooranee et.al., 2019; Transcriptome analysis..., 2020).

1.2 Методы молекулярной и морфологической идентификации

Род *Alternaria* имеет большое количество легитимных видов, их насчитывается около трехсот во всем мире (Simmons, 2007; The sections of *Alternaria...*, 2012), поэтому их идентификация становится все труднее. Виды *Alternaria*, как правило, выявляются и классифицируются на основе культуральных и морфологических признаков. Ключевой таксономической характеристикой видов рода *Alternaria* являются крупные, многоклеточные, темного цвета (окрашенные) конидии с продольными и поперечными септами. У некоторых видов они настолько узки или развиваются в культуре настолько быстро, что образование продольных перегородок встречается редко. Конидии образуются одиночно или в виде разветвленных цепочек на коротких прямостоячих конидиеносцах, имеют широкое основание, постепенно сужаются, образуя апикальный вырост. Иногда типичная конидия развивается без сужения от всей вершины конидиеносца.

Идентификация видов *Alternaria* включает оценку конидий и паттернов споруляции (sporulation patterns), которые являются и остаются весьма изменчивыми. Основными факторами, определяющими характер споруляции, являются длина первичных конидиеносцев, характер ветвления, наличие, длина и происхождение вторичных конидиеносцев, углы ветвления, степень образования цепочек и размер и формы конидий (Simmons, 2007).

Перечисленные выше морфологические признаки сильно зависят от условий роста – субстрата, освещенности и влажности, и, таким образом, могут быть ненадежными. В последнее время были изучены различные молекулярные инструменты для объяснения изменчивости внутри и между видами *Alternaria*. С конца двадцатого века мультигенный филогенетический анализ сыграл значительную роль в определении видов *Alternaria*. Методы ДНК-фингерпринта, такие как случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) (Comparative Genetic Variation..., 2018; Investigation of the stereoselectivity..., 2008), полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (AFLP) (Use of molecular

tools..., 2006), микросателлитные последовательности (ISSR) (Inter simple sequence..., 2013), анализ последовательности рибосомной ДНК (rDNA) – внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) (PCR Detection of *Alternaria* spp..., 2011) и малая субъединица митохондриальной рибосомы рДНК (Park M.S. et.al., 2008); белково-кодирующие гены фактора элонгации трансляции (TEF1- α), бета-тубулина, АТФазы плазменной мембраны, кальмодулина (calmodulin), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (gpd), эндополигалактуроназы (endo-PG), основного аллергена *Alternaria* (Alt a1) и безымянных геномных регионов (ORA1-3, OPA2-1 и OPA10-2) использовались для исследований на уровне популяции и видов (Kusaba et.al., 1995; PCR Detection of *Alternaria* spp..., 2011; Hong S.G. et.al., 2005; Characterization of *Alternaria* isolates..., 2014; Differentiation of the closely related species..., 2014; Zhu et.al., 2015; Evaluation of commercial Upland..., 2018). Lawrence с соавт. (2014) и Ганнибал Ф.Б. с соавт. (2014) установили, что гены, кодирующие белки (gpd, Alt a1 и calmodulin), были информативными в выявлении видов *Alternaria* (Characterization of *Alternaria* isolates..., 2014; Differentiation of the closely related species..., 2014).

Ученые из Бельгии считают, что полиморфизмы в областях ITS и gpd слишком низки, чтобы отделить мелкоспоровые виды *Alternaria* поэтому проводили дополнительные анализы последовательностей Alt a 1 гена и EF- α (Identification of *A. arborescens*..., 2017).

1.3 Факторы патогенности грибов *Alternaria*

В большинстве зарубежных источников авторы указывают, что патогены *Alternaria* являются некротрофами, т.е. питаются погибшими клетками растения-хозяина (Production of a host-specific toxin..., 1998; When and how to kill a plant cell..., 2011). Стратегия инфицирования некротрофных грибов менее сложна, чем у биотрофов. Некротрофы способствуют программируемой клеточной смерти, в то время как биотрофы подавляют ее развитие. Апрессории и гифы, образованные типичными некротрофами и находящиеся внутри растения-хозяина, незаметны и

однородны. Некротрофы убивают клетки растения-хозяина токсинами, не противостоят образованию активных форм кислорода (АФК), что способствует ускоренной колонизации тканей хозяина (Torto-Alalibo et.al., 2009; Penetration and infection processes..., 2014).

Помимо прямых потерь урожая сельскохозяйственных культур, виды рода *Alternaria* могут значительно снижать качество и безопасность продукции из-за их способности к токсинообразованию. По литературным данным для видов рода *Alternaria* известно несколько факторов патогенности: хозяин-специфические и хозяин-неспецифические токсины и гидролитические ферменты.

Пигментами окраски конидий видов *Alternaria* являются меланины. Они могут иметь как косвенное, так и непосредственное значение в вирулентности. С одной стороны, они выступают как «бронезилет», защита грибов от экологических стрессов или неблагоприятных условий, таких как экстремальные температуры, УФ-излучение и соединения, секретлируемые микробными антагонистами, таким образом способствуя выживанию и продлению жизнеспособности (Production of a host-specific toxin..., 1998). Однако, есть небольшое исключение: известны штаммы-альбиносы.

Многие виды *Alternaria* sp. выделяют микотоксины – вторичные метаболиты, низкомолекулярные компоненты, которые не играют роли для нормального развития и размножения грибов, но важны в формировании патогенности. Микотоксины можно разделить на две категории: специфические для хозяина и неспецифические. Неспецифические токсины хозяина обладают более слабым фитотоксическим действием, поражают широкий спектр видов растений и считаются дополнительными факторами вирулентности, наряду с другими факторами – механизмами проникновения в растительные клетки и ферментативными процессами (Penetration and infection processes..., 2014).

Были идентифицированы многие из неспецифических альтернариевых токсинов. Самыми распространенными являются брефелдин А, (дегидро-) курвулярин, тенуазоновая кислота, альтенуен, альтернариол, монометилловый

эфир альтернариола, тентоксин, цинниол, стемфилтоксины, альтертоксины (Swart A.E. et.al., 1995). Они проявляют фитотоксическую активность по-разному.

Хозяин-специфические токсины поражают на узкий спектр видов растений. Существует как минимум 12 хозяин-специфических токсин-производящих фитопатогенных видов грибов. По мнению некоторых исследователей, большинство этих вариантов следует считать патотипами *A. alternata* (*Alternaria toxins...*, 2017). Эта гипотеза подтверждается молекулярными исследованиями (Kusaba et.al., 1994, 1995, 1997; Nishimura et.al., 1983). Японские исследователи обнаружили, что патогенные биотипы, продуцирующие хозяин-специфические токсины, имели дополнительные минихромосомы, а непатогенные не имели (*Molecular karyotypes for Alternaria...*, 1999).

Каждый патотип *Alternaria alternata* обладает уникальными патогенными свойствами (*Molecular karyotypes for Alternaria...*, 1999). Выделено семь патотипов *Alternaria alternata*, каждый из которых выделяет соответствующих хозяин-селективный токсин: АК-токсин патотипа японкой груши (*Pyrus pyrifolia* Nakai), АМ-токсин патотипа яблони (*Malus domestica* Borkh.), АТ-токсин табака (*Nicotiana tabacum* L.), АСR- (АСRЛ-) или АСТG-токсин на грубокожистом лимоне (*Citrus jambhiri* Lush.), АСТ или АСТG- на мандарине (*Citrus reticulata* Blanco), ААL-(AL) томатах (*Solanum lycopersicum* L.) и АF-токсин на землянике (*Fragaria* L. sp.). Исследование токсинов (кроме АТ-токсина) показало, что они заметно различаются по химической структуре, а АК-, АСТ-, и АF-токсины имеют между собой некоторое сходство (*Alternaria toxins...*, 2017).

В работе Л.Ю. Кокаевой проведено изучение активности сериновых протеаз, секретируемых двумя различающимися по вирулентности штаммами *A. alternata* – MELT 5 и MELT 12. Эти штаммы секретируют внеклеточные протеазы двух типов – трипсиноподобные и субтилизиноподобные. Эти протеазы относятся к группе гидролитических ферментов, которые делают макромолекулярные соединения доступными для использования в пищевых целях. Внеклеточные протеазы, выделяемые *A. alternata*, способны мацерировать ткани растения и разрушать компоненты клеточной стенки, что позволяет

преодолевать естественную резистентность растения-хозяина. Таким образом, они выполняют функцию не только пищеварительных ферментов грибов, но и во многих случаях участвуют в процессе патогенеза. У более агрессивного штамма MELT 5 была выше активность трипсиноподобной протеазы, чем у менее агрессивного MELT 12. В то же время у менее патогенного штамма MELT 12 была существенно выше активность субтилизиноподобной протеазы. На основании этого авторы сделали предположение, что агрессивность штаммов и их ферментный состав зависит от трофической приуроченности, т.е. более агрессивный штамм MELT 5 с высокой активностью трипсиноподобной протеазы способен поражать живые ткани растения-хозяина, а менее агрессивный MELT 12 обладает сапротрофным питанием, утилизируя отмершие ткани (Вирулентность штаммов *Alternaria alternata...*, 2015; Кокаева., 2016).

1.4 Методы контроля альтернариозов

Виноградное растение – многолетняя лиана. Виноград возделывается на одном и том же месте в течение многих лет (40 и больше), поэтому для создания его постоянной высокой продуктивности необходимы условия, обеспечивающие оптимальный рост кустов, высокую урожайность и качество продукции. К этим условиям относится правильная закладка виноградника, обрезка, обеспечение оптимальной нагрузки куста, оптимальная система защиты.

Основным известным методом контроля альтернариозов является химический. Анализ научной информации показал, что для контроля альтернариозов на разных культурах в различных регионах мира применялись препараты со следующими действующими веществами (ДВ): дифеноконазол, тебуконазол, азоксистробин, манкоцеб, цимоксанил, фамоксадон, диметоморф, хлороталонил, фенамидон. Разные виды патогенов сельскохозяйственных культур проявляют различную чувствительность к группам химических фунгицидов.

Против поздней и ранней гнили картофеля широко используются и эффективны фунгициды манеб, манкозеб и хлороталонил. Однако к их

недостаткам относится необходимость регулярного применения в высоких дозах. Более предпочтительными считаются ингибиторы хинона, в том числе, пиракlostробин и азоксистробин. Проведенные исследования бельгийских ученых о чувствительности *in vitro* патогенов картофеля *Alternaria solani* и *A. alternata* к фунгицидам показали, что азоксистробин, дифеноконазол, мандипропамид, манкоцеб, пиракlostробин, боскалид в некоторой степени уменьшали прорастание спор и рост вегетативного мицелия *Alternaria*, однако межвидовая чувствительность была изменчивой. Смесь боскалида и пиракlostробина лучше действовала против *A. solani*. В целом, фунгициды больше подавляли рост *A. solani*, чем *A. alternata*. Эффективность дитиокарбамата (манкоцеба) была высокой, тогда как внешний ингибитор хинона азоксистробин проявлял невысокую активность, особенно по отношению к *A. alternata*. Наряду с манкоцебом, дифеноконазол в сочетании с мандипропамидом обладал значительно более сильным ингибирующим действием по сравнению с азоксистробином и смесью пиракlostробин плюс боскалид (Assessing the Belgian potato..., 2017). В погодных условиях Нижнего Поволжья России проводили мелкоделяночные эксперименты по влиянию обработок фунгицидами на развитие альтернариоза картофеля и его урожайность. Наименьшую заболеваемость и наибольшую урожайность показал картофель, выращенный по схемам обработок препаратами Луна экспириенс, КС (флуопирам + тебуконазол), Акробат МЦ, ВДГ (манкоцеб + диметоморф), Ревус Топ, КС (мандипропамид + дифеноконазол), Квадрис (азоксистробин) (Нкетсо и др., 2020).

В исследованиях последних лет сообщается о появлении резистентных штаммов *Alternaria alternata* и *A. solani* к ингибиторам хинона и сукцинатдегидрогеназы, в частности, стробилуринам и боскалиду (Boscalid-resistance in *Alternaria alternata*..., 2017). В Калифорнии в 2015 году проведен эксперимент по определению чувствительности патогена фисташки *Alternaria alternata* к фунгицидам. Из 229 изолятов большинство оказались устойчивыми к боскалиду (86,3%) и пиракlostробину (92,9%), но чувствительными к флудиоксонилу (77,8%) и ципродинилу (89,7%) (Avenot et.al., 2015).

Сообщалось, что из 22 изолятов *A. alternata*, полученных из пораженных растений *Paris polyphylla* var. *chinensis* в провинции Сычуань на юго-западе Китая, 20 были устойчивы к дифеноконазолу (Detection and Biological Characteristics..., 2021).

Индийскими учеными было установлено, что манкоцеб, тебуконазол, дифенаконазол и азоксистробин идеально подходят для борьбы с пурпурной пятнистостью лука, вызванной *Alternaria porri*, и повышения урожайности. Многие биологические подходы, такие как растительные экстракты и средства биологического контроля, были признаны частично эффективными для борьбы с болезнью (Jhala et.al., 2017).

В исследовании *in vitro* проведена оценка чувствительности к фунгицидам *Alternaria alternata*, возбудителя гнили сердцевинки плодов яблони. Высокую эффективность в подавлении роста гриба показал препарат Луна Транквилити, КС (125 г/л флуопирама + 375 г/л пириметанила) – 95 %, 70 % эффективность фунгицид Грануфло, ВДГ (800 г/кг тирама) и 75 % Хорус, ВДГ (750 г/кг ципродинила). Фунгицид Скор, КЭ (250 г/л дифеноконазола) подавлял рост мицелия гриба на 100 % (Якуба и др., 2020).

В качестве послеуборочной обработки для предотвращения альтернариевой гнили citrusовых в Калифорнии предлагается имазалил. Широкий диапазон чувствительности к пентиопираду наблюдался у изолятов *Alternaria alternata* и *A. arborescens*, вызывающих опадение и внутреннее поражение плодов citrusовых. Системные фунгициды метконазол и тебуконазол показали процент ингибирования роста мицелия значительно выше, чем остальные фунгициды. Среднюю активность показал флуопирам. Другие авторы также сообщали об изолятах *A. alternata* с низкой, умеренной и высокой устойчивостью к пентиопираду, но устойчивости к флуопираму не наблюдалось (Sensitivities of Baseline Isolates..., 2014). Тем не менее, недавние исследования сообщили о резистентных к флуопираму изолятах в той же популяции (Avenot et.al., 2019).

Отсутствие устойчивости растений к альтернариозам является одной из причин сохранения патогена в течение всего года и вызывает эпифитотии, что

требует распылять очень большое количество пестицидов. В связи с риском для здоровья, опасностью загрязнения окружающей среды и угрозой резистентности *Alternaria* при использовании химических фунгицидов для борьбы с болезнями растений считается целесообразным свести их использование к минимуму. Биологическая борьба с патогенами растений с помощью антагонистических микроорганизмов является экологически чистым и надежным подходом, лучшей альтернативой использованию химических фунгицидов.

Исследования видов *Trichoderma* как потенциальных продуцентов для создания биопрепаратов ведутся давно. Основными механизмами их биологического контроля являются антибиоз, микопаразитизм и пищевая конкуренция. Ghildyal и Pandey (2008) установили, что *Trichoderma* sp. продуцирует диффундирующие и летучие метаболиты. Dennis и Webster (1971) также сообщали о выделении летучих и нелетучих антибиотиков видами *Trichoderma*. *Trichoderma* sp. в качестве микопаразита развивается на гифах других грибов, обвивается вокруг них и разрушает клеточные стенки. Паразитическое действие ограничивает развитие и активность патогенных грибов. Был сделан вывод, что *Trichoderma* чувствует присутствие грибов-мишеней и, по-видимому, растет топически по отношению к ним.

При исследовании биологической активности *Trichoderma harzianum* было показано, что гриб подавляет развитие *A. alternata*. *T. harzianum* растет быстрее, чем *A. alternata* и в чистой культуре, и в двойной (Gveroska et.al., 2012). По публикациям нескольких последних лет можно сделать вывод, что максимальную антифунгальную активность в отношении возбудителей альтернариозов разных сельскохозяйственных культур проявляют штаммы видов *Trichoderma harzianum* и *Trichoderma viride*. В двойных культурах с патогенными штаммами *Alternaria* подавление мицелия штаммами патогена *T. harzianum* составляет 53,85-82,81%, штаммами *T. viride* – 66,08-79,45%. Антагонист *Trichoderma viride* ингибировал мицелий *Alternaria porri* на 76,55%, а *Trichoderma harzianum* на 70,74% (Biocontrol agents against early blight..., 2020; Effect of fungal..., 2013).

В 2008 году учеными из Индии было тщательно изучено ингибирующее действие жидких культуральных фильтратов видов *Trichoderma*, а именно *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* и *T. virens*, на рост мицелия и прорастание спор *Alternaria porri*. Обнаружено также, что виды *Penicillium*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces roseus* и *Cryptococcus luteolus* эффективны в подавлении роста *Alternaria porri* (Imtiaj et.al., 2008). В более позднем исследовании изолят *Trichoderma harzianum* (Th-3) продемонстрировал высокую эффективность в снижении заболеваемости лука *Alternaria porri* в тепличных и полевых условиях. Полевые эксперименты также подтвердили потенциал изолята Th-3 для стимулирования роста и урожайности. Были протестированы отдельно и в комбинации *P. fluorescens* (Pf1), *Bacillus subtilis* и *T. viride* для подавления фитофтороза листьев лука (*Alternaria palandui*) в тепличных и полевых условиях. В дополнение к подавлению заболевания, лечение с помощью смеси антагонистов способствовало росту растений с точки зрения увеличения высоты растений и, в конечном счете, урожайности луковиц (Prakasam et.al., 2012).

Для биологической защиты от альтернариозов проводили эксперименты не только с грибными и бактериальными фунгицидами, но и с препаратами растительного происхождения. Содержащиеся в растениях танины, сапонины, фенольные соединения, эфирные масла и флавоноиды обладают антимикотическими свойствами. Плюсами таких биофунгицидов является то, что они биоразлагаемые, селективные и могут быть получены из местных растений.

Протестировано влияние растительных экстрактов в разных концентрациях на рост мицелия и спорообразование *Alternaria alternata*. Независимо от концентрации, экстракт чеснока (*Allium sativum* L.) был признан наиболее эффективным в ингибировании роста мицелия (46,60 %) *A. alternata*. Экстракты листьев нима (*Azadirachta indica* A. Juss.) и дурмана (*Datura stramonium* L.) показали хорошие результаты – 43,30 % и 40,30 % соответственно. Экстракты листьев акации (*Acacia nilotica* (L.) Delile) и амаранта (*Amaranthus viridis* L.) были наименее эффективны в подавлении роста мицелия *A. alternata* (Kantwa et.al., 2014). Вид *Alternaria solani*, патогенный для пасленовых, оказался чувствителен к

маслу чайного дерева (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) (*In vitro* sensitivity of *Alternaria solani*..., 2015).

В 2016 году в условиях *in vitro* были проведены исследования влияния 11 водных экстрактов лекарственных растений на развитие фитопатогенных грибов *Alternaria* sp. Наибольшей эффективностью ингибирования мицелия обладали водные настои ромашки лекарственной (37,4 %), плюща обыкновенного (22,7 %) тысячелистника обыкновенного (14,8 %) (Эффективность фунгицидного действия..., 2017).

Оценено влияние растительных экстрактов на рост мицелия *Alternaria solani* *in vitro*. Исследование проводили на чашках Петри методом «отравленного субстрата» (poison food technique). Результаты показали, что максимально эффективными были экстракт дурмана (*Datura fastosa*) (80,78 %), партениума позднеспелого (*Parthenium hysterophorus*) (76,48 %), акирантеса (*Achyranthus aspera*) (69,66 %), ивы (*Salix* sp.) (65,14 %) и физалиса наименьшего (*Physallis minima*) (49,53 %). Таким образом, экстракты дурмана и партениума могут стать возможными источниками для получения новых и эффективных биофунгицидов для борьбы с *A. solani* на различных культурах (*In vitro* antifungal activities..., 2017).

Наряду с использованием биометода на основе применения биофунгицидов в контроле альтернариозов, имеются сообщения о разработке биологического метода, базирующегося на использовании иммуноиндукторов или индукторов болезнестойчивости (неспецифической устойчивости) растений.

Состояние растения-хозяина оказывает огромное влияние на характер патогенеза альтернариевых грибов. Ослабленные растения, с пониженным адаптивным потенциалом сильнее поражаются данной группой возбудителей. Поэтому разработка мер повышения иммунного статуса растений обязательно должна рассматриваться в программах контроля альтернариозов.

По мере преодоления патогенными микроорганизмами внешних барьеров растения: кутикулярного, суберинового слоя, клеточной стенки – клетка должна «почувствовать» опасность и включить систему реагирования. Растение

распознает определенные молекулы (элиситоры), присущие микроорганизмам (MAMPs, microbe-associated molecular patterns), как сигнал, запускающий иммунную защиту. К настоящему времени уже выявлен ряд соединений, индуцирующих устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды: флагелин, фактор элонгации бактерий, хитин, глюкан, ксиланаза, некоторые липофильные соединения, например, арахидоновая кислота и эргостерол (MAMP (microbe-associated molecular pattern)..., 2013).

Исследования взаимосвязи между растением-хозяином и паразитом показали, что растения в процессе культивирования утратили способность вовремя запускать иммунный ответ. Для того, чтобы активировать защитные реакции растения, используют элиситоры – метаболиты грибного и бактериального происхождения. Эти вещества действуют как сигнальные молекулы и запускают последовательность иммунных реакций растения. Наиболее активными индукторами сопротивления являются некоторые полисахариды: глюканы, хитин и хитозан. Авторы считают, что при разработке индукторов устойчивости растений к болезням приоритетными в качестве элиситоров должны быть глюканы, способные включать гены устойчивости и приводить к увеличению синтеза глюканаз и других фитоалексинов. Исследования группы ученых были направлены на поиск биологически активных глюканов у высших базидиальных грибов. На основе глюканов трутовика обыкновенного (*Fomes fomentarius* (L.) Fr.) создан препарат Микосан-Н для предпосевной обработки семян и Микосан-В для обработки растений в период вегетации. В настоящее время он разрешен для применения на однолетних культурах - пшенице, ячмене, горохе, кукурузе, сахарной свекле, а также на многолетних культурах – на яблоне (Препараты нового поколения..., 2002; Горовой, 2005).

Салициловая кислота как элиситор признана лучшим средством для снижения заболеваемости горчицы альтернариозом (*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc.). Было обнаружено, что другие несколько веществ тоже значительно снижают развитие альтернариоза: хитозан, β -аминомасляная кислота, 2,6-

дихлоризоникотиновая кислота. Влияние соединений-элиситоров на урожайность также было изучено. Обработки салициловой кислотой дают максимальную урожайность. Хитозан оказался лучшей альтернативой салициловой кислоте в качестве химического элиситора, повышающего урожайность и снижающего заболеваемость (Mamgain et.al., 2019).

Вне- и внутриклеточные метаболиты бактерий *Pseudomonas putida* F19 и *P. aurantiaca* B-162 индуцируют системную устойчивость к альтернариозам у сельскохозяйственных растений. При исследовании элиситорных свойств комплексов внеклеточных бактериальных метаболитов высокая биологическая активность наблюдалась у препарата на основе *P. aurantiaca* B-162: снижение заболеваемости более чем на 30 % зафиксировано у шести видов растений (петрушки, рапса, моркови, огурцов, капусты и редьки), в то время как внеклеточные метаболиты *P. putida* F19 значительно снижали поражаемость альтернариозом у четырех исследованных видов: рапса, моркови, томатов и редьки (Феклистова и др., 2013).

2 УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Условия проведения исследований

Место проведения исследований. Лабораторные исследования проводились в лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов и ЦКП ФГБНУ СКФНЦСВВ. Молекулярно-генетическая идентификация патогенных видов – возбудителей некротической листовой пятнистости винограда проводилась с применением метода молекулярно-генетических исследований в лаборатории ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (г. Москва). Работа с коллекцией штаммов-антагонистов проводилась в лаборатории биометода ФНЦ ВНИИМК (Краснодар). Полевые исследования проводились на виноградниках ООО агрофирмы «Южная», Темрюкский район, Краснодарский край. Фитосанитарный мониторинг и отбор биологических образцов проводили в отделениях ООО агрофирмы «Южная» – отд. №1 (п. Кучугуры), отд. №3 (ст. Курчанская), а также на Анапской ампелографической коллекции (АЗОСВиВ). Опыты по разработке мер борьбы с некротической листовой пятнистостью винограда проводились на стационарном участке сорта Бианка в отделении № 3 ООО агрофирмы «Южная».

Краснодарский край является основным регионом виноградовинодельческой продукции РФ. Его почвенно-климатические условия благоприятны для промышленного возделывания сортов разных направлений использования и различных сроков созревания (Виноградарство России: настоящее и будущее, 2004). Климатические условия региона характеризуются высокой суммой активных температур (3400-3600 С) и оптимальным распределением их по месяцам. Сумма годовых осадков составляет 350-647 мм, средняя годовая влажность воздуха 70 %, длительность вегетационного периода 170-240 дней, максимум положительных температур +42,0°С, отрицательных - 36,7°С (Петров и др., 2020).

2.2 Объекты исследований

Объектами исследования являлись технический сорт винограда – Бианка, комплекс грибных возбудителей некротической листовой пятнистости винограда, экспериментальные фунгициды различной природы (химические, биологические).

Характеристика сорта винограда Бианка. Технический сорт раннего срока созревания, сложный межвидовой гибрид европейско-американского происхождения – Виллар блан (генетическая формула 56,19 % *Vitis vinifera* + 3,13 % *Vitis labrusca* + 29,16 % *Vitis rupestris* + 6,25 % *Vitis berlandieri* + 5,28 % *Vitis lincecumii*) × Шасла бувье (Венгрия). Ягоды средней величины, белые, округлые, вкус гармоничный с лёгким цветочным ароматом. Сорт обладает высоким сахаронакоплением (до 24-26%) при сохранении титруемой кислотности 8-9 ‰. Морозоустойчивость –25...–27 °С. Грозди среднеплотные, цилиндрической формы, средний вес грозди 120 г. Органолептическая оценка виноградных материалов сорта на заседании дегустационной комиссии ФГБНУ СКФНЦСВВ составляет 7,4-8,0 баллов.

Возбудители некротической листовой пятнистости винограда, листья растений винограда, химические фунгициды (в том числе зарегистрированные в «Списке...» (Список пестицидов и агрохимикатов..., 2018, 2019, 2020, 2021) и экспериментальные) и различные штаммы-продуценты антибиотической микрофлоры из коллекции ООО Биотехагро (г. Тимашевск) с титрами не менее 1×10^9 КОЕ/мл, антагонисты из коллекции лабораторий ФГБНУ СКФНЦСВВ и ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК.

2.3 Методы исследований

Мониторинг динамики развития и распространения некротической листовой пятнистости винограда для определения характера патогенеза в зависимости от абиотических условий и элементов агротехники проводили регулярно методом маршрутных обследований на поражаемом сорте Бианка в

промышленных насаждениях ООО «Южная» (отделение № 3, ст. Курчанская) по методике ВИЗР (2009) (Доспехов, 2014; Методическое и аналитическое обеспечение..., 2010; Методика выявления и учета..., 1971; Методические указания..., 1979).

Выделение культур грибов осуществляли из листьев винограда с признаками поражения некротической листовой пятнистости, а также из образцов лозы и почек (зимующий запас инфекции) (Методы экспериментальной микологии, 1973; Пидопличко, 1977; Благовещенская, 2017; Новое в систематике..., 2003).

Грибы, входящие в микопатоккомплекс некротической листовой пятнистости, были выделены с инфицированных листьев методом тканевых фрагментов (Reactive oxygen species..., 2020). Для выделения грибов использовали агаризованные питательные среды – картофельную, картофельно-сахарозную, картофельно-морковную. Чашки Петри с указанными средами асептически инокулировали небольшими сегментами некротизированной ткани листьев вместе со здоровыми участками. Посевы культивировали 5-7 дней при температуре 25°C. Выросшие колонии грибов идентифицировали по определителям (Simmons, 2007; Саттон и др., 2001). Частоту встречаемости микромицетов (А) определяли по формуле (1) (Болотянская, 2019):

$$A = (B/C) * 100 \%, \quad (1)$$

где В – число образцов, на которых вид обнаружен;

С – общее число проанализированных образцов.

Для выделения изолятов *Alternaria* пользовались методиками закладки образцов во влажную камеру и на чашки Петри с картофельно-морковным агаром (КМА). Перед закладкой поверхность растительного материала стерилизовали 70 % этанолом и промывали 2 часа под проточной водой для предотвращения загнивания. После закладки чашки Петри и влажные камеры выдерживали при 20-25 °С. Анализ спороношения проводили с использованием бинокля раз в

сутки до появления обильного спороношения возбудителя болезни. После обнаружения конидий под биноклем, приготавливали микропрепарат, который просматривали под микроскопом.

Построение обобщенной линейной модели для оценки динамики и развития и распространения болезни. Анализ данных проводился на языке Python. Для работы с таблицами использовался пакет *pandas*, для построения модели - пакет *statsmodels* (Seabold et.al., 2010), работа с матрицами проводилась с помощью пакета *patsy*, формула для расчета χ^2 использовалась из пакета *scipy*, для визуализации результатов и построения графиков использовался пакет *plotly*. Регрессия развития и распространения альтернариоза строилась методом обобщенной линейной модели с Пуассоновским распределением отклика. Была использована обобщенная модель, поскольку развитие и распространение болезни имеют накопительную природу, ее динамика прогрессирует во времени, а значит, может быть описана логарифмически. Также распределение Пуассона более характерно для моделирования оцениваемых счетных показателей поражения болезнью (Agresti, 2015). Для выявления наличия избыточности дисперсии в модели находилось частное суммы квадратов остатков Пирсона и степеней свободы остатков этой модели по формуле (2):

$$\frac{pearson_Chi^2}{residuals} \quad (2)$$

В случае сильных отклонений дисперсии использовалось так называемое квази-пуассоновское выравнивание (Sellers et.al., 2017; Dean et.al., 2016) – были взяты произведения квадратов μ на квадраты разности единицы и μ (формула (3):

$$\mu^2 * (1 - \mu)^2 \quad (3)$$

Для подтверждения значимого влияния оцениваемого показателя рассчитывалось р-значение критерия χ^2 отношения логарифмов правдоподобия

двух моделей: модели с включенным оцениваемым параметром и без него (формула (4):

$$2(\ln L_{FullModel} - \ln L_{ResidualModel}) \quad (4)$$

Разницу логарифмов правдоподобия аппроксимировали распределением χ^2 с числом степеней свободы, равным разнице факторов, полной и вложенной моделей (модели с включенным оцениваемым параметром и без него), формула (5):

$$dfM_{FullModel} - dfM_{ResidualModel} \quad (5)$$

Для оценки качества модели, находили долю объясненной девиансы (аналог R^2 для логарифмических моделей), рассчитанную как разность нулевой девиансы с остаточной девиансой модели, деленное на нулевую девиансу, формула (6):

$$\frac{\text{null_deviance} - \text{residual_deviance}}{\text{null_deviance}} \quad (6)$$

Построение моделей проводилось и представлено согласно приведенному протоколу (Zuur et.al., 2016).

При построении функции регрессии, в качестве зависимого фактора выступают количественные непрерывные показатели развития и распространения болезни. В качестве предикторов модели использовались следующие типы факторов: количественный дискретный – период учета; качественные - год учета, ярус побега, тип культивирования.

Формула модели имела следующий вид (7):

$$'R; P \sim \text{период учета} + \text{год} + \text{ярус} + \text{тип культивирования}' \quad (7)$$

При изучении морфолого-культуральных свойств изолятов *Alternaria sp.* в лабораторных условиях был проведен посев на разные питательные среды – КМА (картофельно-морковный агар), ТА (томатный агар), овощная среда V8 (Лёвкина и др., 2003) Анализ роста изолятов проводили на 10-е сутки согласно рекомендациям Симмонса (2007). Радиальную скорость роста и ростовой коэффициент изолятов *Alternaria* на разных питательных средах определяли согласно методике Бухало А.С. (1988). Данная методика позволяет учесть несколько характеристик роста культур и способствует получению более адекватных данных. Учёт роста диаметра колонии, высоты мицелия и плотности колонии проводили на 7-е сутки.

Ростовой коэффициент рассчитывали по формуле (8):

$$PK = D * h * g / t, \quad (8)$$

где D – диаметр колонии, мм;

h – высота мицелия, мм;

g – плотность колонии, балл;

t – возраст колонии, сутки.

Радиальную скорость роста колонии возбудителя определяли по формуле (9):

$$PCP = (R_2 - R_1) / (t_2 - t_1), \quad (9)$$

где R₂ – радиус колонии на момент учета, мм;

R₁ – радиус инокуляционного блока, мм;

t₂, t₁ – начальное и конечное время культивирования, сутки.

Анализ микроструктур проводили согласно общепринятым методикам – методом раздавленной капли (Благовещенская, 2017); определение габитуса

спороношения – методом микроскопирования агарового блока на предметном стекле без покровного стекла.

Выделение ДНК проводили по модифицированной методике (Molecular Detection and Characterization..., 2016). Качество выделенной ДНК было проверено с помощью электрофоретического анализа и спектрофотометра. Молекулярно-генетическую идентификацию проводили методом ПЦР на 5 генов: ITS (внутренний транскрибируемый спейсер) (38 - Amplification and direct sequencing..., 1990), GAPDH (ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы) (Berbee et.al., 1999), Alt a1 (ген главного аллергена *Alternaria alternata*) (Identification of *A. arborescens*..., 2017), tub (ген β -тубулина) (Multiple evolutionary origins..., 1998), tef (фактор элонгации трансляции 1 альфа) (*Alternaria species associated*..., 2019) (таблица 1).

Таблица 1 – Используемые в исследовании праймеры и условия ПЦР для них

Ген	Праймеры	Условия ПЦР
ITS-регион	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	94°C – 2 мин., 35×(94°C – 30 сек., 38°C – 1 мин., 72°C – 2 мин.), 72°C – 5 мин.
Alt a1	Alt-For ATGCAGTTCACCACCATCGC, Alt-Rev ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC	94°C – 3 мин., 40×(94°C – 40 сек., 58°C – 40 сек., 72°C – 40 сек.), 72°C – 5 мин.
gpd	gpdF CAACGGCTTCGGTTCGCATTG, gpdR GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	95°C – 30 сек., 44×(94°C – 15 сек., 50°C – 30 сек., 68°C – 3 мин.), 72°C – 15 мин.
β -тубулин	T1 AACATGCGTGAGATTGTAAGT, T22 TCTGGATGTTGTTTGGGAATCC	94°C – 5 мин., 40×(94°C – 35 сек., 56°C – 1 мин., 72°C – 2 мин.), 72°C – 10 мин.
TEF 1 α	Alt-tef1 CTTGGAGGGAACCATCTTGA Alt-tef2 CTGGTACAAGGGTTGGGAGA	95°C – 2 мин., 40×(94°C – 30 сек., 55°C – 30 сек., 72°C – 50 сек.), 72°C – 7 мин.

В опыте на патогенность *in vitro* из свежесобранных листьев винограда пробочным сверлом вырезали диски диаметром 40 мм и раскладывали на влажную стерильную фильтровальную бумагу. С помощью пипетки инокулировали поверхность дисков споровой суспензией изолятов *Alternaria*. Концентрация спор конидиальной суспензии составляла 1×10^6 конидий/мл. Чашки Петри с инокулированным листовым материалом инкубировали при температуре 25°C. Степень патогенности определяли в зависимости от площади поражения поверхности листовых дисков. Размер некрозов отмечали на 3, 5 и 7 сутки от момента инокуляции. При отсутствии некрозов штамм признавали непатогенным. Штаммы, заражение которыми сопровождалось появлением мелких точечных некрозов на поверхности листовых дисков, считали слабо патогенными. Штаммы, вызывающие некротизацию 10-30 % площади дисков, считали умеренно патогенными, более 50% – высокопатогенными.

Изучение антифунгальной активности биологических и химических фунгицидов в лабораторных условиях проводили с помощью диффузного метода (метод бумажных дисков) по общепринятой методике (Сэги, 1979). Для исследований были взяты 2 штамма рода *Alternaria* с доказанной патогенностью – А-429-2, А-425-3. Список исследуемых фунгицидов представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Список исследуемых фунгицидов

№ п/п	Класс химических веществ	Действующее вещество	Зарегистрированное в РФ название фунгицида, препаративная форма	Норма расхода, л, кг/га
1	2	3	4	5
1	Триазолы	250 г/л дифеноконазол	Скор, КЭ	0,4
2		60 г/л дифеноконазол + 30 г/л цифлufenамид	Динали, ДК	0,7
3		125 г/л тетраконазол	Домарк, КЭ	0,32
4		250 г/л тебуконазол	Колосаль, КЭ	0,4
5		120 г/л пропиконазол+ 60 г/л флутриафол+ 30 г/л дифеноконазол	Капелла, МЭ	1,3
6		400 г/л масло чайного дерева+ 150 г/л дифеноконазол	Шриланк, КМЭ	0,7
7	Стробилурины	250 г/л азоксистробин	Квадрис, СК	0,8
8		50 г/кг пираклостробин + 550 г/кг метирам	Кабрио Топ, ВДГ	2,0

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
9	Стробилурины	250 г/л азоксистробин	Интрада, СК	0,6
10		500 г/кг крезоксим-метил	Строби, ВДГ	0,2
11	Дитиокарбаматы	750 г/кг манкоцеб	Фортуна Глобал, ВДГ	3,0
12		800 г/кг манкоцеб	Дитан М-45, СП	3,0
13		640 г/кг манкоцеб+ 40 г/кг мефеноксам	Ридомил Голд МЦ, ВДГ	2,5
14	Морфолины (производные коричной кислоты) + прочие вещества	200 г/л диметоморф + 200 г/л флуазинам	Инсайд, СК	1,2
15	Препараты меди	861 г/кг меди хлорокись	Хом, СП	3,6
16		576 г/кг меди гидроокись	Чемп, ВДГ	3,0
17		345 г/л сульфат меди трехосновный	Купроксат, КС	6,0
18	Пиридил-этил бензамиды	125 г/л флуопирам + 375 г/л пириметанил	Луна Транквилити, КС	1,2
19	Фенилпирролы анилинопиримидины	250 г/кг флудиоксонил + 375 г/кг ципродинил	Свитч, ВДГ	1,0
20	Оксазолидиндионы и пиперидинил тиазол изоксазолины	30 г/л оксатиапипролин + 300 г/л фамоксадон	Зорвек Энкантия, СЭ	0,8
21	Гидроксианилиды	500 г/кг фенгексамид	Тельдор, ВДГ	1,2
22		240 г/л масло чайного дерева	АВГ-0297	2,0
23	Фталимиды	500 г/л каптана	Каперанг, КС	3,0
24		25 г/л циазофамид + 250 г/л динатрий фосфонат	Милдикат, КС	3,0

Для приготовления рабочих растворов исходные биопрепараты препараты разбавляли стерильной водой до нужной концентрации. Эффективность оценивали в рекомендованных производителями концентрациях биопрепаратов – 2 мл/л и 4 мл/л. Диагностическим признаком для определения степени эффективности препаратов являлась ширина зоны подавления роста тест-культуры вокруг бумажных дисков. Для оценки эффективности химических и биопрепаратов использовали шкалу, представленную в таблице 3.

Таблица 3 – Шкала лабораторной оценки антифунгальной эффективности препаратов, 2019-2021 гг.

Зона подавления роста колоний тест-объекта		
Степень	В баллах	В мм
Очень высокая	4	от 50
Высокая	3	20-50
Средняя	2	5-19
Низкая	1	Менее 5
Отсутствие эффекта	0	0

Оценка антимикотической активности антагонистов. Культуры возбудителей и антагонистов предварительно выращивали порознь на чашках Петри с картофельно-сахарозным агаром. Время культивирования штаммов *Alternaria sp.* составляло 7 дней. Культивирование штаммов-антагонистов проводили в течение 14 дней. Антагонистическую активность грибов и бактерий проводили с использованием метода встречных культур. Для этого предварительно стерильным сверлом (диаметр 6 мм) вырезали блоки с фрагментом колонии антагониста и отдельно с мицелием патогена. Далее стерильной петлей над пламенем спиртовки помещали 2 вырезанных блока с мицелием в 1 чашку Петри на расстоянии 6 см. В качестве контроля выступали культуры антагонистов и патогенов, посеянные отдельно. Анализ роста культур проводили на 10 сутки культивирования. Учеты проводили на 10 сутки культивирования. Отмечали рост патогена и антагониста в см² и % от площади чашки Петри (конкуренция за площадь питания) и характер их взаимодействия: наличие или отсутствие зон задержки роста в результате деятельности гидролитических ферментов или веществ антибиотической природы (стерильная зона, мм); нарастание антагониста на колонию патогена (гиперпаразитическая зона, см²); нарастание колонии патогена на колонию антагониста, см² (Первичный скрининг грибных штаммов антагонистов..., 2020). Повторность опыта – четырёхкратная.

В исследованиях устанавливали антимикотическую активность штаммов коллекции лаборатории ФГБНУ СКФНЦСВВ – Т-213, Т-338, Т-404/1, Т-441/1, Т-503 (таблица 4) и коллекции лаборатории биометода ВНИИМК (таблица 5) (Первичный скрининг грибных штаммов антагонистов..., 2020, Первичный скрининг бактериальных штаммов антагонистов..., 2020).

Таблица 4 – Происхождение штаммов рода *Trichoderma* sp., 2021 г.

№ п/п	Название штамма	Дата выделения	Место выделения	Вид биообразца	Сорт
1	T-213	20.06.2018	ООО АФ Южная, отд. 3	гроздь	Левокумский
2	T-338	21.05.2020	Краснодар, приусадебный виноградник	листья	Киш Миш
3	T-404/1	10.07.2020	ООО АФ Южная, отд. 1	гроздь	Алиготе
4	T-441/1	6.08.2020	ООО АФ Южная, отд. 3	гроздь	Ритон
5	T-503	28.09.2020	Краснодар, приусадебный виноградник	гроздь	Тана 22

Таблица 5 – Коллекция испытываемых штаммов микроорганизмов лаборатории биометода ВНИИМК, 2020 г.

№	Грибные штаммы	Бактериальные штаммы	
		p. <i>Bacillus</i>	p. <i>Pseudomonas</i>
1	2	3	4
1	T-1 <i>Trichoderma</i> sp.	01 кор. f <i>Bacillus</i> sp.	Sgc-1 <i>Pseudomonas</i> sp.
2	T-2 <i>Trichoderma</i> sp.	D-10 <i>Bacillus</i> sp.	12-2 <i>Pseudomonas</i> sp.
3	T-3 <i>Trichoderma</i> sp.	D 1-1 <i>Bacillus</i> sp.	13-2 <i>Pseudomonas</i> sp.
4	T-4 <i>Trichoderma</i> sp.	Fa 4-1 <i>B. subtilis</i>	15-1 <i>Pseudomonas</i> sp.
5	T-5 <i>Trichoderma</i> sp.	Fa 4-2 <i>Bacillus</i> sp.	Sgrc-1 <i>Pseudomonas</i> sp.
6	Tk-1 <i>Trichoderma</i> sp.	5-3 <i>Bacillus</i> sp.	14-3 <i>Pseudomonas</i> sp.
7	Pk-1 <i>Penicillium</i> sp.	D 7-1 <i>B. subtilis</i>	14-4 <i>Pseudomonas</i> sp.
8	M-24 <i>Penicillium</i> sp.	D 7-3 <i>Bacillus</i> sp.	16-2 <i>Pseudomonas</i> sp.
9	Pv-3 <i>Penicillium</i> sp.	Fz 9 <i>Bacillus</i> sp.	Oif 2-1 <i>Pseudomonas</i> sp.
10	Pf-1 <i>Penicillium</i> sp.	Б (2-1) <i>Bacillus</i> sp.	
11	Pbc-1 <i>Penicillium</i> sp.	Б-2 <i>Bacillus</i> sp.	
12	Pr-1 <i>Penicillium</i> sp.	Б-5 <i>Bacillus</i> sp.	
13	Pp-1 <i>Penicillium</i> sp.	Б-12 <i>Bacillus</i> sp.	
14	Av-1 <i>Aspergillus</i> sp.	D 1-3 <i>Bacillus</i> sp.	
15	Af-1 <i>Aspergillus</i> sp.	3-1 <i>Bacillus</i> sp.	
16	An-1 <i>Aspergillus</i> sp.	3-2 <i>Bacillus</i> sp.	
17	Tr-1 <i>Trichothecium</i> sp.	3-3 <i>Bacillus</i> sp.	
18	Xk-1 <i>Chaetomium</i> sp.	1a <i>Bacillus</i> sp.	
19	Xk-2 <i>Chaetomium</i> sp.	К 1-1 <i>Bacillus</i> sp.	

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4
20	Хк-3 <i>Chaetomium</i> sp.	Р-9 <i>Bacillus</i> sp.	
21	Хк-4 <i>Chaetomium</i> sp.	11-1 <i>Bacillus</i> sp.	
22	SM-1 <i>Sordaria</i> sp.	11-3 <i>Bacillus</i> sp.	
23	A-1 <i>Basidiomycota</i>	ВВ (С) <i>Bacillus</i> sp.	
24	И-3 <i>Basidiomycota</i>	5Б-1 <i>Bacillus</i> sp.	
25	Tt-1 <i>Talaromyces</i> sp.		
26	Ma-1 <i>Metarhizium</i> sp.		

Содержание пигментов, оводненность. Относительное содержание воды (RWC) в листьях винограда устанавливали по общепринятой методике (Leaf gas exchange..., 1998). Изменение активности фотосинтеза под воздействием стрессового фактора определяли по содержанию суммы хлорофиллов a+b (Chl a+b). Содержание хлорофиллов определяли спектрофотометрическим методом (Lichtenthaler et.al., 2001). Содержание пигментов (хлорофилл a + b) определяли спектральным методом на приборе UNICO 2800 («United Products & Instruments@, США). Для статистического анализа использовали программу Statistika-99.

Определение содержания аминокислот. Аминокислоты определяли в ЦКП ФГБНУ СКФНЦСВВ (г. Краснодар, Россия) методами спектрофотометрии и капиллярного электрофореза, с использованием методик (Design of experiments for amino acid..., 2017; Low-Temperature stress tolerance..., 2019; Peptide and Amino Acids..., 2012; Structural and functional characteristics..., 2017).

Для определения показателей урожайности и качества урожая использовали отраслевые методики. Для характеристики среднего веса грозди брали пробу из 200 гроздей с каждого опытного варианта и взвешивали в лабораторных условиях (Агротехнические исследования..., 1978).

На стационарном участке наиболее поражаемого сорта Бианка испытывали различные схемы защиты винограда в течение 3-х лет в мелкоделяночных опытах. Размер опытной делянки – 80 кустов. Одна повторность – 20 кустов. Схема посадки 4x4. Формировка – кордон обыкновенный. Общая площадь стационарного участка сорта Бианка – 19 га. Всего 625 кустов на 1 га. Схема

мелкоделяночного опыта включала 4 варианта – контроль, вариант химической защиты (стандарт) – без обработок препаратами против некротической листовой пятнистости, вариант химической защиты с обработками экспериментальными препаратами против некротической листовой пятнистости (вариант 1), вариант биологизированной защиты (вариант 2). Мелкоделяночный опыт проводили в 4-х кратной повторности. Обработки проводились в течение сезона с мая по август с интервалом 8-10 дней, всего 10 туров обработок (таблица 6).

Таблица 6 – Схема опыта

Последовательность обработок препаратами в экспериментальных схемах защиты от некротической листовой пятнистости			
1	2	3	4
Контроль – без обработок	Химическая защита (стандарт)	Химическая защита (опыт 1)	Биологизированная защита (опыт 2)
	Полирам (700 г/кг метирама) (2,5 кг/га)	Полирам (700 г/кг метирама) (2,5 кг/га)	Полирам (700 г/кг метирама) (2,5 кг/га)
	Рapid Голд, СП (640 г/кг манкоцеба + 80 г/кг цимоксанила), 1,5 кг/га	Скор, КЭ (250 г/л дифеноконазола), 0,4 л/га	Скор, КЭ (250 г/л дифеноконазола), 0,4 л/га
	Кабрио Топ, ВДГ (50 г/кг пираклостробина + 550 г/кг метирама), 2,0 кг/га	Кабрио Топ, ВДГ (50 г/кг пираклостробина + 550 г/кг метирама), 2,0 кг/га Свитч, ВДГ (250 г/кг флудиоксонила + 375 г/кг ципродинила), 1,0 л/га	Кабрио Топ, ВДГ (50 г/кг пираклостробина + 550 г/кг метирама), 2,0 кг/га Свитч, ВДГ (250 г/кг флудиоксонила + 375 г/кг ципродинила), 1,0 л/га
	Талендо, КЭ (200 г/л проквиназида), 0,2 л/га	Колосаль, КЭ (250 г/л тебуконазола), 0,4 л/га	Колосаль, КЭ (250 г/л тебуконазола), 0,4 л/га
	Динали, ДК (60 г/л дифеноконазола + 30 г/л цифлуфенамида), 0,6 л/га	Динали, ДК (60 г/л дифеноконазола + 30 г/л цифлуфенамида), 0,6 л/га Рapid Голд, СП (640 г/кг манкоцеба + 80 г/кг цимоксанила), 1,5 кг/га.	Динали, ДК (60 г/л дифеноконазола + 30 г/л цифлуфенамида), 0,6 л/га Рapid Голд, СП (640 г/кг манкоцеба + 80 г/кг цимоксанила), 1,5 кг/га.

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4
	Танос, ВДГ (250 г/кг фамоксадона + 250 г/кг цимоксанила), 0,4 кг/га	Скор, КЭ (250 г/л дифеноконазола), 0,4 л/га Луна Транквилити, КС (125 г/л флуопирама + 375 г/л пириметанила), 1 л/га	БСка-3, Ж (<i>Trichoderma viride</i> 838 (ВКПМ F-838), в пересчете на сухое вещество - не менее 1,5 г/дм ³ ; <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> (ВКПМ В-118А) - 2,5x10 ⁸ КОЕ/см ³ ; <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> КС-2 (ВКПМ КС-2 В-11141) - 2,5x10 ⁸ КОЕ/см ³ , БФТИМ, Ж (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> КС-2 (ВКПМ КС-2 В-11141)
	Кумулус, ВДГ (800 г/кг серы), 0,4 кг/га	Квадрис, СК (250 г/л азоксистробина), 0,8 л/га Рapid Голд, СП (640 г/кг манкоцеба + 80 г/кг цимоксанила), 1,5 кг/га	БСка-3, Ж (2,5 л/га), БФТИМ, Ж (3,0 л/га)
Контроль – без обработок	Рapid Голд (640 г/кг манкоцеба + 80 г/кг цимоксанила), 1,5 кг/га	Луна Транквилити, КС (125 г/л флуопирама + 375 г/л пириметанила), 1 л/га	БСка-3, Ж (2,5 л/га), БФТИМ, Ж (3,0 л/га)
	Кантус, ВДГ (500 г/кг боскалида), 1,0 л/га	Рapid Голд, СП (640 г/кг манкоцеба + 80 г/кг цимоксанила), 1,5 кг/га	БСка-3, Ж (2,5 л/га), БФТИМ, Ж (3,0 л/га)
	Кумулус, ВДГ (800 г/кг серы), 0,4 кг/га	Кумулус, ВДГ (800 г/кг серы), 0,4 кг/га	
	Кантус, ВДГ (500 г/кг боскалида), 1,0 л/га		

Биологическую эффективность фунгицидов отдельно и схем защиты от некротической листовой пятнистости в целом оценивали по фитосанитарным и агробиологическим параметрам. По результатам балльной оценки пораженных растений определяли развитие болезни по формуле (10) (Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов..., 2009):

$$R = \Sigma (a \times b) \times 100 / N \times K, \quad (10)$$

где R – развитие болезни, %;

$\Sigma (a \times b)$ – сумма произведений числа больных растений (a) на соответствующий им балл поражения (b);

N – общее число растений в пробе (больных и здоровых);

K – высший балл шкалы учета.

Биологическую эффективность экспериментальных фунгицидов и схем защиты рассчитывали по формуле Аббота (11) (Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов..., 2009):

$$\text{Э \%} = (K - O / K) \times 100, \quad (11)$$

где Э – биологическая эффективность, %;

K – развитие болезни в контроле (без обработки), %;

O – развитие болезни в испытываемом варианте после обработки, %

Определение экологической безопасности фунгицидов. Одним из важных критериев отбора и оценки препаратов по санитарной, экологической и токсикологической безопасности необходимо считать интегральный показатель - токсическая нагрузка (ТН), выражаемая количеством полулетальных доз для теплокровных животных, вносимых на гектар площади в процессе однократной обработки пестицидом. Чем меньше этот показатель, тем более экологичен и приемлем данный препарат. Этот дополнительный показатель рассчитывали для определения степени опасности выбранных для исследования фунгицидов для теплокровных животных и человека. Расчёт проводили по формуле, предложенной Ю.Н. Фадеевым (1988):

$$\text{ТН} = \frac{\text{Норма применения действующего вещества (в } \frac{\text{МГ}}{\text{Га}})}{\text{ЛД50 (} \frac{\text{МГ}}{\text{КГ}})}$$

По показателю токсической нагрузки выделяют четыре класса опасности пестицидов:

I – малоопасные, при применении которых ТН не превышает 100 полулетальных доз на га;

II – умеренно-опасные (ТН от 100 до 1000 полулетальных доз на га);

III – опасные (ТН 1000 до 10000 полулетальных доз на га);

IV – особо опасные, применение которых создают ТН на гектар более 10000 полулетальных дозировок (Долженко Т.В. и др., 2006, 2009).

Опасность изучаемых фунгицидов для пчёл определяли по соответствующему расчётному показателю - коэффициенту опасности (Зинченко В.А., 2012). Для почвы сравнительную оценку опасности изучаемых фунгицидов рассчитывали по показателю экологической нагрузки – ЭН (Долженко Т.В. и др., 2006).

Для расчётов вышеуказанных токсикологических показателей использовали следующие справочные данные по действующим веществам изученных фунгицидов (таблица 7).

Таблица 7 – Основные токсикологические характеристики действующих веществ изученных фунгицидов (The Pesticide Manual, 2003; <http://rupest.ru/>; https://commission.europa.eu/index_en, <https://sitem.herts.ac.uk/>)

Название действующего вещества	ЛД ₅₀ пероральная для теплокровных и человека, мг/кг	ЛД ₅₀ дермальная для теплокровных и человека, мг/кг	ЛД ₅₀ для пчёл, мкг/пчелу	Т ₅₀ в почве, недель
1	2	3	4	5
Азоксистробин	5000,0	2000,0	25,0	25,8
Боскалид	5000,0	2000,0	166,0	29,7
Дифеноконазол	1453,0	2010,0	177,0	13,1
Манкоцеб	5000,0	2000,0	110,0	0
Метирам	5000,0	2000,0	80,0	1,0
Пиракlostробин	5000,0	2000,0	110,0	4,8
Пириметанил	4150,0	5000,0	100,0	4,5
Проквиназид	4846,0	5000,0	125,0	3,2

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5
Сера	2000,0	2000,0	100,0	0
Тебуконазол	1700,0	2000,0	83,1	6,0
Фамоксадон	5000,0	2000,0	63,0	2,9
Флудиоксонил	5000,0	2000,0	100,0	6,1
Флуопирам	2000,0	2000,0	102,3	17,0
Цимоксанил	960,0	2000,0	85,3	0,5
Ципродинил	2000,0	2000,0	112,5	6,4
Цифлufenамид	5000,0	2000,0	100,0	3,6

Экономическую эффективность экспериментальных схем защиты устанавливали по уровню рентабельности. Уровень рентабельности применения схем защиты рассчитывали по формуле (12) (Минаков И.А. и др., 2004):

$$P_x = \frac{ЧД_d}{З_d} * 100, \quad (12)$$

где P_x – уровень рентабельности, %;

$ЧД_d$ – дополнительный чистый доход, тыс. руб.;

$З_d$ – затраты на применение, тыс. руб.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Таксономическая структура микопатоксиса некротической листовой пятнистости винограда

Анализ литературы показал, что грибы рода *Alternaria* sp. в основном являются послеуборочными патогенами винограда. О листовых пятнистостях, их вредоносности, распространении данные крайне ограничены. Так, И.С. Попшой приводит краткие сведения о возбудителе альтернариоза винограда *Alternaria vitis* со ссылкой на F Cavara (1888). Ученый описал симптомы болезни как пепельные пятна вдоль жилок листьев с налетом конидиеносцев с цепочками конидий. В 1889 Cavara F. году отнес патоген к виду *Macrosporium vitis* (род впоследствии переименован в *Alternaria*). Другое исследование 1964 года показало, что описанный возбудитель не является специализированным видом *A. vitis*, а относится к виду *A. tenuissima* (Joly, 1964). Патогенность для винограда нового вида *A. viniferae*, выделенного в 2014 году Тао W.-С. с соавторами из цветоножек и рахисов виноградных гроздей, не доказана (*A new Alternaria species...*, 2014).

Виноградные грозди – скоропортящийся продукт с небольшим сроком годности из-за размягчения и опадания ягод, усыхания гребней, поражения ягод гнилями (*Biocontrol of postharvest Alternaria...*, 2019). Сильному поражению ягод во время созревания способствует их высокая оводненность и сахаристость. По оценкам экспертов, от 10 до 40% от общего объема произведенного столового винограда подвержены грибной инфекции, что приводит к значительным экономическим потерям (*Manual de poscosecha...*, 2019).

Симптомы развития альтернариевой гнили во время послеуборочного хранения, представляют собой твердые, темно-коричневые поражения на ягодах, обычно вблизи цветоножек; наличие серого мицелия на цветоножках

и ягодах. Представители рода *Alternaria* могут быть причиной латентной инфекции, при которой грибок проникает в ткани и остается в состоянии покоя до возникновения благоприятных условий для заражения. Исследования, проведенные в Аргентине в течение 2010-2012 годов, показали, что патоген *Alternaria* spp. был обнаружен в столовом винограде в высоком процентном соотношении и что он колонизирует ягоды, цветоножки и рахис в течение всего периода развития грозди. После сбора урожая возбудитель может оставаться в гроздях, поражая их; грибы *Alternaria* способны расти при низких температурах. Результаты исследований зарубежных ученых также показали, что штаммы *Alternaria alternata* выделяют микотоксины, которые обнаруживались в виноградных соках и вине (Mycobiota and toxicogenic *Alternaria* spp..., 2019). Более поздние исследования также сообщают, что грибы *Alternaria* являются одними из самых распространенных послеуборочных патогенов (Molecular explication of grape..., 2021).

Таким образом, результаты научного обзора показали, что сведений о листовых пятнистостях винограда, вызванных грибами *Altrernaria* spp., крайне мало.

В 2018 году на винограднике раннего технического гибридного сорта Бианка (Виллар блан+Шасла бувье), расположенном в отд. № 3 ООО «АФ «Южная» Темрюкского района Краснодарского края, обнаружена листовая пятнистость, похожая на описанные ранее симптомы альтернариоза. Заболевание развивалось в эпифитотийной форме на протяжении всей вегетации (рисунок 1).



Рисунок 1 – Начальные этапы патогенеза некротической листовой пятнистости винограда, сорт Бианка, Краснодарский край

Ранее возбудитель болезни был определен как *Alternaria tenuissima*, настоящее исследование проведено с целью уточнить таксономическую структуру патоконплекса (Юрченко др., 2011). Для установления биоэкологических особенностей пятнистости в период 2018-2021 гг. проведен регулярный мониторинг промышленных насаждений винограда в основной зоне виноградарства края – Анапо-Таманской.

Отборы листьев с типичными признаками некротической листовой пятнистости для лабораторного анализа микобиоты производились в течение вегетационных периодов 2018-2021 гг.

Установлено, что первые признаки некротических пятен появлялись в конце мая на молодых листьях винограда. Проявление болезни отмечалось только на ослабленных листьях нижнего яруса и протекало в сапротрофной форме. С повышением температуры воздуха и понижением относительной влажности отмечалось появление некротической листовой пятнистости в паразитической форме. В результате трехлетних наблюдений, распространение и развитие болезни, начиная с третьей декады июня приобретало эпифитотийный характер.

Установлено, что микопатокмплекс некротических пятен на листьях содержит около 13 видов мицелиальных грибов. Анализ показал, что частота их встречаемости неодинакова и варьирует по годам (Буровинская и др., 2021; 2022) (рисунок 2).

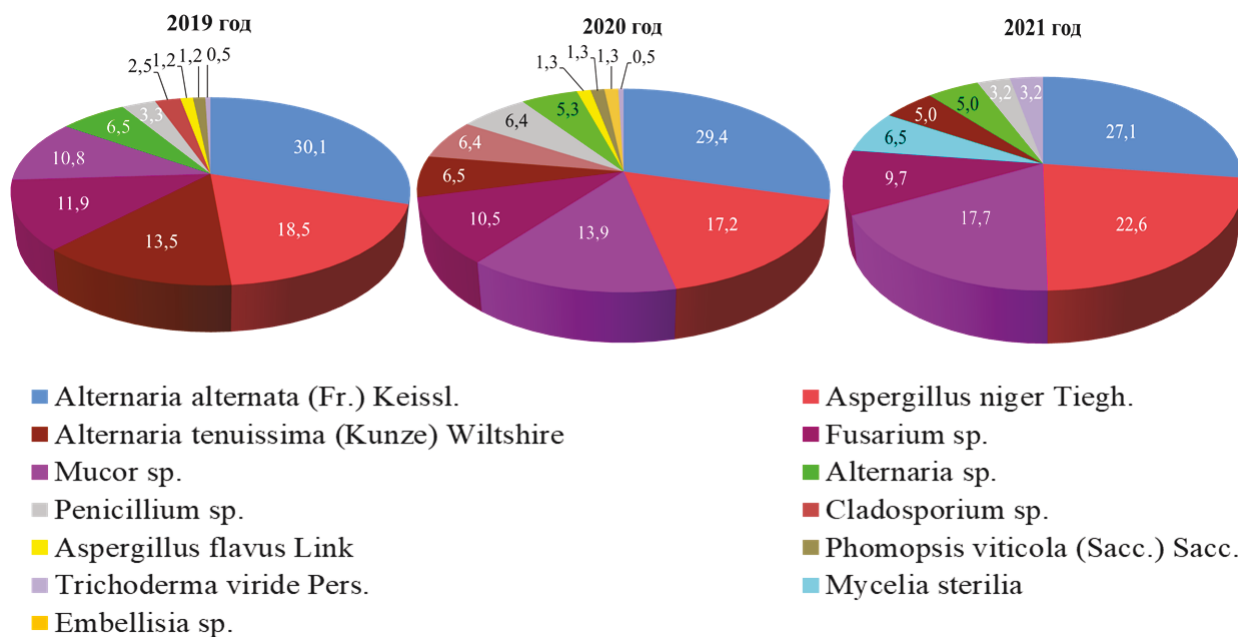


Рисунок 2 – Усредненная частота встречаемости микромицетов из патокмплекса некротической листовой пятнистости винограда за весь вегетационный период, Анапо-Таманская агроэкологическая зона, Западное Предкавказье, виноградники поражаемых сортов, 2019-2021 г.

Данные микроскопирования показали, что преобладающими микромицетами являлись виды рода *Alternaria* Nees. Из них наиболее распространены виды *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (27,1-30,1 %) и *A. tenuissima* (5,0-13,5 %), остальная доля приходится на другие виды *Alternaria* sp. (5,0-6,5 %). Часто встречались *Aspergillus niger* Tiegh. (17,2-22,6 %), *Mucor* Fresen. (10,8-17,7 %), *Fusarium* Link (9,7-11,9 %). К редко встречающимся грибам относятся *Penicillium* Link (5,7 %), *Cladosporium* Link (5,7 %). На долю остальных грибов в структуре патокмплекса приходится всего 7,7 %, включая *Aspergillus flavus* Link (1,4 %), *Embellisia* E.G. Simmons (2,8 %), *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc., (1,4 %) *Trichoderma* Pers. (1,4 %),

Trichothecium Link (0,7 %). Последние два микромицета, вероятнее всего, присутствуют в качестве эпифитной микрофлоры.

На основе анализа таксономического состава был сделан вывод, что микромицеты *Aspergillus niger* Tiegh., *Mucor* sp., *Fusarium* sp. присутствуют в качестве сопутствующих патогенных видов. При сильном ослаблении растения вследствие под влиянием негативных абиотических факторов, либо при сильном развитии доминирующего патогена *Alternaria* sp., они присоединяются к инфекции в качестве некротрофов.

В мониторинге динамики патоконплекса был проведен анализ его структуры в зависимости от погодных условий и старения листьев.

В течение вегетационных периодов 2019-2021 годов грибы *Alternaria* sp. и *Aspergillus niger* Tiegh. были доминирующими микромицетами в микопатоконплексе. В мае-июне, на молодых листьях, вместе с альтернариевыми грибами часто встречались *Aspergillus niger* Tiegh. (20,33 %) и *Fusarium* Link (13,37 %). В июле, который отличался пониженной влажностью и высокой температурой, количество аспергилловых грибов возрастало, но при этом снижался процент встречаемости *Alternaria* и *Fusarium*. В особенно жаркие периоды в посевах наблюдался только *Aspergillus niger* Tiegh. В августе-сентябре, на старых и ослабленных листьях, в микопатоконплексе значительно чаще встречался *Mucor* Fresen. (20,6 %), что также может говорить о его некротрофности по отношению к винограду (таблица 8).

Таблица 8 – Усредненная частота встречаемости микромицетов в разные фенофазы вегетационного периода (по мере старения листьев), 2019-2021 гг.

Микромицет	Частота встречаемости, %		
	Май-июнь	Июль	Август-сентябрь
1	2	3	4
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	13,3	18,3	11,8
<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wildshire	13,0	11,8	10,3
<i>Alternaria</i> sp.	5,5	8,8	13,5

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4
<i>Fusarium</i> Link	13,4	7,1	14,6
<i>Cladosporium</i> Link	2,6	1,9	2,8
<i>Mucor</i> Fresen.	3,9	11,6	20,6
<i>Penicillium</i> Link	8,7	4,7	5,0
<i>Aspergillus flavus</i> Link	8,4	0,0	0,0
<i>Embellisia</i> E.G. Simmons	0,0	1,9	0,0
<i>Phomopsis viticola</i> (Sacc.) Sacc.	2,1	1,9	0,0
<i>Trichoderma</i> Pers.	0,9	5,8	3,0
<i>Trichothecium</i> Link	0,9	0,0	0,7
<i>Mycelia sterilia</i>	6,0	3,7	0,0

Исходя из вышеизложенных данных, интерес для более подробного изучения этиологии некротической листовой пятнистости вызвал гриб *Alternaria alternata*, идентифицированный по определителям (Simmons, 2007; Саттон, 2001). Морфологические признаки микроструктур соответствовали описанию: конидии имели яйцевидную форму, были разделены поперечными и вертикальными стенками, с минимальным развитием апикальных выступов. Гифы и конидиеносцы светло-коричневые и были разделены перегородками.

3.2 Биоэкологические особенности некротической листовой пятнистости листьев в агроценозах винограда Западного Предкавказья

Представители рода *Alternaria* широко распространены в природе, встречаются везде – в почве, на растительных остатках, в воздухе и т.д. Это, в основном, сапротрофные грибы, которые играют значительную роль в круговороте органики в природе. Как уже упоминалось выше, в последние годы все чаще появляются сообщения о растущем экономическом значении альтернариевых грибов. Некоторые виды приобрели патогенные свойства и

вызывают болезни важных сельскохозяйственных культур (зерновые, декоративные, масличные, крестоцветные, пасленовые, цитрусовые, плодовые, косточковые). Патогенные виды рода *Alternaria* на вегетирующих растениях вызывают медленное разрушение тканей хозяина за счет снижения фотосинтетического потенциала; инфекция приводит к образованию некротических поражений на листьях в виде пятен, представляющих собой реакцию сверхчувствительности тканей растения в ответ на вторжение патогена (The sections of *Alternaria...*, 2012).

Некротическая пятнистость листьев винограда, впервые обнаруженная на виноградниках Краснодарского края (Юрченко и др., 2011), возбудителем которой предварительно был установлен вид *A. tenuissima* имеет в корне отличающиеся признаки заболевания от ранее описанных на винограде. Симптомы некротической листовой пятнистости винограда более близки к симптомам альтернариозов на других культурах. Патогенез начинается с появления очень мелких округлых точечных пятен черного или темно-коричневого цвета по всей поверхности листа, сначала с нижней стороны: заражение происходит путем проникновения возбудителя через устьица, затем некрозы становятся видны с верхней стороны листа.

При попадании инфекционных гиф возбудителя в растительные ткани и выделения в них токсинов развивается реакция сверхчувствительности, на листьях образуются коричневато-бурые, постепенно светлеющие пятна с темно-коричневой, почти черной каймой (рисунок 3), по мере развития болезни пятна увеличиваются, сливаются, затем покрывают всю поверхность листьев. К концу вегетации на растениях восприимчивых сортов может не остаться ни одного здорового листа (рисунки 4, 5).



Рисунок 3 – Характерные окаймленные пятна альтернариоза (реакция сверхчувствительности) на листе винограда, Краснодарский край



Рисунок 4 – Сильное развитие некротической пятнистости на листьях винограда, сорт Бианка



Рисунок 5 – Опадение листьев винограда вследствие сильного развития некротической листовой пятнистости, сорт Бианка, Краснодарский край

В целях установления закономерностей формирования патоконплекса некротической листовой пятнистости винограда в промышленных виноградниках в меняющихся средовых условиях юга России изучено влияние особенностей агротехники на характер патогенеза на сильно поражаемом евро-американском гибридном сорте Бианка.

В исследованиях 2019-2021 годов изучалось влияние способа выращивания винограда на поражаемость растений альтернариозом с помощью математических методов. Сравнивалось 2 способа – выращивание в корнесобственной культуре и в привитой. В таблице 9 представлены основные показатели обобщенных линейных моделей, построенных для оценки динамики развития и распространения болезни за три года, учитывая ярус побега и тип культивирования.

Таблица 9 – Основные показатели обобщенных линейных моделей динамики развития и распространения альтернариоза на винограде сорта Бианка.

Развитие болезни					
	коэффициент	станд. ошибка	z	P> z	Объяснен. девианса
Интерцепт	4.4141	3.656	1.207	0.227	0,45
Период учета	7.3112	0.508	14.386	p<0.001	
Год [2020]	-32.4848	2.852	-11.389	p<0.001	
Год [2021]	-27.5348	2.852	-9.653	p<0.001	
Ярус [нижний]	44.0360	2.852	15.438	p<0.001	0,78
Ярус[средний]	23.6694	2.852	8.298	p<0.001	
Тип[привитая]	-6.5296	2.329	-2.804	0.005	0,79
Распространение болезни					
Интерцепт	19.1304	4.119	4.645	p<0.001	0,23
Период учета	6.4183	0.573	11.211	p<0.001	
Год [2020]	-18.8417	3.213	-5.864	p<0.001	
Год [2021]	-13.1896	3.213	-4.105	p<0.001	
Ярус [нижний]	56.9583	3.213	17.726	p<0.001	0,57
Ярус[средний]	51.7229	3.213	16.097	p<0.001	
Тип[привитая]	-5.2500	2.624	-2.001	0.045	0,58

Рассчитанное р-значение критерия χ^2 правдоподобия не выявил значимых различий между моделями, построенными по наличию и отсутствию фактора типа культивирования винограда, как для модели развития, так и для модели распространения болезни (для модели развития: $D = 0,59$; $p > 0,05$; для модели распространения: $D = 37$, $p > 0,05$). Иными словами, различия в типе культивирования, учитываемые моделью, построенной по трехлетним данным, значимо не меняют саму модель. Что подтверждается объясненной девиансой, которая для полной модели развития болезни равна 0,79, а для вложенной модели (модели без фактора типа культивирования) – 0,78.

Анализ динамики развития альтернариоза показал, что на растениях винограда в корнесобственной культуре течение заболевания проходит интенсивнее. Согласно модели, на корнесобственной культуре развитие болезни происходит в среднем на 6,5 балла больше, чем на привитой ($p > 0,01$), а распространение в среднем на 5,3 балла больше, чем на привитой

культуре. При этом уровень значимости фактора типа культивирования винограда в модели распространения болезни приближен к 0,05, это можно объяснить малым количеством значимых линейных данных – в 2019-ом году по нижнему ярусу происходит почти 100 % распространение болезни уже к началу - середине учетов. В течение вегетационного сезона развитие и распространение болезни на корнесобственной культуре прогрессирует быстрее, чем на привитой: в период первого учета различия в развитии болезни – 2 балла, в период восьмого учета – 10 баллов. В распространении болезни при этом 3,5 и 7 баллов соответственно (рисунок 6).

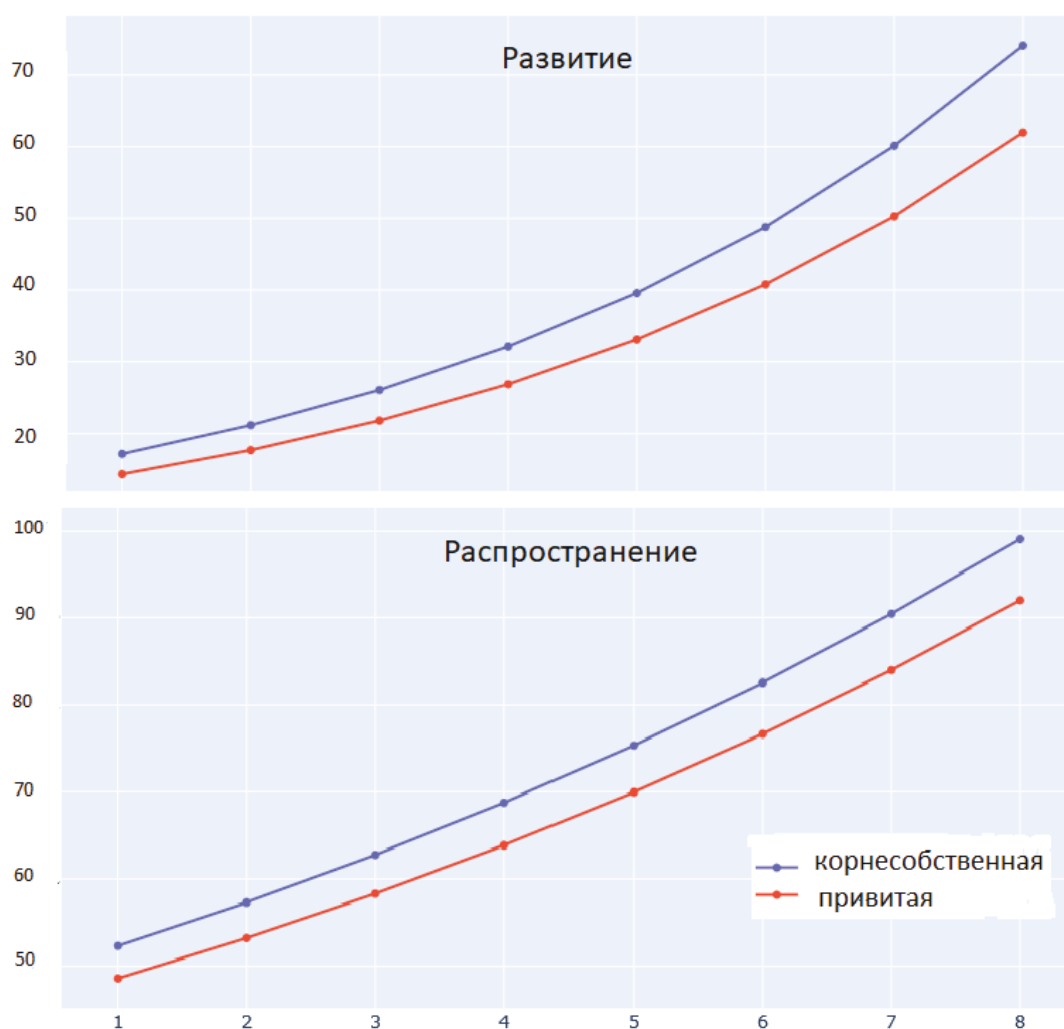


Рисунок 6 – Динамика развития и распространения альтернариоза у привитой и корнесобственной культуры сорта Бианка.

Различия отмечены в интенсивности развития болезни на листьях среднего и особенно верхнего яруса побегов. Как для моделей развития, так и для моделей распространения болезни p -значение критерия χ^2 правдоподобия указывает на значимые различия между моделями, одна из которых учитывает фактор яруса виноградной лозы, а другая нет (для модели развития: $D = 13,3$, $p < 0,01$; для модели распространения: $D = 9$, $p < 0,01$). Т.е. учет яруса побега имеет существенное значение на качество модели, что подтверждается объясненной девиансой, которая для полной модели развития болезни равна 0,78 (0,57 для модели распространения), а для вложенной модели (модели без фактора яруса) - 0,45 (0,23 для модели распространения).

Согласно данным, представленным в таблице 1, развитие болезни в среднем и нижнем ярусе на 24 и 44 % выше, чем на верхнем ярусе ($p < 0,01$). Распространение болезни при этом в среднем и нижнем ярусе на 52 и 57 балла выше, чем на верхнем ($p < 0,01$). При этом в течение вегетационного сезона развитие и распространение болезни на нижних ярусах прогрессируют быстрее, чем на верхнем. Развитие болезни в нижнем ярусе и распространение в верхнем и среднем ярусе на период седьмого учета по рассчитанным показателям приближается к 100 % (рисунок 7).

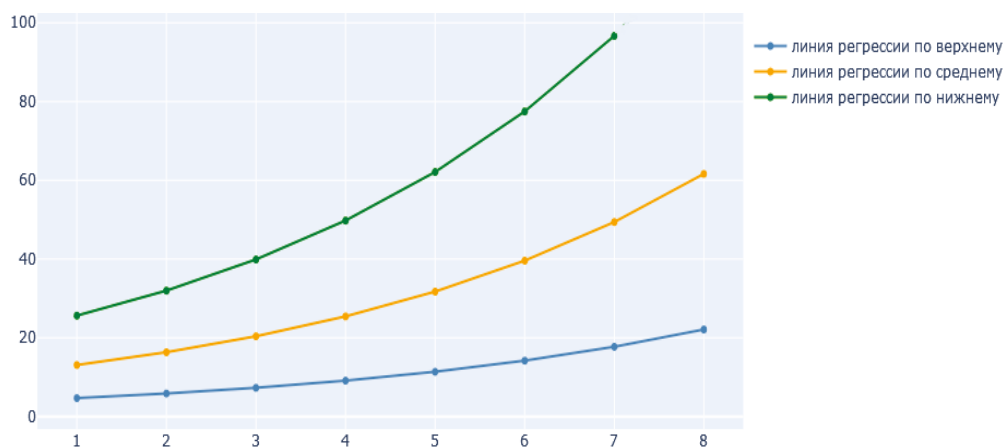


Рисунок 7 – Динамика развития альтернариоза на разных ярусах побега винограда сорта Бианка

3.3 Оценка патогенности изолятов грибов *Alternaria* sp., выделенных из патокомплекса некротической листовой пятнистости винограда

В задачи исследований входило подтвердить патогенность грибов *Alternaria* для винограда, определить видовой состав возбудителей.

В большинстве зарубежных источников показано, что альтернариевые патогены являются некротрофами, т.е. питаются погибшими клетками растения-хозяина (When and how to kill a plant cell..., 2011; Torto-Alalibo et.al., 2009).

Некротрофы способствуют программируемой клеточной смерти, в то время как биотрофы подавляют ее развитие (Production of a host-specific toxin..., 1998).

Процесс инфицирования растений альтернариевыми грибами включает прорастание конидий, проникновение и колонизацию поверхности растений. Из конидий прорастают обычно несколько зародышевых трубок. По результатам исследований ряда авторов, проникновение возбудителя в ткани растений происходит либо непосредственно через эпидермис или микротрещины в нем, либо через устьица или чечевички (Swart et.al., 1995).

В опытах группы исследователей из Индии была продемонстрирована стратегия заражения листьев горчицы разными по агрессивности штаммами *Alternaria brassicae*. Было показано, что наименее агрессивный изолят *A. brassicae* заражает лист горчицы, распространяясь только по эпидермальным клеткам. В результате колонизации гифами клетки листьев некротизируются под воздействием токсинов, выделяемых грибом. Высокоагрессивный изолят *A. brassicae* (CaAbD5) проникает через устьичное отверстие листа хозяина, образуя сеть аппрессорий.

Формирование нескольких зародышевых трубок и аппрессорий из конидий является общей чертой рода *Alternaria*, это обнаружено у *A. porri*, *A. linicola*, *A. alternata* и *A. cassia*. Ван Дайк и Тригино (1987) наблюдали

некрозы клеток в субоматальной области под аппрессориями без признаков грибной инвазии в ткани. Считается, что гибель этих клеток до проникновения грибов – это следствие диффундирующих токсинов (Dehpour et.al., 2010).

В другом исследовании Swart с соавторами (1995) проводили заражение гроздей столового винограда *Alternaria alternata* при холодильном хранении. Конидии легко прорастали на поверхности ягод, цветоножек и рахисов незрелых и зрелых гроздей. На кончиках прорастающих из конидий зародышевых трубок и гифов в течение 16 часов формировались аппрессории. Возбудитель проникал в ткани хозяина через устьица, чечевички и микротрещины в эпидермисе. Инфекционные гифы не вызывали некроза клеток, локализовались в субсоматальных полостях или поверхностных клетках чечевичек, в случае эпидермальных микротрещин гифы не проникали глубже нескольких эпидермальных клеток. В условиях повышенной влажности при холодильном хранении гриб вырастает из устьиц, чечевичек и микротрещин, в течение 168 ч наблюдается обширный поверхностный рост (Swart et.al., 1995).

Исследователи из Ирана изучали с помощью световой и электронной микроскопии процесс инфицирования миннеолы (танжело) грибом *A. alternata*. Было обнаружено, что возбудитель инфицирует растение напрямую через эпидермис или через устьица с образованием аппрессорий или без них. Из каждой конидии вырастают многочисленные зародышевые трубки. Гифы продолжали расти через полость субсомы, иногда росли в межклеточном пространстве мезофильной ткани. Вещества, выделяемые грибом, особенно токсины, вызывали повреждения клеток (Dehpour et.al., 2010).

Для скрининга на патогенность изолятов *Alternaria* использовалась методика заражения высечек из листьев (Гасич и др., 2013; Далинова и др., 2014). Тесты проводили на дисках диаметром 4 см, высеченных из здоровых листьев винограда поражаемого сорта Бианка. Патогенность изолятов

устанавливали по способности образовывать некрозы при заражении суспензией спор с нижней стороны листа, где возбудители прорастали через устьица. Учеты проводили на третьи, пятые и седьмые сутки. Отмечали площадь пораженной поверхности листовых дисков, исходя из того, что общая площадь дисков составляет $12,6 \text{ см}^2$. Изоляты *Alternaria* spp. отличались по степени вирулентности. Агрессивные изоляты образовывали наибольшую зону некротизации (более 50 % площади листового диска) на 7-е сутки после инокуляции, к наиболее вирулентным были отнесены 424-1; 424-2; 427 (рисунок 8).

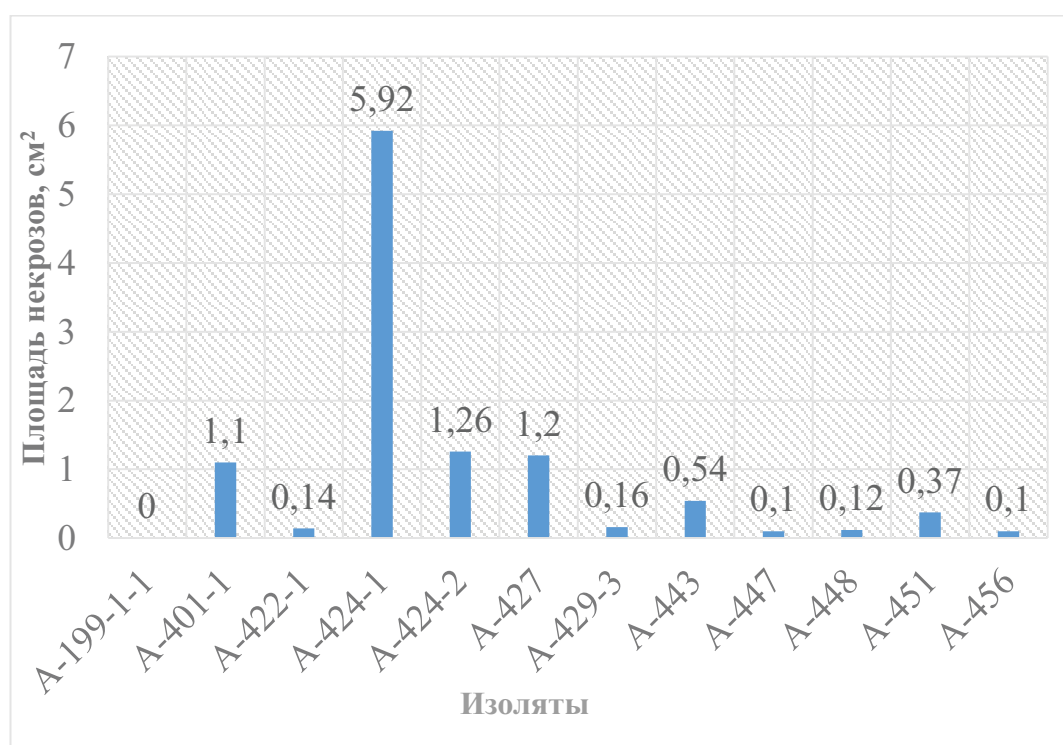


Рисунок 8 – Результаты скрининга изолятов *Alternaria* sp. на патогенность

Ориентируясь на характер развития некрозов на листовых дисках было установлено, что микопатоккомплекс некротической листовой пятнистости винограда включает в себя как гембиотрофные, так и некротрофные виды грибов *Alternaria* spp (рисунок 9).

424-1 *Alternaria* sp.427 *Alternaria* sp.429-3 *Alternaria* sp.443 *Alternaria* sp.447 *Alternaria* sp.448 *Alternaria* sp.

Рисунок 9 – Листовые диски при инокуляции гембиотрофными изолятами *Alternaria* sp., 2020-2021 гг.

Некрозы, вызванные гембиотрофами, были более темного цвета, имели более или менее четкие очертания, со временем при увеличении некротических пятен на большинстве некрозов образовывалась кайма черного цвета (реакция сверхчувствительности).

Патогенный процесс при заражении некротрофными (раневыми) патогенами отличался от гембиотрофов прорастанием патогена через края вырезанных дисков, представляющих собой раневые поверхности и сопровождался образованием бесформенных расплывчатых (диффузных) некрозов и хлорозов (рисунок 10).



Рисунок 10 – Вид листовых дисков при заражении некротрофными изолятами *Alternaria* sp., 2020-2021 гг.

Некоторые изоляты (421-2 и 425-3) вызвали поражение проводящих органов (жилок листа).

Среди 39 экспериментальных изолятов *Alternaria* sp. пять были установлены как непатогенные. После первой и повторной инокуляции листовых дисков некрозов не наблюдалось (рисунок 14).

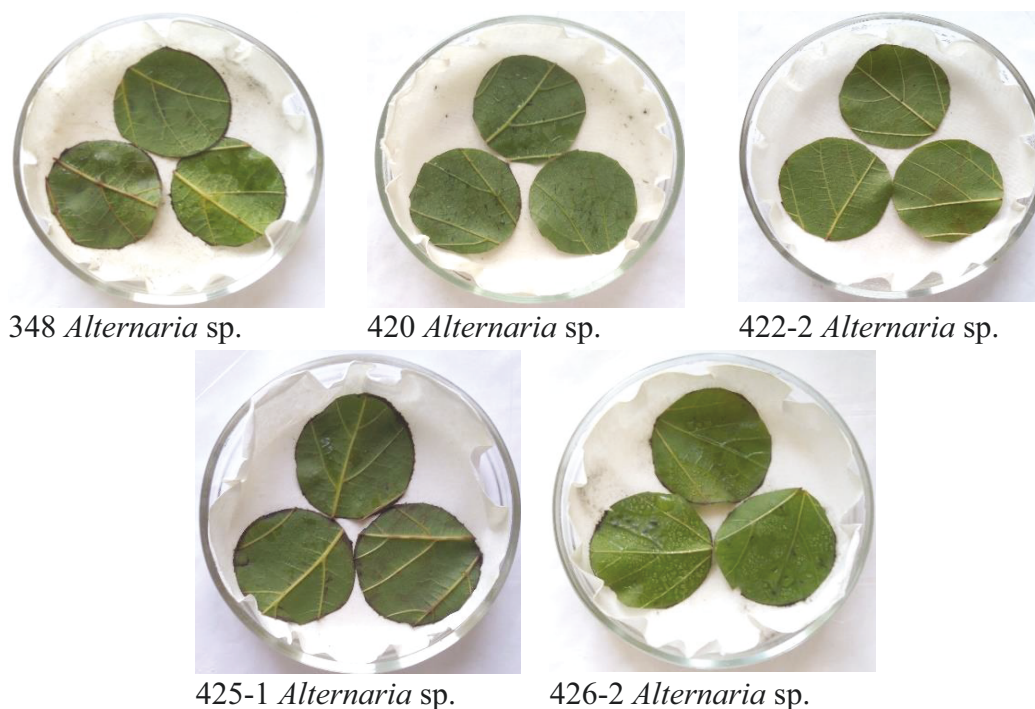


Рисунок 11 – Непатогенные изоляты *Alternaria* sp., 2020 г.

Проблема вредоносности некротрофных грибов и бактерий вызывает в последнее время все больший научный интерес в проведении исследований

механизмов взаимодействия некротрофных фитопатогенов с растениями, было показано, что патогенные виды могут сочетать в себе различные типы питания – биотрофность, гемибиотрофность и некротрофность (Laluk et.al., 2010; Newman, 2020; Kraepiel et.al., 2016). Метаболиты (эффекторы) некротрофических патогенов включают некоторые молекулы, которые первоначально были обозначены как специфичные для хозяина или селективные к хозяину токсины (HST). Эти некротрофические эффекторы (NE) охватывают необычайно широкий спектр молекулярных форм. Например, грибы рода *Alternaria* продуцируют такие токсины как поликетид (PKS), нерибосомальный пептид (NRPS), молекулы с малой молекулярной массой NE. Эффекторы биотрофных и гемибиотрофных патогенов обычно включают белки Avr, которые распознаются соответствующими белками резистентности (R). Однако в отсутствие белка R микотоксины способствуют вирулентности гриба путем подавления врожденных иммунных реакций растения, таких как иммунитет, вызванный PAMP, в процессе, называемом чувствительностью к эффектору (ETS), что позволяет установить биотрофное взаимодействие. ETS особенно важна на ранних стадиях инфекции, и в соответствии с этим экспрессия генов Avr обычно достигает пика в эти ранние моменты времени. Кроме того, гемибиотрофные патогены первоначально продуцируют эффекторы для подавления гибели клеток, но на более поздних фазах они снижаются, а другие некротрофические эффекторы индуцируются и начинают доминировать во взаимодействии.

То есть сначала полупаразитные грибы устанавливают биотрофное взаимодействие с растением-хозяином, а на более поздних стадиях инфекции переходят к некротрофии. Данное положение подтверждается и в наших исследованиях.

3.4 Культуральные и морфологические свойства патогенных и непатогенных изолятов *Alternaria* spp.

В природных условиях грибы получают пищу и энергию из субстрата, на котором они живут. Для культивирования гифомицетов в лаборатории необходимо подобрать питательную среду со всеми необходимыми элементами для их роста и других жизненных процессов. Не все среды одинаково хороши для разных видов мицелиальных грибов. В зависимости от поставленных целей существуют различные подходы в изучении культур микромицетов и подборе оптимальных питательных сред *in vitro*.

Для альтернариевых грибов такой скрининг можно осуществлять по критерию выхода биомассы гриба (г/100 мл среды) (Влияние состава питательной среды..., 2011). Некоторые исследователи утверждают, что интерес представляют среды, на которых удается получить большую биомассу, так как важным диагностическим признаком *Alternaria* является строение конидий, габитус и структура паттернов – из агаризованных сред по критерию наибольшего выхода биомассы выделены картофельно-глюкозная и Чапека (Влияние состава питательной среды..., 2011; Некоторые методические подходы..., 2012; Влияние состава среды на морфологические..., 2021). По мнению авторов, для определения видовой принадлежности альтернариевых грибов следует избегать сложных или чрезмерно питательных сред; показано, что, наиболее оптимальными для образования конидий и паттернов споруляции патогенных штаммов является картофельно-морковный агар и агаризованная среда V-8 (Simmons, 2007; Ганнибал, 2004). Существует еще один тип субстрата – среды с экстрактом листьев растения-хозяина. Например, на такой среде зафиксирована максимальная скорость роста изолятов *A. alternata*, выделенных из листьев нони (*Morinda citrifolia* L.). Картофельно-сахарозный агар признан лучшим для роста возбудителей альтернариозов различных культур: *A. carthami* - патогена листьев сафлора, *A. solani*, вызывающего листовую пятнистость

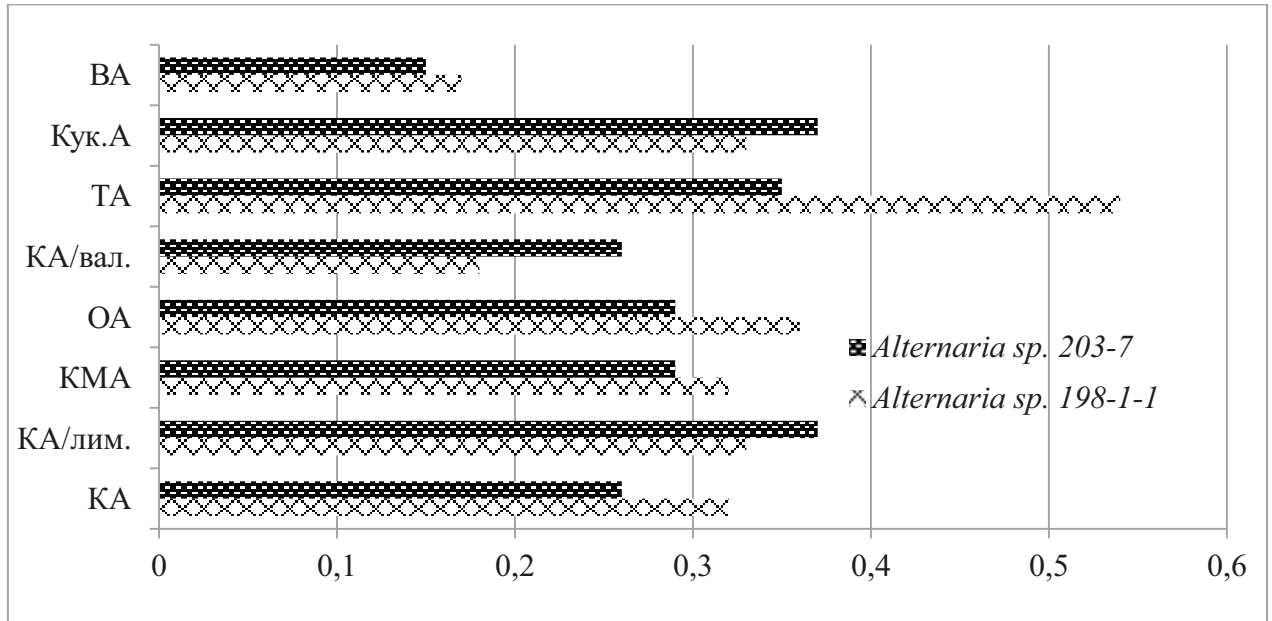
томатов, *A. alternata* - патогена листьев табака и жасмина, *A. palandui*, поражающего листья лука (Hubballi et.al., 2010). Для дифференциации близких видов по культуральным признакам были осуществлены попытки подобрать селективные питательные среды (Andersen et.al., 1996).

Активно ведущиеся в настоящее время молекулярно-генетические исследования показали, что виды *Alternaria* группируются в несколько различных клад, ныне называемых секциями (*Alternaria redefined*, 2013) и хотя появляются сведения о том, что новые полученные таксоны не всегда коррелируют с видовыми группами, выделенными на основе морфологических характеристик (Roberts et.al., 2000), тем не менее изучение видов необходимо начинать именно с описания их морфолого-культуральных свойств, так как они могут быть важным дополнением к диагностике вида, более адекватному пониманию микроэволюционных процессов в популяциях и т.д.

Грибные культуры (изоляты) рода *Alternaria*, участвующие в опытах по изучению морфолого-культуральных свойств и выбору оптимальной среды для культивирования, были выделены из патоконтекста некротической листовой пятнистости винограда сильно поражаемых сортов.

Установлено, что при культивировании на овсяном, томатном и кукурузном агаре исследуемые изоляты продуцировали наибольший объем биомассы (Буровинская и др., 2021).

В исследовании индийских ученых максимальная скорость роста зафиксирована на картофельно-сахарозном, овсяном агаре и среде Уолксмана (Hubballi et.al., 2010). В нашем эксперименте на томатном и кукурузном агаре установлена наибольшая скорость роста колоний, тестируемых изолятов (рисунок 12).



Примечание: КА – картофельный агар; КА/лим. – картофельный агар с добавлением лимонной кислоты; КМА – картофельно-морковный агар; ОА – овсяный агар; КА/вал. – картофельный агар с экстрактом корня валерианы; ТА – томатный агар; Кук.А – кукурузный агар; ВА – водный агар.

Рисунок 12 – Скорость роста колоний грибов *Alternaria sp.* на различных питательных средах, мм/час, 2019 г.

Однако, на перечисленных выше средах спороношение было слабым. Сильное развитие вегетативного мицелия затрудняло изучение микроструктурных признаков изолятов (габитуса споруляции, расположение первичных конидиеносцев и др.).

На картофельном агаре и КА с добавлением лимонной кислоты альтернариевые грибы образовывали умеренное количество вегетативного мицелия, при этом интенсивное спороношение также вызывало некоторые трудности в определении видов по микроструктурным признакам (слишком большая вариативность). На картофельно-морковном агаре отмечено умеренное развитие вегетативного мицелия и менее обильное спороношение (рисунок 13).

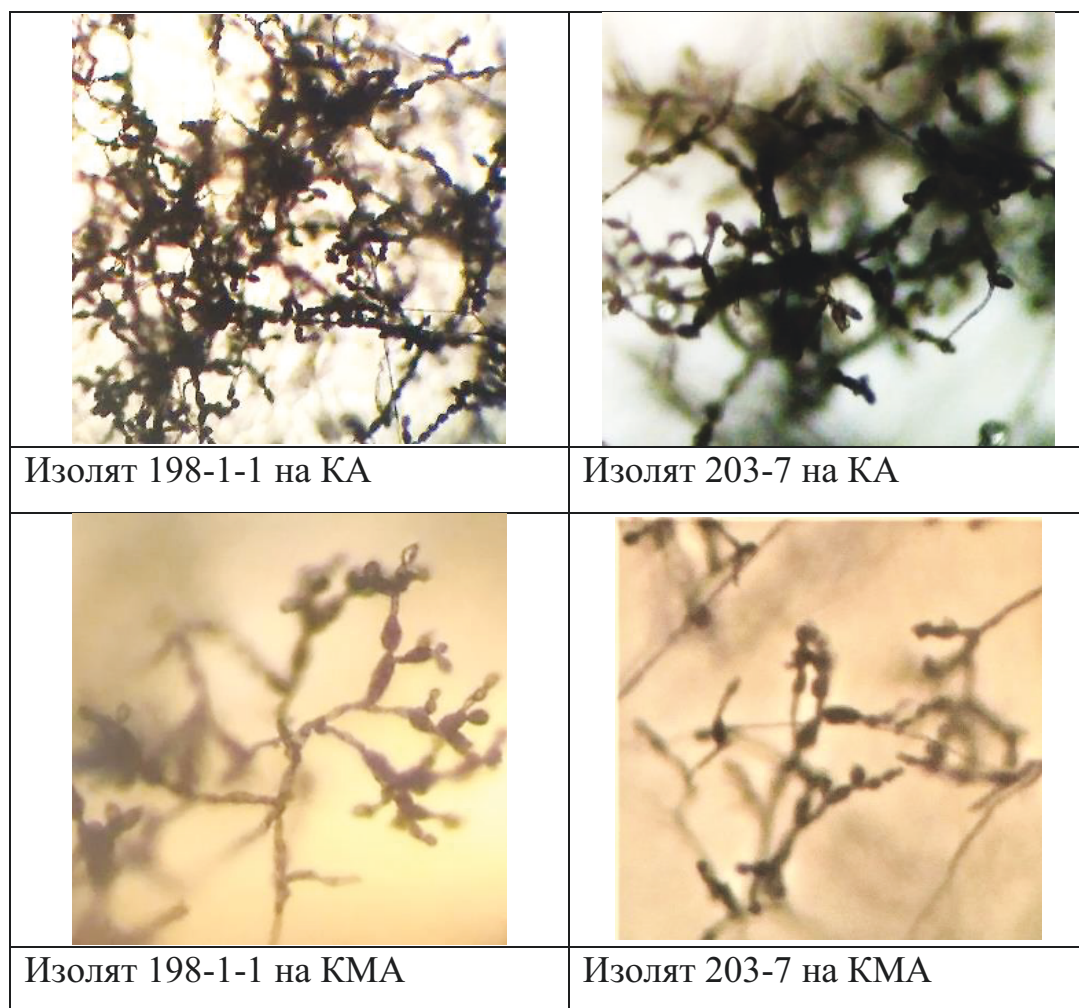


Рисунок 13 – Габитус споруляции *Alternaria* sp. на картофельном (КА) картофельно-морковном агаре (КМА), 2019 г.

Сравнительный анализ морфологических и культуральных характеристик на других агарах (водный, КА с экстрактом корня валерианы) показал, что развитие вегетативного мицелия и конидий было слабым, поэтому эти среды нельзя считать оптимальными для культивирования альтернариевых грибов (рисунок 14). Учеными подтверждено, что наименьший средний рост мицелия наблюдается в водном агаре (Hubballi et.al., 2010).



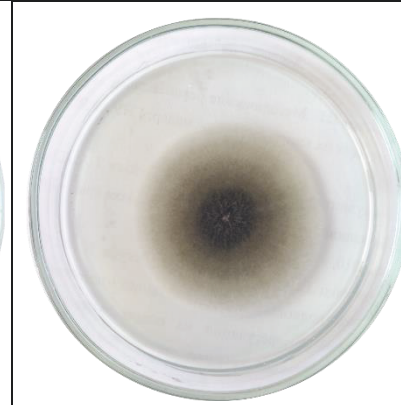


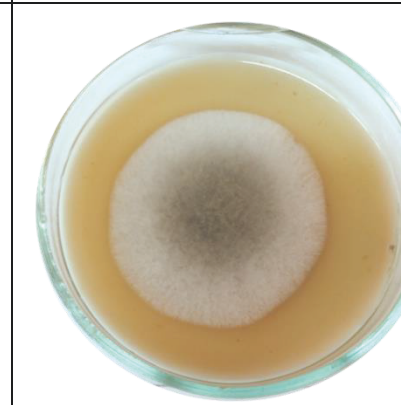
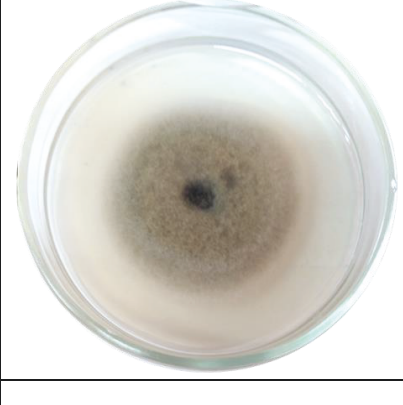

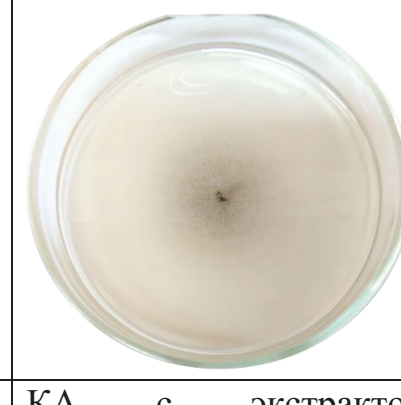
		
Картофельный агар (КА)	КА с добавлением лимонной кислоты	Картофельно-морковный агар
		
Овсяной агар	Кукурузный агар	Томатный агар (ТА)
		
Сенной агар	Водный агар (ВА)	КА с экстрактом валерианы

Рисунок 14 – Внешний вид колоний *Alternaria* sp. 203 л.7 на различных питательных средах на седьмые сутки культивирования, 2019 г.

Таким образом, проведенный скрининг позволил выбрать в качестве наиболее оптимальной питательной среды для культивирования изолятов *Alternaria* картофельно-морковный агар (КМА). На КМА за счет небольшого количества питательных веществ наблюдается малое количество вегетативного мицелия и умеренное спорообразование.

Помимо различий в скорости роста, изоляты на разных средах также демонстрировали различия в отношении цвета колонии. На КА, КА с добавлением лимонной кислоты и КМА они темно-серого цвета, на кукурузном – желтовато-оливкового, на овсяном и сенном – серого, на томатном мицелий почти белого цвета. В эксперименте ученых из Индии изоляты *Alternaria alternata* образовывали колонии черного цвета на ВА и агаре Чапека Докса, белого цвета на агаризованных средах Ричарда, Мартинса Роуз и Уолксмана, темно-коричневые на КСА и овсяном агарах, коричневые на агаризованной среде с экстрактом листьев хозяина (*Morinda citrifolia* L.).

На выбранной питательной среде (КМА) провели идентификацию еще 2-х изолятов по морфолого-культуральным признакам. Они были идентифицированы как *A. tenuissima* и *A. alternata*. Конидии изолята *A. tenuissima* 336-3, выделенного из пораженных листьев сорта винограда Бианка, обратно булабовидной формы оливково-коричневого цвета, собранные в неветвящиеся цепочки, размером 30-45 × 11-13 мкм. Габитус споруляции изолята 185-7 *A. alternata*, выделенного с листьев сорта винограда Левокумский, представляет собой многократно ветвящиеся цепочки яйцевидных или эллипсоидных конидий, размер которых 25-30 × 5-9 мкм (рисунок 15).

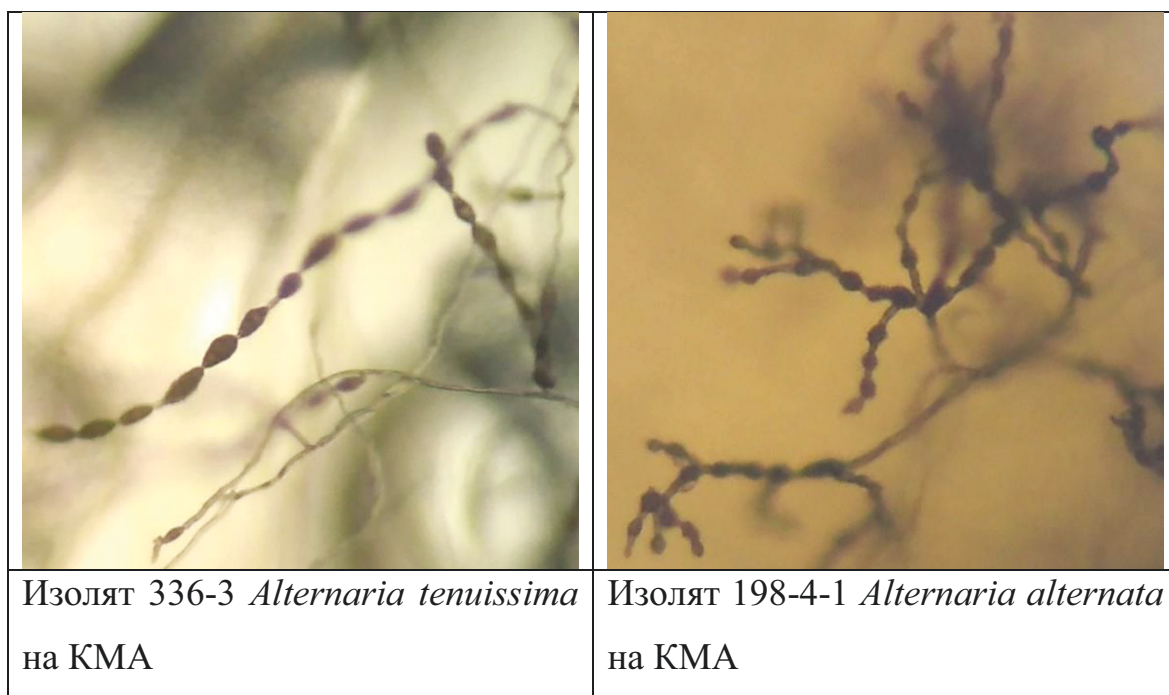


Рисунок 15 – Габитус споруляции изолятов *Alternaria*, 2019 г.

На выбранной среде смотрели внутривидовые различия по культуральным признакам колоний нескольких изолятов *A. tenuissima* и *A. alternata*. Для этого исследования выбрали изоляты с типовыми колониями, которые имели различия по нескольким культуральным признакам внутри вида (таблица 10). Колонии *A. alternata* преимущественно темно-серого цвета с оливковым оттенком со слабо выраженными концентрическими зонами. Мицелий колоний штамма *A. tenuissima* 198-1-1 белый в центре и по краю колонии, темно-серый вокруг центра, штамма *A. tenuissima* 199-1-1 однородного светло-серого цвета, с белыми вкраплениями. Колонии штамма *A. tenuissima* 336-3 преимущественно серого цвета без оливкового оттенка.

Таблица 10 – Культуральные признаки репрезентативных изолятов на седьмые сутки культивирования, 2019 г.

№	Вид гриба	Название изолята	Диаметр колоний (мм)	Воздушный мицелий	Центр колонии
1	<i>A. tenuissima</i>	198-1-1	68,0±2,0	Рыхлый, ватообразный, вокруг центра войлочный	Бугорок 17-18 мм в диаметре, с белым пушистым мицелием
		199-1-1	65,0±3,1	Рыхлый, ватообразный	Белые вкрапления 1-3 мм в диаметре
		336-3	51,0±2,5	Рыхлый, ватообразный	Бугорок 5 мм в диаметре
2	<i>A. alternata</i>	185-7	68,0±2,0	Гомогенный, рыхлый, ватообразный	Бугорок 5 мм в диаметре с белыми вкраплениями до 1 мм
		198-4-1	55,0±2,7	Рыхлый, ватообразный	Бугорок 3 мм в диаметре, образованный рыхлым серым воздушным мицелием
		200-1-2	65,0±2,9	Рыхлый, ватообразный	Белые вкрапления 1-3 мм в диаметре

Таким образом, установлена оптимальная среда для культивирования грибов из патокомплекса некротической листовой пятнистости рода *Alternaria* – картофельно-морковный агар (КМА). На этой среде отмечается достаточное, но не слишком обильное спороношение и умеренное развитие вегетативного мицелия. КМА также является оптимальным субстратом для установления разнообразия культуральных признаков штаммов внутри вида для возможного разграничения по штаммовому признаку, что имеет значение для проведения дальнейших популяционных исследований.

Исследования по изучению морфолого-культуральных свойств продолжили еще на 4-х патогенных изолятах *Alternaria spp.* 401-1, 424-1, 425-3 и 454. Для культивирования были выбраны агаризованные среды КМА, ТА

и среда V-8 (смесь овощных соков). Внешний вид колоний и описание морфологических характеристик изолятов *Alternaria spp.* представлены в таблицах 11-12.

Таблица 11 – Результаты культивирования патогенных штаммов рода *Alternaria* на разных специфических средах на 3-и сутки, 2021 г.



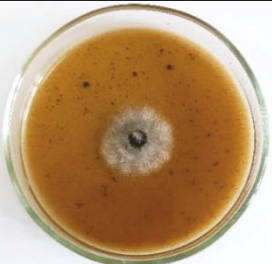
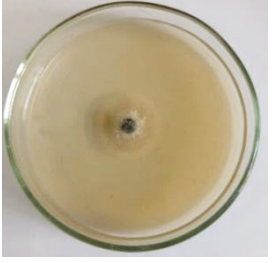





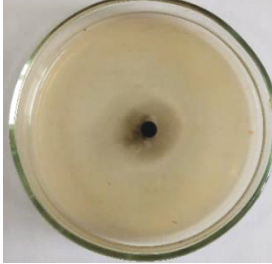


Номер изолята	Разновидности питательных сред		
	КМА	ТА	V8
на 3-и сутки культивирования			
401-1			
424-1			
425-3			
454			

Таблица 12 – Результаты культивирования патогенных изолятов рода *Alternaria* на разных специфических средах на 10-е сутки, 2021 г.

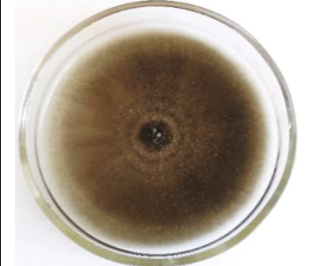
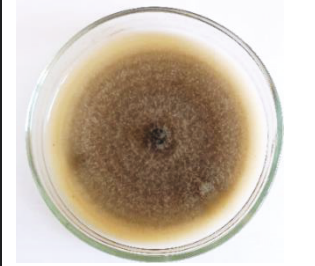

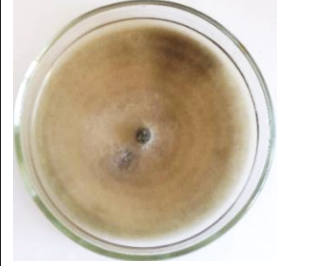



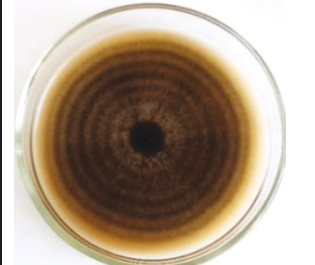
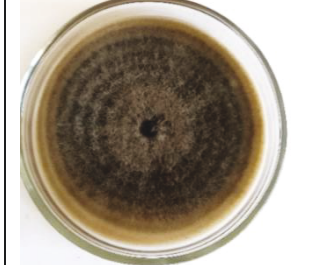
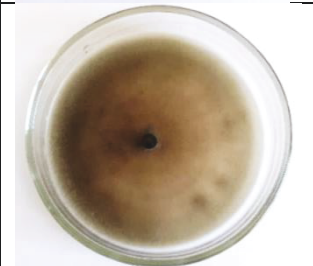
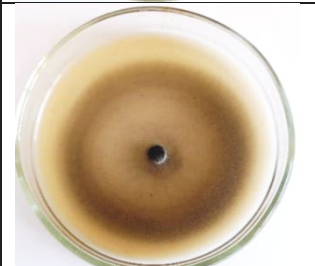

Номер изолята	Разновидности питательных сред		
	КМА	ТА	V8
на 10-е сутки культивирования			
401-1			
424-1			
425-3			
454			

Таблица 13 – Характеристика культуральных свойств колоний изолятов рода *Alternaria* на разных средах, 2021 г.

	Культуральный признак	401-1	424-1	425-3	454
Картофельно-морковный агар (КМА)	Реверс	темно-серый	гомогенный, светло-серый	неоднородный, по краю темно-серый, в центре –светло-серый	неоднородный, светло-серый
	Диаметр колонии	90 мм	90 мм	90 мм	90 мм
	Высота мицелия	0,4 мм	1,5 мм	0,2 мм	0,2 мм
	Профиль	плоский	плоский	плоский	плоский
	Форма	правильная	правильная	правильная	правильная
	Край колонии	ровный, ворсинчатый	ровный, ворсинчатый	ровный, ворсинчатый	ровный, ворсинчатый
	Воздушный мицелий	рыхлый, присутствует только по краям	гомогенный, ватообразный, рыхлый	отсутствует	рыхлый, присутствует только по краям
	Центр колонии	черный с белыми вкраплениями	белые вкрапления	темный	темный
	Цвет мицелия	темно-серый с зеленым оттенком по краям, слегка видны радиальные круги	светло-серый, наличие радиальных кругов	наличие радиальных кругов по краю колонии	светло-серый, слегка видны радиальные круги
Томатный агар (ТА)	Реверс	гомогенный, светло-серый	гомогенный, темно-серый	гомогенный, светло-коричневый	неоднородный, темно-серый по краям
	Диаметр колонии	79 мм	78 мм	88 мм	75 мм

Продолжение таблицы 13

	Культуральный признак	401-1	424-1	425-3	454
Томатный агар (ТА)	Высота мицелия	1,7 мм	1,7 мм	1,8 мм	0,2 мм
	Профиль	плоский	плоский	плоский	плоский
	Форма	правильная	правильная	правильная	правильная
	Край колонии	ровный, ворсинчатый	ровный, ворсинчатый	ровный, реснитчатый	ровный, реснитчатый
	Воздушный мицелий	гомогенный, плотный, ватообразный	гомогенный, плотный, ватообразный	только в центре	практически отсутствует
	Центр колонии	черный	белые вкрапления	черный	темный
	Цвет мицелия	светло-серый, с оливковым оттенком, наличие радиальных кругов	светло-серый, с оливковым оттенком по краю, наличие радиальных кругов	темно-серый, наличие радиальных кругов по всей колонии	светло-серый, темно-серый по краям
	Реверс	гомогенный, темно-серый	гомогенный, бурый	гомогенный, бурый	черный
	Диаметр колонии	90 мм	90 мм	90 мм	82 мм
Овощная среда V8	Высота мицелия	2,5 мм	2,7 мм	1,9 мм	0,7 мм
	Профиль	плоский	плоский	плоский	плоский
	Форма	правильная	правильная	правильная	правильная
	Край колонии	ровный, ворсинчатый	ровный, ворсинчатый	ровный, реснитчатый	ровный, ворсинчатый
	Воздушный	гомогенный, плотный	гомогенный, плотный	гомогенный, плотный	гомогенный, плотный
	Центр колонии	темный с белыми вкраплениями	темный с белыми вкраплениями	черный	темный

Среда V-8 наряду с КМА признается оптимальной для культивирования альтернариевых грибов на различных культурах (Ганнибал, 2011; Simmons, 2007). Томатный агар был взят для сравнения. Сравнительную оценку изолятов проводили по ростовому коэффициенту (РК) (рисунок 16) и радиальной скорости роста (РСР) (рисунок 17).

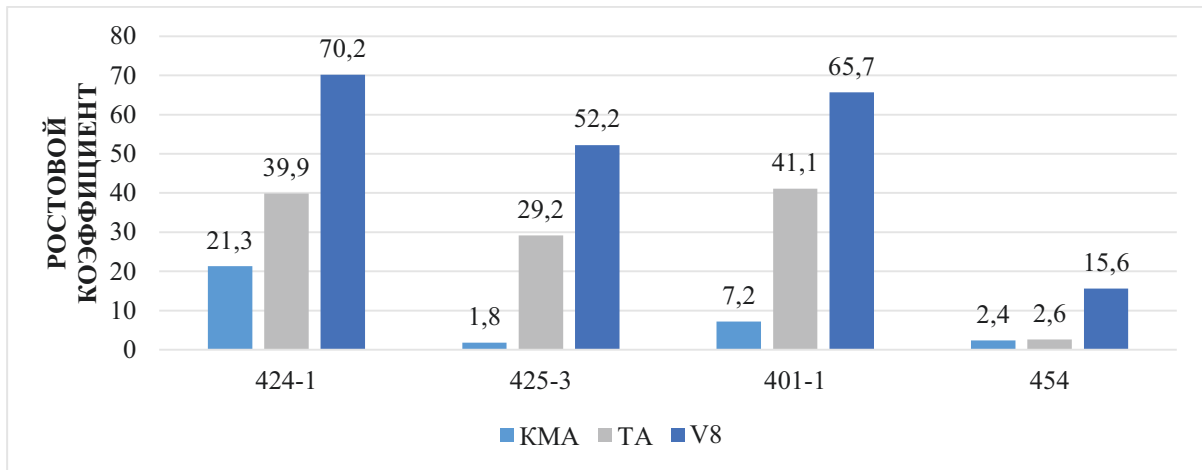


Рисунок 16 – Ростовый коэффициент патогенных изолятов рода *Alternaria* – возбудителей некротической листовой пятнистости винограда, 2021 г.

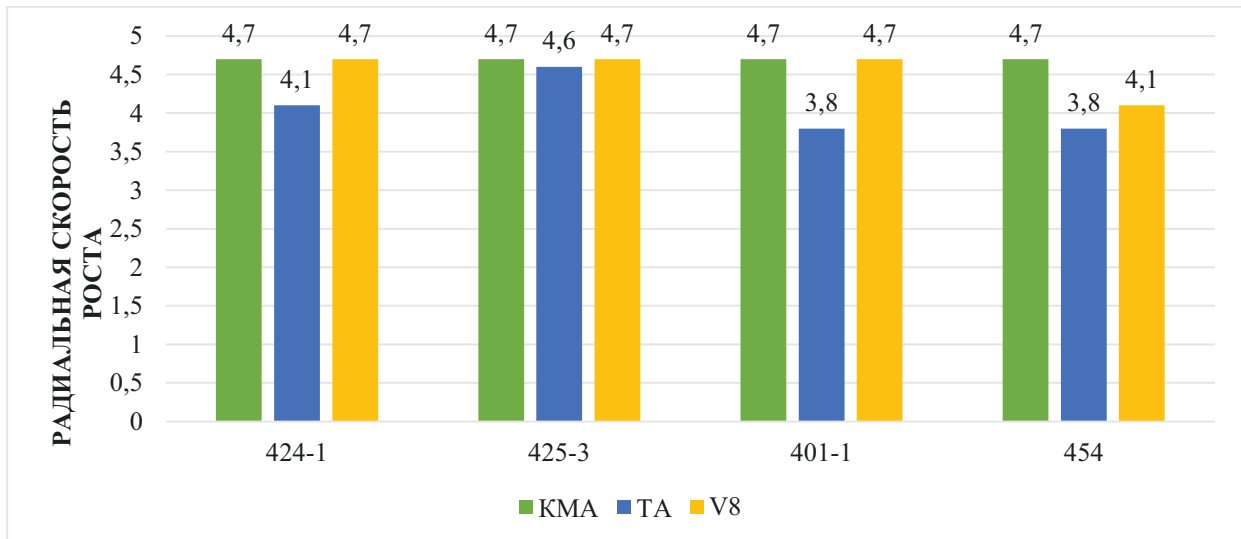


Рисунок 17 – Радиальная скорость роста патогенных изолятов рода *Alternaria* – возбудителей некротической листовой пятнистости винограда, 2021 г.

Установлено, что наибольший ростовой коэффициент фиксировался на овощной среде V8 у изолятов 424-1, 425-3 и 401-1. У изолята 454 ростовой коэффициент на всех разновидностях сред был намного ниже, чем у всех остальных. На томатном агаре ростовой коэффициент у изолятов 424-1, 425-3 и 401-1 был ниже, чем на овощной среде V8, но намного выше, чем на КМА. На КМА ростовой коэффициент варьировал от 1,8 до 21,3.

Анализ радиальной скорости роста патогенных изолятов при культивировании на разных питательных средах показал, что показатель варьировал в пределах 3,8-4,7. Наименьшая радиальная скорость роста отмечена на томатном агаре у изолятов 424-4, 401-1 и 454. На КМА показатель у всех изолятов составлял 4,7. На овощной среде V8 показатель был одинаковым у изолятов 424-4, 401-1, 425-3 и составлял 4,7. Однако у изолята 454 отмечено наименьшее значение 4,1 по сравнению с остальными исследуемыми изолятами.

Постоянными для всех изолятов на всех изучаемых средах были такие культуральные признаки, как профиль, форма и край колонии. Реверс колонии в зависимости от изолята и состава среды был однородным и неоднородным. Образование плотного гомогенного ватообразного мицелия наблюдалось в основном на томатном агаре и овощной среде V8 практически у всех исследуемых штаммов, за исключением изолята 454. У изолята 454 образование плотного мицелия наблюдалось только на среде V8. Диаметр колонии варьировал от 75 мм до 90 мм, причем на томатном агаре диаметр колонии был ниже по сравнению с остальными средами. И у изолята 454 наблюдали диаметр меньше по сравнению с остальными изолятами. Высота мицелия также была различной на разных средах, и варьировала в пределах от 0,2 мм до 2,7 мм (на среде V8).

При изучении морфологических свойств изолятов на 10-е сутки культивирования при микропировании определяли габитус спороношения и форму конидий (таблицы 14, 15).

Таблица 14 – Габитус спороношения патогенных изолятов рода *Alternaria* на разных специфических средах на 10-е сутки, 2021 г.



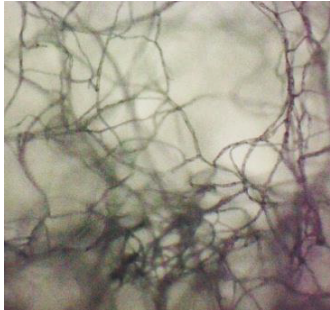
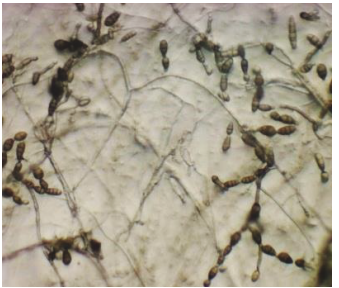


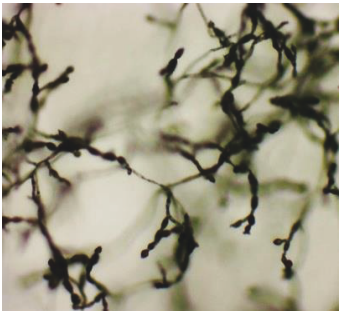


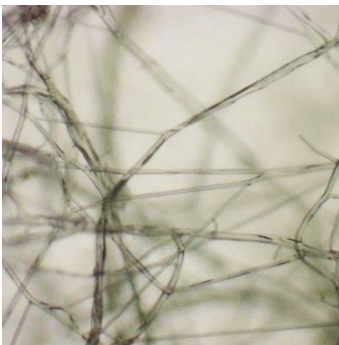

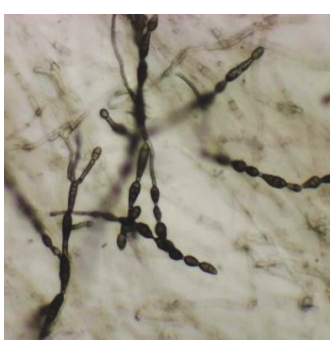




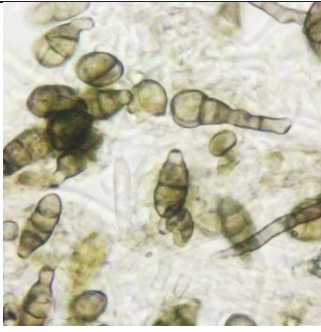
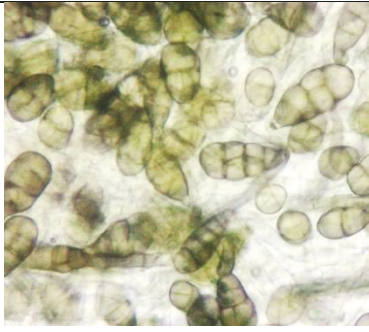
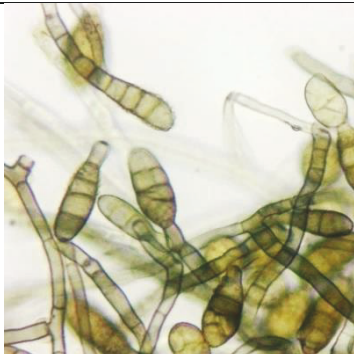

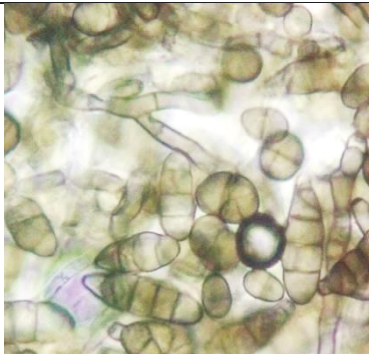
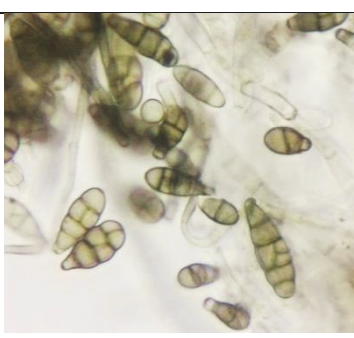

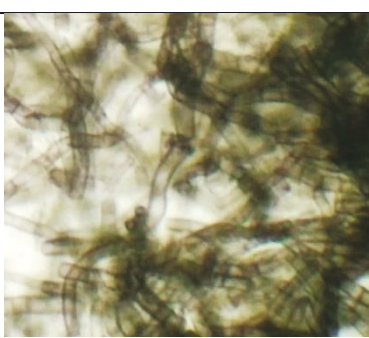
Номер изолята	Разновидности питательных сред		
	КМА	ТА	V8
на 10-е сутки культивирования			
401-1			
424-1			
425-3			
454			

Таблица 15 – Типы конидий патогенных изолятов рода *Alternaria* на разных специфических средах на 10-е сутки, 2021 г.

Номер изолята	Разновидности питательных сред		
	КМА	ТА	V8
на 10-е сутки культивирования			
401-1			
424-1			
425-3			
454			

Установлено, что габитус спороношения в виде цепочек конидий образовывался на всех средах, но у 2-х изолятов (401-1, 454) отсутствовал на овощной среде V8. У изолята 454 наблюдался стерильный мицелий.

На среде КМА у всех изолятов наблюдалось образование более вытянутых конидий с хорошо развитыми вторичными конидиеносцами, например, у штамма 401-1. На среде ТА и V8 наблюдали образование более округлых конидий с тупоконусным клювом. У изолята 454 отсутствовали конидии на 10 сутки культивирования. У изолята 425-3 отмечали одиночные цепочки конидий в ветвящейся головке (без учета коротких боковых ветвей), которые могут иметь до 15-20 конидий. Первые 1-2 конидии в цепочке обычно остаются длинно эллиптическими по мере созревания; конидии, образующиеся позже в цепочке, становятся яйцевидными, эллипсоидными или сфероидными.

Таким образом, выявлено, что на овощной среде V8 культуры *Alternaria spp.* интенсивнее спорулируют, дают больший объем биомассы и достаточно большую вариативность микроструктур, тогда как на КМА можно получить хорошо просматриваемые формы ветвления, структуру паттернов, более однозначные признаки микроструктур. Можно констатировать, что в зависимости от цели работы и для полноты описания систематических признаков виноградных изолятов *Alternaria spp.* можно использовать одну из 3-х сред (КМА, ТА, V-8), либо их сочетание.

3.5 Молекулярно-генетическая идентификация патогенных видов *Alternaria*

В связи с высокой пластичностью морфологических признаков культур грибов *Alternaria* Nees изучение только морфолого-культурального критерия чаще всего недостаточно для их идентификации. На ключевой таксономический признак, габитус споруляции (three-dimensional sporulation pattern) (Simmons et.al., 1993), при культивировании в лабораторных условиях сильно влияет состав питательной среды, освещенность, температура.

Распространенным определителем для грибов *Alternaria* является руководство по идентификации Э. Симмонса (2007). В нем описаны определенные условия для культивирования альтернариевых грибов. И, хотя эти

условия можно легко воспроизвести в любой лаборатории, на морфологические характеристики, возможно, могут влиять другие факторы: внутривидовая изменчивость, специализация патогена, его тип питания.

В связи с этим хотелось бы отметить необходимость широкого внедрения современных молекулярных методов, обеспечивающих бóльшую точность и объективность при идентификации многих видов микроорганизмов. Согласно исследованиям J.H.C. Woudenberg с соавт. (2013), комплекс *Alternaria* в настоящее время включает девять родов и восемь секций (*Alternaria* redefined, 2013).

На основе анализа литературных данных наиболее подходящими для идентификации патогенных штаммов признаны ITS-регион, гены главного аллергена *Alternaria* (Alt a1), фактора элонгации трансляции α (TEF1 α), глицеральдегидполигалактуронидазы (gpd), β -тубулина (бета-тубулина).

Полученные нуклеотидные последовательности проанализированы с помощью алгоритма NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для определения наиболее близких, находящихся в базе данных. Ниже представлено подробное описание результатов выравнивания по каждому гену.

Внутренний транскрибируемый спейсер (ITS). По данному региону не удалось определить бóльшую часть штаммов. Только *Alternaria* 199-1-1, 401-1 и 443 на 99-100 % сходны с последовательностями *A. alternata* KJ728679.1, JQ080319.1, и MT557509.1 штамма 401-1. Последовательности остальных штаммов идентичны видам *A. alstroemeriae*, *A. alternata*, *A. angustiovoidea*, *A. arborescens*, *A. brassicae*, *A. destruens*, *A. gaisen*, *A. lini*, *A. longipes*, *A. malvae*, *A. solani*, *A. infectoria*, *A. chlamydospora*, *A. tenuissima*, *A. jacinthicola*, *A. compacta*, *A. gaisen*, *A. mali*. Полезность ITS-региона для идентификации видов *Alternaria*, который является универсальным геном штрихкодирования для грибов, горячо обсуждается, потому что несколько морфологически различных видов (например, *A. alternata* и *A. tenuissima*) либо на 100% идентичны, либо почти идентичны.

Ген главного аллелгена *Alternaria 1* (Alt a1). Участки генов бóльшей части штаммов соответствуют последовательностям *A. alternata*. Последовательности гена штаммов 199-1-1, 401-1, 447, 451 и 492-2 на 100 % соответствуют *A. alternata* AF288160.1. Последовательности штаммов 429-3 и 443 на 100 % идентичны таковым у *A. alternata* AF288160.1, MH728995.1, KJ396786.1, а 424-1, 424-2 и 614-4 идентичны на 100 % *A. alternata* KY923227.1; 448 и 456 на 100 % соответствуют *A. alternata* нескольких штаммов из базы NCBI. Участок гена штаммов 422-1 и 427 не показал четкого деления между видами. Последовательность штамма 422-1 идентична *A. alternata* (AF288160.1) и *A. tenuissima* (MW016006.1), а 427 сходна на 99,72 % с *A. alternata* (MW685778.1, MW685777.1, MW316727.1, MW233652.1), *A. tenuissima* (LC631829.1) и *A. arborescens* (MF581232.1, MF581231.1).

Ген фактора элонгации трансляции альфа 1 (TEF1 α). Для штаммов 199-1-1, 429-3, 443 и 492-2 в результате выравнивания BLAST выявлено сходство на 99 % с последовательностью *Alternaria arborescens* JQ905140.1. Для остальных штаммов идентификация по этому гену оказалась неуверенной. Так, последовательности штаммов 401-1, 422-1, 424-1, 424-2, 427, 447, 448, 451, 456 и 614-4 на 99-100 % идентичны нескольким последовательностям видов *A. alternata* (MN970210.1, MK340863.1, KU933426.1, CP061877.1 и др.) и *A. tenuissima* (MN078931.1, JQ905124.1, KU577440.1), а штамм 614-4 дополнительно совпал с последовательностью *A. longipes* JQ905136.1.

Ген бета-тубулина (β -tubulin). Частичные последовательности этого гена на 99-100 % совпали с видом *A. alternata* (таблица 16).

Таблица 16 – Результаты выравнивания последовательностей генов патогенных видов *Alternaria* (NCBI National Center for Biotechnology Information)

Ген	Номер изолята	Количество сравниваемых пар нуклеотидов	Сходство с последовательностями из базы данных NCBI, %	Вид <i>Alternaria</i>
1	2	3	4	5
Alt a1	199-1-1	510	99-100	<i>Alternaria alternata</i>
	401-1	502		
	424-1	502		
	424-2	471		
	429-3	459		
	443	459		
	451	497		
	456	502		
	492-2	512		
	614-4	465		
	422-1	498	100	<i>A. alternata</i> или <i>A. tenuissima</i>
	427	462	99,72	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> или <i>A. arborescens</i>
ITS	199-1-1	854	99,65	<i>A. alternata</i>
	401-1	459	100	
	422-1	459	99-100	<i>A. alstroemeriae</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. angustiovoidea</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. brassicae</i> , <i>A. destruens</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. lini</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. malvae</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. infectoria</i> , <i>A. chlamydospora</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. jacinthicola</i> , <i>A. compacta</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. mali</i> .
	424-1	530		
	424-2	570		
	427	336		
	429-3	560		

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5
	443	894		<i>A. alstroemeriae, A. alternata, A. angustiovoidea, A. arborescens, A. brassicae, A. destruens, A. gaisen, A. lini, A. longipes, A. malvae, A. solani, A. infectoria, A. chlamydospora, A. tenuissima, A. jacinthicola, A. compacta, A. gaisen, A. mali.</i>
	447	477		
	448	568		
	451	571		
	456	569		
	492-2	400		
	614-4	569		
β- тубулин	199-1-1	752	100	<i>Alternaria alternata</i>
	401-1	574	100	<i>Alternaria alternata</i>
	422-1	1064	99,91	<i>Alternaria alternata</i>
	424-1	770	100	<i>Alternaria alternata</i>
	424-2	825	100,0	<i>Alternaria alternata</i>
	429-3	638	100,0	<i>Alternaria alternata</i>
	443	476		<i>Alternaria alternata</i>
	447	1186	99,75	<i>Alternaria alternata</i>
	448	1107		<i>Alternaria alternata</i>
	451	537	100,0	<i>Alternaria alternata</i>
	456	762	99,87	<i>Alternaria alternata</i>
	492-2	1195	99,50	<i>Alternaria alternata</i>
	614-4	1161	99,83	<i>Alternaria alternata</i>
TEF 1α	199-1-1	596	99	<i>A. arborescens</i>
	429-3	595		
	443	588		
	492-2	587		
	401-1	581	99-100	<i>A. alternata</i> или <i>A. tenuissima</i>
	422-1	596		
	424-1	570		
	424-2	584		
427	572			
TEF 1α	443	588	99-100	<i>A. alternata</i> или <i>A. tenuissima</i>
	447	586		
	448	596		
	451	596		

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5
	456	574		
	614-4	495	100	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> или <i>A. longipes</i>
gpd	199-1-1	500	99-100	<i>A. alternata</i>
	424-1	562		
	492-2	558		
	614-4	530		
	429-3	526	97,72	<i>A. alternata</i>
	424-2	400	100	<i>A. alternata</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. tenuissima</i>
	401-1	565	99-100	<i>A. alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. mali</i> , <i>A. tenuissima</i>
	422-1	559		
	427	559		
	447	567		
	448	558		
	443	554	99-100	<i>A. alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. tenuissima</i>
	451	552		
456	552			

Ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (gpd). 199-1-1, 424-1, 492-2 – 99-100 % *A. alternata* МК683855.1, 614-4 – 99,81 % *A. alternata* КР877999.1, 401-1, 422-1, 427, 447, 448 – 100 % *A. alternata*, *A. longipes*, *A. arborescens*, *A. mali*, *A. tenuissima*, 443, 451, 456 – 100 % *A. alternata*, *A. longipes*, *A. arborescens*, *A. tenuissima*, 424-2 – 100 % *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima*, 429-3 – 97,72 % *A. alternata* MN633402.1.

Метод идентификации альтерналиевых видов с помощью трехмерной модели споруляции создан, чтобы упростить классификацию внутри рода. Хотя уже было показано, что на характер споруляции могут сильно влиять параметры культивирования, он остается значимым признаком для различения подвидовых групп *Alternaria*. Согласно морфологическим данным, полученным при культивировании на общепринятых для идентификации *Alternaria* (Simmons E.G.,

2007) большинство изолятов являются мелкоспоровыми видами с размерами конидий $25-30 \times 5-9$ мкм и паттерном споруляции, характерным для *A. alternata*.

В последние годы исследования, основанные на ДНК-технологии, выявили клады *Alternaria*, которые не всегда соотносятся с группами видов, основанными на морфологических характеристиках (*Alternaria redefined*, 2013). В наших экспериментах изоляты 424-1 и 424-2, идентифицированные молекулярно как *Alternaria alternata*, имеют морфологию *A. tenuissima*, а именно неразветвленные цепочки (рисунок 18.1, 18.2).

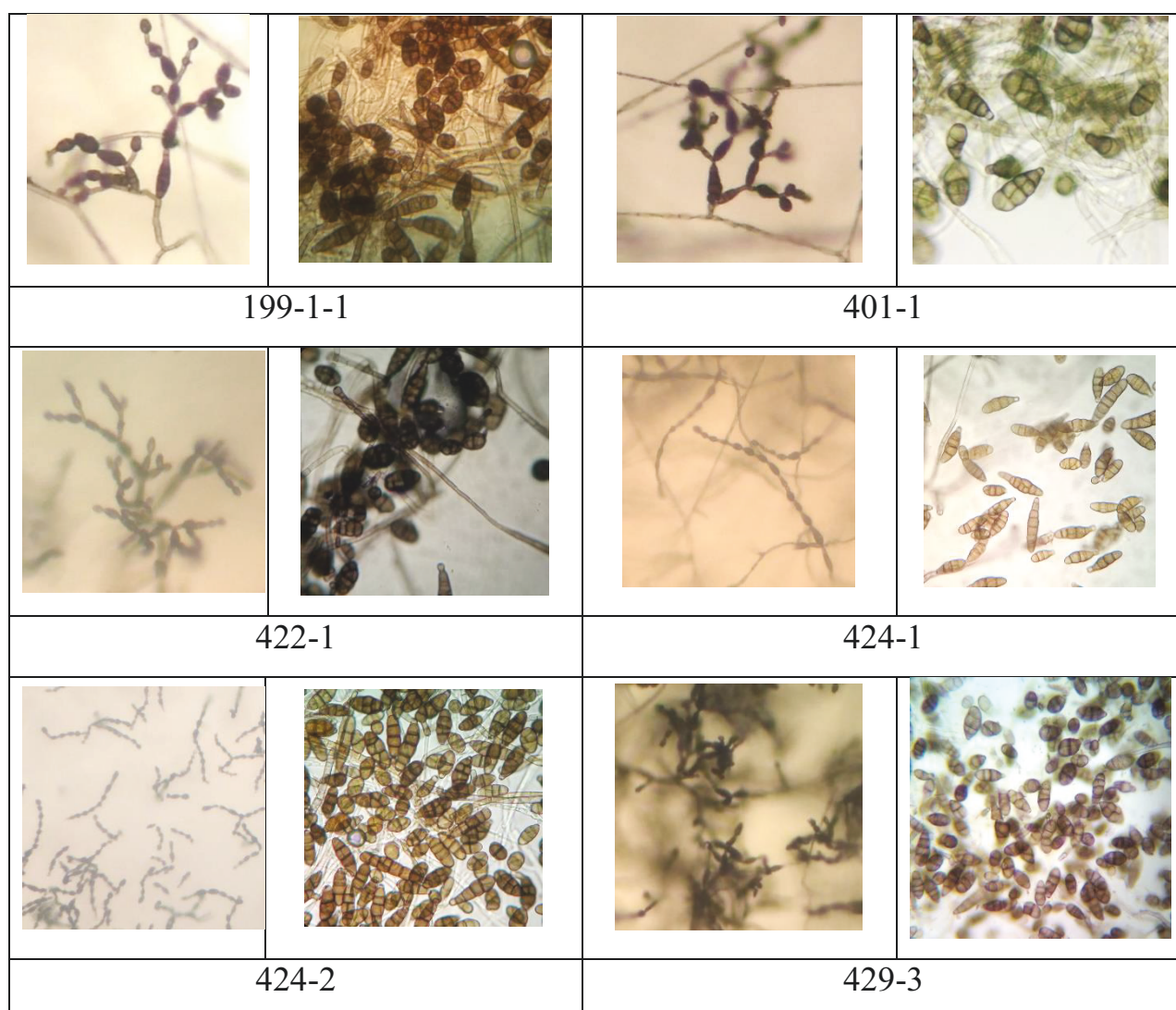


Рисунок 18.1 – Морфология патогенных штаммов *Alternaria*

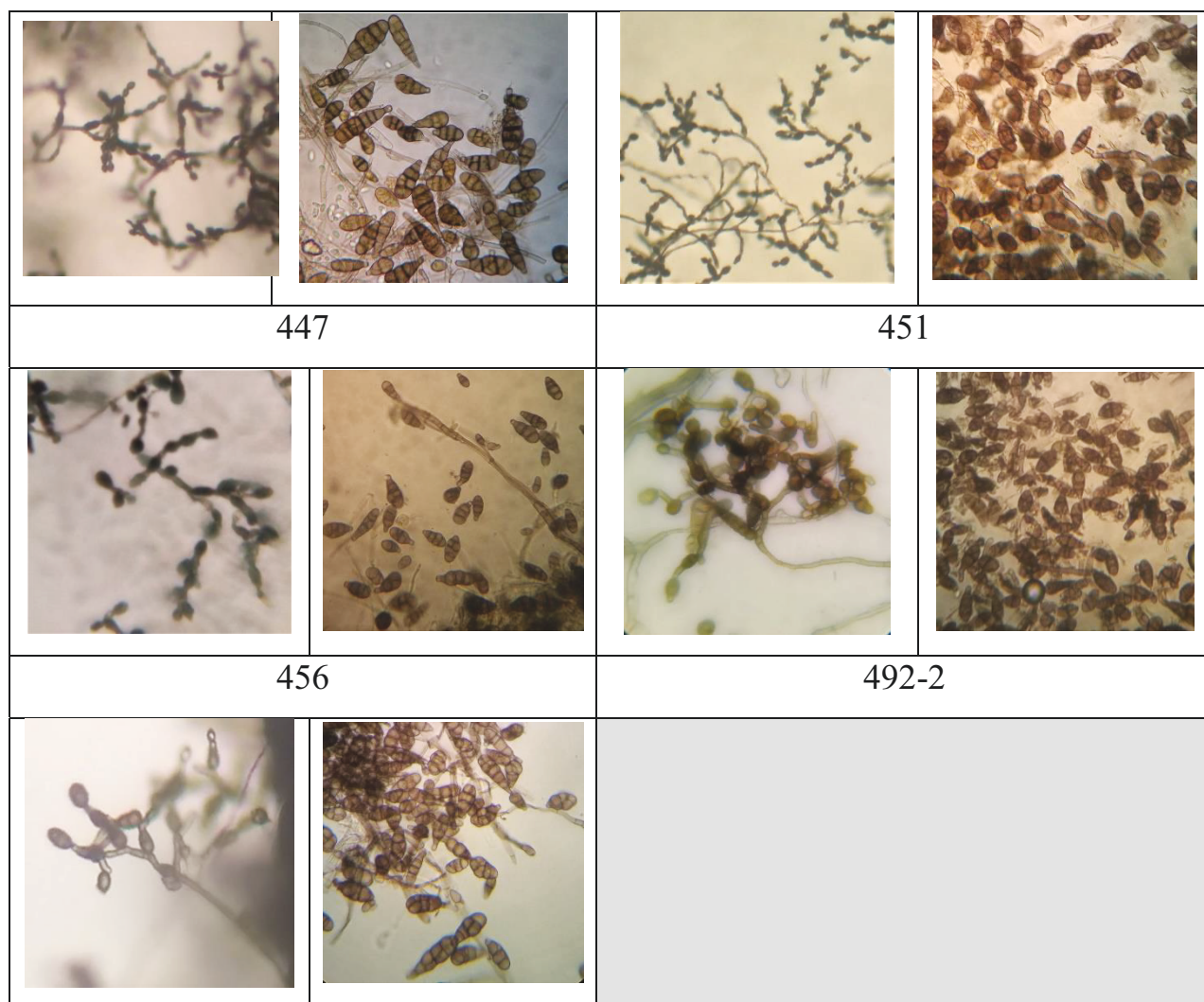


Рисунок 18.2 – Морфология патогенных штаммов *Alternaria*

Таким образом, молекулярно-генетические исследования позволили установить в качестве основного вида в комплексе патогенных штаммов альтернариевых грибов вид *Alternaria alternata*.

3.6 Оценка полевой устойчивости сортов винограда к поражению некротической пятнистостью листьев

Ориентируясь на течение фитопатогенеза в полевых условиях, к изучению степени устойчивости на основе проявления признаков поражения некротической

пятнистостью листьев у находящихся в наблюдении сортов винограда приступали в период интенсивного развития естественной инфекции (Юрченко и др., 2019).

Оценивая степень устойчивости сортов винограда к поражению листовой пятнистостью, отмечено, что в пределах вида *Vitis vinifera* наиболее поражаемыми были белые сорта западноевропейской эколого-географической группы – convar. *occidentalis* subconvar. *gallica* (Совиньон Блан, Пино Блан, Шардоне, Алиготе, Мюллер Тургау, Рислинг).

За период наблюдений распространение болезни на них колебалось от 0 до 29,1 %, а интенсивность развития от 0 до 9,2 %. Максимальные распространение и развитие некротической листовой пятнистости зафиксированы в 2020 году на сортах Мюллер Тургау (P 29,1% R 9,2 %) и Совиньон блан (P 26,4 % R 9,0 %). Первые признаки заболевания на этих сортах обнаруживались в фенофазу «плодообразование: начало формирования грозди» на продуктивных, но ослабленных листьях (причина - воздушная и почвенная засухи). Высокая степень полевой устойчивости к альтернариозу отмечена у красных сортов западноевропейской эколого-географической группы (Мерло, Каберне Совиньон) (R 0-0,7 %), а также у сорта бассейна Черного моря - convar *pontica* Negr. (Саперави) (R 0,9 %).

В целом в подавляющем большинстве наблюдений на сортах внутривидового происхождения некротическая пятнистость развивалась на стареющих или ослабленных и поврежденных листьях (например, солнечными ожогами), развитие болезни начиналось значительно позже, чем на межвидовых гибридах. (таблица 17).

Таблица 17 – Полевая оценка поражения листьев винограда некротической пятнистостью в условиях Анапо-Таманской зоны, 2020 г.

Сорт винограда	Генотип	Показатели заболеваемости	
		P, %	R, %
Гибридные евро-американские сорта			
Бианка	(<i>V. vinifera</i> + <i>V. labrusca</i> + <i>V. riparia</i> + <i>V. rupestris</i> + <i>V. berlandieri</i> + <i>V. aestivalis</i> + <i>V. cinerea</i>) x <i>V. vinifera</i>	100	58,9
Молдова	(<i>V. vinifera</i> x (<i>V. vinifera</i> + <i>V. labrusca</i> + <i>V. riparia</i> + <i>V. rupestris</i> + <i>V. berlandieri</i> + <i>V. aestivalis</i> + <i>V. cinerea</i>))	43,0	22,4
Августин	<i>V. vinifera</i> x (<i>V. vinifera</i> + <i>V. labrusca</i> + <i>V. rupestris</i> + <i>V. berlandieri</i> + <i>V. lincecumii</i>)	38,0	24,4
Дунавски лазур	<i>V. vinifera</i> x (<i>V. vinifera</i> + <i>V. labrusca</i> + <i>V. rupestris</i> + <i>V. berlandieri</i> + <i>V. lincecumii</i> .)	43,8	22,4
Первенец Магарача	<i>V. vinifera</i> x (<i>V. vinifera</i> x (<i>V. vinifera</i> + <i>V. riparia</i> + <i>V. rupestris</i>))	55,2	28,8
Цитронный Магарача	<i>V. vinifera</i> + <i>V. vinifera</i> + <i>V. labrusca</i>	15,1	4,8
Левокумский	<i>V. vinifera</i> + <i>V. labrusca</i>	100	61,9
Декабрьский	<i>V. vinifera</i> x (<i>V. vinifera</i> + <i>V. labrusca</i> + <i>V. rupestris</i> + <i>V. berlandieri</i> + <i>V. lincecumii</i>)	29,2	14,7
Дойна	<i>V. lincecumii</i> + <i>V. rupestris</i> + <i>V. vinifera</i>	34,2	17,1
Гибридные евро-амурские сорта			
Куньлеань	(<i>V. vinifera</i> x <i>V. amurensis</i>) x <i>V. vinifera</i> convar. boreali-africana	0	0
Брускам	<i>V. vinifera</i> x <i>V. labrusca</i> x <i>V. amurensis</i>	0	0
Амур	<i>V. vinifera</i> convar. orientali-mediterranea x <i>V. amurensis</i> x <i>V. vinifera</i>	0	0
Кристалл	<i>V. vinifera</i> x <i>V. amurensis</i>	5,1	3,5
Восторг	<i>V. vinifera</i> x + <i>V. amurensis</i>	7,4	3,1
Европейские сорта			
Рислинг рейнский	<i>V. vinifera</i> convar occidentalis subconvar. gallica	14,3	5,2
Совиньон блан		26,4	9,0
Алиготе		11,2	2,5
Шардоне		10,5	0,8
Пино блан		5,3	2,0
Мюллер Тургау		29,1	9,2
Траминер		0	0
Каберне Совиньон		0	0
Мерло		3,7	0,7
Саперави	<i>V. vinifera</i> convar pontica subconvar. georgica	2,3	0,9

При проведении анализа по влиянию происхождения межвидовых сортов винограда на степень полевой устойчивости к альтернариозу установлено, что европейско-американо-амурские сорта (Кунлеань, Брускам, Амур, Кристалл, Восторг) не поражались совсем или поражались слабо (R 0-3,5 %), возбудитель присутствовал на них в основном как сапротроф. Сильнее всего поражались европейско-американские сорта (Бианка, Легокумский, Августин, Молдова, Первенец Магарача, Декабрьский, Дунавски лазур). Среди них, как наиболее восприимчивые к альтернариозу, выделяются - сорт Бианка (Сейв Виллар 12-375 x Шасла бувье) – сложный межвидовой гибрид (*V. vinifera* + *V. labrusca* + *V. riparia* + *V. rupestris* + *V. berlandieri* + *V. aestivalis* + *V. cinerea*) (Юрченко Е.Г. и др., 2019), сорт Легокумский - гибридный сеянец от свободного опыления (*V. vinifera* x *V. labrusca*). Распространение болезни на них было очень широким до 100%, а интенсивность развития доходила до 61,9%.

3.7 Выявление физиолого-биохимических барьеров неспецифической устойчивости сортов винограда к поражению некротической листовой пятнистостью

В условиях усиления воздействия факторов внешней среды на ампелоценозы в Краснодарском крае, возрастают риски ослабления растений и более интенсивного развития заболеваний, вызванных полупаразитными грибами, к которым относится и некротическая листовая пятнистость. В этой связи большое значение имеет состояние защитно-компенсаторных и других приспособительных реакций винограда, регуляция и сохранение относительного постоянства внутренней среды растений как одного из главных средств приспособления к переменным условиям среды и воздействию повреждающих факторов (Sauerborn et.al., 2002; Kishor et.al., 2005; Aquaporins and plant water balance, 2008).

Многочисленными исследованиями доказана важная роль концентрации фотосинтетических пигментов в формировании урожая и поддержания высокого иммунного статуса растений. Фотосинтез у растений винограда как основа продукционного процесса находится в тесной зависимости от большого количества природных и антропогенных факторов среды обитания (Zufferey et.al., 2009; Jicheng et.al.,2002; Svercel et.al., 2010). Она, очевидно, имеет еще большее значение для экосистем, где растения постоянно подвергаются воздействию биотического, абиотического и пестицидного прессинга.

Это связано с тем, что он может нанести серьезный ущерб фотосинтетическому аппарату растения, угнетая активность фотосистемы II, снижая содержание хлорофиллов и других фотосинтетических пигментов, что приводит к общему торможению роста и, следовательно, значительному снижению урожайности (Carbon Nanotubes Decrease..., 2021).

В проведенной работе по установлению физиолого-биохимических барьеров неспецифической устойчивости различных по генотипу сортов винограда к некротической пятнистости листьев, в первую очередь, рассматривали процессы фотосинтеза на основе определения содержания пигментов – хлорофилла "а", хлорофилла "b" в листьях в динамике.

Было выявлено, что в механизме физиолого-биохимического барьера к развитию некротической пятнистости на листьях винограда заметную роль играет высокое содержание суммы хлорофиллов, а и b, на протяжении всего периода патогенеза и особенно в период начального развития болезни (в июне). Так, общее содержание хлорофиллов было выше в среднем на 30% у устойчивых европейских сортов по сравнению с высоко восприимчивыми межвидовыми гибридами. У светлых сортов содержание хлорофиллов в период нарастания интенсивности болезни отмечалось на уровне 1,53-1,99 мг/см² (европейский сорт Рислинг рейнский) и 0,55-1,11 мг/см² (евро-американский сорт Бианка), у темноокрашенных - 0,93-1,23 мг/см² (европейский сорт Каберне Совиньон) и 0,62-0,89 мг/см² (евро-американский сорт Левокумский) (рисунки 19, 20).

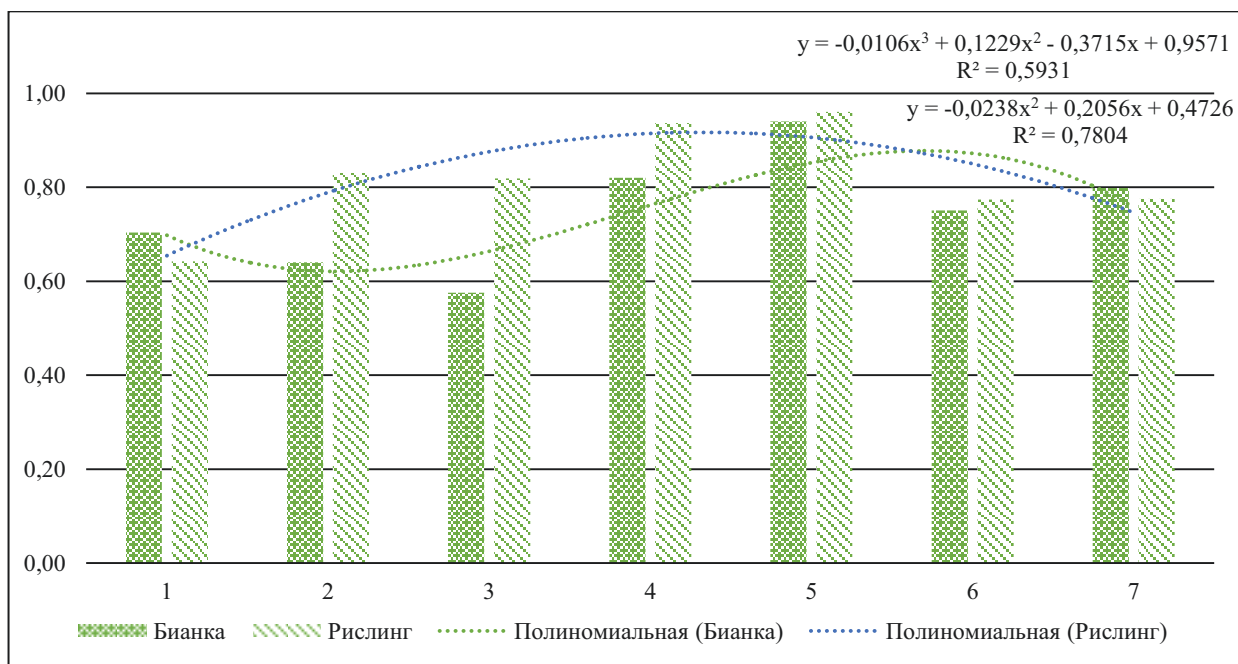


Рисунок 19 –Динамика содержания суммы хлорофиллов (a+b) в мг/см² (среднее за два года) в листьях у различных по генотипу светлых сортов винограда, Краснодарский край, 2020-2021 г.

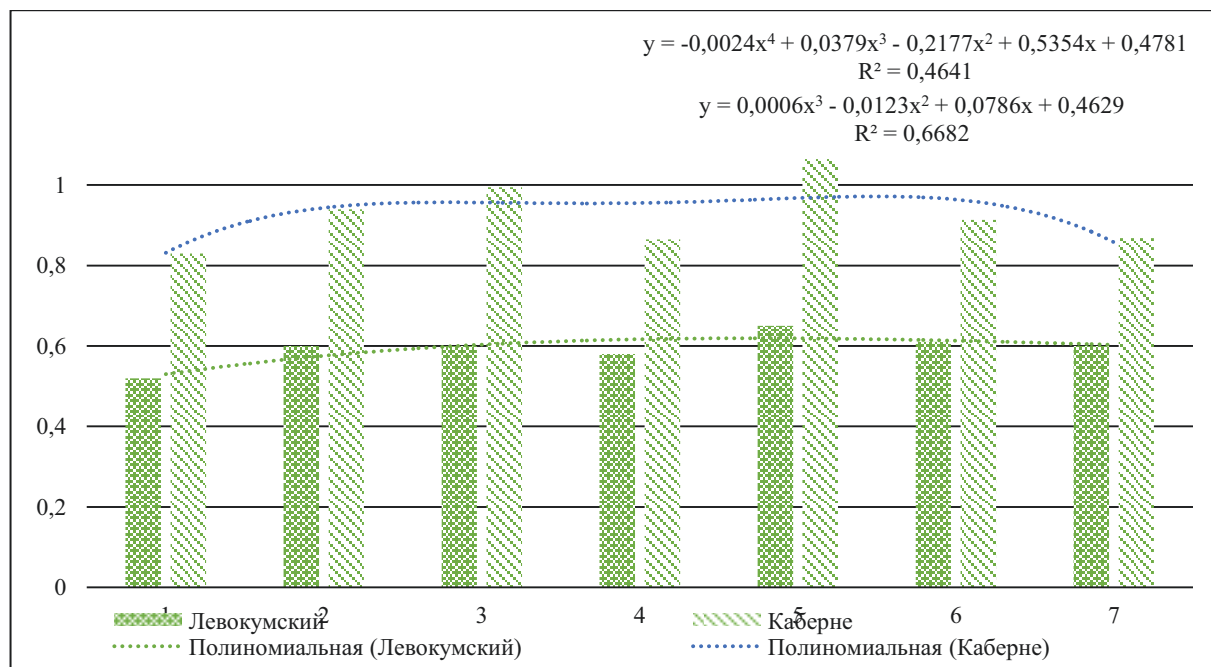


Рисунок 20 –Динамика содержания суммы хлорофиллов (a+b) в мг/см² (среднее за два года) в листьях у различных по генотипу темноокрашенных сортов винограда, Краснодарский край, 2020-2021 г.

Существует прямая зависимость между содержанием хлорофиллов и водоудерживающей способностью в листьях древесных растений (Васильева К.А. и др., 2011). Недостаток воды снижает эффективность фотосинтетических процессов, при этом стоит учитывать, что при относительно высокой интенсивности воздействия засухи могут происходить значимые изменения (Effects of Drought Stress..., 2007). Отличия между растениями винограда, находящимися под воздействием наиболее интенсивного водного дефицита, отличаются минимальным размером ягод, большим соотношением кожицы и мякоти, слабым накоплением фенольных соединений и сухих веществ в ягодах. У ослабленных растений выше риск заражения патогенами, на них интенсивнее развиваются болезни.

Изучение динамики оводненности листьев показало постепенное снижение содержания общей воды у всех исследуемых сортов по мере роста среднесуточных температур воздуха. Однако, отмечена разница в содержании воды в листьях различных по генотипу сортов винограда в период заражения и начального развития некротической листовой пятнистости. Наименьшая оводненность листьев наблюдалась в период конца июля-начала августа. Закономерно, что у евроамериканских гибридных сортов винограда, очень интенсивно развивалась некротическая листовая пятнистость в период интенсивного снижения оводненности листьев (рисунки 21, 22).

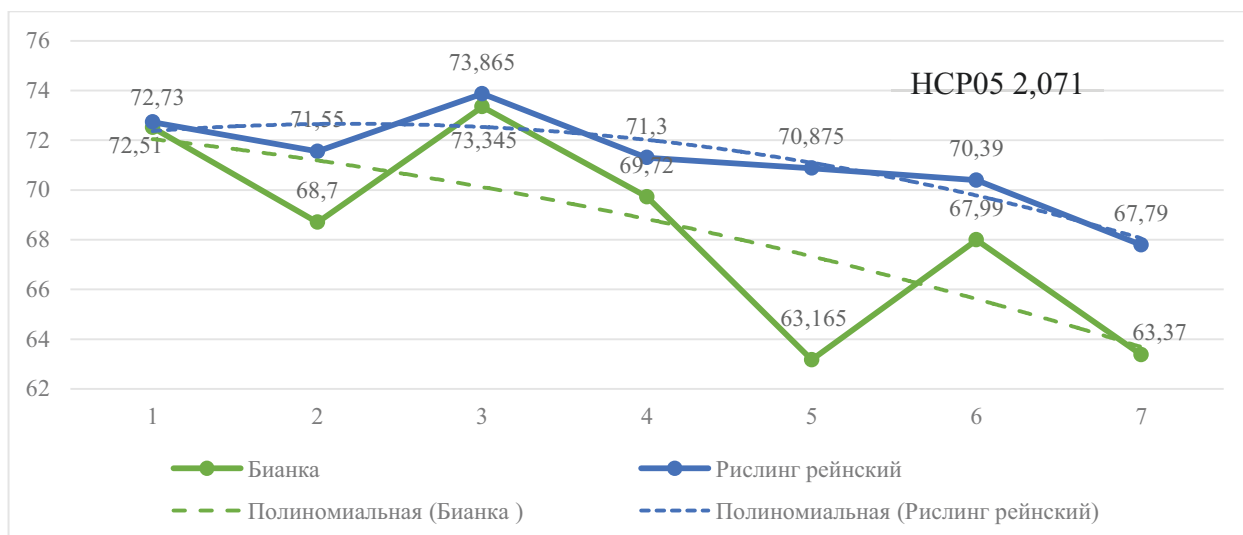


Рисунок 21 – Динамика оводненности листьев различных по генотипу белых сортов винограда (среднее за два года), Анапо-Таманская зона, Краснодарский край, 2020-2021 г.

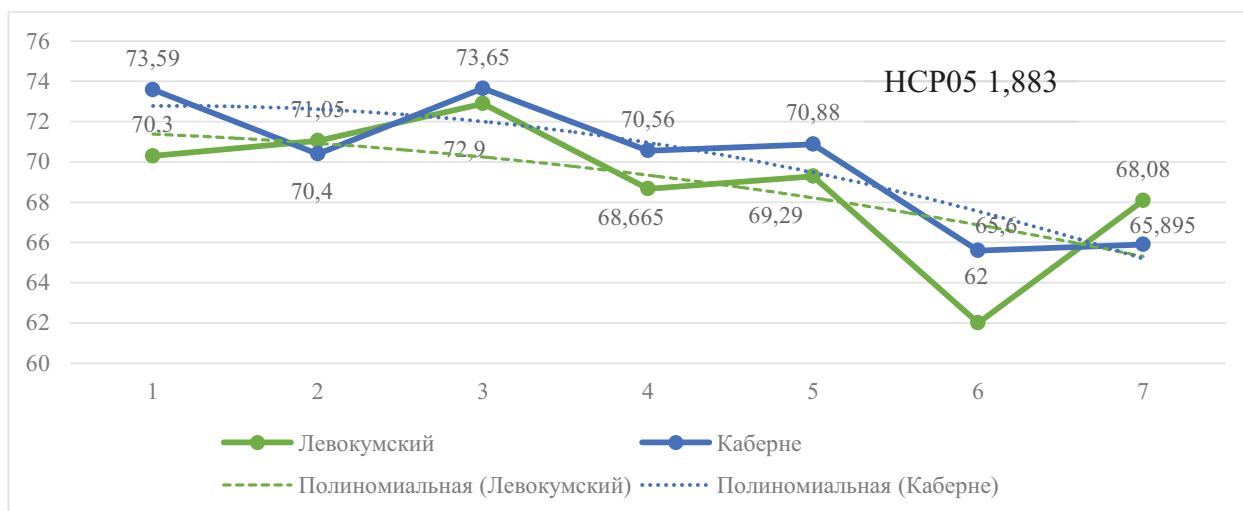


Рисунок 22 – Динамика оводненности листьев различных по генотипу темноокрашенных сортов винограда (среднее за два года), Анапо-Таманская зона, Краснодарский край, 2020-2021 г.

Об эффективности фотосинтеза в условиях высоких температур также свидетельствует и содержание свободных аминокислот. Аминокислоты, наряду с органическими и фенолкарбоновыми кислотами участвуют в окислительно-восстановительных процессах. Их лабильность позволяет поддерживать равновесие между окислением веществ и их восстановлением. Известно, что

стрессы вызывают появление свободных радикалов, что ведет к развитию деструктивных эффектов. Чем интенсивнее окислительно-восстановительные процессы в клетках растения, тем устойчивее оно к стрессам.

На фоне роста неблагоприятного воздействия погодных условий (высокотемпературная засуха) на протяжении практически месяца наблюдался эффект более высокого накопления свободных аминокислот в листьях европейских сортов винограда, которые хотя и постепенно снижаясь, превышали содержание в листьях гибридных сортов. Такой эффект наблюдался у всех европейских сортов в опыте – Рислинга рейнского по сравнению с Бианкой и Каберне Совиньона по сравнению с Левокумским (рисунки 23, 24).

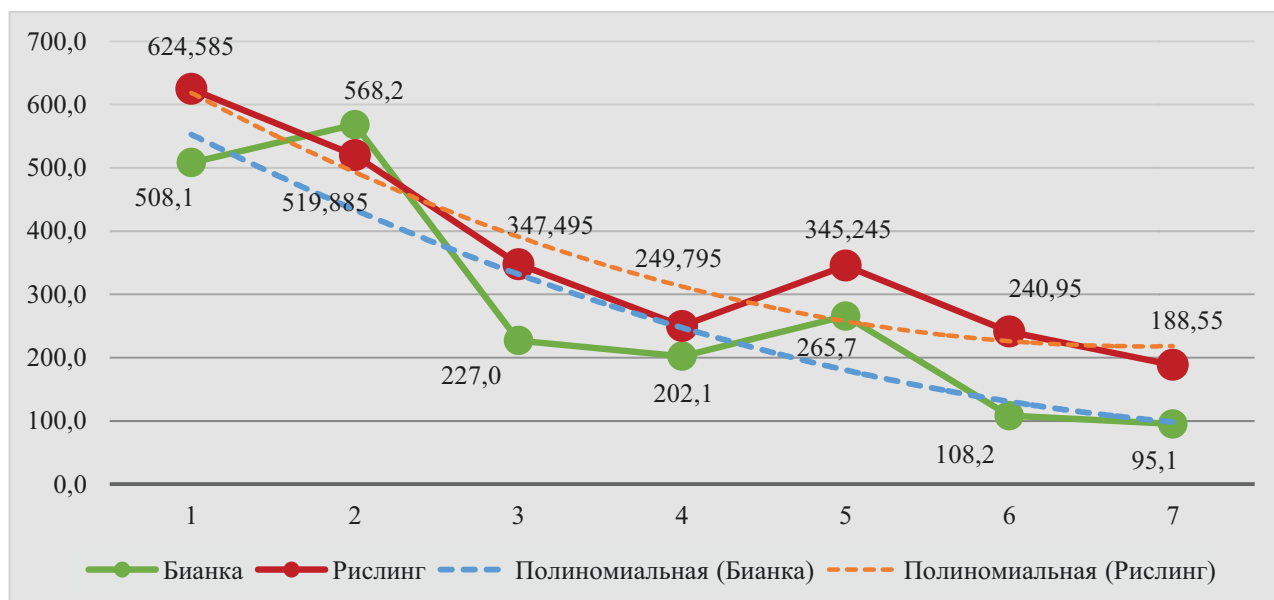


Рисунок 23 – Динамика содержания свободных аминокислот (мг/кг) в листьях у различных по генотипу светлоокрашенных сортов винограда (среднее за два года), Анапо-таманская зона, Краснодарский край, 2020-2021 гг.

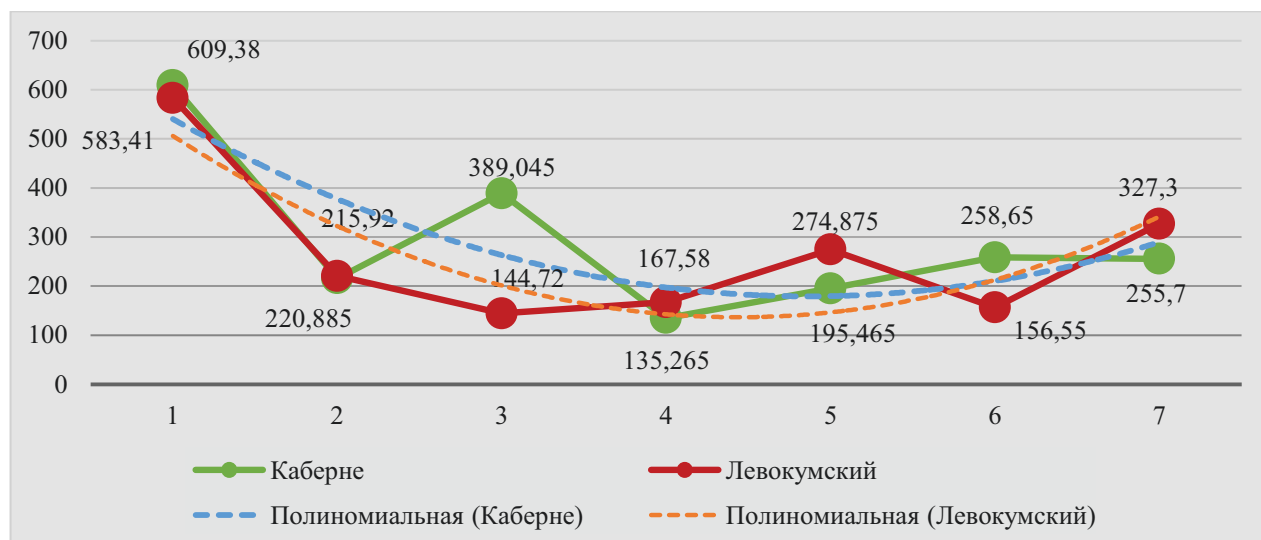


Рисунок 24 – Динамика содержания свободных аминокислот (мг/кг) в листьях у различных по генотипу темноокрашенных сортов винограда (среднее за два года), Анапо-Таманская зона, Краснодарский край, 2020-2021 гг.

Особая роль в обеспечении устойчивости растений к засухе отводится пролину. Стресс-индуцированное накопление пролина в растительных клетках обладает мультифункциональным действием на клеточный метаболизм, помогая растениям адаптироваться к неблагоприятным условиям, защищая от инактивации белки, ДНК, ряд ферментов и другие важнейшие клеточные компоненты (Кузнецов В.В. и др., 1999).

В опытах проводили оценку накопления пролина в листьях у различных по генотипу сортов винограда. Анализ полученных данных показал, что содержание пролина было достоверно выше у европейских сортов по сравнению с евроамериканскими гибридами практически на протяжении всего периода наблюдений. Наибольшую разницу отмечали в период возможного заражения и начала развития некротической листовой пятнистости (рисунки 25, 26).

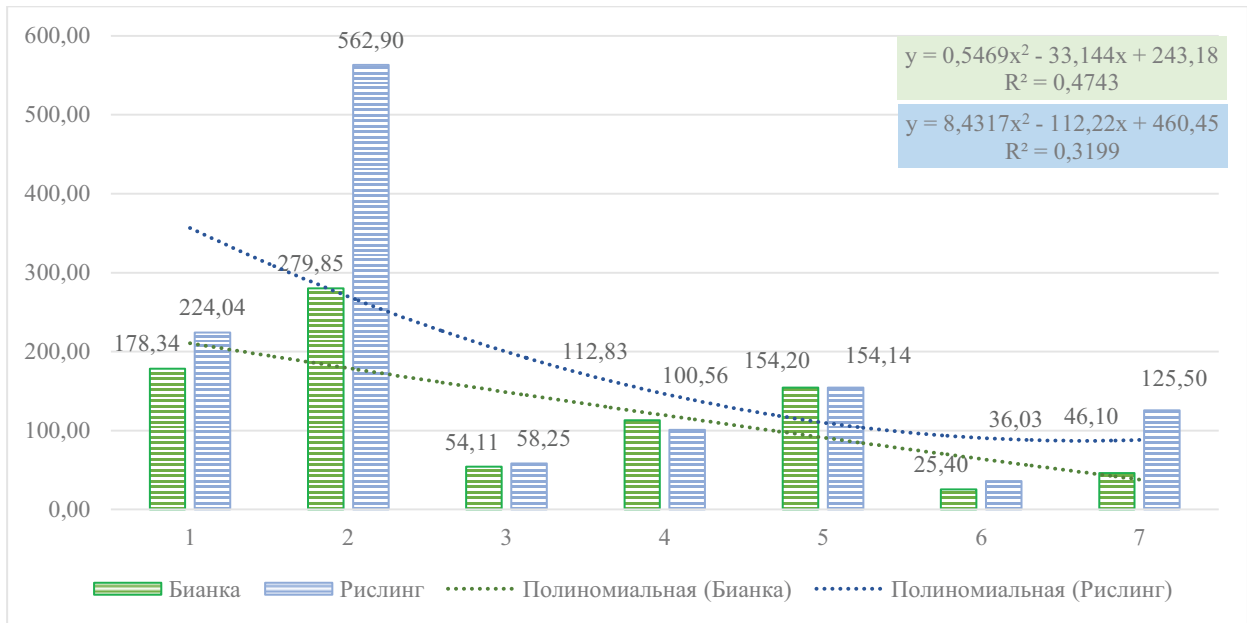


Рисунок 25 – Динамика содержания накопления пролина в листьях у различных по генотипу светлоокрашенных сортов винограда (среднее за два года), Анапотаманская зона, Краснодарский край, 2020-2021 г.

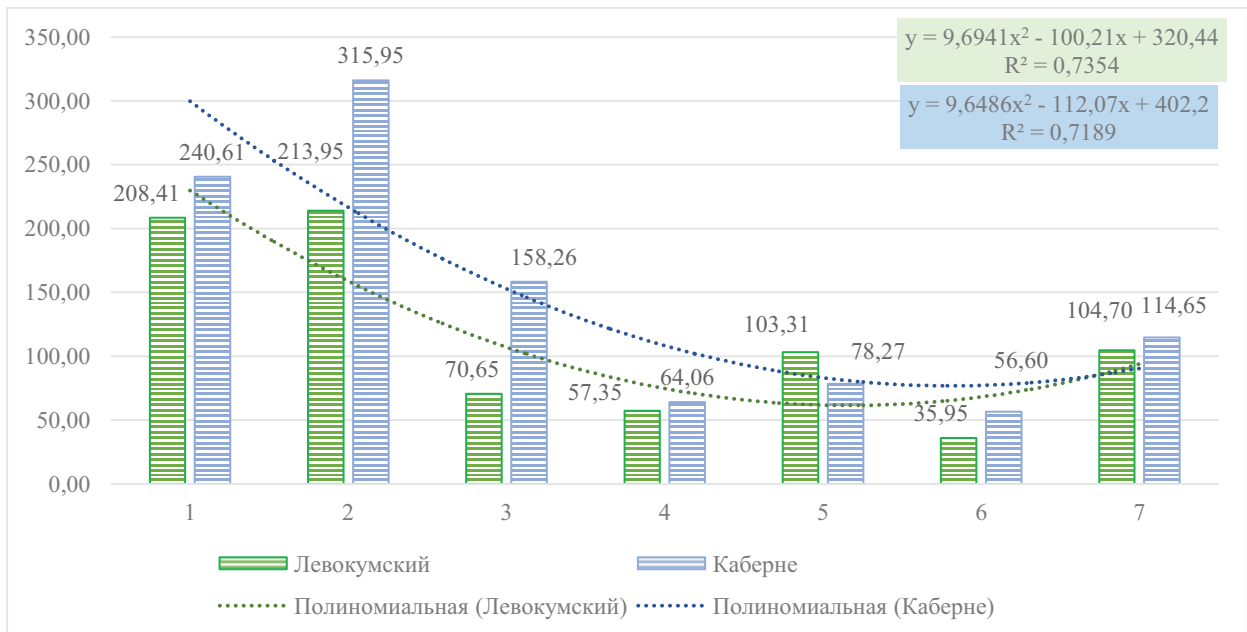


Рисунок 26 – Динамика содержания накопления пролина в листьях у различных по генотипу темноокрашенных сортов винограда (среднее за два года), Анапотаманская зона, Краснодарский край, 2020-2021 гг.

3.8 Разработка мер контроля некротической листовой пятнистости винограда

3.8.1 Лабораторные исследования

3.8.1.1 Скрининг антимикотической активности химических фунгицидов в отношении наиболее агрессивных изолятов патокомплекса некротической листовой пятнистости винограда

В результате лабораторного скрининга фунгицидов из группы триазолов было выявлено, что действующие вещества дифеноконазол (Скор, КЭ) и дифеноконазол в сочетании с маслом чайного дерева (Шриланк, КМЭ) были наиболее эффективными в подавлении роста мицелия обоих штаммов. Установлено, что штамм А-429-2 более устойчив ко всем протестированным препаратам из данной группы (рисунок 27).

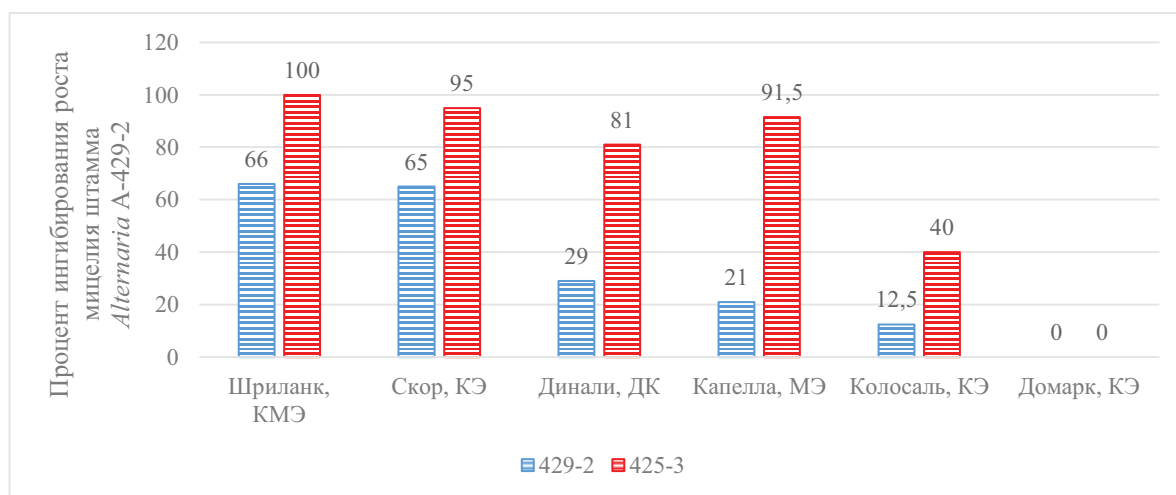


Рисунок 27 – Эффективность фунгицидов из группы триазолов в отношении патогенных штаммов *Alternaria* spp. А-425-3 и А-429-2 *in vitro*

Сниженную чувствительность у штамма А-429-2 наблюдали и к комбинированным препаратам: дифеноконазол+цифлуфенамид (Динали, ДК) и пропиконазол+флутриафол+дифеноконазол (Капелла, МЭ) (рисунок 28).



Рисунок 28 – Скрининг триазолов в отношении патогенного штамма рода *Alternaria* А-429-2 – возбудителя некротической листовой пятнистости винограда

О фунгицидной активности у перечисленных действующих веществ в отношении разных видов *Alternaria* также свидетельствуют проведенные ранее мировые исследования. Так, Iacomì-Vasilescu с соавт. (2004) установили, что флутриафол и дифеноконазол эффективно сдерживали рост мицелия патогенных для крестоцветных полевых изолятов *A. brassicae*, *A. brassicicola* и *A. japonica* (*In vitro* fungicide sensitivity..., 2004). Наибольшее ингибирование *in vitro* (%) патогена картофеля *A. alternata* было зафиксировано при применении флутриафола 6,94% + тебуконазола 20,8% (Evaluation of *in vitro* antifungal potential..., 2021). Mane с соавт. (2011) сообщили, что лучшими среди фунгицидов группы триазолов в

подавлении радиального роста *A. alternata* были дифеноконазол и гексаконазол (Management of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler..., 2011). В ингибировании прорастания конидий и роста мицелия патогена подсолнечника *A. helianthi* пропиконазол оказался среди наиболее эффективных системных фунгицидов (Amaresh V.S. et.al., 2002). Также пропиконазол полностью ингибировал *in vitro* рост патогенного для коровьего гороха (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., 1842) гриба *Alternaria alternata* (In vitro evaluation of different fungicides..., 2010). Patel С.М. (2008) установил, что пропиконазол обладает высокой фунгитоксичностью в отношении *A. alternata*. Исследователи из Индии обнаружили, что пропиконазол и другие действующие вещества из группы триазолов полностью ингибируют *A. alternata*, вызывающего листовые некрозы кунжута, даже при минимальной концентрации (Акбари et.al., 2007; Ginoya et.al., 2015).

Фунгицид на основе тетраконазола (Домарк, КЭ) не ограничивал рост обоих патогенов. Тебуконазол (Колосаль, КЭ) проявил антимикотическую активность в меньшей степени по сравнению с другими действующими веществами из исследуемой химической группы препаратов (12,5 %) (рисунок 29).

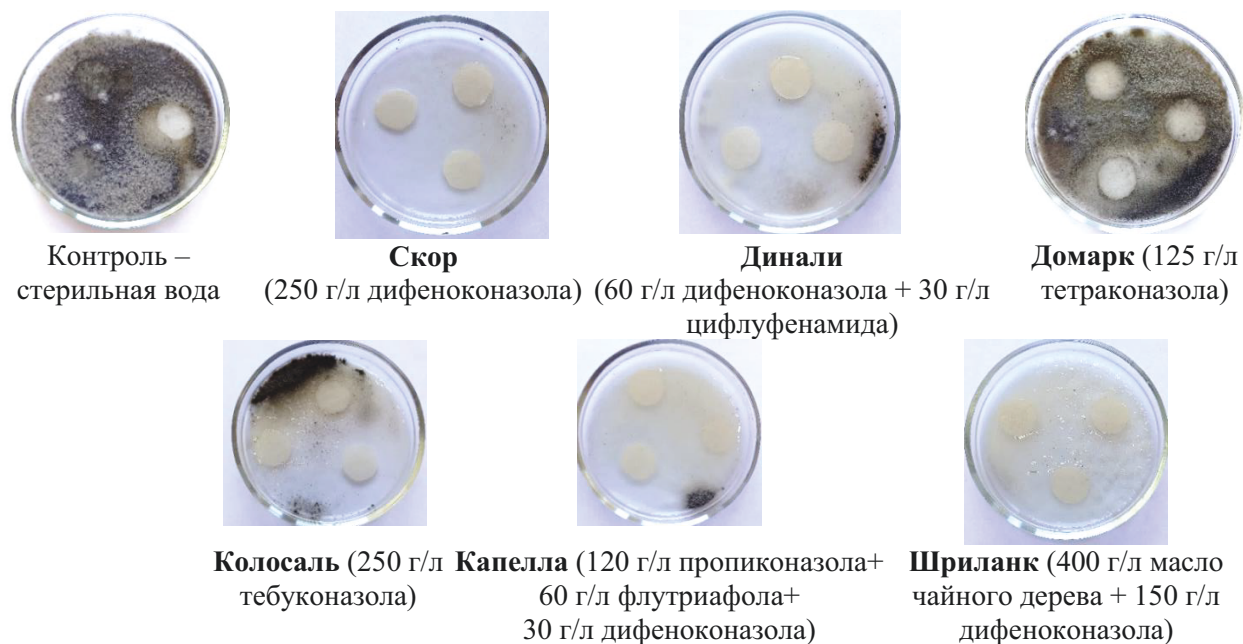


Рисунок 29 – Скрининг триазолов в отношении патогенного штамма рода *Alternaria* А-425-3 – возбудителя некротической листовой пятнистости винограда

Напротив, в другом исследовании этот ингредиент вызывал наиболее интенсивное ингибирование роста колоний штаммов *A. dauci*, *A. brassicae* и *A. alternata in vitro* среди других испытанных фунгицидов на протяжении всего периода культивирования. Тебуконазол был очень эффективен в ингибировании роста мицелия патогенов цитрусовых *Alternaria spp.* (Characterization, pathogenicity, and fungicide sensitivity..., 2022). Устойчивость к тебуконазолу была задокументирована в недавнем исследовании у патогенного для томатов *A. alternata* (Fitness and cross-resistance..., 2015).

В результате проведения скрининга химических препаратов группы стробилуринов было выявлено, что азоксистробин и крезоксим-метил не оказывали никакого влияния на рост патогенных штаммов (рисунок 30).











<i>Alternaria A-429-2</i>				
				
Контроль – стерильная вода	Квадрис 250 г/л азоксистробина	Кабрио Топ (50 г/кг пираклостробина + 550 г/кг метирама)	Интрада 250 г/л азоксистробина	Строби (500 г/кг крезоксим- метила)
<i>Alternaria A-425-3</i>				
				
Контроль – стерильная вода	Квадрис 250 г/л азоксистробина	Кабрио Топ (50 г/кг пираклостробина + 550 г/кг метирама)	Интрада 250 г/л азоксистробина	Строби (500 г/кг крезоксим- метила)

Рисунок 30 – Скрининг стробилуринов в отношении патогенных штаммов *Alternaria A-429-2* и *A-425-3* – возбудителей некротической листовой пятнистости винограда

Но среди стробилуринов небольшое фунгитоксическое действие оказалось у комбинированного препарата 50 г/кг пиракlostробина + 550 г/кг метирама. При скрининге данного действующего вещества выявлены зоны ингибирования роста мицелия обоих штаммов в пределах 2-4 мм. Хотя, Survilien E. с соавт. (2006) сообщали, что пиракlostробин отличался высокой ингибирующей активностью в отношении роста *A. alternata*, *A. brassicae*, *A. dauci* на протяжении 21 дня культивирования.

В зарубежной практике в течение нескольких лет азоксистробин и пиракlostробин отлично подходили для борьбы с альтернариозными болезнями в овощных культурах. При этом отмечалось, что некоторые грибы в популяции видов *Alternaria* могут проявлять устойчивость к данным фунгицидам (Farrar et.al., 2004). В экспериментах Survilien E. с соавт. (2006) штамм *A. dauci*-Сг показал устойчивость к азоксистробину и трифлористробину после 21 дня инкубации (ингибирующая активность составила 13,33 и 14,44% соответственно). В 2001 году Pasche J.S. с соавт. (2005) с помощью ПЦР в реальном времени определили мутацию F129L, вызывающую средний уровень устойчивости к фунгицидам – азоксистробину и пиракlostробину.

Низкой антифунгальной активностью обладали действующие вещества, относящиеся к группе дитиокарбаматов – манкоцеб (Фортуна Глобал, ВДГ и Дитан М-45, СП), манкоцеб+мефеноксам (Ридомил Голд, ВДГ). Можно сделать вывод, что эти препараты непригодны для дальнейшего полевого скрининга (рисунок 31). Напротив, в зарубежных исследованиях ученые сообщают о полном подавлении манкоцебом патогена хлопка (*Gossypium* spp.) *A. macrospora* и возбудителей пятнистостей *A. alternata*, выделенных с различных культур, а также чувствительности к нему *A. helianthi* (Amaresh et.al., 2002; *In vitro* evaluation of different fungicides..., 2010; Ginoya et.al., 2015; Kaur et.al., 2020).









<i>Alternaria</i> A-429-2			
			
Контроль – стерильная вода	Дитан М-45 (800 г/кг манкоцеба)	Ридомил Голд МЦ (640 г/кг манкоцеба+ 40 г/кг мефеноксама)	Фортуна Глобал (750 г/кг манкоцеба)
<i>Alternaria</i> A-425-3			
			
Контроль – стерильная вода	Дитан М-45 (800 г/кг манкоцеба)	Ридомил Голд МЦ (640 г/кг манкоцеба+ 40 г/кг мефеноксама)	Фортуна Глобал (750 г/кг манкоцеба)

Рисунок 31 – Скрининг дитиокарбаматов в отношении патогенных штаммов *Alternaria* A-429-2 и A-425-3 – возбудителей некротической листовой пятнистости винограда

Препараты группы меди не оказали никакого фунгитоксического действия в отношении всех штаммов. Поверхность среды чашек Петри заросла штаммом возбудителя болезни полностью (рисунок 32). О низкой чувствительности к ним видов *Alternaria* или вовсе её отсутствии сообщается во многих странах (Evaluation of *in vitro* antifungal potential..., 2021; Kaur et.al., 2020; *In vitro* Evaluation of Botanical Extracts..., 2020; Dhaka et.al., 2022). Dhaka S. с соавт. (2022) в эксперименте с использованием метода отравленного субстрата выяснили, что самый низкий процент ингибирования радиального роста колоний *A. solani* наблюдался при использовании оксихлорида меди.









<i>Alternaria</i> A-429-2			
			
Контроль – стерильная вода	Купроксат (345 г/л сульфата меди трехосновного)	Хом (861 г/кг меди хлорокиси)	Чемп (576 г/кг меди гидроокиси)
<i>Alternaria</i> A-425-3			
			
Контроль – стерильная вода	Купроксат (345 г/л сульфата меди трехосновного)	Хом (861 г/кг меди хлорокиси)	Чемп (576 г/кг меди гидроокиси)

Рисунок 32 – Скрининг медных препаратов в отношении патогенных штаммов рода *Alternaria* – возбудителей некротической листовой пятнистости винограда

Помимо исследуемых групп веществ, в скрининге использовались фунгициды из разных химических групп, в том числе новых. В отношении обоих штаммов выявлены эффективные *in vitro* фунгициды: из группы анилопиримидинов – флуопирам+пириметанил (Луна Транквилити, КС) и флудиоксонил+ципродинил (Свитч, ВДГ). Каптан (Каперанг, КС) проявил некоторую активность в отношении обоих штаммов, однако, *Alternaria* A-429-2 был более устойчив к нему. К комбинированному препарату диметоморф+флуазинам (Инсайд, СК) оказался чувствительным только штамм А-425-3 (рисунок 33, таблица 14).

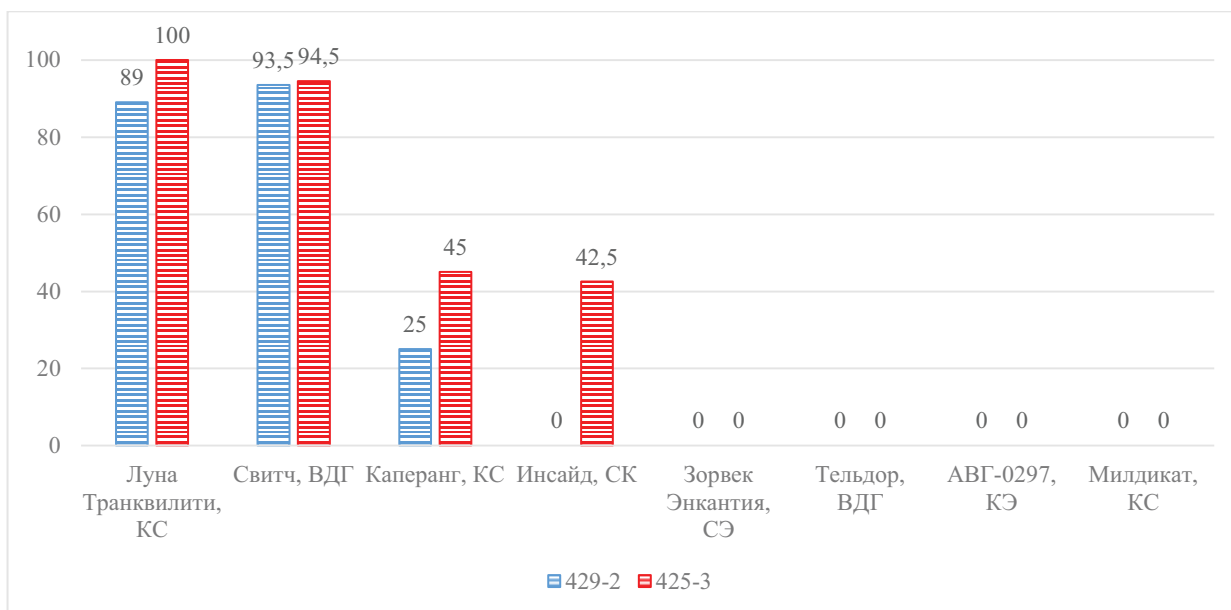





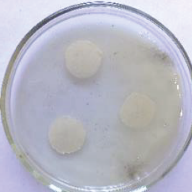




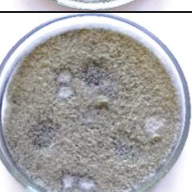







Рисунок 33 – Эффективность фунгицидов из разных химических групп в отношении патогенных штаммов *Alternaria* spp. А-425-3 и А-429-2 *in vitro*

Флудиоксонил ингибирует прорастание спор, удлинение зародышевых трубок, рост мицелия, а также вызывает деформацию зародышевых трубок и разрыв клеток. Судя по результатам испытаний фунгицидов на фисташке (*Pistacia vera* L.), Свитч (Switch) оказался очень эффективным в борьбе с фитопатогенами *Alternaria*, и благодаря уникальному способу действия двух его компонентов он оказался отличным выбором для включения в стратегии борьбы с резистентностью, чтобы замедлить, остановить или уменьшить нарастание резистентности к боскалидам в *Alternaria* (Avenot et.al., 2015).

Однако обнаружены изоляты *A. brassicicola*, обладающие высокой устойчивостью ($EC_{50} > 100$ мг/л) как к дикарбоксимидам (например, ипродиону и процимидону), так и к фенилпирролам (например, флудиоксонил). Это было первым сообщением о грибных изолятах с высокой перекрестной устойчивостью к дикарбоксимидам и фенилпирролам (*In vitro fungicide sensitivity...*, 2004).

Таблица 17 – Скрининг препаратов из разных химических групп в отношении патогенного штамма рода *Alternaria* А-429-2 – возбудителя некротической листовой пятнистости винограда

Группа химических фунгицидов	Название препарата	Фото	
		А-429-2	А-425-3
Оксазолидиндионы и пиперидинил-тиазол-изоксазолины	Зорвек Энкантia (30 г/л оксатиапипролин + 300 г/л фамоксадон)		
Пиридил-этил бензамиды	Луна Транквилити (125 г/л флуопирам + 375 г/л пириметанил)		
Фенилпирролы анилопиримидины	Свитч (250 г/кг флудиоксонил + 375 г/кг ципродинил)		
	Милдикат (25 г/л циазофамид + 250 г/л динатрий фосфонат)		
Гидроксианилиды	Тельдор (500 г/кг фенгексамид)		
	АВГ-0297 (240 г/л масло чайного дерева)		
	Каперанг (500 г/л каптана)		
Морфолины (производные коричной кислоты) + прочие вещества	Инсайд (200 г/л диметоморф + 200 г/л флуазинам)		

3.8.1.2 Скрининг антимикотической активности штаммов-антагонистов в отношении изолятов *Alternaria* spp., выделенных из патокомплекса некротической листовой пятнистости винограда

По результатам скрининга 24 штаммов *Bacillus* sp. Cohn. из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК методом встречных культур на специализированной для них среде Тайлона-3 восемнадцать обладали антимикотической активностью против возбудителя некротической листовой пятнистости по типу антибиоза (Burovinskaya et.al., 2021) (таблица 15).

На среде Тайлона-3 наибольшей антимикотической активностью в отношении *Alternaria* sp. обладали штаммы P-9 *Bacillus* sp., 5Б-1 *Bacillus* sp. и 01 кор f *Bacillus* sp., стерильная зона при совместном культивировании составила 8,0 мм (рисунок 34).

Остальные 15 штаммов *Bacillus* sp. образовали стерильную зону 2,5-7,0 мм при зарастании поверхности среды на 4,2-37,3 %. На КСА штаммы *Bacillus* sp. совместно с возбудителем некротической листовой пятнистости проявляли несколько меньшую антимикотическую активность. Максимальную стерильную зону в двойной культуре показали штаммы 3-3 и К 1-1, которая составила 7,5 мм (таблица 18).

Таблица 15 – Антимикотическая активность штаммов бактерий-антагонистов из рода *Bacillus* к возбудителю некротической листовой пятнистости винограда *Alternaria* sp., при температуре 25 °С на среде Тайлона-3, на 10-е сутки культивирования, 2020 г.

Штамм <i>Bacillus</i> sp.	Площадь зарастания поверхности питательной среды				S, мм	K2, см ²
	Антагонистом		Патогеном			
	см ²	%	см ²	%		
P-9	6,7	8,3	30,6	37,8	8,0	0
5Б-1	2,9	3,6	34,7	42,8	8,0	0
01 кор f	15,2	18,8	39,6	48,9	8,0	0
3-3	10,4	12,8	42,3	52,2	7,0	0
Д-10	17,0	21,0	41,4	51,1	6,5	0

Продолжение таблицы 15

Штамм <i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	Площадь зарастания поверхности питательной среды				S, мм	K2, см ²
	Антагонистом		Патогеном			
	см ²	%	см ²	%		
Д 1-3	4,2	5,2	39,1	48,3	6,5	0
5-3	3,4	4,2	38,8	47,9	6,5	0
Б (2-1)	17,9	22,1	22,7	28,0	6,0	0
Д 7-1	6,0	7,4	36,0	44,4	6,0	0
К 1-2	30,2	37,3	22,3	27,5	5,0	0
К 1-1	10,4	12,8	38,4	47,4	5,0	0
Б-5	4,8	5,9	37,2	45,9	5,0	0
Д 1-1	10,0	12,3	40,6	50,1	3,8	0
11-2	20,8	25,7	20,2	24,9	4,0	0
11-1	16,1	19,9	25,2	31,1	4,0	0
Б-12	17,8	22,0	32,0	39,5	3,5	0
Fa 4-1	16,1	19,9	35,5	43,8	2,5	0
Fz-9	17,1	21,1	30,0	37,0	0	0
Д 7-3	14,3	17,7	53,6	66,2	0	0
Fa 4-2	6,8	8,4	42,6	52,5	0	0
Б-2	2,6	3,2	27,1	70,4	0	0
11-3	1,1	1,4	59,8	73,8	0	1,1
1a	1,6	2,0	72,9	90,0	0	1,6
ВВ(С)	2,4	3,0	59,7	73,7	0	2,2
<i>Alternaria sp.</i>	-	-	72,3	89,5	0	0
Примечание: S – стерильная зона; K2 – зона подавления антагониста патогеном						

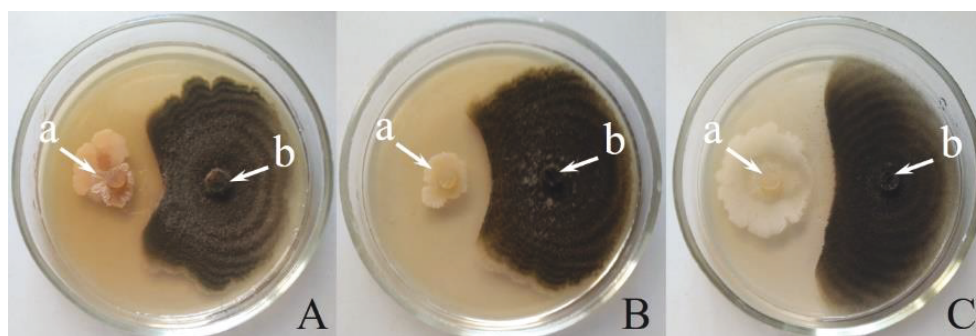


Рисунок 34 – Антимикотическая активность бактериальных штаммов из рода *Bacillus* к возбудителю некротической листовой пятнистости, через 10 суток культивирования. А – Р-9 *Bacillus polymyxa*; В – 5Б-1 *Bacillus subtilis*; С – 01 кор f *Bacillus* sp. а – антагонист, b – патоген.

Таблица 16 – Антимикотическая активность штаммов бактерий-антагонистов *Bacillus* sp. к возбудителю некротической листовой пятнистости винограда *Alternaria* sp., при температуре 25 °С на КСА, на 10-е сутки культивирования, 2020 г.

Штамм <i>Bacillus</i> sp.	Площадь зарастания поверхности питательной среды				S, мм	K2, см ²
	Антагонистом		Патогеном			
	см ²	%	см ²	%		
3-3	8,2	10,1	43,2	53,3	7,5	-
К 1-1	5,5	6,8	41,7	51,6	7,5	-
Д 7-1	2,5	3,1	39,2	48,4	7,0	-
Б-12	17,8	22,0	32,0	39,5	6,0	-
11-1	3,0	3,7	41,7	51,5	6,0	-
К 1-2	2,0	2,5	43,3	53,5	6,0	-
5Б-1	3,5	4,3	28,7	35,4	5,5	-
Р-9	4,0	4,9	43,4	53,6	4,0	-
Б-5	3,1	3,8	43,3	53,5	4,0	-
Б (2-1)	8,3	10,2	41,7	51,7	2,5	-
5-3	7,4	9,1	45,9	56,7	2,5	-
11-2	8,7	10,7	45,0	55,6	2,0	-
01 кор f	8,3	10,2	38,0	46,9	2,0	-
Д 1-1	30,6	37,8	40,1	49,5	1,0	-
Д-10	22,5	27,8	32,0	39,5	-	-

Продолжение таблицы 16

Штамм <i>Bacillus sp.</i>	Площадь зарастания поверхности питательной среды				S, мм	K2, см ²
	Антагонистом		Патогеном			
	см ²	%	см ²	%		
Fa 4-1	19,0	23,5	36,1	44,6	-	-
Fz-9	11,3	14,0	42,1	52,0	-	-
Д 1-3	6,8	8,4	42,0	51,9	-	-
Fa 4-2	6,3	7,8	49,5	61,1	-	-
Д 7-3	1,2	1,5	65,3	80,6	-	-
ВВ(С)	2,4	3,0	47,2	58,3	-	1,1
Б-2	3,7	4,6	54,0	66,7	-	1,8
1a	14,8	18,3	41,1	51,1	-	4,5
Примечание: S – стерильная зона; K2 – зона подавления антагониста патогеном						

Одним из этапов работы был скрининг штаммов бактерий антагонистов из рода *Pseudomonas*. Испытания проводили на 2 разных средах – КСА и Кинга В. Среда Кинга В была выбрана в качестве специализированной среды для бактерий рода *Pseudomonas* (таблица 17). Из девяти коллекционных бактерий рода *Pseudomonas* антибиотическую активность к возбудителю некротической листовой пятнистости проявили только три штамма бактерий – 14-3, 14-4, Oif 2-1 (рисунок 35).

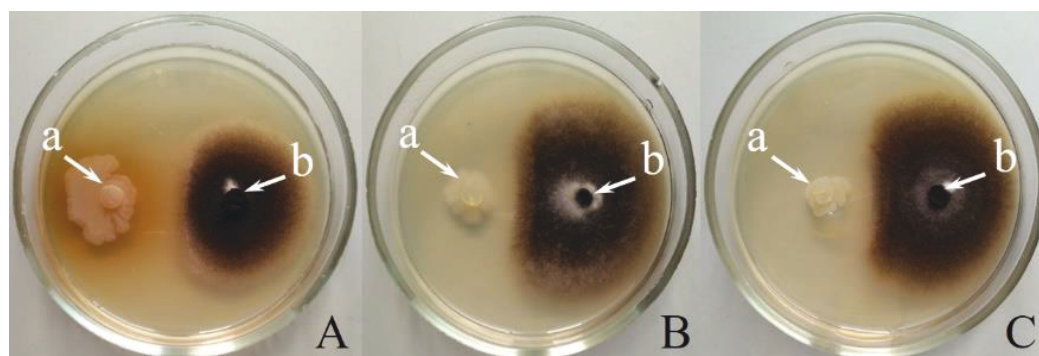


Рисунок 35 – Антимикотическая активность штаммов грибов к возбудителю некротической листовой пятнистости на винограде через 10 суток культивирования на среде Кинга Б. А – 14-3 *Pseudomonas* sp.; В – 14-4 *Pseudomonas* sp.; С – Oif 2-1 *Pseudomonas* sp. а – антагонист, b – патоген.

Таблица 17 – Антимикотическая активность штаммов бактерий-антагонистов из рода *Pseudomonas* к возбудителю некротической листовой пятнистости винограда *Alternaria* sp., при температуре 25 °С на среде Кинга Б, на 10-е сутки культивирования, 2020 г.

Штамм <i>Pseudomonas</i> sp.	Площадь зарастания поверхности питательной среды				Размер антибиотической зоны, мм
	Антагонист		Патоген		
	см ²	%	см ²	%	
14-3	4,3	5,3	29,5	36,5	9,0
Oif 2-1	1,3	1,6	36,8	45,4	8,0
14-4	7,0	8,6	36,3	44,8	3,5
15-1	4,5	5,6	29,3	36,2	0
Sgc-1	4,3	5,3	24,8	30,6	0
13-2	3,2	4,0	40,6	50,1	0
16-2	2,8	3,4	35,3	43,6	0
12-2	2,5	3,1	36,4	44,9	0
Sgrc-1	1,6	2,0	45,3	55,9	0
<i>Alternaria</i> sp. (контроль)	-	-	48,3	39,6	-

Установлено, что на картофельно-сахарозном агаре так же, как и на среде Кинга Б, максимальную стерильную зону в двойной культуре образовал штамм

14-3 *Pseudomonas* sp. – 9,0 мм. Зона подавления роста *Alternaria* sp. на КСА штаммами Oif 2-1 и 14-4 составляла 6,5 и 5,0 мм соответственно (таблица 18).

Таблица 18 – Антимикотическая активность штаммов бактерий-антагонистов из рода *Pseudomonas* к возбудителю некротической листовой пятнистости винограда *Alternaria* sp., при температуре 25 °С на картофельно-сахарозном агаре, на 10-е сутки культивирования, 2020 г.

Штамм <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i>	Площадь зарастания поверхности питательной среды				Размер антибиоти- ческой зоны, мм	Площадь подавления антагониста патогеном, см ²
	Антагонист		Патоген			
	см ²	%	см ²	%		
14-3	4,5	5,6	42,0	51,9	9,0	-
Oif 2-1	3,0	3,7	14,9	51,7	6,5	-
14-4	2,8	3,5	43,2	53,3	5,0	-
16-2	21,1	26,0	29,5	36,4	-	-
15-1	4,0	4,9	48,7	60,1	-	-
Sgc-1	3,6	4,4	39,7	49,0	-	-
12-2	3,1	3,8	46,0	56,8	-	-
Sgrc-1	1,2	1,5	74,7	92,2	-	1,2
13-2	2,0	2,5	67,5	83,4	-	2,0

На агаризованной среде Рудакова изолят возбудителя некротической листовой пятнистости *Alternaria* sp. за десять суток культивирования занял 89,3 % поверхности питательной среды. Из 27 грибных штаммов антагонистическую активность к возбудителю некротической листовой пятнистости через 10 суток совместного культивирования на среде Рудакова проявили 17 штаммов. Из них 12 штаммов обладали двойным механизмом действия – конкуренцией за площадь питания, гиперпаразитизмом (Burovinskaya et.al., 2022).

Наибольшую антагонистическую активность из коллекции грибов-антагонистов в отношении возбудителя некротической листовой пятнистости проявили все штаммы из рода *Trichoderma* sp., штаммы А-1 и И-3 *Basidiomycota*, Tr-1 *Trichothecium* sp. (таблица 19).

Таблица 19 – Антагонистическая активность штаммов грибов-антагонистов к возбудителю некротической листовой пятнистости винограда *Alternaria sp.*, при температуре 25 °С на среде Рудакова, на 10-е сутки культивирования, 2020 г.

Штамм-антагонист	Площадь зарастания поверхности питательной среды				S, см ²	K2, см ²
	Антагонист		Патоген			
	см ²	%	см ²	%		
<i>Alternaria sp.</i> (контроль)	-	-	72,3	89,3	-	-
Конкуренция за площадь питания+гиперпаразитизм						
T-4 <i>Trichoderma sp.</i>	81,0	100	15,6	19,3	15,6	0
T-5 <i>Trichoderma sp.</i>	81,0	100	16,2	20,0	16,2	0
T-3 <i>Trichoderma sp.</i>	81,0	100	17,6	21,7	17,6	0
T-1 <i>Trichoderma sp.</i>	81,0	100	17,7	21,9	17,7	0
T-2 <i>Trichoderma sp.</i>	81,0	100	19,2	23,7	19,2	0
Tr-1 <i>Trichothecium sp.</i>	81,0	100	36,1	44,6	36,1	0
A-1 <i>Basidiomycota sp.</i>	81,0	100	37,3	46,0	37,3	0
Tk-1 <i>Trichoderma sp.</i>	69,3	85,6	40,9	50,5	32,5	0
И-3 <i>Basidiomycota sp.</i>	72,0	88,9	36,1	44,6	29,5	0
An-1 <i>Aspergillus sp.</i>	56,7	70,0	30,4	37,5	7,8	0
SM-1 <i>Sordaria sp.</i>	64,5	79,7	16,5	20,4	1,4	0
Ma-1 <i>Metarhizium sp.</i>	60,9	75,2	21,0	25,9	0,9	0
Гиперпаразитизм						
Pr-1 <i>Penicillium sp.</i>	21,3	62,3	43,9	54,2	3,7	0
Хк-3 <i>Chaetomium sp.</i>	41,9	51,7	44,1	54,4	3,4	0
Хк-1 <i>Chaetomium sp.</i>	38,3	47,3	45,0	55,6	3,5	0
Pf-1 <i>Penicillium sp.</i>	16,2	20,0	49,6	61,2	3,0	0
Хк-4 <i>Chaetomium sp.</i>	38,7	47,8	46,0	56,8	1,9	0
Примечание: S – площадь гиперпаразитической зоны; K2 – площадь подавления антагониста патогеном						

У группы из шести штаммов, относящихся к роду *Trichoderma* (Tk-1, T-1, T-2, T-3, T-4, T-5 *Trichoderma sp.*) отмечена наибольшая конкурентная способность за площадь питания по отношению к возбудителю некротической листовой

пятнистости с полным зарастанием патогена антагонистом (гиперпаразитизмом) (рисунок 36).

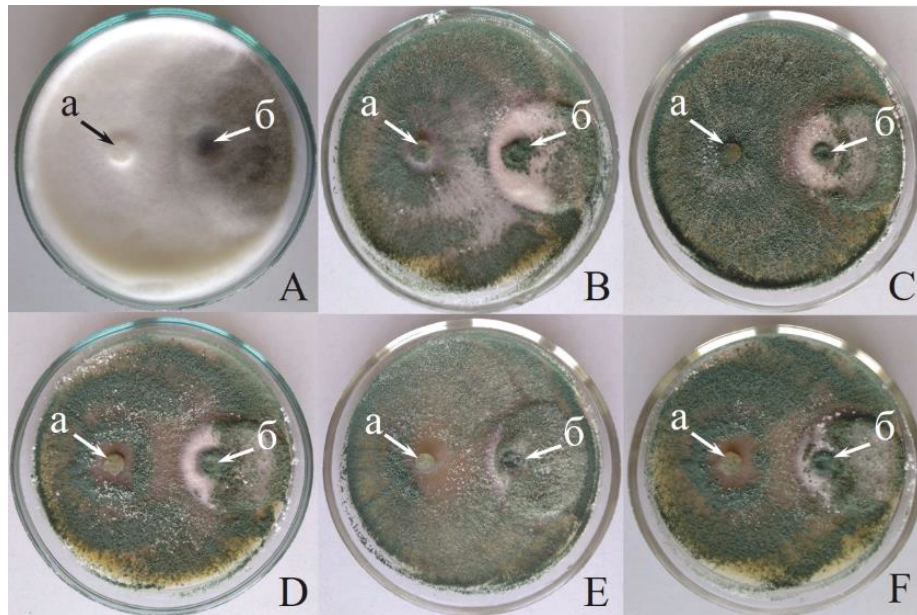


Рисунок 36 – Антагонистическая активность штаммов грибов из рода *Trichoderma* к возбудителю некротической листовой пятнистости на винограде через 10 суток культивирования на среде Рудакова: А – Тк-1 *Trichoderma* sp. В – Т-1 *Trichoderma* sp.; С – Т-2 *Trichoderma* sp.; D – Т-3 *Trichoderma* sp.; Е – Т-4 *Trichoderma* sp.; F – Т-5 *Trichoderma* sp.

а – антагонист; б – патоген.

На картофельно-сахарозном агаре (КСА) изолят возбудителя некротической листовой пятнистости *Alternaria* sp. (в контрольном варианте без антагониста) за десять суток культивирования занял 100 % поверхности питательной среды (таблица 21).

Таблица 21 – Антагонистическая активность штаммов грибов-антагонистов к возбудителю некротической листовой пятнистости винограда *Alternaria* sp., при температуре 25 °С на картофельно-сахарозном агаре, на 10-е сутки культивирования, 2020 г.

Штамм-антагонист	Площадь зарастания поверхности питательной среды				S, см ²	K1, мм	K2, см ²
	Антагонистом		Патогеном				
	см ²	%	см ²	%			
<i>Alternaria</i> sp.(контроль)	-	-	81,0	100	-	-	
Конкуренция за площадь питания+гиперпаразитизм+антибиоз							
A-1 <i>Basidiomycota</i>	81,0	100,0	42,7	52,7	42,7	0	0
T-2 <i>Trichoderma</i> sp.	81,0	100,	30,9	38,1	30,9	7,0	0
T-4 <i>Trichoderma</i> sp.	77,9	96,2	23,8	29,4	15,6	26,2	0
Tr-1 <i>Trichothecium</i> sp.	74,3	91,7	34,7	42,8	25,7	0	0
Tk-1 <i>Trichoderma</i> sp.	71,3	88,0	36,8	45,4	25,1	0	0
T-1 <i>Trichoderma</i> sp.	70,7	87,3	38,3	47,3	27,0	4,5	0
T-3 <i>Trichoderma</i> sp.	63,0	77,8	33,8	41,7	18,1	13,0	0
T-5 <i>Trichoderma</i> sp.	64,4	79,5	32,6	40,2	16,8	8,0	0
SM-1 <i>Sordaria</i> sp.	65,2	80,5	15,8	19,5	0,6	0	0
Подавление антагониста патогеном							
Pk-1 <i>Penicillium</i> sp.	33,6	41,5	50,4	62,2	4,0	0	0
Pv-3 <i>Penicillium</i> sp.	30,7	37,9	44,6	55,1	3,5	0	0
Хк-3 <i>Chaetomium</i> sp.	35,7	44,1	46,4	57,3	2,4	0	0
Примечание: S – площадь гиперпаразитической зоны; K1 – размер стерильной зоны; K2 – площадь подавления антагониста патогеном							

Установлено, что на среде КСА антагонистическая активность штаммов-антагонистов была несколько иной, чем на среде Рудакова. Площадь зарастания питательной среды антагонистами была значительно меньше, при этом патоген успевал занять 19,5-69,5 %. Максимальная конкуренция за площадь питания (100 %) и гиперпаразитизм отмечены у штаммов A-1 *Basidiomycota* (42,7 %) и T-2 *Trichoderma* sp. (30,9 %). Остальные штаммы рода *Trichoderma* (T-1, Tk-1, T-3, T-5

Trichoderma sp.) также проявили высокую конкурентную способность (77,8-96,2 %), и гиперпаразитизм (15,6-27,0 см²).

Кроме того, у четырех штаммов из этого рода отмечен ярко выраженный антибиоз, максимальная стерильная зона обнаружена у штаммов Т-3 и Т-4 *Trichoderma* sp. (рисунок 37 С, D, E, F).

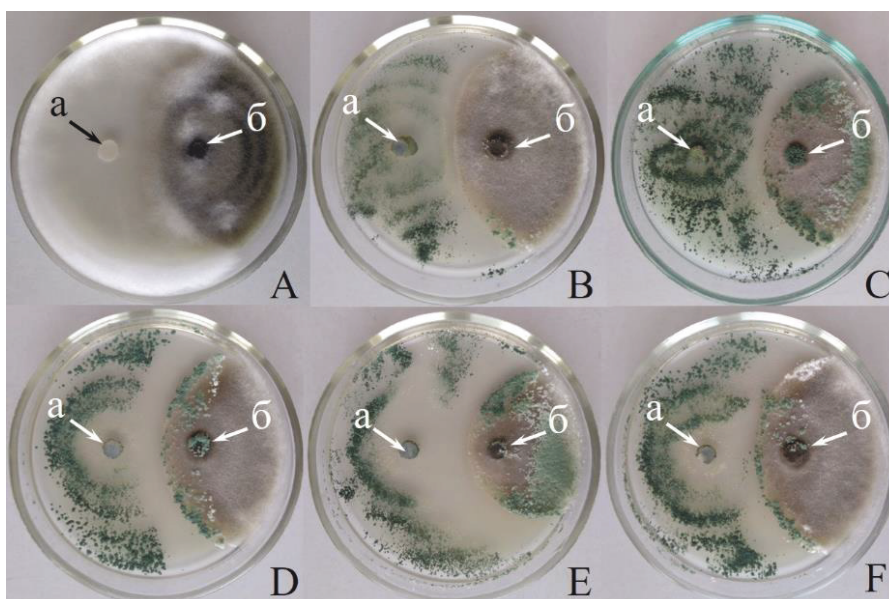


Рисунок 37 – Антагонистическая активность штаммов грибов из рода *Trichoderma* к возбудителю некротической листовой пятнистости на винограде через 10 суток культивирования на картофельно-сахарозном агаре:

А – Тк-1 *Trichoderma* sp.; В – Т-1 *Trichoderma* sp.; С – Т-2 *Trichoderma* sp.; D – Т-3 *Trichoderma* sp.; E – Т-4 *Trichoderma* sp.; F – Т-5 *Trichoderma* sp.

а – антагонист; б – патоген.

Штаммы А-1 и И-3 *Basidiomycota*, Tr-1 *Trichothecium* sp. и все штаммы *Trichoderma* sp. могут рассматриваться в качестве перспективных антагонистов для дальнейших полевых испытаний. Штаммы Т-1, Тк-1, Т-3, Т-5 *Trichoderma* sp. могут использоваться в качестве продуцентов антибиотических веществ против грибов *Alternaria* sp., так при культивировании в двойной культуре у них обнаружена стерильная зона.

В исследованиях изучали антимикотическую активность 5 коллекционных штаммов *Trichoderma spp.*, выделенных из ампелоценозов Западного Предкавказья.

Для скрининга был выбран изолят *Alternaria sp.* 425-3, при тестировании на патогенность установленный как наиболее вирулентный с выраженным некротрофным типом питания. Максимальная гиперпаразитическая активность в отношении данного патогена *Alternaria sp.* отмечена у *Trichoderma spp.* Т-404/1 и Т-338 (таблица 22).

Таблица 22 – Антагонистическая активность аборигенных штаммов *Trichoderma spp.* к возбудителю некротической листовой пятнистости винограда *Alternaria sp.*, при температуре 25 °С на картофельно-сахарозном агаре, на 10-е сутки культивирования

Исследуемый штамм	Площадь зарастания поверхности питательной среды				K1, мм	K2, см ²
	Антагонистом		Патогеном			
	см ²	%	см ²	%		
<i>Alternaria sp.</i> (контроль)	-	-	81,0	100,0	-	-
Конкуренция за площадь питания+гиперпаразитизм+антибиоз						
Т-404/1	63,6	100,0	7,1	11,1	6,0	7,1
Конкуренция за площадь питания+гиперпаразитизм						
Т-441/1	45,8	71,9	16,6	26,1	0	8,3
Т-338	63,6	100,0	10,2	16,0	0	10,2
Т-213	51,9	81,5	11,3	17,7	0	6,0
Т-503	45,5	71,4	13,9	21,8	0	3,7
Примечание: K1 – размер стерильной зоны; K2 – площадь гиперпаразитической зоны						

Антибиотическая способность установлена только у штамма *Trichoderma sp.* Т-404/1, стерильная зона вокруг мицелия патогена составляла 6,0 см (рисунок 38).

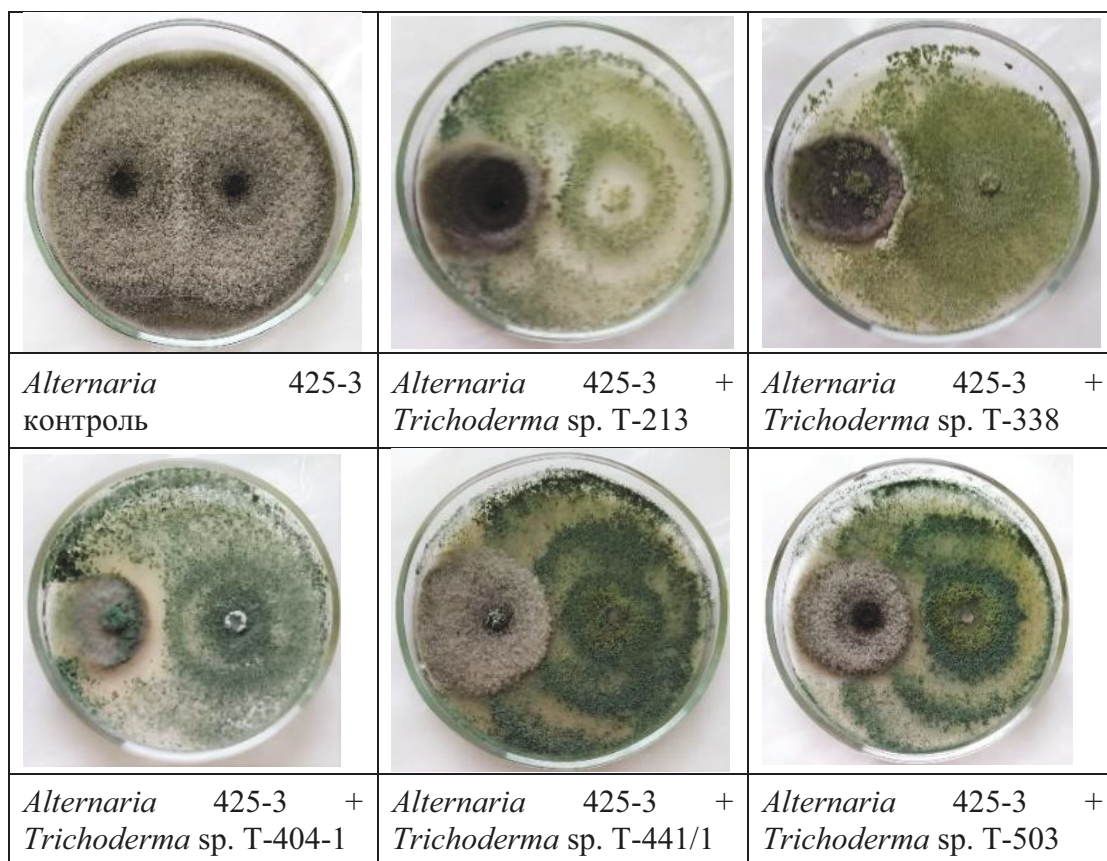


Рисунок 38 – Антагонистическая активность аборигенных штаммов грибов из рода *Trichoderma* к возбудителю некротической листовой пятнистости на винограде через 10 суток культивирования на картофельно-сахарозном агаре: слева – патоген, справа – антагонист.

Анализ полученных результатов показал, что все исследованные штаммы *Trichoderma* spp. проявляют антимикотическую активность в отношении микопатогенов из родов *Alternaria* Nees, 1817 и *Fusarium* Link., 1809, выделенных из пораженных органов винограда в насаждениях Западного Предкавказья, базирующуюся на различных механизмах межмикробного взаимодействия. Большая часть исследованных штаммов *Trichoderma* spp., сочетала в себе несколько механизмов антимикотической активности в отношении *Alternaria* sp. Так, у штаммов T-404/1, T-338, T-441/1 в отношении возбудителя некротической листовой пятнистости *Alternaria* sp. отмечена конкуренция за площадь питания и гиперпаразитизм. Штамм T-404/1 обладал тройным механизмом действия – конкуренцией за площадь питания, микопаразитической и антибиотической

активностью. Выраженный антибиоз, который отмечен у штамма Т-404/1, можно объяснить активным выделением в питательную среду диффундирующих метаболитов, подавляющих рост возбудителя некротической листовой пятнистости (Effect of fungal..., 2013). У всех антагонистов обнаружена высокая конкурентная способность за площадь питания. Наибольшей степенью паразитизма на колониях *Alternaria* sp. обладали штаммы *Trichoderma* spp. Т-338 и Т-441/1.

Обобщая полученные данные по скринингу антимикотической активности у штаммов-антагонистов в отношении лабораторных культур *Alternaria* sp. можно сделать вывод, что штаммы *Trichoderma* spp. Т-338 и Т-404/1 обладают выраженными микопаразитическими свойствами в отношении всех исследованных изолятов фитопатогенов; высокой конкурентной активностью обладает большинство исследованных штаммов (Т-338, Т-441/1, Т-404/1, Т-503); в большей или меньшей степени все штаммы проявили антагонистическую активность. Однако в качестве наиболее активных антагонистов установлены следующие штаммы: Т-404-1 в отношении *Alternaria* sp.

В скрининге на антифунгальную активность культуральных фильтратов микроорганизмов-антагонистов в отношении *Alternaria tenuissima* участвовало 12 штаммов семи видов бактерий и 7 штаммов четырех видов грибов. При сравнении антифунгальной активности 2-х концентраций рабочих растворов препаратов было выявлено, что бактериальные фунгициды показывают большую эффективность в концентрации 4,0 мл/л (таблица 15), а грибные – в концентрации 2,0 мл/л (таблица 23).

Таблица 23 – Антифунгальная активность грибных препаратов в отношении *Alternaria tenuissima*, 2018-2019 гг.

№ штамма	Зона угнетения роста мицелия, мм
<i>Gliocladium roseum</i> F-213	0
<i>Hansenula anomala</i> Y-2646	0
<i>Trichoderma harzianum</i> F-114	0
<i>Trichoderma viride</i> F-218	3,8
<i>Trichoderma viride</i> F-219	6,5
<i>Trichoderma viride</i> F-294	7,8
<i>Trichoderma viride</i> F-838	9,8

Среди бактериальных штаммов-продуцентов в качестве наиболее эффективных в подавлении целевого микопатогена установлены *B. amyloliquefaciens* КС-2 В-11141 и *B. subtilis* var. *niger* В-118. Зона подавления роста мицелия *Alternaria sp.* при использовании *B. amyloliquefaciens* КС-2 В-11141 составляла не менее 5 мм, а применение *B. subtilis* var. *niger* В-118 приводило к угнетению мицелия патогена в радиусе не менее 6,5 мм. Штаммы *B. subtilis* В-117, *B. subtilis* BS-1, *B. subtilis* В-522 и *A. acidocaldarius* В-5250 обладали низкой антифунгальной активностью (зона угнетения роста мицелия для первых двух – 3 мм, для следующих двух – 3,5 и 4 мм, соответственно). 6 штаммов не проявили активности (таблица 24).

Таблица 24 – Антифунгальная активность бактериальных препаратов в отношении *Alternaria sp.*, 2018-2019 гг.

№ штамма	Ширина зоны подавления роста тест-культуры, мм
1	2
<i>Bacillus subtilis</i> В-115	0
<i>B. subtilis</i> В-116	0
<i>B. subtilis</i> В-117	3,0
В-5225 <i>B. subtilis</i>	3,5

Продолжение таблицы 24

1	2
<i>B. subtilis</i> BS-1	3,0
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> B-118	6,5
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> B-5250	4,0
<i>B. amyloliquefaciens</i> KC-2 B-11141	5,0
<i>B. licheniformis</i> B-3039	0
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> BS-1393	0
<i>P. koreensis</i> B-3481	0
<i>Streptomyces albidoflavus</i> AC33	0

Среди грибных штаммов-продуцентов, участвовавших в скрининге на антимикотическую активность наибольшая эффективность выявлена у *T. viride* F-838 и *T. viride* F-294 (рисунок 39).

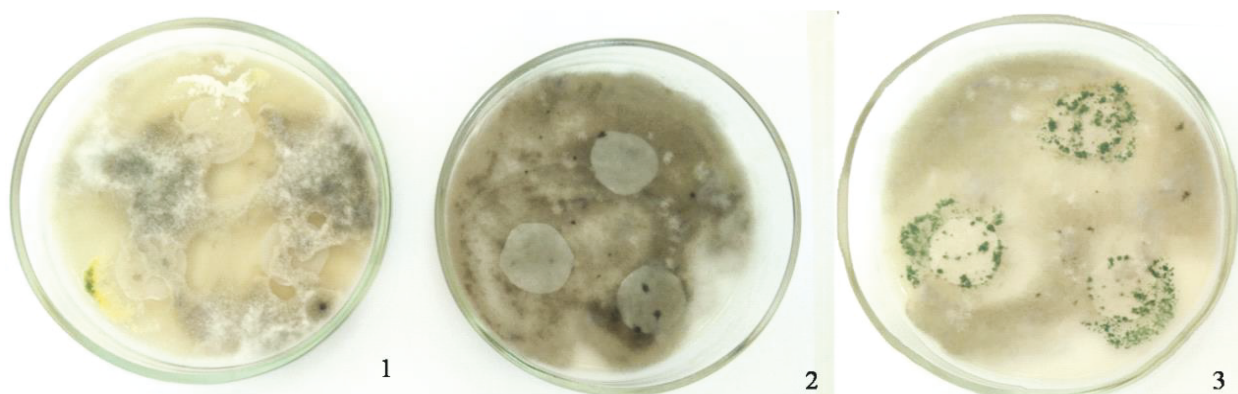


Рисунок 39 – Антифунгальная активность грибных препаратов, 2018-2019 гг.:

1 – *Trichoderma viride* F-838; 2 – контроль; 3 – *Trichoderma viride* F-294

Препараты на основе штаммов *T. viride* F-838, *T. viride* F-294, *T. viride* (*lignorum*) F-219 обладали средней эффективностью, их применение приводило к угнетению мицелия патогена в радиусе не менее 9,8, 7,8 и 6,5 мм соответственно (рисунок 40).

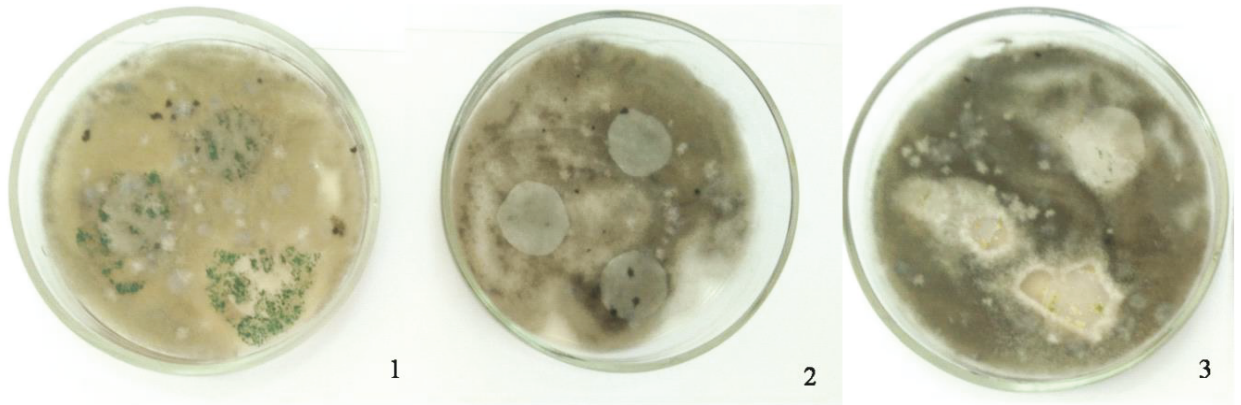


Рисунок 40 – Антифунгальная активность грибных препаратов, 2018-2019 гг.:
1 – *Trichoderma viride (lignorum)* F-219; 2 – контроль; 3 – *Trichoderma viride* F-218

Препарат на основе штамма *Trichoderma viride* F-218 обладал низкой антифунгальной активностью (зона угнетения роста мицелия – 3,8 мм). У штаммов грибов *Gliocladium roseum* F-213, *Hansenula anomala* Y-2646 и *T. harzianum* F-114 не выявлено биологической эффективности в подавлении альтернариевого гриба.

Для полевых испытаний были выбраны наиболее эффективные штаммы, которые показали наибольшую активность в отношении комплекса возбудителей, вызывающих некротическую листовую пятнистость – *Bacillus subtilis* var. *niger* B-118, *B. amyloliquefaciens* KC-2 B-11141, *A. acidocaldarius* B-5250; *Trichoderma viride* F-838, F-294 и F-219.

3.9 Экологическая безопасность систем защиты

Интенсификация виноградарства требует большого количества ресурсов: топлива, электричества, удобрений и пестицидов, научного обеспечения (Егоров и др., 2021а; 2021б). Виноград одна из самых обрабатываемых с.х. культур, за сезон применяется 10-14 обработок, в основном химическими препаратами.

Чрезмерное применение химических средств защиты растений создает неблагоприятные последствия для здоровья человека и стабильности экосистем и может иметь отдаленные последствия. Оценка нагрузки пестицидов на агроэкосистему необходима для ее эффективного функционирования (Петрова , 2022).

Одним из показателей оценки токсичности фунгицидов является их воздействие на организм теплокровных животных и человека при проникновении через кожные покровы. По кожно-резорбтивной токсичности фунгициды делятся на несколько групп:

- с резко выраженной токсичностью ($LD_{50} < 300$ мг/кг)
- с выраженной токсичностью ($LD_{50} = 300-1000$ мг/кг)
- со слабо выраженной токсичностью ($LD_{50} > 1000$ мг/кг) (Зинченко, 2012).

По данным Государственного каталога (2018, 2019, 2020, 2021), препарат Кумулус, ВДГ относится к третьему классу опасности, но по результатам расчета токсической нагрузки он определен как опасный по причине высокой нормы применения – 8,0 кг/га. Шесть фунгицидов в применяемой норме на гектар умеренно опасны, два мало опасны. В стандартной системе защиты в среднем самая высокая токсическая нагрузка на одну обработку, которая составила 726,6 ЛД₅₀/га. Тогда как в опытном варианте 1 (химическая защита) мало опасны для теплокровных четыре фунгицида, пять умеренно опасны. Токсическая нагрузка на одну обработку отмечена на уровне 554,9 ЛД₅₀/га. В биологизированной защите применялось восемь фунгицидов, пять из десяти обработок за сезон – биопрепараты, являющиеся наиболее безопасными для животных и человека. В

опытном варианте 2 зафиксирована самая низкая токсическая нагрузка на одну обработку – 130,0 ЛД₅₀/га (таблица 25).

Таблица 25 – Токсическая нагрузка различных вариантов систем защиты

Схема защиты	Торговое название препарата	Норма применения, л/га, кг/га	Токсическая нагрузка (ТН), ЛД ₅₀ /га	Характеристика
1	2	3	4	5
Химическая защита/стандарт	Талендо, КЭ	0,4	16,5	м-о*
	Динали, ДК	0,6	28,4	м-о*
	Кантус, ВДГ	1,0	100,0	у-о**
	Танос, ВДГ	0,4	124,2	у-о**
	Свитч, ВДГ	1,0	237,5	у-о**
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	240,0	у-о**
	Рapid Голд, СП	1,5	317,0	у-о**
	Полирам, ВДГ	2,5	350,0	у-о**
	Кумулус, ВДГ	8,0	3200,0	о***
	ТН в среднем на 1 обработку			726,6
Химическая защита/вариант 1	Динали, ДК	0,6	28,4	м-о*
	Квадрис, СК	0,8	40,0	м-о*
	Колосаль, КЭ	0,4	58,8	м-о**
	Скор, КЭ	0,4	68,8	м-о*
	Луна Транквилити, КС	1,0	152,9	у-о**
	Рapid Голд, СП	1,5	317,0	у-о**
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	240,0	у-о**
	Свитч, ВДГ	1,0	237,5	у-о**
	Полирам, ВДГ	2,5	350,0	у-о**
	Кумулус, ВДГ	8,0	3200,0	о***
	ТН в среднем на 1 обработку			554,9

Продолжение таблицы 25

1	2	3	4	5
Биологизированная защита/вариант2	БСка, Ж	0	0	м-о [*]
	БФТИМ, Ж	0	0	м-о [*]
	Динали, ДК	0,6	28,4	м-о [*]
	Колосаль, КЭ	0,4	58,8	м-о ^{**}
	Скор, КЭ	0,4	68,8	м-о [*]
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	240,0	у-о ^{**}
	Свитч, ВДГ	1,0	237,5	у-о ^{**}
	Рапид Голд, СП	1,5	317,0	у-о ^{**}
	Полирам, ВДГ	2,5	350,0	у-о ^{**}
	ТН в среднем на 1 обработку			130,0

Примечание: м-о^{*} – малоопасные; у-о^{**} – умеренно опасные; о^{***} – опасные

Медоносные пчёлы являются активным звеном в развитии и поддержании экологического равновесия природной среды. Эти насекомые опыляют более 75 % сельскохозяйственных культур и более 90% диких видов цветковых растений. Использование токсичных для пчёл пестицидов может существенно сократить их популяцию, что повлечет за собой потерю урожайности многих сельскохозяйственных культур (Шафикова, 2020). Отравление пестицидами может привести к потере не только сборщиц, но и ульевых пчел, их популяция может резко сократиться до нескольких пчел-кормилиц, матки и недавно появившихся пчел. Матка перестает откладывать яйца, что приводит к перерыву в цикле выведения потомства. Многие колонии пчёл, которые не уничтожаются сразу, могут быть ослаблены до такой степени, что становятся неэффективны как опылители или производители меда, что вызывает экономические потери как пчеловодов, так и для аграрного производства (Петрова, 2022).

По токсичности для пчёл все пестициды делятся на четыре класса. Фунгициды являются наиболее безопасной для пчёл группой химических веществ (Назарова, 2009). Расчёты коэффициентов опасности фунгицидов в нашем исследовании согласуются со сведениями из Государственного каталога

пестицидов и агрохимикатов (2018, 2019, 2020, 2021), согласно которому все рассматриваемые фунгициды относятся к третьему классу опасности для пчёл (малоопасные). В среднем на одну обработку самый высокий коэффициент опасности для пчёл в стандартной защите, минимальный – в биологизированной (таблица 26).

Таблица 26 – Коэффициент опасности фунгицидов для медоносных пчёл

Схема защиты	Торговое название препарата	Норма применения, л/га, кг/га	Коэффициент опасности для пчёл, $K_{оп}$
1	2	3	4
Химическая защита/стандарт	Динали, ДК	0,6	0,38
	Талендо, КЭ	0,4	0,64
	Танос, ВДГ	0,4	2,76
	Кантус, ВДГ	1,0	3,01
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	4,66
	Свитч, ВДГ	1,0	5,83
	Рapid Голд, СП	1,5	10,14
	Полирам, ВДГ	2,5	21,88
	Кумулус, ВДГ	8,0	64,00
	$K_{оп}$ в среднем на 1 обработку		
Химическая защита/вариант 1	Скор, КЭ	0,4	0,06
	Динали, ДК	0,6	0,38
	Шриланк, КМЭ	0,4	0,34
	Колосаль, КЭ	0,4	1,20
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	4,66
	Луна Транквилити, КС	1,0	4,97
	Свитч, ВДГ	1,0	5,83
	Квадрис, СК	0,8	8,00
	Рapid Голд, СП	1,5	10,14
	Полирам, ВДГ	2,5	21,88
	$K_{оп}$ в среднем на 1 обработку		

Продолжение таблицы 26

1	2	3	4
Биологизированная защита/вариант 2	БСка, Ж	2,5	0,00
	БФТИМ, Ж	3,0	0,00
	Скор, КЭ	0,4	0,06
	Динали, ДК	0,6	0,38
	Колосаль, КЭ	0,4	1,20
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	4,66
	Свитч, ВДГ	1,0	5,83
	Рapid Голд, СП	1,5	10,14
	Полирам, ВДГ	2,5	21,88
	К_{оп} в среднем на 1 обработку		

Данные по оценке опасности изученных фунгицидов для почвы по показателю экологической нагрузки приведены в таблице 27. Биологизированная система защиты обладала наименьшей экологической нагрузкой на почву. В стандартной и варианте 1 химической системах защиты использовался фунгицид на основе неорганического действующего вещества – Кумулус, ВДГ, который не разлагается в почве.

Таблица 27 – Экологическая нагрузка пестицидов

Схема защиты	Торговое название препарата	Норма применения, л/га, кг/га	Экологическая нагрузка, у.е.
1	2	3	4
Химическая защита/стандарт	Талендо, КЭ	0,4	52,83
	Танос, ВДГ	0,4	68,00
	Рapid Голд, СП	1,5	254,50
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	316,00
	Динали, ДК	0,6	337,53
	Полирам, ВДГ	2,5	350,00
	Кантус, ВДГ	1,0	2970,00
	Кумулус, ВДГ	8,0	не разлагается
	ЭН в среднем на 1 обработку		

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4
Химическая защита/вариант 1	Рapid Голд, СП	1,5	254,50
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	316,00
	Динали, ДК	0,6	337,53
	Полирам, ВДГ	2,5	350,00
	Колосаль, КЭ	0,4	352,94
	Скор, КЭ	0,4	901,58
	Квадрис, СК	0,8	1032,00
	Луна Транквилити,	1,0	1469,13
	Свитч, ВДГ	1,0	1505,00
	Кумулус, ВДГ	8,0	не разлагается
	ЭН в среднем на 1 обработку		
Биологизированная защита/вариант 2	БСка, Ж	2,5	0,00
	БФТИМ, Ж	3,0	0,00
	Рapid Голд, СП	1,5	254,50
	Кабрио Топ, ВДГ	2,0	316,00
	Динали, ДК	0,6	337,53
	Полирам, ВДГ	2,5	350,00
	Колосаль, КЭ	0,4	352,94
	Скор, КЭ	0,4	901,58
	Свитч, ВДГ	1,0	1505,00
	ЭН в среднем на 1 обработку		

По всем экотоксикологическим показателям наиболее благоприятной является биологизированная система защиты (таблица 28).

Таблица 28 – Суммарные экотоксикологические параметры изучаемых систем защиты (на 10 обработок)

Вариант опыта	Токсическая нагрузка, ЛД ₅₀ /га	Коэффициент опасности для пчёл	Экологическая нагрузка, у.е.
Химическая защита / стандарт	7993,1	184,62	7573,36
Химическая защита / вариант 1	5549,1	146,43	9398,39
Биологизированная защита / вариант 2	1300,5	44,15	4017,55

3.10 Полевые исследования

3.10.1 Оценка биологическая эффективности экспериментальных фунгицидов различного происхождения в борьбе с некротической листовой пятнистостью винограда

Был проведен полевой эксперимент для оценки биологической эффективности фунгицидов химического и биологического происхождения, ранее установленных *in vitro* как эффективные против *A. alternata*. Опыт проведен на техническом белом сорте Бианка (отд. № 3 Кубань ООО агрофирма «Южная»). Высокая биологическая эффективность против некротической листовой пятнистости винограда установлена при применении смесей 125 г/л флуопирама + 375 г/л пириметанила (Луна Транквилити, КС) и 250 г/кг флудиоксопила + 375 г/кг ципродинила (Свитч, ВДГ) в полевых условиях. Достаточно хорошая эффективность зафиксирована при использовании препаратов из группы триазолов – 250 г/л дифеноконазола (Скор, КЭ) и комбинированного препарата Шриланк, КМЭ (400 г/л масло чайного дерева+150 г/л дифеноконазола). Из химических препаратов наименьший контроль болезни (76,2 %) отмечен смесью 60 г/л дифеноконазола+ 30 г/л цифлуфенамида (Динали, ДК). Проведенные полевые опыты подтверждают лабораторный скрининг.

Из бактериальных препаратов Наибольшее снижение развития и распространения болезни отмечали в варианте обработки препаратом на основе штамма *Bacillus subtilis* var. *niger* В-118А (95,8 %); эффективными также оказались препараты на основе *Bacillus amyloliquefaciens* КС-2 В-11141 (95,2 %) и *Alicyclobacillus acidocaldarius* В-5250. Среди грибных фунгицидов наибольшую биологическую эффективность показал препарат на основе штамма *Trichoderma viride* F-838. Достаточный контроль болезни обеспечили и водные растворы культуральных жидкостей других триходермовых штаммов (титр не менее 1×10^9 КОЕ/мл) (рисунок 41).

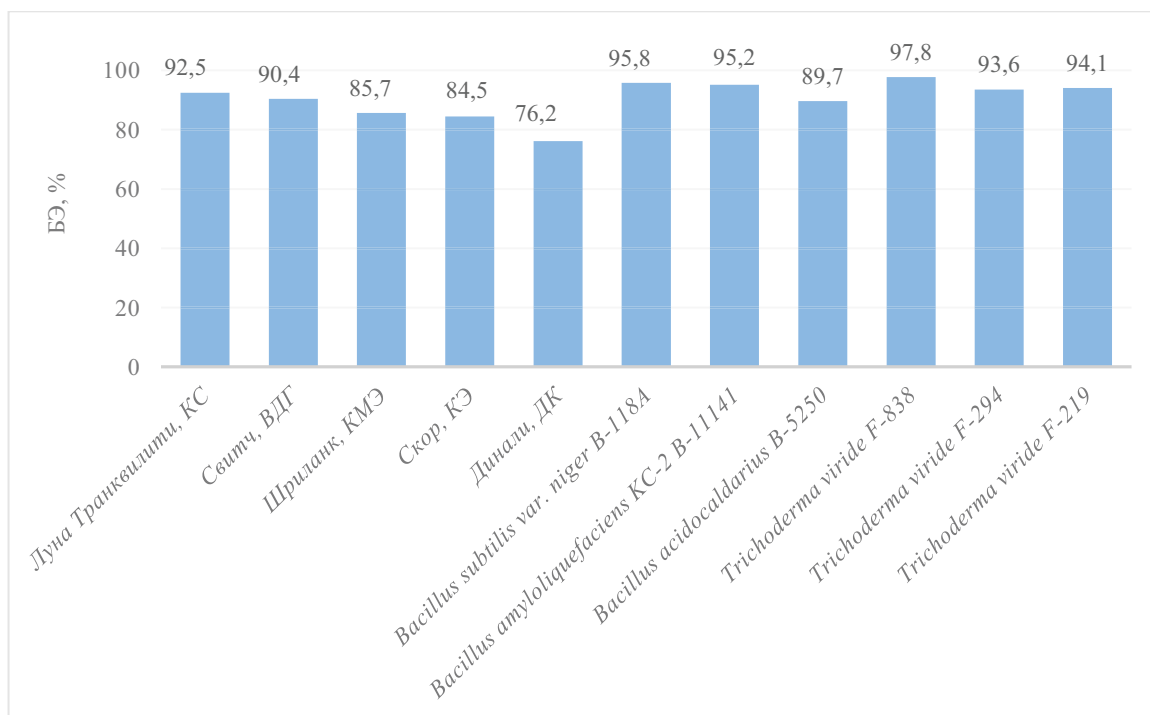


Рисунок 41 – Результаты полевого скрининга экспериментальных фунгицидов на биологическую эффективность в борьбе с некротической листовой пятнистостью винограда, сорт Бианка, ООО агрофирма Южная

Химическая схема защиты от болезней (опытный вариант 1), в отличие от стандарта, включает препараты, действующие вещества которых обладают в том числе высокой активностью против микопатогенов – возбудителей некротической листовой пятнистости.

В биологизированную схему защиты в химический блок были включены химические фунгициды, у которых в спектре целевых патогенов находились в том числе возбудители некротической пятнистости. В биологический блок входили биопрепараты, продуценты которых на этапе скринга показали высокую противоальтернариозную активность. Для биологизированной схемы защиты винограда от некротической листовой пятнистости были выбраны следующие препараты:

– химического генеза – Луна Транквилити, КС (125 г/л флуопирама + 375 г/л пириметанила), Свитч, ВДГ (250 г/кг флудиоксопила + 375 г/кг ципродинила), Скор, КЭ (250 г/л дифеноконазола); Динали, ДК (60 г/л дифеноконазола + 30 г/л цифлуфенамида).

– биологического генеза – биофунгициды на основе штаммов-продуцентов: *Trichoderma viride* F-838, *Trichoderma viride* F-219, *Bacillus subtilis* var. *niger* B-118A, *Bacillus amyloliquefaciens* КС-2 В-11141 (95,2 %) и *Bacillus acidocoldarius* В-5250.

Биологизированную схему, включающую защиту от некротической листовой пятнистости, формировали так, чтобы свести к минимуму риск развития резистентности возбудителя и одновременно максимизировать контроль болезни (Патент RU 2472337С2 А01G17/00 (2006.01) 20.02.2013). Она содержит химические фунгициды, на основе различных механизмов действия. Например, флуопирам (Луна Транквилити) относится к новому химическому классу пиридил-этил-бензамидов. Механизм действия этого вещества обусловлен процессами блокировки митохондриального дыхания клеток патогенов (SDHI-ингибитор). Пириметанил (Луна Транквилити) из химической группы анилинпиримидинов (АР-фунгициды) ингибирует синтез метионина в грибах. Фунгициды из группы триазолов, ингибируют биосинтез эргостерола (DMI-фунгициды), подавляют синтез грибных стероидов.

В основу биологизированной схемы лег разработанный ранее принцип биологизации защиты винограда от болезней в ФГБНУ СКФНЦСВВ (Патент RU 2472337 С2 А01G17/00 (2006.01) 20.01.2013), который подразумевает чередование блоков обработок – химического и биологического: 1-ый блок обработок химическими фунгицидами проводят в период от распускания почек до начала формирования ягод, 2-ой блок обработок биологическими фунгицидами – в период от начала формирования ягод до уборки винограда (рисунок 42).

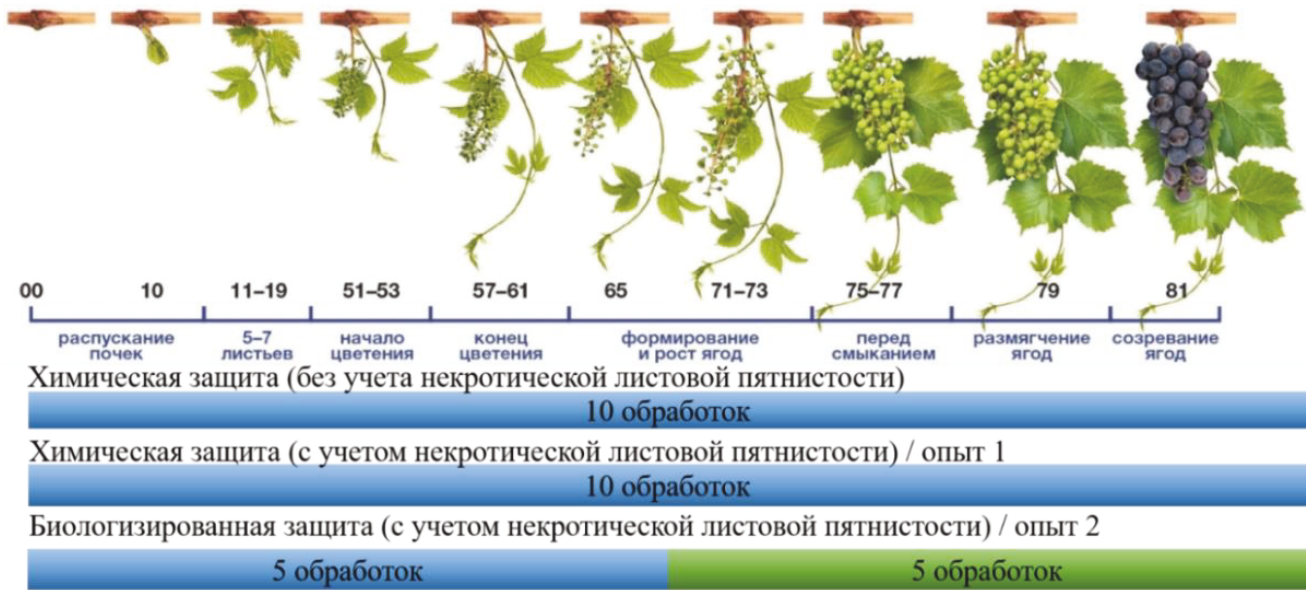


Рисунок 42 – Схемы защиты винограда от некротической листовой пятнистости, используемые в экспериментах

Биологическую эффективность экспериментальных (биологизированной и химической) схем защиты определяли в 2019-2021 гг., в которую входили эффективные против некротической листовой пятнистости фунгициды и сравнивали с биологической эффективностью традиционной схемы использования химических препаратов без учета нового заболевания (по влиянию на интенсивность развития некротической пятнистости листьев) (рисунок 43, таблица 29).

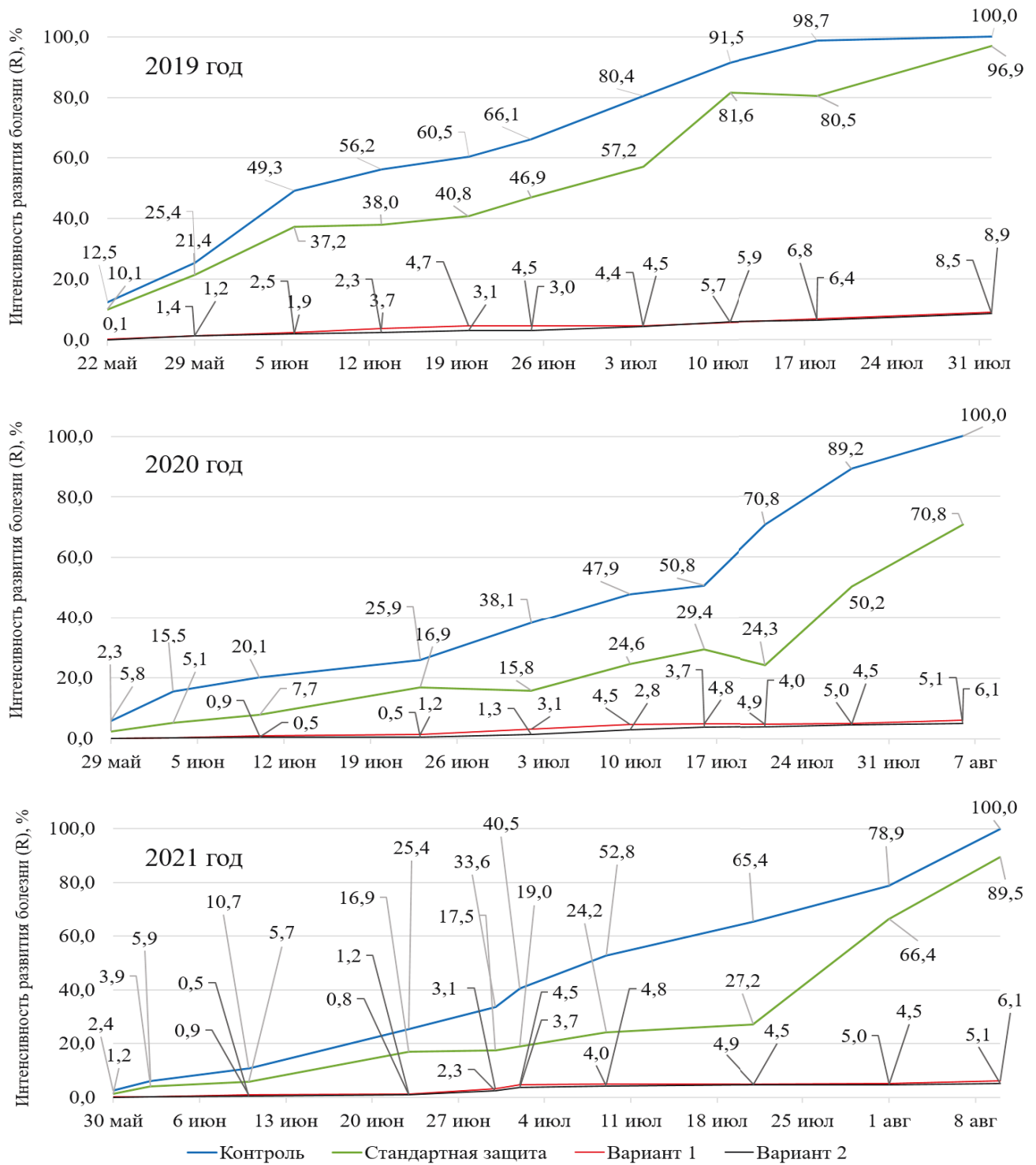


Рисунок 43 – Динамика интенсивности развития некротической листовой пятнистости винограда (R, %) при разных вариантах опыта, сорт Бианка, 2019-2021 гг., вариант 1 – химическая защита, вариант 2 – биологизированная защита.

Таблица 29 – Биологическая эффективность различных схем защиты против некротической листовой пятнистости винограда, сорт Бианка (2019-2021 гг.)

Вариант	Биологическая эффективность, %		
	2019	2020	2021
Химическая защита (без обработок против некротической листовой пятнистостью) / стандарт	62,4	63,7	69,5
Химическая защита / вариант 1	92,1	94,7	90,4
Биологизированная защита / вариант 2	95,8	97,2	92,8

Динамика интенсивности развития некротической листовой пятнистости менялась в зависимости от условий года (Юрченко, Б.Д., 2022). Анализ эффективности всех испытываемых вариантов защиты показал, что в варианте стандарта была самая низкая биологическая эффективность, что на 23,3-33,5 % ниже по сравнению с биологизированной защитой (вариант 2) и на 20,9-31,0 % по сравнению с химической (вариант 1) Эффективность в обеих экспериментальных схемах защиты винограда в борьбе с некротической листовой пятнистостью была стабильно высокой на протяжении всего периода исследований.

3.10.2 Сравнительная оценка биологической эффективности различных схем защиты винограда в борьбе с некротической листовой пятнистостью

Рост и развитие виноградного растения, а также количество и качество полученного урожая во многом зависят от условий окружающей среды. Эффективность различных экспериментальных схем защиты сравнивали не только по прямому подавляющему воздействию на патогены, но и по влиянию на урожайность и качество винограда.

В период уборки урожая определяли качество урожая по показателям урожайности и титруемой кислотности (таблица 30):

Таблица 30 – Агробиологические и биохимические показатели винограда сорта Бианка в зависимости от применяемой схемы защиты от некротической листовой пятнистости, отд. № 3 Кубань, 2019-2021 гг.

Вариант опыта	Средний урожай с куста, кг	Средний вес грозди, г	Титруемая кислотность, г/дм ³	Общий сахар, г/дм ³
2019 г.				
Контроль	5,51	81,9	10,2	17,2
Стандарт	6,92	115,8	10,5	18,4
Вариант 1	8,95	124,7	12,1	19,8
Вариант 2	9,00	147,45	14,0	19,9
НСР05	2,530	15,2323	0,6123	0,2359
2020 г.				
Контроль	5,64	90,13	10,1	17,0
Стандарт	6,81	110,8	11,5	17,2
Вариант 1	8,12	132,4	13,2	19,5
Вариант 2	9,30	150,00	13,5	20,5
НСР05	2,402	16,2250	0,4589	0,2458
2021 г.				
Контроль	5,54	91,14	10,1	15,8
Стандарт	6,82	109,9	11,5	16,4
Вариант 1	8,23	133,4	13,2	18,9
Вариант 2	10,1	148,10	13,5	21,5
НСР05	1,982	20,1258	0,4589	0,5283

При анализе данных была выявлена достоверная разница между вариантами. Биологизация защиты винограда от нового заболевания – некротической листовой пятнистости, позволила наиболее полно реализовать продукционный потенциал растений по сравнению с химическим вариантом защиты. Анализ полученных данных показал, что средний вес грозди в варианте биологизированной защиты (вариант 2) ежегодно был выше на 11,2-34,3% по сравнению с химическим вариантом (вариант 1) и на 42,7-52,6 % по сравнению с контрольным вариантом. Установлено, что титруемая кислотность по вариантам

опыта также отличалась и наиболее высокой была в варианте биологической защиты на 2,0-2,5 % выше по сравнению с химической защитой. Титруемая кислотность очень влияет на качество виноматериалов и итоговые органолептические качества вина из технических сортов.

3.11 Экономическая эффективность различных экспериментальных схем защиты от болезней с учетом некротической листовой пятнистости

В современных рыночных условиях снижение себестоимости сельскохозяйственной продукции имеет огромное значение. В свою очередь снижение себестоимости влияет на снижение цен, вследствие чего продукция становится более конкурентоспособной. Себестоимость включает в себя целый ряд факторов, которые ее обуславливают. И одним из значимых факторов являются затраты на защитные обработки при выращивании продукции. Ниже представлена стоимость 1 л (кг) препаратов в зависимости от системы защиты от некротической листовой пятнистости винограда (таблица 31).

Таблица 31 – Стоимость систем защиты

№	Используемые фунгициды	Цена за кг, л, руб.	Затраты на средства защиты от болезней, тыс. руб./га
1	2	3	4
1	Химическая защита, без обработок против некротической пятнистости листьев / стандарт		
	Полирам (2,5 кг/га)	1026,6 руб	36,7
	Рapid Gold (1,5 кг/га)	755 руб.	
	Кабрио Топ (2,0 кг/га)	2012 руб.	
	Талендо (0,2 л/га)	5885 руб.	
	Динали (0,6 л/га)	4260 руб.	36,7
	Танос (0,4 кг/га)	4322 руб.	

Продолжение таблицы 31

1	2	3	4
	Кумулус (6,0 кг/га)	170 руб.	
	Рапид Голд (1,5 кг/га)	755 руб.	
	Кантус (1,0 л/га)	5590 руб.	
	Вивандо (0,25 л/га)	6020 руб.	
	Кумулус (6,0 кг/га)	170 руб.	
	Кумулус (6,0 кг/га)	170 руб.	
	Кантус (1,0 л/га)	5590 руб.	
2	Химическая защита, включающая обработки против некротической		
	Капелла (0,8 л/га)	1050,8 руб	22,7
	Скор (0,4 л/га)	628,5 руб.	
	Свитч (1,0 л/га)	8015 руб.	
	Колосаль (0,4 л/га)	970 руб.	
	Свитч (1,0 л/га)	8015 руб.	
	Рапид Голд (1,5 кг/га)	755 руб.	
	Скор (0,4 л/га)	628,5 руб.	
	Квадрис (0,8 л/га)	389 руб.	
	Луна Транквилити (1 л/га)	3224,9 руб.	
	Кумулус (6,0 кг/га)	170 руб.	
3	Биологизированная защита, включающая обработки химическими и		
	Луна Транквилити (1 л/га)	3224,9 руб.	20,0
	Скор (0,4 л/га)	628,5 руб.	
	Кабрио Топ (2,0 кг/га)	2012 руб.	
	Свитч (1,0 л/га)	8015 руб.	
	Колосаль (0,4 л/га)	970 руб.	
	Динали (0,6 л/га)	4260 руб.	
	Рапид Голд (1,5 кг/га)	755 руб.	
	БСка – 3, Ж (2,5 л/га) - 5	119 руб.	

Для оценки экономической эффективности экспериментальных (химической и биологизированной) схем защиты от болезней были определены такие показатели, как издержки на защиту, себестоимость производства винограда,

выручка от продаж, прибыль от продаж, и самое главное рентабельность производства в пересчете на 1 га виноградника (таблица 32).

Таблица 32 – Эффективность изучаемых схем защиты от некротической листовой пятнистости винограда технического сорта Бианка

Показатель	Контроль (стандарт)	Опыт 1 ХИМ	Опыт 2 БИО	Отклонение от стандарта, +/-	
				ХИМ	БИО
Биологическая эффективность, %	65,4	90,5	93,1	21,3	27,7
Урожайность (в среднем за 2019-2021 гг.), т/га	10,5	12,8	13,9	2,3	3,2
Издержки на защиту, тыс. руб.	37,1	27,6	15,7	-10,4	-25,1
Издержки на производство, тыс. руб./га	247,2	232,4	225,7	198,5	186,6
Себестоимость производства, руб./ц	2452,8	1915,1	1598,5	1806,0	1582,2
Выручка от продаж, тыс.руб./га	328,0	407,2	399,3	367,5	401,2
Прибыль от продаж, тыс.руб./га	84,9	170,0	212,7	130,9	176,5
Рентабельность производства, %	32,6	72,4	94,9	33,3	57,0

Расчет экономической эффективности применения различных технологий защиты против некротической листовой пятнистости на техническом сорте Бианка выявил высокую рентабельность технологии биологизированной защиты, которая составила 94,9 %. Рентабельность стандартной защиты составила 32,6 %, в то время как у химической защиты против некротической пятнистости листьев – 72,4 %. Спрогнозировано значительное снижение себестоимости производства

технического винограда в результате применения биологизированной технологии. Так, себестоимость производства 1 ц продукции при применении стандартной системы защиты составила 2452,8 тыс. руб., химической защиты против некротической пятнистости листьев – 1915,1 тыс.руб. и биологизированной – 1598,5 тыс.руб. Таким образом, сравнение экономической эффективности двух экспериментальных схем защиты от болезней с учетом некротической пятнистости листьев винограда показало, что вариант биологизированной защиты винограда технического сорта Бианка является наиболее рентабельным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 По результатам молекулярно-генетической идентификации по пяти генам (ITS, GAPDH, tub, TEF1 α , Alt a1) в качестве основного вида в комплексе патогенных штаммов альтернариевых грибов установлен вид *Alternaria alternata*.

2 По результатам скрининга оптимальной питательной средой для культивирования грибов *Alternaria* определен картофельно-морковный агар.

3 Показано, что на растениях винограда в корнесобственной культуре патогенез проходит интенсивнее, чем в привитой. Наиболее сильно в годы исследований поражались листья нижнего яруса. Ориентируясь на характер заражения и развития некрозов на листовых дисках было установлено, что микопатоккомплекс некротической листовой пятнистости винограда включает в себя как гембиотрофные, так и некротрофные виды грибов *Alternaria spp.* При тестировании коллекции альтернариевых грибов на патогенность отобрано 23 патогенных штамма, из них 3 выделены как наиболее вирулентные.

4 В результате проведенной оценки полевой устойчивости 25 сортов винограда на 51 участке виноградников, установлено, что сорта винограда внутривидового европейского происхождения (*Vitis vinifera*) более устойчивы к поражению некротической пятнистостью листьев, чем сорта межвидового (евро-американского) происхождения (*V. vinifera* скрещенные с *V. labrusca*, *V. berlandieri*, *V. rotundifolia* и др.). Полевая оценка подтверждена лабораторными тестами с помощью искусственного заражения суспензией спор патогенного изолята *Alternaria sp.* различных по генотипу сортов винограда.

5 Установлено, что в механизме физиолого-биохимического барьера к развитию некротической пятнистости на листьях винограда в период заражения и начального развития болезни (июнь-начало июля) заметную роль играет высокое общее содержание хлорофиллов, оводненность и высокая интенсивность накопления пролина.

6 В результате лабораторного скрининга химических препаратов оценена

антифунгальная активность препаратов их разных химических групп. Наиболее эффективными *in vitro* признаны фунгициды – дифеноконазол, дифеноконазол+масло чайного дерева из группы триазолов; из группы пиридил-этил бензамидов: флуопирам+пириметанил; из группы фенилпирролов и анилопириимидинов: флудиоксонил+ципродинил. Лабораторный скрининг антагонистов из коллекции ООО Биотехагро показал, что бактериальные штаммы *Bacillus subtilis* В-117, *Bacillus subtilis* В-5225, *Bacillus subtilis* BS-1, *Bacillus subtilis* var. *niger* В-118, *Alicyclobacillus acidocaldarius* В-525 и *Bacillus amyloliquefaciens* КС-2 В-11141 и 4 грибных штамма *Trichoderma viride* проявляют антифунгальную активность в отношении *Alternaria spp.* По результатам скрининга антифунгальной активности бактерий-антагонистов из коллекции ВНИИМК штаммов выделены перспективные штаммы: три – из рода *Bacillus*: Р-9, 5Б-1 и 01 кор f, *Bacillus* sp. и три – из рода *Pseudomonas*: 14-3, 14-4 и Оif 2-1 *Pseudomonas* sp. Отмечены наиболее перспективные штаммы грибов-антагонистов из коллекции ВНИИМК, проявившие свои антагонистические свойства в отношении возбудителя некротической листовой пятнистости *Alternaria sp.*: шесть штаммов из рода *Trichoderma* (Т-1, Т-2, Т-3, Т-4, Т-5, Тк-1 *Trichoderma* sp.), обладающие тройным механизмом действия – конкуренцией за площадь питания, гиперпаразитизмом и антибиозом, два штамма из отдела *Basidiomycota* (А-1, И-3 *Basidiomycota*) и один штамм из рода *Trichothecium* (Tr-1 *Trichothecium* sp.). Из 5 аборигенных штаммов *Trichoderma spp.* из коллекции СКФНЦСВВ выделено 2 штамма (Т-404/1 и Т-441/1) в качестве перспективных для дальнейших исследований по разработке мер биологического контроля новых микопатогенов винограда. В полевых условиях наиболее эффективными в защите от некротической листовой пятнистости установлены химические препараты Луна Транквилити, КС (125 г/л флуопирама + 375 г/л пириметанила), Свитч, ВДГ (250 г/кг флудиоксонила + 375 к/кг ципродинила), Скор, КЭ (250 г/л дифеноконазола), Динали, ДК (60 г/л дифеноконазола + 30 г/л цифлуфенамида), биофунгициды на основе штаммов-продуцентов: *Trichoderma viride* F-838,

Trichoderma viride F-219, *Bacillus subtilis* var. *niger* B-118A, *Bacillus amyloliquefaciens* КС-2 В-11141 (95,2 %) и *Bacillus acidocoldarius* В-5250.

7 Наиболее экологически безопасной установлена биологизированная система защиты. Установлено значительное снижение себестоимости производства технического винограда в результате применения биологизированной технологии. Так, себестоимость производства 1 ц продукции при применении стандартной системы защиты составила 2452,8 тыс. руб., химической защиты против некротической пятнистости листьев – 1915,1 тыс.руб. и биологизированной – 1598,5 тыс.руб.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Для адекватности краткосрочного прогноза развития заболеваний в фитосанитарном мониторинге виноградников необходимо обращать внимание на симптомы некротической (альтернариозной) пятнистости листьев и при обнаружении характерных заболевания проводить специальные обработки.

2. Для расширения спектра действия рекомендовать к регистрации и включению в «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации» химические и биологические фунгициды, показавшие высокую эффективность в борьбе с некротической пятнистостью на винограде.

3. Для повышения эффективности систем защиты винограда от болезней на поражаемых некротической (альтернариозной) пятнистостью сортах рекомендовано применение биологизированной технологии контроля новых патогенов комплекса грибов из рода *Alternaria* (основной вид *Alternaria alternata*) – возбудителей некротической пятнистости листьев винограда. Рекомендуемая технология состоит из 2-х блоков – химического и биологического, которые включают 5 обработок фунгицидами из групп триазолов, фенилпирролов и анилинопиримидинов и 5 обработок микробиологическими фунгицидами – БФТИМ (*Bacillus amyloliquefaciens* КС-2 В-11141), БСка-3 (*Trichoderma viride* 256, *Pseudomonas koreensis* В-3481, *Bacillus subtilis* 17, *Bradyrhizobium japonicum* 614a).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Агротехнические исследования по созданию интенсивных виноградных насаждений на промышленной основе / В.П. Бондарев, З.И. Захарова. – Новочеркасск, 1978, – 173 с.
2. Астапчук, И.Л. Вариабельность культуральных признаков штаммов *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., возбудителя гнили сердцевины плодов яблони, на различных питательных средах [Электронный ресурс] / И.Л. Астапчук, Г.В. Якуба, А.И. Насонов // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2021. – № 68(2). – С. 255-271. – URL: <https://doi.org/10.30679/2219-5335-2021-2-68-255-271> [дата обращения: 11.03.2022].
3. Благовещенская, Е.Ю. Микологические исследования: основы лабораторной техники. Учебное пособие / Москва: ЛЕНАНД, 2017. – 96 с.
4. Болотянская, Е.А. Видовое разнообразие и частота встречаемости мицелиальных грибов на различных сортах винограда на ЮБК и в других зонах Крыма / Е.А. Болотянская // Виноградарство и виноделие. Сборник научных трудов. – 2019. – Т. 48. – С. 11-13.
5. Буровинская, М.В. Видовая структура микопатоксикоза нового заболевания винограда – некротической листовой пятнистости в условиях 2019-2020 гг / М.В. Буровинская, Е.Г. Юрченко // Защита растений от вредных организмов, Краснодар, 21-25 июня 2021 года / Материалы X международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Кубанского государственного аграрного университета. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2021. – С. 62-64.
6. Буровинская, М.В. К изучению культуральных свойств грибов рода *Alternaria* Nees, ассоциированных с виноградом [Электронный ресурс] / М.В. Буровинская, Е.Г. Юрченко // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2021. – Т. 3, № 69. С. 240-256. – URL: <https://doi.org/10.30679/2219-5335-2021-3-69-240-256>.

7. Буровинская, М.В. Структура и динамика патоконплекса некротической листовой пятнистости винограда в условиях Западного Предкавказья [Электронный ресурс] / М.В. Буровинская, Е.Г. Юрченко // Плодоводство и виноградарство Юга России – Краснодар: ФГБНУ СКФНЦСВВ, 2022. – Т. 3, № 75. – С. 231-242. – URL: <https://doi.org/10.30679/2219-5335-2022-3-75-231-242>.

8. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / Отв. ред. Дудка И.А.; АН УССР. Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.

9. Васильева, К.А. Состояние пигментного комплекса ассимиляционного аппарата клена остролистного (*Acer platanoides* L.) в условиях загрязнения / К.А. Васильева, Г.А. Зайцев, А.Ю. Кулагин // Вестник Московского государственного университета леса. – 2011. – № 3. – С. 51-54.

10. Виноградарство России: настоящее и будущее / Е.А. Егоров, А.М. Аджиев, К.А. Серпуховитина, Л.П. Трошин, А.И. Жуков, Ш.Н. Гусейнов, А.Н. Алиева. – Махачкала: Издательский дом "Новый день", 2004. – 440 с.

11. Вирулентность штаммов *Alternaria alternata* к сортам картофеля и томата / Л.Ю. Кокаева, Н.Н. Кудрявцева, М.А. Побединская, Б.Т. Зайчик, С.Н. Еланский // Защита картофеля. – 2015. – № 1. – С. 14-18.

12. Влияние состава питательной среды на рост грибов рода *Alternaria* / С. Николаева, А. Николаев, В. Шубина, Л. Волощук // Revistă științifică a Universității Stat din Moldova. – 2011. – № 1(41). – С. 117-123.

13. Влияние состава среды на морфологические и культуральные признаки штамма *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., возбудителя гнили сердцевины плодов яблони / И.Л. Астапчук, Г.В. Якуба, А.А. Фоменко, Е.А. Солоп // Защита растений от вредных организмов. Материалы X международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Кубанского государственного аграрного университета (Краснодар, 21-25 июня 2021 года). – 2021. – С. 24-27.

14. Ганнибал, Ф.Б. Альтернариозы сельскохозяйственных культур на

территории России / Ф.Б. Ганнибал, А.С. Орина, М.М. Левитин // Защита и карантин растений. – 2010. – № 5. – С. 30-32.

15. Ганнибал, Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. Методическое пособие / Ф.Б. Ганнибал. – СПб.: ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, 2011. – 71 с.

16. Ганнибал, Ф.Б. Видовой состав, систематика и география возбудителей альтернариозов подсолнечника в России // Вестник защиты растений. – 2011а. – № 1. – С. 13-19.

17. Ганнибал, Ф.Б. Виды рода *Alternaria* на яблоне / Ф.Б. Ганнибал, И.В. Бильдер, Т. Ули-Маттила // Микология и фитопатология. – 2008. – Т. 42, № 1. – С. 20-27.

18. Ганнибал, Ф.Б. Возбудители альтернариоза растений семейства крестоцветные в России: видовой состав, география и экология / Ф.Б. Ганнибал, Е.Л. Гасич // Микология и фитопатология. – 2009. – Т. 43, № 5. – С. 79-88.

19. Ганнибал, Ф.Б. Мелкоспоровые виды рода *Alternaria* на злаках // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38 (3). – С. 19-28.

20. Ганнибал, Ф.Б. Характеристика патогена томата *Alternaria tomatophila*, ранее не идентифицированного в России / Ф.Б. Ганнибал, А.С. Орина // Микология и фитопатология. – 2013. – Т. 47, вып. 1. – С. 51-55.

21. Гасич, Е.Л. Микобиота видов *Heracleum* на территории северо-западного региона Российской Федерации и микромицеты, перспективные для контроля *Heracleum sosnowskyi* / Е.Л. Гасич, А.О. Берестецкий, Л.Б. Хлопунова // Микология и фитопатология. – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 333-342.

22. Горовой, Л.Ф. Биологические средства защиты растений и биотехнология их производства / Л. Ф. Горовой // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества: Материалы Междунар. науч.- практ. конф. – 2005. – С. 51-52.

23. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации / М.: «ООО Издательство

Агрорус», 2018. – 899 с.

24. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации / М.: «ООО Издательство Агрорус», 2019. – 899 с.

25. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации / М.: «ООО Издательство Агрорус», 2020. – 899 с.

26. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации / М.: «ООО Издательство Агрорус», 2021. – 899 с.

27. Далинова, А.А. Особенности начального развития *Alternaria sonchi in vitro* и на листьях различных растений / А.А. Далинова, А.О. Берестецкий // Микология и фитопатология. – 2014. – Т. 48, № 4. – С. 274-280.

28. Долженко, Т.В. Экологизированная защита растений. Экологическое обоснование основных положений выпускной квалификационной работы. Методические указания для студентов, обучающихся по специальности «Защита растений» / Т.В. Долженко. – Санкт-Петербург - СПбГАУ. - 2009. – 19 с.

29. Долженко, Т.В. Экотоксикологический мониторинг пестицидов в агроэкосистемах / Т.В. Долженко, В.И. Долженко. – Санкт-Петербург - СПбГАУ. - 2006. - 14 с.

30. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – Москва: Альянс, 2014. – 352 с.

31. Егоров, Е.А. Методические подходы к биологизации интенсификационных процессов (на примере промышленного плодоводства) [Электронный ресурс] / Е.А. Егоров, Ж.А. Шадрин, Г.А. Кочьян // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2021а. – № 71(5). – С. 1-22. – URL: <https://doi.org/10.30679/2219-5335-2021-5-71-1-22>.

32. Егоров, Е.А. Научное обеспечение становления, развития плодоводства и виноградарства Северо-Кавказского региона / Е.А. Егоров // Вестник

российской сельскохозяйственной науки. – 2021б. – № 3. – С. 4-7.

33. Егорова, Л.Н. Род *Alternaria* и близкие к нему гифомицеты с Дальнего Востока России. // Микология и фитопатология. – 1999. – Т. 33, № 1. – С. 13-18.

34. Зинченко, В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность / В.А. Зинченко. - Москва: КолосС. - 2012. - 247 с.

35. Идентификация и токсикологическая характеристика штаммов *Alternaria japonica* / Салимова Д.Р., Кочура Д.С., С.В. Сокорнова, А.С. Орина, Ф.Б. Ганнибал, А.О. Берестецкий // Микология и фитопатология. – 2021. – Т. 55, № 3. – С. 203-218.

36. Кокаева, Л.Ю. Микобиота пораженных листьев *Solanum tuberosum* L., *S. lycopersicum* L. и *S. dulcamara* L.: дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.12: защищена 22.04.2016 / Кокаева Людмила Юрьевна. – М., 2016. – 197 с.

37. Кузнецов, В.В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция / В.В. Кузнецов, Н.И. Шевякова // Физиология растений. – 1999. – Т.46 (2). – С.321-336.

38. Лёвкина, Л.М. Род *Alternaria* Nees: Новое в систематике и номенклатуре грибов / Л.М. Лёвкина; под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии; Микология для всех. – 2003. – С. 276-303.

39. Лёвкина, Л.М. Таксономия рода *Alternaria* Nees / Л.М. Левкина. // Микология и фитопатология. – 1984. – Т. 18. № 1. – С. 80-86.

40. Методика выявления и учета болезней плодовых и ягодных культур / М.: Колос, 1971. – 23 с.

41. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве / по ред. В.И. Долженко. – СПб, 2009. – 378 с.

42. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов / ВАСХНИЛ, ВНИИ защиты растений; сост. М.К. Хохряков. – Ленинград: ВИЗР, 1979. – 78 с.

43. Методическое и аналитическое обеспечение организации и проведения исследований по технологии производства винограда / под ред. К.А.

Серпуховитиной. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. – 182 с.

44. Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская [и др.]; отв. ред. В.И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1973. – 240 с.

45. Назарова, Н.П. О воздействии пестицидов на жизнедеятельность медоносных пчел / Н.П. Назарова // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. – 2009. – № 4. – С. 134-137.

46. Некоторые методические подходы к выделению и изучению действия токсических веществ гриба *Alternaria* на проростки томатов / С. Николаева, А. Николаев, В. Шубина, Л. Волощук // Revistă științifică a Universității Stat din Moldova. – 2012. – № 1(51). – С. 72-79.

47. Нкетсо, Т.Х. Применение фунгицидов в борьбе с альтернариозом картофеля в условиях Нижнего Поволжья / Т.Х. Нкетсо, И.Д. Еськов // Аграрный научный журнал. – 2020. – № 2. – С. 24-28.

48. Новое в систематике и номенклатуре грибов / А.Ю. Сергеев, А.В. Александрова, В.Г. Арзуманян, С.Ф. Багирова [и др.]. – Москва: Общероссийская общественная организация "Общественная национальная академия микологии", 2003. – 496 с.

49. Новое в систематике и номенклатуре грибов / Под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – Москва, 2003. – 452 с.

50. Пат. № 2472337 С2 А01G17/00 (2006.01) Российская Федерация, МПК А01G 17/00. Способ биологизированной защиты винограда от болезней / Е.Г. Юрченко; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия (RU). – № 2011111808/13; заявл. 29.03.2011; опубл. 20.01.2013, Бюл. № 2.

51. Петров, В.С. Агроэкологическое зонирование территории для оптимизации размещения сортов, устойчивого виноградарства и качественного виноделия / В.С. Петров, Г.Ю. Алейникова, А.А. Мarmorштейн. – Краснодар: Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства,

виноделия, 2020. – 138 с.

52. Петрова, Н.Г. Биологическое и токсикологическое обоснование применения средств защиты пшеницы яровой от листовых болезней на северо-западе нечернозёмной зоны: дисс. ... канд. биол. наук: 06.01.07: защищена 09.06.2022: утв. 28.11.2022. – СПб, 2022. – 250 с.

53. Пидопличко, Н.М. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель / Н.М. Пидопличко. – Киев: «Наукова думка», 1977. – Т. 2. – 298 с.

54. Препараты нового поколения для защиты растений / Л.Ф. Горовой, И.И. Кошевский, В.В. Редько, В.В. Теслюк // Сборник трудов НАН Украины. – 2002. – С. 87-92.

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

56. Орина, А.С. Видовой состав возбудителей альтернариоза пасленовых культур на территории России: автореф. дис. ... канд. биол. наук: специальность 03.02.12 «Микология» / Орина Александра Станиславовна. – ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии. – Санкт-Петербург, 2011. – 19 с.

57. Первичный скрининг бактериальных штаммов антагонистов из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК к возбудителю фомоза подсолнечника (часть 2) / Л.В. Маслиенко, А.Х. Воронкова, Л.А. Даценко, Е.А. Ефимцева, Д.А. Пуногина, С.А. Гайдукова, В.В. Казакова, С.Р. Ковалева // Масличные культуры. – 2020б. – № 3 (183). – С. 107-113.

58. Первичный скрининг грибных штаммов антагонистов из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК к возбудителю фомоза подсолнечника (часть 1) / Л.В. Маслиенко, А.Х. Воронкова, Л.А. Даценко, Е.А. Ефимцева, Д.А. Пуногина, С.А. Гайдукова, В.В. Казакова, С.Р. Ковалева // Масличные культуры. – 2020а. – № 2 (182). – С. 103-111.

59. Попушой, И.С. Микозы виноградной лозы (мировая сводка) /

И.С. Попушой, Л.А. Маржина. – Кишинев: Штиинца, 1989. – 242 с.

60. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов: Пер. с англ. / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди. – М.: Мир, 2001. – 486 с.

61. Свидетельство о регистрации базы данных RU2022620636 Российская Федерация. База данных распространения и вредоносности некротической листовой пятнистости (*Alternaria* spp.) на винограде в Западном Предкавказье [Электронный ресурс] / Юрченко Е.Г., Буровинская М.В.; заявитель и правообладатель ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» – № 2022620473, заявл. 16.03.2022; опубл. 25.03.2022, Бюл. № 4 – 88 КБ.

62. Соколова, Л.М. Создание исходного материала столовой моркови для селекции на устойчивость к *Alternaria radicina* M. dr. et. E. и *Fusarium avenaceum* Link. Ex. ex.: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Соколова Любовь Михайловна. – М., 2010. – 32 с.

63. Сорокин, Н.В. О некоторых болезнях винограда и других растений Кавказского Края [Текст] / Н.В.Сорокин. – Тифлис, 1892. – 22 с.

64. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / М., 1979. – 296 с.

65. Фадеев, Ю.Н. Оценка санитарной и экологической безопасности пестицидов / Ю.Н. Фадеев // Защита растений. - 1988. - № 7. - С. 20-21.

66. Феклистова, И.Н. Метаболиты бактерий *Pseudomonas* индуцируют системную устойчивость растений к возбудителям альтернариоза / И. Н. Феклистова, Ю.М. Кулешова, М.Н. Федорович // Вестник БГУ. Серия 2. – 2013. – № 2. – С. 38-42.

67. Шафикова, К.Ф. Химические токсикозы пчел в современных условиях / К.Ф. Шафикова, С.А. Пашаян // Актуальные вопросы науки и хозяйства: новые вызовы и решения: Сборник материалов LIV Студенческой научно-практической конференции (Тюмень, 10 ноября 2020 г.). – Том 2. – Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2020. – С. 262-268.

68. Экономика отраслей АПК / И.А. Минаков, Н.И. Куликов,

О.В. Соколов, Л.А. Сабетова, И.Л. Ермаков [и др.] – М.: КолосС, 2004. – 464 с.

69. Эффективность фунгицидного действия растительных экстрактов в отношении фитопатогенов винограда / Я.А. Волков, Е.А. Матвейкина, Е.П. Странишевская, А.А. Колосова // Русский виноград. – 2017. – № 5. – С. 127-133.

70. Юрченко, Е.Г. Биологизация систем защиты винограда от оидиума на основе использования грибного и бактериального фунгицидов / Е.Г. Юрченко, Н.П. Грачева, В.Н. Ничипоренко [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. – Краснодар: СКФНЦСВВ, 2010. – № 4(3). – С. 80-85. – URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/10/03/12.pdf> [дата обращения: 10.03.2022].

71. Юрченко, Е.Г. Возможность биологизированного контроля нового патогена виноградников Западного Предкавказья *Alternaria tenuissima* / Е.Г. Юрченко, Н.П. Грачева, В.Н. Ничипоренко [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2011. – Т. 6, № 12. – С. 137-149. – <https://www.elibrary.ru/oiyixr>.

72. Юрченко, Е.Г. Полевая устойчивость сортов винограда к альтернариозу / Е.Г. Юрченко, М.В. Буровинская // Плодоводство и ягодоводство России. – 2019. – Т. 58. – С. 194-200.

73. Юрченко, Е.Г. Оценка полевой устойчивости сортов винограда к альтернариозу в условиях Западного Предкавказья / Е. Г. Юрченко, Н.П. Грачева // Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в XXI веке (иммунитет, селекция, репродукция). – Краснодар, 2011. – Т. 4, ч. 1. – С. 536-542.

74. Якуба, Г.В. Видовая структура комплекса микромицетов, возбудителей гнили сердцевины плодов яблони Краснодарского края [Электронный ресурс] / Г.В. Якуба, И.Л. Астапчук, А.И. Насонов // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2019. – № 60(6). – С. 148-162. – URL: <https://doi.org/10.30679/2219-5335-2019-6-60-148-162>.

75. Якуба, Г.В. Изучение основных тенденций в развитии микозов яблони в меняющихся условиях среды / Г.В. Якуба // Плодоводство и ягодоводство

России. – 2013. – Т. 36, № 2. – С. 355-360.

76. Якуба, Г.В. Оценка эффективности фунгицидов *in vitro* против возбудителя гнили сердцевины плодов яблони *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler / Г.В. Якуба, И.Л. Астапчук // Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 5-9 октября 2020 г.) / отв. ред. И.А. Тихонович. – 2020. – С. 280.

77. Якуба, Г.В. Эволюция паразитических свойств *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler на яблоне в условиях Краснодарского края / Г.В. Якуба // Плодоводство и ягодоводство России. – 2010. – Т. 24, № 2. – С. 380-386.

78. Agresti A. Foundations of Linear and Generalized Linear Models. – John Wiley & Sons, Inc., 2015. – 473 с.

79. Akbari, L.F. Management of *Alternaria alternata* causing blight of sesame with fungicide / L.F. Akbari, A.M. Parakhia // J. Mycol. Pl. Pathol. – 2007. – Vol. 37, № 3. – P. 426-430.

80. Ainsworth and Bisby's Dictionary of fungi. 10th edition / P.M. Kirk, P.F. Cannon, D.W. Minter, J.A. Stalpers. – Oxfordshire: CABI, 2008. – 771 p.

81. Alkooranee, J.T. Induce systemic resistance in cucumber by some bioelicitors against *Alternaria* leaf blight disease caused by *Alternaria cucumerina* fungus / J.T. Alkooranee, N.N. Kadhum // Plant Archives. – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 747-755.

82. A new *Alternaria* species from grapevine in China / W.-C. Tao, W. Zhang, J.-Y. Yan, K.D. Hyde, E.H.C. McKenzie, X.-H. Li, Y. Wang // Mycological Progress. – 2014. – Vol. 13, № 4. – P. 999.

83. *Alternaria* redefined / J.H.C. Woudenberg, J.Z. Groenewald, M. Binder, P.W. Crous // Studies in Mycology. – 2013. – V. 75. – P. 171-212.

84. *Alternaria* species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach / S. Somma, M.T. Amatulli, M. Masiello, A. Moretti, A.F. Logrieco // International Journal of Food Microbiology. – 2019. – Vol. 293 – P.

34-43.

85. *Alternaria* toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis / M. Meena, S. K. Gupta, P. Swapnil, A. Zehra, M.K. Dubey, R.S. Upadhyay // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1451.

86. Amaresh, V.S. Field Evaluation of Fungicides in the Management of *Alternaria* Leaf Blight of Sunflower / V.S. Amaresh, V.B. Nargund // *Annals of Plant Protection Sciences*. – 2002. – Vol. 10, № 2. – P. 331-336.

87. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna gene for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor // *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. – 1990. – P. 315-322.

88. Andersen, B. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes* / B. Andersen, E. Krøger, R.G. Roberts // *Mycological Research*. – 2001. – Vol. 105, № 3. – P. 291-299.

89. Andersen, B. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics / B. Andersen, U. Thrane // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1996. – Vol. 42. – P. 685-689.

90. Andrew, M. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex / M. Andrew, T.L. Peever, B.M. Pryor // *Mycologia*. – 2009. – Vol. 101, № 1. – P. 95-109.

91. Aquaporins and plant water balance / R. Kaldenhoff, M. Ribas-Carbo, S.J. Flexas, C. Lovisolo, M. Heckwolf, N. Uehlein // *Plant Cell and Environment*. – 2008. – Vol. 31. – P. 658-666.

92. Assessing the Belgian potato *Alternaria* population for sensitivity to fungicides with diverse modes of action / S. Landschoot, M. Vandecasteele, J. Carrette, B. De Baets, M. Höfte, K. Audenaert, G. Haesaert // *European Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 148, № 3. – P. 657-672.

93. Assessment of mycogenic zinc nano-fungicides against pathogenic early

blight (*Alternaria solani*) of potato (*Solanum tuberosum* L.) / A. Singh, S.S. Gaurav, G. Shukla, P. Rani // Materials Today: Proceedings. – 2022. – Vol. 49. – P. 3528-3537.

94. Avenot, H.F. Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards / H.F. Avenot, T.J. Michailides // Crop Protection. – 2015. – Vol. 78 – P. 214-221.

95. Avenot, H.F. Phenotypic and molecular characterization of resistance to the SDHI fungicide fluopyram in populations of *Alternaria alternata* from pistachio orchards in California / H.F. Avenot, M. Luna, T.J. Michailides // Crop Protection. – 2019. – Vol. 124 – P. 104838.

96. Berbee, M.L. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences / M.L. Berbee, M. Pirseyedi, S. Hubbard. – 1999. – Mycologia. – Vol. 91. – P. 964-977.

97. Bhutta, A.R. Study on pathogenicity of seed-borne fungi of sunflower in Pakistan / A.R. Bhutta, M.H. Rahber-Bhatti, I. Ahmad // Helia (Yugoslavia). – 1997. – Vol. 20, № 27. – P. 57-66.

98. Biochemical characterization of isolates of *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki and Nishihara causing sunflower blight / J. Rajender, B. Pushpavathi, M.S.L. Santha, L. Prasad, S. Sumathi // International journal of plant sciences. – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 249-254.

99. Biocontrol agents against early blight (*Alternaria solani*) of tomato / K.P. Ragupathi, P.R. Renganayaki, S. Sundareswaran, S.M. Kumar, A. Kamalakannan // Pharma Innovation. – 2020. – Vol. 9, № 12. – P. 283-285.

100. Biocontrol of postharvest *Alternaria* decay in table grapes from Mendoza province / A.F. Stocco, M.E. Diaz, M.C. Rodríguez Romera, L.A. Mercado, M.L. Rivero, M.L. Ponsone // Biological Control. – 2019. – Vol. 134 – P. 114-122.

101. Bio-genetic analysis of resistance in tomato to early blight disease, *Alternaria alternata* / G. Alizadeh-Moghaddam, Z. Rezayatmand, M.N. Esfahani,

M. Khozaei // *Phytochemistry*. – 2020. – Vol. 179. – P. 112486.

102. Boscalid-resistance in *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* populations: An emerging problem in Europe / S. Landschoot, J. Carrette, M. Vandecasteele, B. De Baets, M. Höfte, K. Audenaert, G. Haesaert // *Crop Protection*. – 2017. – Vol. 92 – P. 49-59.

103. Burovinskaya, M. Antimycotic activity of bacterial strains against the pathogen of grape necrotic leaf spotting *Alternaria* sp. / M. Burovinskaya, E. Yurchenko, L. Maslienko // *E3S Web of Conferences*. – 2021. – Vol. 254. –P. 05004. – <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125405004>.

104. Burovinskaya, M.V. Micromycetes antagonistic potential *in vitro* against *Alternaria* sp., a pathogenic strain associated with grapes / M.V. Burovinskaya, L.V. Maslienko, E.G. Yurchenko // *BIO Web of Conferences: International Scientific Conference, Krasnodar, 21-23 September 2021*. – Krasnodar: EDP Sciences, 2021. – Vol. 34. – P. 04011. – <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213404011>.

105. Carbon Nanotubes Decrease the Negative Impact of *Alternaria solani* in Tomato Crop / Y. González-García, G. Cadenas-Pliego, Á.G. Alpuche-Solís, R.I. Cabrera, A. Juárez-Maldonado // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11, № 5. – P. 1080.

106. Carson, M.L. Effect of two foliar pathogens on seed yield of sunflower / M.L. Carson // *Plant Disease*. – 1987. – Vol. 71, № 6. – P. 549-551.

107. Characteristics of *Alternaria alternata* strawberry pathotype isolated in New Zealand and the resistance of the «Akita Berry» strawberry to the fungus / H. Takahashi, H. Furuya, T. Takai, T. Matsumoto // *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. – 1997. – Vol. 65 (4). – P. 785-790.

108. Characterization of *Alternaria* isolates from the infectoria species-group and a new taxon from *Arrhenatherum*, *Pseudoalternaria arrhenatheria* sp. nov. / Lawrence D.P., Ph.B. Gannibal, F.M. Dugan, B.M. Pryor // *Mycological Progress*. – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 257-276.

109. Cho, H.S. Three *Alternaria* Species Pathogenic to Sunflower / H.S. Cho, S.H. Yu // *The Plant Pathology Journal*. – 2000. – Vol. 16 (6). – P. 331-334.

110. Citrus Black Rot is Caused by Phylogenetically Distinct Lineages of *Alternaria alternata* / T.L. Peever, L. Carpenter-Boggs, L.W. Timmer, L.M. Carris, A. Bhatia // *Phytopathology*. – 2005. – Vol. 95, № 5. – P. 512-518.

111. Comparative Genetic Variation Among *Alternaria brassicae* Isolates Infecting Oilseed Brassica In India / S. Chanyal, S. Srivastava, P.D. Meena, G. Taj // *International Journal of Pure & Applied Bioscience*. – 2018. – Vol. 6, № 4. – P. 394-400.

112. Comparison of *Alternaria* spp. Collected in Italy from Apple with *A. mali* and Other AM-Toxin Producing Strains / F. Rotondo, M. Collina, A. Brunelli, B.M. Pryor // *Phytopathology*. – 2012. – Vol. 102, № 12. – C. 1130-1142.

113. Contrasting species boundaries between sections *Alternaria* and *Porri* of the genus *Alternaria* / H. Ozkilinc, F. Rotondo, B.M. Pryor, T.L. Peever // *Plant Pathology*. – 2018. – Vol. 67, № 2. – C. 303-314.

114. Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens* / M.G. Kgate, B. Flett, M. Truter, T.A.S. Aveling // *Crop Protection*. – 2020. – Vol. 132. – P. 105146.

115. Dean, C.B. Overdispersion / C.B. Dean, E.R. Lundy // *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. – 2016. – P. 1-9.

116. Dehpour, A.A. Histopathological studies with electron microscopy (SEM & TEM) of *Alternaria alternata*, causal agent of brown spot and black rot diseases (as postharvest diseases) on citrus in the North of Iran / A.A. Dehpour, A. Majd, S.V. Alavi // *Acta Horticulture*. – 2010. – № 877. – P. 1655-1662.

117. Dennis, C. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics / C. Dennis, J. Webster // *Transactions of the British Mycological Society*. – 1971. – Vol. 57, № 1. – P. 41-48.

118. Design of experiments for amino acid extraction from tobacco leaves and their subsequent determination by capillary zone electrophoresis / O. Hodek, T. Křížek, P. Coufal, H. Ryšlavá // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 409, № 9. – P. 2383-2391.

119. Detection and Biological Characteristics of *Alternaria alternata* Resistant to Difenoconazole from *Paris polyphylla* var. *chinensis*, an Indigenous Medicinal Herb / C. Sun, F. Li, M. Wei, Z. Xiang, C. Chen, D. Xu // *Plant Disease*. – 2021. – Vol. 105, № 5. – P. 1546-1554.

120. Dhaka, S. Efficacy of different Fungicide against *Alternaria solani* Caused Early Blight Disease of Tomato under *in vitro* Conditions / S. Dhaka, A. Choudhary // *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 1, № 15. – P. 61-65.

121. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness / Gannibal Ph.B., A.S. Orina, N.V. Mironenko, M.M. Levitin // *European Journal of Plant Pathology*. – 2014. – Vol. 139, № 3. – P. 609-623.

122. Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: Identification using new highly variable loci and support from morphological characters / A.D. Armitage, D.J. Barbara, R.J. Harrison, C.R. Lane, S. Sreenivasaprasad, J.W. Woodhall, J.P. Clarkson // *Fungal Biology*. – 2015. – Vol. 119, № 11. – P. 994-1006.

123. Diversification and independent domestication of Asian and European pears / J. Wu, Y. Wang, J. Xu, S.S. Korban, Z. Fei [et. al.] // *Genome Biology*. – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 77.

124. Effects of Drought Stress on Chlorophyll Fluorescence and Photosynthetic Pigments in Grapevine Leaves (*Vitis vinifera* cv. «White Riesling») / L. Zulini, M. Rubinigg, R. Zorer, M. Bertamini // *Acta Horticulturae*. – 2007. – C. 289-294.

125. Effect of fungal and bacterial bioagents against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler *in vitro* condition / R.B. Rajput, K.U. Solanky, V.P. Prajapati, D.M. Pawar, S. Suradkar // *The Bioscan*. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 627-629.

126. Evaluating aggressiveness and host range of *Alternaria dauci* in a controlled environment: Evaluating aggressiveness and host range of *Alternaria dauci* / C. Boedo, S. Benichou, R. Berruyer, P. Simoneau, M. Lecomte, M. Briard, V. Le Clerc, P. Poupard // *Plant Pathology*. – 2012. – Vol. 61, № 1. – P. 63-75.

127. Evaluation of *in vitro* antifungal potential of several fungicides against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, the causal agent of potato brown spot in Afghanistan / A.K. Madadi, H. Rauf, M.H. Falahzadah, A. Yousufzai, A.S. Jamily, W.A. Sarhadi // Novel Research in Microbiology Journal. – 2021. – Vol. 5, № 1. – P. 1106-1117.

128. Evaluation of commercial Upland (*Gossypium hirsutum*) and Pima (*G. barbadense*) cotton cultivars, advanced breeding lines and glandless cotton for resistance to *Alternaria* leaf spot (*Alternaria alternata*) under field conditions / Y. Zhu, P. Lujan, S. Dura, R. Steiner, T. Wedegaertner, J. Zhang, S. Sanogo // Euphytica. – 2018. – Vol. 214, № 8. – P. 147.

129. Exogenous hexanoic acid induced primary defense responses in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants infected with *Alternaria solani* / Z. Rabiei, S. Hosseini, A. Dehestani, H. Pirdashti, F. Beiki // Scientia Horticulturae. – 2022. – Vol. 295 – P. 110841.

130. Farrar, J.J. *Alternaria* diseases of carrot / J.J. Farrar, B.M. Pryor, R.M. Davis // Plant disease. – 2004. – Vol. 88, № 8. – P. 776-784.

131. First Report of *Alternaria alternata* Causing Leaf Blight of Potatoes in South Africa / J.E. Van der Waals, B.E. Pitsi, C. Marais, C.K. Wairuri // Plant Disease. – 2011. – Vol. 95, № 3. – P. 363.

132. First Report of *Alternaria raphani* Causing Black Patches on Chinese Radish During Postharvest Storage in Canada / X.J. Su, H. Yu, T. Zhou, X.-Z. Li, J. Gong, C.L. Chu // Plant Disease. – 2005. – Vol. 89, № 9. – P. 1015.

133. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb / A.A. Malandrakis, Z.A. Apostolidou, A. Markoglou, F. Flouri // European Journal of Plant Pathology. – 2015. – Vol. 142, № 3. – P. 489-499.

134. Gannibal, Ph.B. *Alternaria cucumerina* causing leaf spot of pumpkin newly reported in North Caucasus (Russia) / Ph.B. Gannibal // New Disease Reports. – 2011. – Vol. 23, № 1. – P. 36-36.

135. Genetic diversity and population structure of pear (*Pyrus* spp.) collections

revealed by a set of core genome-wide SSR markers / Q. Liu, Y. Song, L. Liu, M. Zhang, J. Sun, S. Zhang, J. Wu // *Tree Genetics & Genomes*. – 2015. – Vol. 11. – P. 1-22.

136. Genotyping-by-sequencing of pear (*Pyrus* spp.) accessions unravels novel patterns of genetic diversity and selection footprints / S. Kumar, C. Kirk, C. Deng, C. Wiedow, M. Knaebel, L. Brewer // *Horticulture Research*. – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 17015.

137. Characterization, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Alternaria* isolates associated with preharvest fruit drop in California citrus / B.X. Camiletti, P.S.F. Lichtemberg, J.A. Paredes, T.A. Carraro, J. Velascos, T.J. Michailides // *Fungal Biology*. – 2022. – Vol. 126, № 4. – P. 277-289.

138. Ghildiyal, A. Isolation of Cold Tolerant Antifungal Strains of *Trichoderma* sp. From Glacial Sites of Indian Himalayan Region / A. Ghildiyal, A. Pandey // *Research Journal of Microbiology*. – 2008. – Vol. 3, № 8. – P. 559-564.

139. Ginoya, C.M. Evaluation of newer fungicides against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing fruit rot disease of chilli / C.M. Ginoya, N.M. Gohel // *International journal of plant protection*. – 2015. – Vol. 8, № 1. – P. 169-173.

140. Gveroska, B. *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco / B. Gveroska, J. Ziberoski // *Applied Technologies and Innovations*. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. 67-76.

141. Hong, S.G. Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. reveals variable and conserved domains / S.G. Hong, D. Liu, B.M. Pryor // *Mycological Research*. – 2005. – Vol. 109, № 1. – P. 87-95.

142. Hubballi, M. Effect of Environmental Conditions on Growth of *Alternaria alternata* Causing Leaf Blight of Noni / M. Hubballi, N. Sevugapperumal, R. Thiruvengadam // *World Journal of Agricultural Sciences*. – 2010. – Vol. 2, № 6. – P. 171-177.

143. Identification of *A. arborescens*, *A. grandis*, and *A. protenta* as new members of the European *Alternaria* population on potato / S. Landschoot,

M. Vandecasteele, B. De Baets, M. Höfte, K. Audenaert, G. Haesaert // *Fungal Biology*. – 2017. – Vol. 121, № 2. – P. 172-188.

144. Inter simple sequence repeat polymorphism in *Alternaria* genomic DNA exposed to lethal concentrations of isothiocyanates / R. Troncoso-Rojas, M.E. Báez-Flores, B. Pryor, H.S. García, M.-E. Tiznado-Hernández // *African Journal of Microbiology Research*. – 2013. – Vol. 7, № 10. – P. 838-852.

145. Imtiaj, A. Antagonistic effect of three *Trichoderma* species on the *Alternaria porri* pathogen of onion blotch / A. Imtiaj, T.-S. Lee // *World Journal of Agricultural Science*. – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 13-17.

146. Investigation of the stereoselectivity of an anti-amino acid antibody using molecular modeling and ligand docking / D.I. Ranieri, D.M. Corgliano, E.J. Franco, H. Hofstetter, O. Hofstetter // *Chirality*. – 2008. – Vol. 20, № 3-4. – P. 559-570.

147. *In vitro* antifungal activities of common weed extracts on mycelial growth of *Alternaria solani* (Ell. and Martin) Jones and Grout / J. Singh, S.K. Biswas, D. Nagar, R. Singh, M. Singh // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2017. – Vol. 6, № 8. – P. 2636-2642.

148. *In vitro* Evaluation of Botanical Extracts, Chemical Fungicides and *Trichoderma harzianum* Against *Alternaria brassicicola* Causing Leafspot of Cabbage / L.B. Pun, K. Chhetri, A. Pandey, R. Poudel // *Nepalese Horticulture*. – 2020. – Vol. 14, № 1. – P. 68-76.

149. *In vitro* evaluation of different fungicides, plant extracts and bio-agents against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing leaf blight of cowpea / D.S. Thaware, P.A. Fugro, Y.T. Jadhav, S.V. Magar, R.A. Karande // *International Journal of Plant Protection*. – 2010. – Vol. 3, № 2. – P. 356-360.

150. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles / B. Iacomi-Vasilescu, H. Avenot, N. Bataillé-Simoneau, E. Laurent, M. Guénard, Ph. Simoneau // *Crop Protection*. – 2004. – Vol. 23, № 6. – P. 481-488.

151. *In vitro* sensitivity of *Alternaria solani* to conventional fungicides and a biofungicide based on tea tree essential oil / M. Stepanović, S. Jevremović, E. Rekanović, M. Mihajlović, S. Milijašević-Marčić, I. Potočnik, B. Todorović // *Pesticidi I Fitomedicina*. – 2015. – Vol. 1, № 30. – P. 25-33.

152. Jhala, P. Effective Management of Purple Blotch of Onion Caused by *Alternaria porri* (Ellis) Through Host Resistance, Fungicides and Botanicals / P. Jhala, B.L. Mali, M.K. Meena // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2017. – Vol. 6, № 5. – P. 1737-1745.

153. Jicheng, Z. Effects of low light environment on the growth and photosynthetic characteristics of grape leaves / Z. Jicheng, W. Lijun, H. Weidong // *Journal of China Agricultural University* – 2002. – Vol. 7, № 3. – P. 75-78.

154. Kantwa, S.L. *In vitro* effect of fungicides and phyto-extracts against *Alternaria alternata* causing leaf blight of groundnut / S.L. Kantwa, J.P. Tatarwal, K.S. Shekhawat // *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. – 2014. – V. 7, № 6. – P. 28-31.

155. Kaur, M. Prevalence of ber black fruit spot (*Alternaria alternata*) and its management / M. Kaur, S.K. Thind, A. Arora // *Indian Phytopathology*. – 2020. – Vol. 73, № 2. – P. 245-251.

156. Kishor, K.P.B. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance / K.P.B. Kishor, S. Sangam, A. Ravi // *Current Science*. – 2005 – Vol. 88, № 3 – P. 424-438.

157. Kraepiel, Y. Gram-negative phytopathogenic bacteria, all hemibiotrophs after all? / Y. Kraepiel, M.A. Barny // *Molecular Plant Pathology*. – 2016. – Vol. 17, № 3. – P. 313-316.

158. Kusaba, M. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins / M. Kusaba, T. Tsuge // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1994. – Vol. 60. – P. 3055-3062.

159. Kusaba, M. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific

toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA / M. Kusaba, T. Tsuge // *Current Genetics*. – 1995. – V. 28. – P. 491-498.

160. Kusaba, M. Mitochondrial DNA variation in host-specific toxin-producing pathogens in the genus *Alternaria* / M. Kusaba, T. Tsuge // *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. – 1997. – V. 63. – P. 463-469.

161. Lagopodi, A.L. Effect of a Leaf Spot Disease Caused by *Alternaria alternata* on Yield of Sunflower in Greece / A.L. Lagopodi, C.C. Thanassouloupoulos // *Plant Disease*. – 1998. – Vol. 82, № 1. – P. 41-44.

162. Laluk, K. Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? / K. Laluk, T. Mengiste // *The Arabidopsis Book*. – The American Society of Plant Biologists, 2010. – № 8. – P. 1-34.

163. Latin, R. Modeling the relationship between *Alternaria* leaf blight and yield loss in muskmelon / R. Latin // *Plant Disease*. – 1992. – Vol. 76. – P. 1013-1017.

164. Leaf blight of sunflower caused by *Alternaria tenuissima* and *A. alternata* in Beijing, China / T. Wang, J. Zhao, G. Ma, S. Bao, X. Wu // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2019. – Vol. 41, № 3. – P. 372-378.

165. Leaf gas exchange and fluorescence of *Phillyrea latifolia*, *Pistacia lentiscus* and *Quercus ilex* saplings in severe drought and high temperature conditions / I. Filella, J. Llusià, J. Piñol, J. Peñuelas // *Environmental and Experimental Botany*. – 1998. – № 3 (39). – P. 213-220.

166. Lichtenthaler, H.K. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids / H.K. Lichtenthaler, C. Buschmann // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. – 2001. – P. F4.2.1-F4.2.6.

167. Liu, P. Genetic Variation in Resistance to Valsa canker is Related to Arbutin and Gallic Acid Content in *Pyrus bretschneideri* / P. Liu, Y. Shi, L. Zhu // *Horticultural Plant Journal*. – 2018. – Vol. 4, № 6. – P. 233-238.

168. Low-Temperature stress tolerance of grapevine varieties of different ecological and geographical origin / N.I. Nenko, I.A. Ilyina, G.K. Kiseleva, E.K. Yablonskaya // *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural*,

Exact, and Applied Sciences. – 2019. – Vol. 73. – No 1. – P. 56-65.

169. MacKinnon, S.L. Components from the phytotoxic extract of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola / S.L. MacKinnon, P. Keifer, W.A. Ayer // *Phytochemistry*. – 1999. – № 51. – P. 215-221.

170. Mamgain, A. Potential role of chemical elicitors in induced systemic resistance for the effective management of *Alternaria* blight in mustard / A. Mamgain, M.K. Biswas, N. Dey // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 2246-2250.

171. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants / M.-A. Newman, T. Sundelin, J.T. Nielsen, G. Erbs // *Frontiers in Plant Science*. – 2013. – Vol. 4 (139). – P. 1-14.

172. Management of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing blight of chilli (*Capsicum annum* L.) / V.A. Mane, S.C. Rite, N.K. Medhe, R.D. Gaikwad, V.N. Belwadkar // *Green Farming*. – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 485-486.

173. Maude, R.B. Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and grey leaf spot (*Alternaria brassicae*) of brassicas / R.B. Maude, F.M. Humpherson-Jones // *Annals of Applied Biology*. – 1980. – V. 95. – P. 311-319.

174. Molecular Detection and Characterization of *Fusarium sporotrichioides* based on ITS2 rDNA Polymorphism / E.A.M. Al-Sanae, A.I. Shehata, A.H. Bahkali, M.A. Yahya, A.A. Al Hazzani // *International Journal of Science and Research Methodology*. – 2016. – Vol. 2, № 3. – P. 1-22.

175. Molecular explication of grape berry-fungal infections and their potential application in recent postharvest infection control strategies / D. Solairaj [et al.] // *Trends in Food Science & Technology*. – 2021. – Vol. 116 – P. 903-917.

176. Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins / H. Akamatsu, M. Taga, M. Kodama, R. Johnson, H. Otani, K. Kohmoto // *Current Genetics*. – 1999. – Vol. 35. – P. 647-656.

177. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species / T.L. Peever, G. Su, L. Carpenter-Boggs, L.W. Timmer // *Mycologia*. – 2004. – Vol. 96, № 1. – P.

119-134.

178. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies / K. O'Donnell, H.C. Kistler, E. Cigelnik, R.C. Ploetz // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* – 1998. – Vol. 95, № 5. – P. 2044-2049.

179. Mycobiota and toxicogenic *Alternaria* spp. strains in Malbec wine grapes from DOC San Rafael, Mendoza, Argentina / L.P. Prendes, M.G. Merín, M.A. Andreoni, M.L. Ramirez, V.I. Morata de Ambrosini // *Food Control.* – 2015. – Vol. 57 – P. 122-128.

180. Newman, T.E. The Evolutionary and Molecular Features of Broad Host-Range Necrotrophy in Plant Pathogenic Fungi / T.E. Newman, M.C. Derbyshire // *Frontiers in Plant Science.* – 2020 – Vol. 11. – P. 1772.

181. Nishikawa, J. Japanese species of *Alternaria* and their species boundaries based on host range / J. Nishikawa, C. Nakashima // *Fungal Systematics and Evolution.* – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 197-282.

182. Nishikawa, J. Morphological and molecular characterization of the strawberry black leaf spot pathogen referred to as the strawberry pathotype of *Alternaria alternata* / J. Nishikawa, C. Nakashima // *Mycoscience.* – 2019. – Vol. 60, № 1. – P. 1-9.

183. Nishimura, S. Host-specific toxins from *Alternaria alternata*: Problems and Prospects / S. Nishimura // *Proceedings of the Japan Academy, Series B.* – 1980. – Vol. 56, № 6. – P. 362-366.

184. Nishimura, S. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species / S. Nishimura, K. Kohmoto // *Annual Review of Phytopathology.* – 1983. – V. 21, № 1. – P. 87-116.

185. Occurrence of *Alternaria* leaf blight of sunflower caused by two closely related species *Alternaria solani* and *A. tomatophila* in Inner Mongolia / Y. Zhang, Y. Yu, R. Jia, L. Liu, J. Zhao // *Oil Crop Science.* – 2021. – Vol. 6, № 2. – P. 74-80.

186. Overview of purple blotch disease and understanding its management

through chemical, biological and genetic approaches / Dar A.A., S. Sharma, R. Mahajan, M. Mushtaq, A. Salathia, S. Ahamad, J.P. Sharma // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2020. – Vol. 19, № 12. – P. 3013-3024.

187. Park, M.S. A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotiincultae* / M.S. Park, C.E. Romanoski, B.M. Pryor // *Mycologia*. – 2008. – Vol. 100, № 3. – P. 511-527.

188. Pasche, J.S. Effect of the F129L Mutation in *Alternaria solani* on Fungicides Affecting Mitochondrial Respiration / J.S. Pasche, L.M. Piche, N.C. Gudmestad // *Plant Disease*. – 2005. – Vol. 89, № 3. – P. 269-278.

189. Patel, C.M. Studies on fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) of chilli (*Capsicum annum* L.) and its management / R.C. Patel // M.Sc. (Ag.) Thesis, Anand Agricultural University. – 2008. – P. 38-58.

190. PCR Detection of *Alternaria* spp. in Processed Foods, Based on the Internal Transcribed Spacer Genetic Marker / M. Pavón, I. González, M. Rojas, N. Pegels, R. Martín, T. García // *Journal of Food Protection*. – 2011. – Vol. 74, № 2. – P. 240-247.

191. Penetration and infection processes of *Alternaria brassicicola* on cauliflower leaf and *Alternaria brassicae* on mustard leaf: a histopathological study / P. Sharma, S. Deep, D.S. Bhati, M. Sharma, P. Chowdappa // *Plant Pathology Journal*. – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 100-111.

192. Peptide and Amino Acids Separation and Identification from Natural Products / I. Neda, P. Vlăzan, R. Pop, P. Sfârloagă, I. Grozescu, A.-E. Segneanu // *Analytical Chemistry*. – InTech, 2012. – P. 135-146.

193. Physiological and transcriptional responses of *Alternaria alternata* induced abnormal leaf senescence in *Pyrus pyrifolia* / B. Jia, G. Li, X. Yang, L. Liu, W. Heng, P. Liu // *Scientia Horticulturae*. – 2021. – Vol. 277 – P. 109786.

194. Prakasam, V. *Trichoderma harzianum* (Th-3) a Potential Strain to Manage the Purple Blotch of Onion (*Allium cepa* L.) Caused by *Alternaria porri* under North Indian Plains / V. Prakasam, P. Sharma // *Journal of Agricultural Science*. – 2012. – Vol. 4, № 10. – P. 266-272.

195. Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola* / H. Otani, A. Kohnobe, M. Kodama, K. Kohmoto // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 1998. – № 52 (5). – P. 285-295.

196. Reactive oxygen species generating and scavenging systems play critical role in conferring leaf spot disease resistance in *Withania somnifera* (L.) Dunal / B. Singh, N. Kaur, P. Kumar, V. Hallan, P. Pati // *Industrial Crops and Products*. – 2020. – Vol. 157. – P. 112889.

197. Resistance of some apricot varieties and hybrids to *Alternaria tenuissima* / M. Oprea, V. Balan, E. Dragoescu, A. Ivascu // *ISHS Acta Horticulturae*. – 1986. – V. 192. – P. 231-238.

198. Roberts, R.G. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups / R.G. Roberts, S.T. Reymond, B. Andersen // *Mycological Research*. – 2000. – V. 104. – P. 151-160.

199. Role of four *Alternaria* spp. causing leaf and stem blight of sunflower in Thailand and their chemical controls / S. Prathuangwong, S.W. Kao, T. Sommartya, P. Sinchaisri // *The Kasetsart Journal*. – 1991. – Vol. 25. – P. 112-124.

200. Saharan, G.S. *Alternaria* Diseases of Crucifers: Biology, Ecology and Disease Management / G.S. Saharan, N. Mehta, P.D. Meena. – Singapore: Springer, 2016. – 299 p.

201. Sauerborn, J. Site productivity, the key to crop productivity / J. Sauerborn, // *Journal of Agronomy and Crop Science*. – 2002. – № 6 (188). – P. 363-367.

202. Seabold, S. *Statsmodels: Econometric and Statistical Modeling with Python* / S. Seabold, J. Perktold // *Proceedings of the 9th Python in Science Conference / Texas*, 2010. – P. 92-96.

203. Sellers, K.F. Underdispersion models: Models that are «under the radar» / K.F. Sellers, D.S. Morris // *Communications in Statistics – Theory and Methods*. – 2017. – Vol. 46, № 24. – P. 12075-12086.

204. Sensitivities of Baseline Isolates and Boscalid-Resistant Mutants of *Alternaria alternata* from Pistachio to Fluopyram, Penthiopyrad, and Fluxapyroxad /

H.F. Avenot, H. van den Biggelaar, D.P. Morgan, J. Moral, M. Joosten, T.J. Michailides // *Plant Disease*. – 2014. – Vol. 98, № 2. – P. 197-205.

205. Screening of *Pyrus pyrifolia* genotypes for resistance to *Alternaria alternata* / X. Yang, X. He, Q. Chen, J. Zhang, J. Fan, P. Liu, H. Hu // *Scientia Horticulturae*. – 2020. – Vol. 259 – P. 108838.

206. Simmons, E.G. *Alternaria: an identification manual* / E.G. Simmons. – Netherlands: CBS Biodiversity Series. – 2007. – 775 p.

207. Simmons, E.G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge // *Alternaria. Biology, plant diseases and metabolites* / E.G. Simmons. – Amsterdam: Elsevier, 1992. – P. 1-36.

208. Simmons, E.G. *Alternaria* themes and variations (22-26) / E.G. Simmons // *Mycotaxon*. – 1986. – Vol. 25, № 1. – P. 287-308.

209. Simmons, E.G. *Alternaria* themes and variations (73) / E.G. Simmons, R.G. Roberts // *Mycotaxon*. – 1993. – Vol. 48. – P. 109-140.

210. Simmons, E.G. *Alternaria* themes and variations (236-243): host-specific toxin producers / E.G. Simmons // *Mycotaxon*. – 1999. – Vol. 70. – P. 325-369.

211. Structural and functional characteristics of photosynthetic apparatus of chlorophyll-containing grape vine tissue / K.G. Tikhonov, M.S. Khristina, V.V. Klimova, M.A. Sundirevab, V.D. Kreslavski, R.A. Sidorovc, V.D. Tsidendambayevc, T.V. Savchenko // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2017. – Vol. 64, № 1. – P. 73-82.

212. Survilien, E. Effect of different active ingredients of fungicides on *Alternaria* spp. growth *in vitro* / E. Survilien, E. Dambrauskienė // *Agronomy Research*. – 2006. – № 4. – P. 403-406.

213. Svercel, M.D. The effect of vineyard long-term monoculture soil on production of volatile compounds and photosynthetic apparatus in grapevine leaves / M.D. Svercel, G. Christen, G. Defago // *Vitis*. – 2010. – Vol. 49, № 3. – P. 137-144.

214. Swart, A.E. Infection of table grape bunches by *Alternaria alternata* / A.E. Swart, C.L. Lennox, G. Holz // *South African Journal for Enology and Viticulture*.

– 1995. – Vol. 16, № 1. – P. 3-6.

215. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts / D.P. Lawrence, Ph.B. Gannibal, T.L. Peever, B.M. Pryor // *Mycologia*. – 2012. – V. 105(3). – P. 530-546.

216. Thomma, B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite / B.P.H.J. Thomma // *Molecular plant pathology*. – 2003. – Vol. 4, № 4. – P. 225-236.

217. Torto-Alalibo, T. Infection strategies of filamentous microbes described with the Gene Ontology / T. Torto-Alalibo, S. Meng, R.A. Dean // *Trends in Microbiology*. – 2009. – № 17, № 7. – P. 320-327.

218. Transcriptome analysis of Callery pear (*Pyrus calleryana*) reveals a comprehensive signalling network in response to *Alternaria alternata* / J. Kan, T. Liu, N. Ma, H. Li, X. Li [et. al.] // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12, № 9. – P. e0184988.

219. Transcriptome analysis of mechanisms and candidate genes associated with cucumber response to cucumber *Alternaria* leaf spot infection / R. Sa, D. Liu, L. Chen, L. Liu, Y. Zhang, X. Zhang, C. Xu // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2020. – Vol. 111 – P. 101490.

220. Use of molecular tools to study the diversity of phytopathogenic fungi / R. Saikia, B. Singh, R. Kumar, T. Singh, D.K. Arora // *Indian Journal of Microbiology*. – 2006. – Vol. 46, № 4. – P. 293-306.

221. Van der Waals, J.E. A review of early blight of potato / J.E. Van der Waals, L. Korsten, T.A.S. Aveling // *African Plant Protection*. – 2001. – Vol. 7, № 2. – P. 1-12.

222. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi / R. Horbach, A. R. Navarro-Quesada, W. Knogge, H.B. Deising // *Journal of Plant Physiology*. – 2011. – № 168, № 1. – P. 51-62.

223. Zhu, X.Q. Phylogenetic, Morphological, and Pathogenic Characterization of *Alternaria* Species Associated with Fruit Rot of Blueberry in California / X.Q. Zhu, C.L. Xiao // *Phytopathology*®. – 2015. – Vol. 105, № 12. – P. 1555-1567.

224. Zuur, A.F. A protocol for conducting and presenting results of regression-

type analyses / A.F. Zuur, E.N. Ieno // *Methods in Ecology and Evolution*. – 2016. – Vol. 7, № 6. – P. 636-645.

225. Zufferey, V. Photosynthese de la vigne (cv. Chasselas). III. Influence du regime hydrique / V. Zufferey, F. Murisier // *Revue suisse de viticulture, arboriculture et horticulture*. – 2009. – Vol. 41, № 5. – P. 309-312.

226. Brunaud, P. Miscellanées mycologiques // *Actes de Société Linnéenne de Bordeaux*. – 1897. – Vol. 52. – P. 149.

227. Joly, P. Le genre *Alternaria* recherches physiologiques, biologiques et systematiques / P. Joly // *Encyclopédie Mycologique*. – Paris, 1964. – V. 33. – P. 1-250.

228. Cavara, F. Matériaux de Mycologie lombarde // *Revue mycologique*. – Toulouse, 1889. – Vol. 11, № 44. – P. 186.

229. Cavara, F. Intorno al disseccamento dei grappoli della vite // *Atti dell'Istituto Botanico della. II Ser.* – 1888. – № 1. – P. 319-321.

230. Manual de poscosecha de frutas: manejo integrado de patógenos / L.E. Acuña, A. Carlos, B. Lourdes, C. Romero, M. Soledad, C. Mariángeles, C. Adrián [et al.] – 2a ed rev. – Buenos Aires: INTA Ediciones, 2019. – 56 p.

ПРИЛОЖЕНИЯ

СТО 00668034-128-2021 «Методика выявления некротической листовой пятнистости (*Alternaria* spp.) в виноградных насаждениях»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
САДОВОДСТВА, ВИНОГРАДАРСТВА, ВИНОДЕЛИЯ"
(ФГБНУ СКФНЦСВВ)



СТАНДАРТ
ОРГАНИЗАЦИИ

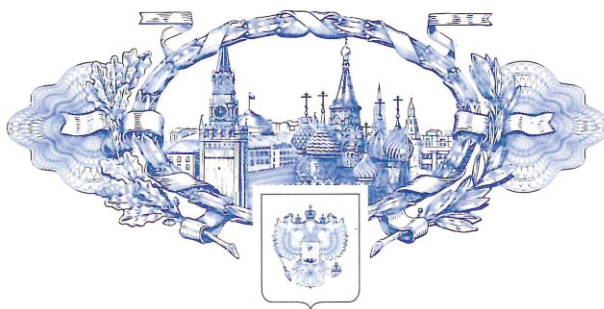
СТО
00668034-
128-2021

ВИНОГРАДАРСТВО
Методика выявления некротической
листовой пятнистости (*Alternaria* spp.)
в виноградных насаждениях

Краснодар
2021

Свидетельство о регистрации базы данных RU2022620636 Российская Федерация. База данных распространения и вредоносности некротической листовой пятнистости (*Alternaria spp.*) на винограде в Западном Предкавказье

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2022620636

**База данных распространения и вредоносности
некротической листовой пятнистости (*Alternaria spp.*)
на винограде в Западном Предкавказье**

Правообладатель: **Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства, виноградарства, виноделия"
(RU)**

Авторы: **Юрченко Евгения Георгиевна (RU), Буровинская
Маргарита Владимировна (RU)**

Заявка № **2022620473**

Дата поступления **16 марта 2022 г.**

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных **25 марта 2022 г.**



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов