

Болезни и вредители растений

УДК 635.64:635-2:579.63

doi: 10.15389/agrobiology.2025.5.911rus

ПЕРВОЕ СООБЩЕНИЕ О ЛИСТОВОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТОМАТА, ВЫЗВАННОЙ ВИДОМ *Cladosporium sphaerospermum****И.А. ЕНГАЛЫЧЕВА¹✉, К.К. ШАРОНОВА¹, Е.Г. КОЗАРЬ¹, О.В. ВЕРБА¹, В.К. ЧИЖИК^{1, 2}, А.В. СОЛДАТЕНКО¹, В.В. МАРТЫНОВ², А.Н. ИГНАТОВ³**

Кладоспориоз, или бурая пятнистость листьев томата, — одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний в условиях защищенного грунта. До недавнего времени возбудителем кладоспориоза считался только один вид — гембиотрофный гриб *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*). Однако в последние годы высокие потери урожая томатов все чаще связывают с недооцененностью роли грибов, ранее считавшихся слабопатогенными или непатогенными для этой культуры, в том числе других видов *Cladosporium*. Так, в литературе в разные годы описаны вирулентные для томата изоляты космополитных видов *C. cladosporioides* (Мексика), *C. oxysporum* (США), а также *C. sphaerospermum*, выделенный из растений томата в послеуборочный период. В настоящей работе впервые с использованием комбинации фитопатологического, молекулярно-генетического (на основании анализа ITS1 и ITS2 участков внутреннего транскрибируемого спейсера), морфологического и иммунологического подходов был выделен и идентифицирован новый вид возбудителя кладоспориоза в защищенном грунте на территории России — *C. sphaerospermum*. Цель исследования — видовая идентификация возбудителя *Cladosporium*, вызывающего кладоспориоз томата в защищенном грунте на территории Московской области, на основе морфологической и молекулярной характеристики. Экспериментальную часть работы по изоляции, идентификации *C. sphaerospermum* и изучению его вирулентности выполняли в 2023–2025 годах на базе ФГБНУ ФНЦ овощеводства (ФГБНУ ФНЦО, п. ВНИИССОК, Одинцовский р-н, Московская обл.), ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии (г. Москва) и ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы (г. Москва). Растения томата в фазу технической спелости плодов с симптомами кладоспориоза были собраны в условиях защищенного грунта (Московская обл.). Для выделения гриба собирали не менее пяти растений с десяти сортов и селекционных линий с начальными симптомами кладоспориоза. Микро- и макроморфологические характеристики оценивали при культивировании гриба на питательных агаризованных средах Чапека-Докса («HiMedia Laboratories», Индия) — PDA, PDA с добавлением отвара листьев крапивы двудомной *Urtica dioica* L. (PDA_{net}) и PDA с добавлением отвара листьев томата *Solanum lycopersicum* L. (PDA_{tom}). Тотальную ДНК выделяли из мицелия гриба возрастом 7–12 сут с помощью набора K-Corb (НПК «Синтол», Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Для видовой идентификации использовали нуклеотидную последовательность внутреннего транскрибируемого спейсера, амплифицированную с помощью праймеров ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') и ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Патогенные свойства *C. sphaerospermum* изучали на 10 линиях томата селекции ФГБНУ ФНЦО. В качестве стандарта устойчивости (St R) к кладоспориозу использовали линию томата селекции ФГБНУ ФНЦО для защищенного грунта VS-ИМ-193-19 (Л-15/25), стандарта восприимчивости (St S) — линию VS-ИМ-15-19 (Л-16/25). Развитие кладоспориоза на листьях томата оценивали через 14 и 21 сут после инокуляции. На основании проведенной в динамике оценки рассчитывали средний индекс поражения (I), степень развития болезни (R, %) и степень распространения болезни (P, %). В настоящей работе с использованием филогенетического анализа и морфологических признаков впервые был выделен и идентифицирован новый вид возбудителя кладоспориоза в России в защищенном грунте — *C. sphaerospermum*. Установлено, что исходные и реизолированные изоляты гриба были идентичны по последовательности ITS локуса и по всем изученным морфологическим признакам. С помощью базы данных NCBI была определена видовая принадлежность гриба как *C. sphaerospermum* с гомологией 100 %, при этом гомология по отношению к *C. fulvum* была меньше 86 %. Показано, что наиболее предпочтительна для культивирования *C. sphaerospermum* питательная среда PDA_{tom}, на которой гриб имел наиболее высокую линейную скорость роста мицелия $V_R = 7,0$ мм/сут. Выявлено высокое соответствие дифференциации линий томата по степени устойчивости при лабораторной оценке: от высокоустойчивых (I = 0,3 балла) до высокочувствительных (I = 3,0 балла), что доказывает значимую ($p \leq 0,05$) высокую агрессивность и широкую вирулентность гриба *C. sphaerospermum* в отношении культуры томата. Полученные данные будут иметь практическую ценность для разработки мер борьбы с возбудителем кладоспориоза.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, томат, кладоспориоз, *Cladosporium sphaerospermum*.

* Статья подготовлена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2025-577.

Свое коммерческое значение в овощеводстве томат (*Solanum lycopersicum* L.) приобрел благодаря высокой потребительской ценности плодов, связанной со значительным содержанием витамина С, полифенолов и каротиноидов (1). В современных условиях селекция томата для защищенного грунта ориентирована на создание сортов и гибридов с высокой урожайностью и устойчивостью к болезням при снижении пестицидной нагрузки на растения и оптимизации систем защиты (2). На сегодняшний день в этих условиях культура подвержена воздействию различных возбудителей грибной этиологии, наиболее вредоносные из которых — *Fusarium* spp., *Verticillium dahliae*, *Phytophthora infestans*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* (3).

Кладоспориоз, или бурая пятнистость листьев томата, — одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний культуры в защищенном грунте не только в России, но и во всем мире, которое приводит к снижению урожая в эпифитотийные годы на 70-100 % (4, 5). До настоящего времени возбудителем кладоспориоза томата считался только один вид — гембиотрофный гриб *Cladosporium fulvum* (*Mycovellosiella fulva* (Pers.) (1816) Link (1816) = *Cladosporium fulvum* Cooke 1883 = *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri.) (6). Патоген отличается узкой специализацией и наличием двух основных молекулярно-генетических механизмов взаимодействия с растением-хозяином (точечные мутации и процессы генетической рекомбинации), чувствительностью к факторам окружающей среды, влияющим на патогенез (7-10). Взаимодействие на основе модели Флора «ген-на-ген» между *Cladosporium fulvum* и томатом изучалось много лет зарубежными исследователями (11-13).

По сообщениям ряда авторов, в последние годы высокие потери урожая на культурах семейства *Solanaceae* связаны с недооцененностью видов, ранее считавшихся слабопатогенными или непатогенными для них (14, 15). По приведенным в открытых источниках данным, из тканей пораженных растений томата в чистую культуру выделяли несколько видов *Cladosporium*. Так, из растений томата на поздней стадии роста и растительных остатков выделены виды *C. cladosporioides* (16, 17), *C. oxysporum* (18, 19), *C. sphaerospermum* (20). Однако в этих исследованиях приведена только информация относительно видовой идентификации, а результаты по изучению патогенности и вирулентности выделенных изолятов отсутствуют.

Также в своих фитопатологических и иммунологических работах с кладоспориозом томата исследователи зачастую не приводят доказательную базу видовой идентификации возбудителя (данные молекулярного анализа или морфологического описания) и, основываясь исключительно на проявлении симптоматики, автоматически относят выделенные изоляты к виду *C. fulvum*.

В настоящей работе впервые с использованием комбинации фитопатологического, молекулярно-генетического (на основании анализа ITS1 и ITS2 участков внутреннего транскрибируемого спейсера), морфологического и иммунологического подходов был выделен и идентифицирован новый вид возбудителя кладоспориоза в защищенном грунте на территории России — *Cladosporium sphaerospermum*.

Цель исследования — видовая идентификация возбудителя *Cladosporium*, вызывающего кладоспориоз томата в защищенном грунте на территории Московской области, на основе морфологической и молекулярной характеристики.

Методика. Изоляцию и изучению вирулентности патогенов выполняли в 2023–2025 годах в условиях защищенного грунта и в лабораторных тестах (Московская обл., Одинцовский р-н, ФГБНУ ФНЦ овощеводства). Растения томата с симптомами кладоспориоза собирали в фазу технической спелости плодов.

Для выделения гриба собирали не менее пяти растений каждого из десяти сортообразцов с начальными симптомами кладоспориоза. Пораженные ткани листа на границе пораженного и здорового участков разрезали на несколько сегментов размером 2×3 мм, подвергали поверхностной стерилизации в 70 % этаноле, трижды промывали в стерильной воде, высушивали в ламинаре, помещали на картофельно-декстрозный агар (PDA) («Jinan Babio Biotechnology Co., Ltd.», Китай) и инкубировали при 25 °С.

Если на растительном материале начиналось спороношение, споры переносили стерильной микробиологической петлей на чашки Петри с PDA. Каждую выросшую изолированную колонию гриба переносили на новую чашку для выделения чистой культуры изолята, а затем получали моноспорные колонии по стандартной методике (15, 21).

Микро- и макроморфологические характеристики оценивали при культивировании гриба на питательных агаризованных средах Чапека-Докса («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия), PDA, PDA с добавлением отвара листьев крапивы двудомной *Urtica dioica* L. (PDA_{net}) и PDA с добавлением отвара листьев томата *Solanum lycopersicum* L. (PDA_{tom}). Культуру гриба первые 3 сут культивировали при 25 °С в темноте, далее 8–10 сут — при световом дне 16 ч и темной фазе 8 ч.

Морфологию колоний, появление пигментации и скорость роста колоний гриба оценивали ежедневно, фиксируя время изменения признаков. Диаметр колоний измеряли в двух поперечных направлениях для трех одновременных посевов до разрастания колоний по всей поверхности питательной среды в чашке Петри.

По результатам всех измерений рассчитывали средние значения (M), стандартное отклонение ($\pm SD$), среднюю скорость роста V_R (мм/сут) по формуле: $V_R = (R_1 - R_0) / (t_1 - t_0)$, где R_1 — радиус колонии в конце роста, мм; R_0 — радиус колонии в начале фазы линейного роста, мм; $t_1 - t_0$ — продолжительность линейной фазы роста, сут.

Микроизображения гриба были получены с помощью микроскопа Axio Lab A1 («Zeiss», Германия) и программного обеспечения ADF Image Capture («ADF Optics Co. Ltd.», Китай).

Тотальную ДНК выделяли из мицелия гриба возрастом 7–12 сут с помощью набора К-Сорб (НПК «Синтол», Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Концентрацию ДНК определяли при $\lambda = 260$ нм с помощью UV/Vis NanoPhotometer P300 («Implen GmbH», Германия). Чистоту выделенной ДНК оценивали по отношению OD₂₆₀/280.

Для видовой идентификации использовали последовательность внутреннего транскрибируемого спейсера, амплифицированную праймерами ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') и ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Реакционная смесь для амплификации содержала 2,5 мкл 10× ПЦР-буфера, 5–10 нг тотальной ДНК, 2,5 мкл 2,5 мкМ dNTP, по 10 пмоль каждого праймера, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (ОАО «Евроген», Россия), до 25 мкл стерильной воды. Амплификацию ДНК проводили в термоциклере MJ Research PTC-200 («Bio-Rad», США). Программа амплификации была следующей: 3 мин при 94 °С; 30 с при 94 °С, 30 с при

56 °С, 1 мин при 72 °С (33 цикла); 5 мин при 72 °С (заключительная элонгация).

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 1,5 % агарозном геле с $1 \times$ ТАЕ (Tris-acetate-EDTA) в присутствии бромистого этидия (10 мг/мл) в камере для горизонтального электрофореза Sub Cell GT («Bio-Rad», США). Длину амплифицированных фрагментов ДНК определяли с помощью маркера молекулярной массы М-100 (НПК «Синтол», Россия). Результаты визуализировали с помощью трансиллюминатора ЕСХ-М («Vilber Lourmat Deutschland GmbH», Германия) и документировали, используя систему «Взгляд» («Хеликон», Россия). Для определения нуклеотидной последовательности ПЦР-продукт очищали от реакционной смеси с помощью набора ColGen (НПК «Синтол», Россия) и секвенировали на анализаторе ABI PRISM 3130xl («Applied Biosystems», США) в двух повторностях.

Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями из баз данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и Mycobank (<https://www.mycobank.org>). Для филогенетического анализа использовали программу MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>).

Десять моноспоровых изолятов гриба были использованы для определения их патогенности на растениях томата с целью выполнения постулатов Коха.

Вирулентные свойства наиболее патогенного изолята С-М-24-4 *S. sphaerospermum* изучали на 10 линиях томата селекции ФГБНУ ФНЦО: VS-ИМ-51-24 (Л-24/25), VS-ИМ-50-24 (Л-25/25), VS-ИМ-73-24 (Л-26/25), VS-ИМ-71-24 (Л-27/25), VS-ИМ-58-24 (Л-28/25), VS-ИМ-75-24 (Л-29/25), VS-ИМ-300-24 (Л-30/25), VS-ИМ-189-24 (Л-31/25), VS-ИМ-206-24 (Л-2/25) и VS-ИМ-275-24 (Л-12/25). Опыт проводили в лабораторном вегетационном боксе в 3-кратной повторности ($n = 3$), по 10 растений каждой линии в одной повторности по полной рандомизированной схеме. В качестве стандарта устойчивости (St R) к кладоспориозу использовали линию томата селекции ФГБНУ ФНЦО для защищенного грунта VS-ИМ-193-19 (Л-15/25), стандарта восприимчивости (St S) — линию VS-ИМ-15-19 (Л-16/25). Все использованные линии, а также St R и St S проявили неодинаковую интенсивность поражения в течение трех лет при испытании в условиях защищенного грунта в Московской области.

При искусственной инокуляции использовали растения томата в возрасте 4-5 настоящих листьев, которые заражали посредством распыления 30 мл суспензии конидий (10^6 конидий/мл) на нижнюю сторону листьев. После высыхания инокулюма растения помещали в вегетационный бокс на стеллажи. В течение первых 2 сут поддерживали относительную влажность 100 %, затем ее снижали до 85 %. Зараженные растения инкубировали в течение 21 сут при 12-часовом световом дне и интенсивности освещения 12 тыс. лк.

Развитие кладоспориоза на листьях томата оценивали через 14 и 21 сут после инокуляции. Поражение кладоспориозом оценивали визуально согласно стандартной четырехбалльной шкале (22) с модификацией: 0-0,1 балла — поражение отсутствует; 0,5 балла — отдельные светлые пятна без спороношения гриба; 1 балл — хлоротичные пятна на единичных листьях без спороношения; 2 балла — пятна на 50 % листовой поверхности, слабое спороношение; 3 балла — пятна на 51-100 % листовой поверхности, сильное спороношение.

На основании результатов оценки, проведенной в динамике, рассчитывали средний индекс поражения (I), а также степень развития болезни

(R, %) и степень распространения болезни (P, %) по следующим формулам: $R = \{[\sum(\text{число пораженных растений} \times \text{соответствующий балл})] / (\text{наивысший балл} \times \text{общее число проанализированных растений})\} \times 100, \%$; $P = (\text{число пораженных растений} / \text{общее число проанализированных растений}) \times 100, \%$. На основании этих показателей образцы дифференцировали на высокоустойчивые — ВУ ($0 < I \leq 0,4$), толерантные — Т ($0,5 < I \leq 1,0$), средневосприимчивые — СВ ($1,1 < I \leq 2,0$), высоковосприимчивые — ВВ ($2,1 < I \leq 4,0$).

Для проведения статистического анализа полученных данных использовали программы Microsoft Excel 2016 («Microsoft Corporation», США) и Statistica 7.0 («StatSoft, Inc.», США). Значимость различий реакции растений томата в опытных и контрольных вариантах, а также относительно St R и St S определяли с использованием теста Дункана с доверительной вероятностью 95 % ($p \leq 0,05$).

Результаты. В 2023 и 2025 годах наблюдалось наиболее сильное развитие кладоспориоза (до 100 % в зависимости от образца), а в 2024 году отмечали умеренное развитие болезни, ее распространение по всей выборке обследованных растений не превышало 36 %.

Первичные симптомы кладоспориоза на томате в условиях теплицы проявлялись на листьях нижнего яруса в виде бледно-зеленых пятен с неровными краями, и при наличии необходимых условий для заражения через 5-7 сут с дорсальной стороны листьев отмечалось спороношение гриба в виде коричневого налета (рис. 1, а, б). У сильновосприимчивых образцов наблюдались также крапчатость, усыхание листовой пластины с периферийной части листа (см. рис. 1, в). Всего за период исследования из пораженных кладоспориозом растений было выделено 10 изолятов гриба. При искусственном заражении эти изоляты вызывали схожие симптомы на тестируемых растениях восприимчивых образцов (см. рис. 1, г-е).

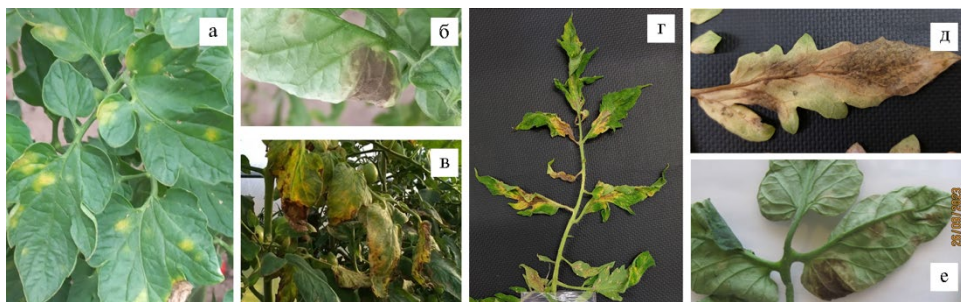


Рис. 1. Симптомы кладоспориоза на растениях томата (*Solanum lycopersicum* L.) восприимчивой линии VS-ИМ-15-19 (Л-16/25): а — первичные симптомы, б — наличие спороношения, в — поздние стадии развития болезни (условия защищенного грунта), г-е — при искусственном заражении *Cladosporium sphaerospermum* в вегетационном боксе (Московская обл., 2025 год).

Для определения видовой принадлежности полученных 10 оригинальных изолятов и 4 реизолятов из искусственно зараженных растений применяли метод анализа полиморфизма первичной структуры ДНК в локусе ITS (internal transcribed spacer), широко применяемый в филогенетическом анализе. Для этих целей были использованы праймеры ITS5 и ITS4 (23). Полученные последовательности ITS сравнивали с последовательностями этого локуса у разных видов рода *Cladosporium* из баз данных GenBank NCBI и Mucobank.

Для всей изученной выборки изолятов последовательности локуса ITS были идентичны. Результаты сравнения представлены на рисунке 2 в виде дендрограммы на примере типичного изолята С-М-24-4 (регистрационный номер в GenBank NCBI PX276843). Последовательность ITS С-М-

24-4 была на 100 % гомологична референсной последовательности штамма *C. sphaerospermum* KX928840 и вошла в общий кластер. Интересно отметить, что последовательность локуса ITS у вида *Fulvia fulva* (*C. fulvum*) — классического возбудителя кладоспориоза томата обладала наибольшими различиями с последовательностью изучаемого изолята (менее 86 % гомологии).

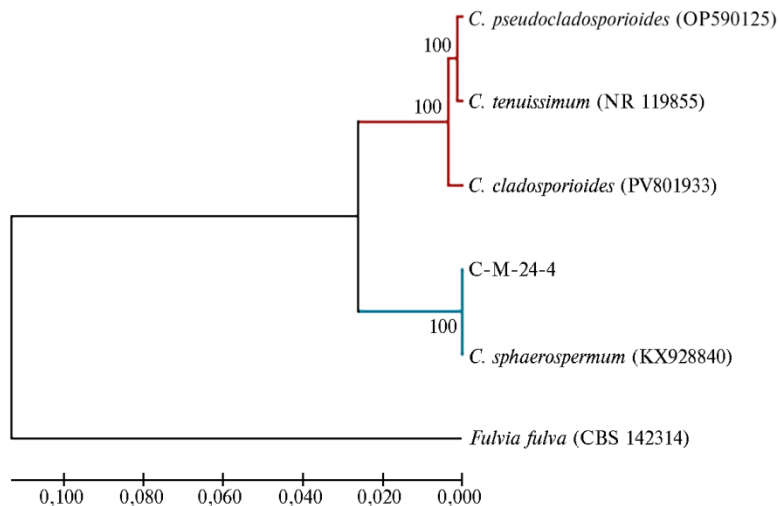


Рис. 2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ITS локуса у разных видов рода *Cladosporium* и полученного изолята выполненный с помощью программы MEGA X (метод UPGMA, бутстреп 1000). Последовательности взяты из базы данных GenBank NCBI, в скобках указаны их регистрационные номера. Исследуемый в этой работе изолят обозначен С-М-24-4 (регистрационный номер в GenBank NCBI PX276843).

Колонии возбудителя кладоспориоза, выращенные на PDA_{том}, PDA, PDA_{нет}, были оливково-зеленого цвета, на среде Чапека-Докса — более темного цвета, уплощенные, с радиальными бороздами (рис. 3, а-г). Форма конидий *C. sphaerospermum* варьировала от эллипсоидной до слегка изогнутой, число перегородок 0-2 (рис. 3, д-з). Размер конидий на PDA_{том} составлял $(6,67 \pm 2,49) \times (3,0 \pm 0,75)$ мкм; на PDA — $(6,17 \pm 1,69) \times (3,51 \pm 1,14)$ мкм; на PDA_{нет} — $(6,34 \pm 0,79) \times (4,02 \pm 0,37)$ мкм и на среде Чапека-Докса — $(4,08 \pm 0,44) \times (2,87 \pm 0,87)$ мкм.

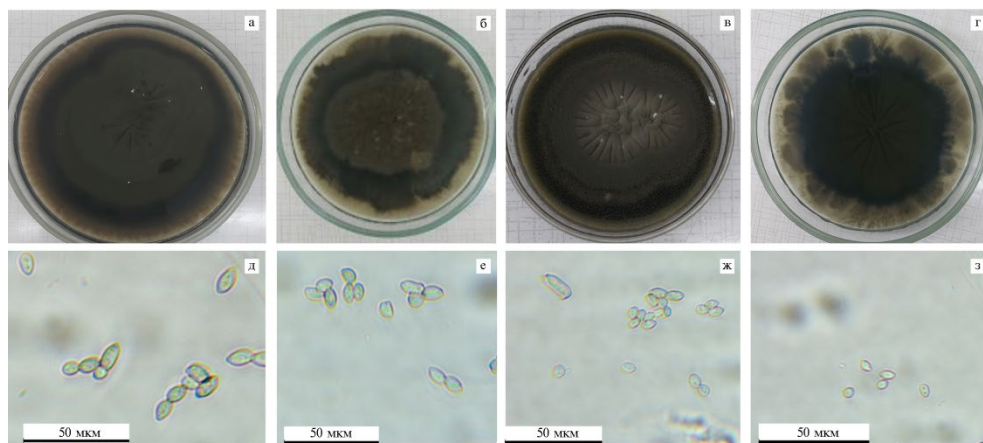


Рис. 3. Колонии (верхний ряд) и конидии (нижний ряд) *Cladosporium sphaerospermum*, вызывающего кладоспориоз томата в условиях защищенного грунта в Московской области, при культивировании на разных агаризованных средах: а, д — на PDA_{том} (PDA с добавлением экстракта листьев томата); б, е — PDA; в, ж — на PDA_{нет} (PDA с добавлением экстракта листьев крапивы двудомной); г, з — на среде Чапека-Докса (микроскоп Axio Lab A1, «Zeiss», Германия).

При культивировании на средах Czapek-Dox, PDA, PDA_{net} и PDA_{tom} была выявлена значительная разница в скорости роста мицелия гриба *C. sphaerospermum* (рис. 4).

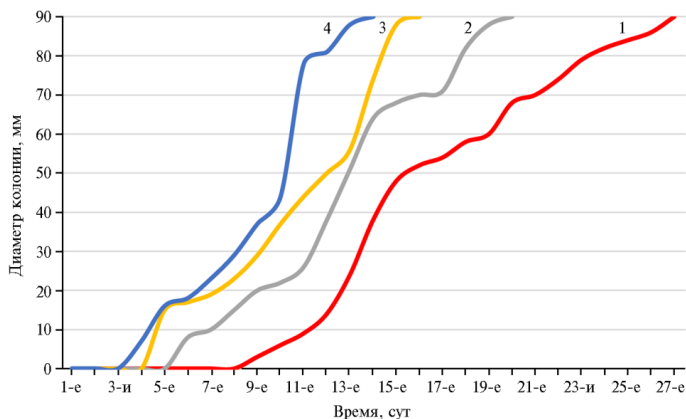


Рис. 4. Динамика роста колоний *Cladosporium sphaerospermum*, вызывающего кладоспориоз томата в условиях защищенного грунта в Московской области, на разных агаризованных средах: 1 — среда Чапека-Докса, 2 — PDA (картофельно-декстрозный агар), 3 — PDA_{net} (PDA с добавлением экстракта листьев крапивы двудомной), 4 — PDA_{tom} (PDA с добавлением экстракта листьев томата).

Изменение линейного скорости роста мицелия (V_R) гриба на испытанных средах варьировала от самой высокой на PDA_{tom} (7,0 мм/сут) до самой низкой на среде Чапека-Докса (4,8 мм/сут). Добавление в питательную среду PDA сока крапивы (PDA_{net}) увеличивало скорость роста гриба на 1,3 мм/сут, сока томата (PDA_{tom}) — на 1,8 мм/сут. Время полного зарастания поверхности питательной среды в чашке Петри в зависимости от среды составила от 14 сут (PDA_{tom}) до 27 сут (среда Чапека-Докса). Отличался рост гриба на анализируемых средах и по сроку наступления лаг-фазы. При культивировании гриба на среде Чапека-Докса наступление лаг-фазы отмечали только на 9-е сут, на среде PDA_{tom} — на 6-е сут. Следовательно, наиболее предпочтительной для культивирования *C. sphaerospermum* была питательная среда PDA_{tom}.

На основе полученных результатов молекулярного филогенетического анализа и морфологических признаков чистых культур мы пришли к выводу, что выделенные из растений томата изоляты принадлежат к виду *C. sphaerospermum*. Исходные изоляты и реизоляты гриба были идентичны по последовательности ITS и по всем изученным морфологическим признакам. Таким образом, мы выполнили условия постулатов Коха и впервые подтвердили, что *C. sphaerospermum* становится возбудителем кладоспориоза томата на территории Российской Федерации.

Десять изолятов гриба были включены в исследование агрессивности посредством заражения растений восприимчивой линии томата *in vivo*. Изучение динамики развития болезни на растениях выявило различия между анализируемыми изолятами *C. sphaerospermum* в сроках появления первых симптомов. Динамика развития болезни по всей совокупности изолятов в течение анализируемого периода носила экспоненциальный характер. У 7 изолятов появление хлоротичных пятен было отмечено уже на 10-е сут ($I = 0,5-2$ балла), у остальных — на 13-е сут, а на 16-е сут средний индекс поражения у всех изолятов составил от 2,5 до 4,0 баллов. Среди них наибольшую агрессивность проявил изолят С-М-24-4, который был включен в дальнейшие исследование на более широком наборе линий томата с различной полевой устойчивостью (рис. 5).



Рис. 5. Вирулентность гриба *Cladosporium sphaerospermum*, вызывающего кладоспориоз томата в условиях защищенного грунта в Московской области, в отношении различных линий томата на 10-е (1) и 16-е сут (2): ВУ — высокоустойчивые, Т — толерантные, СВ — средневосприимчивые, ВВ — высоковосприимчивые ($n = 3$, $M \pm SD$).

^{a-d} Значения, отмеченные одинаковой буквой, не имеют статистически значимых различий при доверительной вероятности 95 % согласно тесту Дункана.

Изучение динамики развития болезни выявило различия между анализируемыми образцами томата в сроках появления первых симптомов. Первые признаки поражения у линий из толерантной, средне- и высоковосприимчивой групп, включая стандарт восприимчивости (St S), были отмечены уже на 10-е сут ($I = 0,5-1,8$ балла). При этом у средневосприимчивых (Л-27/25, Л-2/25 и Л-12/25) и восприимчивых (Л-24/25, Л-25/25 и Л-30/25) линий интенсивность развития болезни резко увеличивалась, и к последнему учету средний индекс поражения составил соответственно $I = 1,4-1,8$ балла (СВ) и $I = 2,4-3,0$ балла (ВВ). У двух линий (Л-28/25 и Л-29/25) толерантной группы, наоборот, после появления первых симптомов в дальнейшем заражение шло по типу реакции сверхчувствительности, и к моменту второго учета средний индекс поражения оказался ниже относительно первой оценки. Исследователи связывают это с тем, что белки-эффекторы, кодируемые генами устойчивости к патогену (*Cf*-гены) в томатах, распознают специфические белки, кодируемые генами патогенной авирулентности (*Avr*-генами), что и приводит к реакции сверхчувствительности при заражении растений видом *C. fulvum* (8-10).

На листьях двух линий (Л-31/25, Л-26/25) с высокой полевой устойчивостью симптомы кладоспориоза появились только на 16-е сут, индекс поражения был невысоким и составил 0,3-0,4 балла, что значительно не отличалось от стандарта устойчивости (St R) Л-15/25.

Таким образом, при лабораторной оценке мы выявили дифференциацию линий томата по степени устойчивости к кладоспориозу — от высокоустойчивых ($I = 0,3$ балла) до высоковосприимчивых ($I = 3,0$ балла), что доказывает статистически значимую ($p \leq 0,05$) высокую агрессивность и широкий спектр вирулентности гриба *C. sphaerospermum* в отношении линий томата.

Полученные нами нуклеотидные последовательности ITS локуса выделенных из пораженных растений изолятов отличались от последовательностей, опубликованных в работе М. Намаяун с соавт. (24) и F. Пан с соавт. (25) на 4 %, включая InDel размером 3 нуклеотида.

Известно, что *C. sphaerospermum*, выделенный в чистую культуру из гниющих листьев помаранца (*Citrus aurantium*), был впервые описан немецким микологом Альбертом Юлиусом Отто Пенцигом (Albert Julius Otto Penzig) в 1886 году (26). Обладая высокой устойчивостью к экстремальным

экологическим условиям (27), *C. sphaerospermum* служит возбудителем различных болезней и аллергических реакций у человека (28, 29). Некоторые штаммы *C. sphaerospermum* являются эндофитами, стимулирующими рост корней *Glycine max* (24). Кроме того, ряд штаммов *C. sphaerospermum* используются как потенциальные биоагенты против возбудителей мучнистой росы пшеницы (30), серой гнили (25).

В работе А.А. Abedy с соавт. (20) *C. sphaerospermum* был выделен из гниющих больших корней и стеблей томата, но не показано, что он служил источником инфекции. Однако недавно появилось сообщение, что *C. sphaerospermum* может вызывать пятнистости листьев алоэ вера (31). Это свидетельствует, что изменяется специализация вида *C. sphaerospermum* и происходит переход его к паразитизму, в том числе на томате, что подтверждают и наши исследования. Все выделенные изоляты этого гриба проявили вирулентность в отношении линий томата с различной устойчивостью к кладоспориозу.

Итак, с помощью внутреннего транскрибируемого спейсера мы провели молекулярную идентификацию изолята, вызывающего кладоспориоз томата в условиях защищенного грунта. По нашим данным, обнаруженный возбудитель кладоспориоза на 100 % соответствует виду *Cladosporium sphaerospermum*. Проведена комплексная оценка этого возбудителя на различных сортообразцах томата. Присутствие *C. sphaerospermum* на растениях томата в качестве патогена должно приниматься во внимание при разработке методов диагностики кладоспориоза томата и контроля развития послеуборочных болезней растений. Дифференциация линий томата по степени устойчивости к *C. sphaerospermum* доказывает значимую ($p \leq 0,05$) высокую вирулентность гриба в отношении культуры. Полученные данные будут иметь практическую ценность для разработки мер борьбы с возбудителем кладоспориоза. Кроме того, новые данные о видовом составе будут использоваться в программе селекции томата на устойчивость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьева И.Ю., Голубкина Н.А., Павлов Е.Л. Соотношение каротиноидов в плодах разной окраски. В сб: *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования*. Сочи, 2018: 192-195.
2. Еськов И.Д., Земскова Ю.К., Лялина Е.В., Критская Е.Е., Суминова Н.Б. Хозяйственно-биологические особенности и защита гибридов томата от мучнистой росы в защищенном грунте. *Аграрный научный журнал*, 2022, 1: 13-16 (doi: 10.28983/asj.y2022i1pp13-16).
3. Randall E., Young V., Sierotzki H., Scalliet G., Birch P., Cooke D., Csukai M., Whisson S. Sequence diversity in the large subunit of RNA polymerase I contributes to mefenoxam insensitivity in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15(7): 664-676 (doi: 10.1111/mpp.12124).
4. Tandon G., Singh S., Kaur S. Comparative analysis of *Cf-4* and *Cf-19* in tomato (*Solanum lycopersicum*)-a bioinformatics study. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 87(10): 1365-1370 (doi: 10.56093/ijas.v87i10.75018).
5. Попов С.Я., Смирнов А.Н. Новые данные по сохранности возбудителей болезней томата после перезимовки. *Сельскохозяйственная биология*, 2024, 59(3): 561-570 (doi: 10.15389/agrobiology.2024.3.561rus).
6. Spangler R.C. *Cladosporium fulvum*. *Botanical Gazette*, 1924, 78(3): 349-352.
7. Velásquez A.C., Castroverde C.D., He S.Y. Plant-pathogen warfare under changing climate conditions. *Current Biology*, 2018, 28(10): R619-R634 (doi: 10.1016/j.cub.2018.03.054).
8. Mesarich C.H., Griffiths S.A., van der Burgt A., Ökmen B., Beenen H.G., Etalo D.W., de Wit P.J. Transcriptome sequencing uncovers the *Avr5* avirulence gene of the tomato leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(8): 846-857 (doi: 10.1094/MPMI-02-14-0050-R).
9. Mesarich C.H., Ökmen B., Rovenich H., Griffiths S.A., Wang C., Karimi Jashni M., Mihajlovski A., Collemare J., Hunziker L., Deng C.H., van der Burgt A., Beenen H.G., Templeton M.D., Bradshaw R.E., de Wit P.J.G.M. Specific hypersensitive response—associated recognition of new

- apoplastic effectors from *Cladosporium fulvum* in wild tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2018, 31(1): 145-162 (doi: 10.1094/MPMI-05-17-0114-FI).
10. Wang C., Cai X., Zheng Z. High humidity represses *Cf-4/Avr4*- and *Cf-9/Avr9*- dependent hypersensitive cell death and defense gene expression. *Planta*, 2005, 222(6): 947-956 (doi: 10.1007/s00425-005-0036-8).
 11. de Wit P.J.G.M. *Cladosporium fulvum* effectors: weapons in the arms race with tomato. *Annual Review of Phytopathology*, 2016, 54(1): 1-23 (doi: 10.1146/annurev-phyto-011516-040249).
 12. Zhao T., Liu W., Zhao Z., Yang H., Bao Y., Zhang D., Wang Z., Jiang J., Xu J., Zhang H., Li J., Chen C., Xu X. Transcriptome profiling reveals the response process of tomato carrying *Cf-19* and *Cladosporium fulvum* interaction. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 572 (doi: 10.1186/s12870-019-2150-y).
 13. Peng R., Sun S., Li N., Kong L., Chen Z., Wang P., Xu L., Wang H., Geng X. Physiological and transcriptome profiling revealed defense networks during *Cladosporium fulvum* and tomato interaction at the early stage. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1085395 (doi: 10.3389/fpls.2022.1085395).
 14. Hami A., Rasool R.S., Khan N.A., Mansoor S., Mir M.A., Ahmed N., Masoodi K.Z. Morpho-molecular identification and first report of *Fusarium equiseti* in causing chilli wilt from Kashmir (Northern Himalayas). *Scientific Reports*, 2021, 11: 3610 (doi: 10.1038/s41598-021-82854-5).
 15. Engalycheva I., Kozar E., Frolova S., Vetrova S., Tikhonova T., Dzhos E., Engalychev M., Chizhik V., Martynov V., Shingaliev A., Dudnikova K., Dudnikov M., Kostanchuk Y. *Fusarium* species causing pepper wilt in Russia: molecular identification and pathogenicity. *Microorganisms*, 2024, 12(2): 343 (doi: 10.3390/microorganisms12020343).
 16. Razak N.J., Abass M.H. First report of *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, and *C. ure-dinicola* as potential pathogens on tomato shoots system in Iraq. *Applied Nanoscience*, 2023, 13(2): 1065-1072 (doi: 10.1007/s13204-021-01851-2).
 17. Robles-Yerena L., Ayala-Escobar V., Leyva-Mir S.G., Lima N.B., Camacho-Tapia M., Tovar-Pedraza, J.M. First report of *Cladosporium cladosporioides* causing leaf spot on tomato in Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 2019, 101(3): 759-759 (doi: 10.1007/s42161-018-00218-x).
 18. Huang X.-Y., Liu Z.-H., Li J., Ji P. First report of a leaf spot on greenhouse tomato caused by *Cladosporium oxysporum* in China. *Plant Disease*, 2013, 97(6): 845-845 (doi: 10.1094/PDIS-11-12-1032-PDN).
 19. Lamboy J.S., Dillard H.R. First report of a leaf spot caused by *Cladosporium oxysporum* on greenhouse tomato. *Plant Disease*, 1997, 81(2): 228-228 (doi: 10.1094/PDIS.1997.81.2.228D).
 20. Abedy A.A., Musawi B.A., Isawi H.A. Abdalmoohsin R.G. Morphological and molecular identification of *Cladosporium sphaerospermum* isolates collected from tomato plant residues. *Brazilian Journal of Biology*, 2021, 82: e237428 (doi: 10.1590/1519-6984.237428).
 21. Vetrova S., Alyokhina K., Engalycheva I., Kozar E., Mukhina K., Sletova M., Krivenkov L., Kameneva A., Tikhonova T., Chizhik V., Martynov V. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with onion basal rot in the Moscow Region of Russian Federation. *Journal of Fungi*, 2024, 10(5): 331 (doi: 10.3390/jof10050331).
 22. *Методические указания по селекции сортов и гибридов томата для открытого и защищенного грунта* /Под ред. А.В. Алпатьева. М., 1986.
 23. Lucentini C.G., Medina R., Franca M.E., Saparrat M.C., Balatti P.A. *Fulvia fulva* [syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*] races in Argentina are evolving through genetic changes and carry polymorphic *avr* and *ecp* gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 2021, 159(3): 525-542 (doi: 10.1007/s10658-020-02181-9).
 24. Hamayun M., Afzal Khan S., Ahmad N., Tang D.S., Kang S.M., Na C.I., Sohn E.Y., Hwang Y.H., Shin D.H., Lee B.H., Kim J.G., Lee I.J. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(4): 627-632 (doi: 10.1007/s11274-009-9982-9).
 25. Pan F., Yang N., Zhu X., Yu C., Jiang M., Jiang Y., Liu S., Wu W., Liu Y. Discovery of a natural hybrid polyketide produced by endophytic *Cladosporium sphaerospermum* for biocontrol of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(32): 12190-12202 (doi: 10.1021/acs.jafc.3c02408).
 26. Bensch K., Groenewald J.Z., Dijksterhuis J., Starink-Willemse M., Andersen B., Sumnerell B.A., Shin H-D., Dugan F.M., Schroers H-J., Braun U., Crous P.W., Starink-willemse M. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 2010, 67: 1-94 (doi: 10.3114/sim.2010.67.01).
 27. Abdullah A.A., Dewan M.M., AL-Abedy A.N. Genetic variation of some isolates of *Cladosporium sphaerospermum* isolated from different environments. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 388(1): 012016 (doi: 10.1088/1755-1315/388/1/012016).
 28. Batra N., Kaur H., Mohindra S., Singh S., Shamanth A.S., Rudramurthy S.M. *Cladosporium sphaerospermum* causing brain abscess, a saprophyte turning pathogen: case and review of published reports. *Journal de Mycologie Médicale*, 2019, 29(2): 180-184 (doi: 10.1016/j.mycmed.2019.04.005).
 29. Yew S.M., Chan C.L., Ngeow Y.F., Toh Y.F., Na S.L., Lee K.W., Hoh C.C., Yee W.Y.,

- Ng K.P., Kuan C. Insight into different environmental niches adaptation and allergenicity from the *Cladosporium sphaerospermum* genome, a common human allergy-eliciting Dothideomycetes. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 27008 (doi: 10.1038/srep27008).
30. Zhu M., Zhang W., Duan X., Yan S., Cai Y., Gong S., Fahad S., Qiu Z. Biocontrol potential of *Cladosporium sphaerospermum* against the wheat powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease*, 2024, 108(10): 2983-2988 (doi: 10.1094/PDIS-02-24-0433-SC).
31. Avasthi S., Gautam A., Bhadauria R. First report of *Cladosporium sphaerospermum* causing leaf spot disease of *Aloe vera* in India. *Journal of Crop Protection*, 2016, 5(4): 649-654.

¹ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства,
143080 Россия, Московская обл., Одинцовский городской округ,
пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14,
e-mail: engirina1980@mail.ru ✉, blowball2001@gmail.com,
kozar_eg@mail.ru, verbaov@mail.ru, chizhikvera@bk.ru, alex-soldat@mail.ru;

²ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
биотехнологии,

127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: martynov.vik@gmail.com;

³ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов

им. Патриса Лумумбы (РУДН),

117198 Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6,
e-mail: an.ignatov@gmail.com

Поступила в редакцию

5 сентября 2025 года

Принята к публикации

13 октября 2025 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2025, V. 60, № 5, pp. 911-922

FIRST REPORT OF LEAF MOLD DISEASE OF TOMATO CAUSED BY *Cladosporium sphaerospermum*

I.A. Engalycheva¹ ✉, K.K. Sharonova¹, E.G. Kozar¹, O.V. Verba¹, V.K. Chizhik^{1, 2},
A.V. Soldatenko¹, V.V. Martynov², A.N. Ignatov³

¹Federal Research Center for Vegetable Growing, 14, ul. Selektionnaya, pos. VNISSOK, Odintsovskii district, 143072 Russia, e-mail engirina1980@mail.ru (✉ corresponding author), blowball2001@gmail.com, kozar_eg@mail.ru, chizhikvera@bk.ru, alex-soldat@mail.ru;

²All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail martynov.vik@gmail.com;

³Peoples' Friendship University of Russia, 6, ul. Miklukho-Maklaya, Moscow, 117198 Russia, e-mail an.ignatov@gmail.com
ORCID:

Engalycheva I.A. orcid.org/0000-0003-4843-111X

Sharonova K.K. orcid.org/0009-0007-5080-7899

Kozar E.G. orcid.org/0000-0002-1319-5631

Verba O.V. orcid.org/000-0001-8081-0983

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Funded by the Ministry of Higher Education and Science of Russia (grant № 075-15-2025-577)

Final revision received September 05, 2025

doi: 10.15389/agrobiology.2025.5.911eng

Accepted October 13, 2025

Chizhik V.K. orcid.org/0000-0003-0373-4256

Soldatenko A.V. orcid.org/0000-0002-9492-6845

Martynov V.V. orcid.org/0000-0003-1784-3429

Ignatov A.N. orcid.org/0000-0003-2948-753X

Abstract

Cladosporiosis or brown leaf mold of tomatoes is one of the most common and damaging diseases in greenhouses. Until recently, only one species, the hemibiotrophic fungus *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) was considered the causative agent. However, in recent years, high tomato yield losses have increasingly been attributed to the underestimation of the role of fungi previously considered weakly or non-pathogenic to this crop, including other *Cladosporium* species. Thus, virulent isolates of the cosmopolitan species *C. cladosporioides* (Mexico), *C. oxysporum* (USA), and *C. sphaerospermum*, isolated from tomato plants in the post-harvest period, have been described in the literature over the years. In this study, a new species of the causative agent of leaf mold in protected soil in Russia — *C. sphaerospermum* was isolated and identified for the first time using a combination of phytopathological, molecular genetic (based on analysis of the ITS1 and ITS2 regions of the internal transcribed spacer), morphological, and immunological approaches. The goal of this study was to identify the *Cladosporium* species that causes tomato leaf mold in greenhouses of the Moscow Province, based on morphological and molecular characteristics. The experimental isolation, identification, and virulence study of *C. sphaerospermum* were conducted from 2023 to 2025 at the Federal Research Center for Vegetable Growing (FSBSI FSVC, VNISSOK, Odintsovsky District, Moscow Province), the All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (Moscow), and the Peoples' Friendship University of Russia (Moscow). Tomato plants at the cropping maturity stage with symptoms of leaf mold were collected in greenhouses (Moscow Province). For fungal isolation, at least five plants with initial

leaf mold symptoms were collected from ten cultivars and breeding lines. Micro- and macromorphological characteristics were assessed by culturing the fungus on Czapek-Dox agar (HiMedia Laboratories, India), PDA, PDA_{net} (PDA supplemented with a decoction of stinging nettle *Urtica dioica* L. leaves), and PDA_{tom} (PDA supplemented with a decoction of tomato *Solanum lycopersicum* L. leaves). Total DNA was isolated from 7- to 12-day-old fungal mycelium using the K-Sorb kit (Synthol, Russia) according to the manufacturer's protocol. For species identification, the nucleotide sequence of the internal transcribed spacer amplified with primers ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') was used. Pathogenic properties of *C. sphaerospermum* were studied on 10 tomato lines bred at the FSBSI FSVC. The tomato line VS-IM-193-19 (L-15/25) for growing in greenhouses bred at the FSBSI FSVC was used as the standard of resistance (St R) to leaf mold, and the line VS-IM-15-19 (L-16/25) was used as the standard of susceptibility (St S). Leaf mold development on tomato leaves was assessed 14 and 21 days after inoculation. Based on the dynamic assessment, the average damage index (I), the degree of disease development (R, %), and the degree of disease spread (P, %) were calculated. In this study, a new species causing leaf mold of tomatoes, *C. sphaerospermum*, was isolated and identified for the first time in Russian greenhouses using phylogenetic analysis and morphological characteristics. The original and reisolated fungal isolates were identical in the ITS locus sequence and all morphological characteristics studied. Using the NCBI database, the species was determined to be *C. sphaerospermum* with 100 % homology, while homology to *C. fulvum* was less than 86 %. PDA_{tom} medium was shown to be the most preferable for cultivating *C. sphaerospermum*, as the fungus demonstrated the highest linear mycelial growth rate ($V_R = 7.0$ mm/day) on it. A high degree of agreement was found between the differentiation of tomato lines by resistance during field and laboratory assessments: from highly resistant (I = 0.3 points) to highly susceptible (I = 3.0 points), demonstrating the significant ($p \leq 0.05$) high aggressiveness and broad virulence of *C. sphaerospermum* against tomato plants. The obtained data will have practical value for developing measures to combat the causative agent of tomato leaf mold.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, tomato, cladosporiosis, *Cladosporium sphaerospermum*.