

УДК 634.75:631.527:632.482.128

СЕЛЕКЦИЯ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТРАКНОЗУ

Т. Н. КАМЕДЬКО, Р. М. ПУГАЧЕВ

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»
г. Горки, Беларусь, 213407

(Поступила в редакцию 10.04.2018)

В ходе научно-исследовательской работы «Видоспецифический состав и патогенность эпифитативно опасных возбудителей болезней земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch.) на территории Беларуси» договор с БРФФИ № Б14-120 от 23.05.2014 из пораженных органов земляники (листья, ягоды) был выделен и введен в культуру гриб *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, вызывающий антракноз. О развитии этого патогена земляники в научных работах белорусских исследователей ранее не упоминалось. Однако, О. В. Скрипка, заведующий лабораторией микологии ФГБУ «ВНИИКР», в своей работе утверждает, что из Беларуси в Воронежскую область с посадочным материалом был завезен патоген, вызывающий антракноз земляники садовой. Во многих странах Европы, Азии, Африки, Америки антракноз является широко распространенным грибным заболеванием. В странах Европейского союза, в Израиле и Чили этот возбудитель включен в карантинный список.

Представлены результаты селекционного обора на устойчивость к антракнозу сеянцев земляники садовой на раннем этапе развития с использованием искусственного заражения патогеном *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds.

Проанализированы результаты инокуляции семян способом опрыскивания споровой и 2–3 настоящих листьев методом обмакивания корневой системы в суспензию спор при пикировке. Отмечен способ искусственного заражения семенного материала, при котором идентифицируется большое количество восприимчивых сеянцев. Предложена схема очередности инокуляции антракнозом растений земляники садовой на раннем этапе развития.

Ключевые слова: земляника садовая, антракноз, искусственное заражение.

In the course of research work "The species-specific composition and pathogenicity of epiphytically-dangerous pathogens of wild strawberry diseases (*Fragaria × ananassa* Duch.) in Belarus", according to the contract with Belarusian Republican Foundation of Fundamental Research No. B14-120 dated May 23, 2014, from the affected strawberry organs (leaves, berries) we isolated and introduced into the culture the fungus *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, which causes anthracnose. The development of this strawberries pathogen has not been mentioned in scientific works of Belarusian researchers. However, O.V. Skripka, the head of mycology laboratory of Federal State Budget Establishment "ALL-RUSSIA PLANT QUARANTINE CENTER", in his work asserts that from Belarus to Voronezh region with planting material a pathogen was introduced that causes anthracnose of garden strawberry. In many countries of Europe, Asia, Africa, and America, anthracnose is a widespread fungal disease. In the countries of European Union, in Israel and Chile, this agent is included in the quarantine list.

We have presented results of selection test for the resistance to anthracnose of garden strawberry seedlings at an early stage of development using artificial infection with the pathogen *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds.

We have analyzed results of seed inoculation by spraying with spore suspension and seedlings inoculation in phases of 1-2 true leaves by spraying with a spore suspension and 2-3 true leaves by dipping the root system into spore suspension during picking. We have noted the method of artificial infection of seed material, in which a large number of susceptible seedlings are identified. We have proposed a scheme for inoculation with anthracnose of plants of garden strawberry at an early stage of development.

Key words: garden strawberry, anthracnose, artificial infection.

Введение

Грибной патоген *Colletotrichum acutatum* обладает высокой вредоносностью. Антракнозом поражаются все органы растений земляники. Гифы гриба распространяются внутриклеточно, уничтожая при этом клетки или участки тканей растений. Инфекция может проникать через зараженный посадочный материал, орудиями труда, с транспортом, воздушно-капельным путем, насекомыми и др. Большой вред эта болезнь оказывает в теплицах и пленочных укрытиях, на плодородных или богатых азотом почвах, в загущенных, плохо проветриваемых посадках. Все это указывает на актуальность работы в направлении получения устойчивого к антракнозу селекционного материала, который станет ресурсом для селекции на иммунитет [1–5].

В рамках научно-исследовательской работы «Разработать эффективный метод отбора устойчивых к болезням генотипов земляники садовой на ранних этапах развития растений», согласно договору с БРФФИ № Б16М-124 от 20.05.2016, была разработана схема селекционного процесса, основанная на раннем отборе устойчивого к антракнозу селекционного материала, который предусматривает искусственное заражение патогеном семян и сеянцев земляники садовой.

Использование инокуляции исходного материала позволит ограничить количество семян, что упростит процесс оценки по хозяйственно ценным признакам, сократит затраты на агротехнические мероприятия, соответственно ускорит процесс внедрения новых устойчивых форм в производство.

Цель исследований – выявить наиболее эффективные методы заражения и оценки гибридных семян земляники для ранней диагностики устойчивости к антракнозу.

Основная часть

Объектами исследований служили фитопатогенный гриб *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds и гибридный материал земляники садовой, полученный от свободного опыления выносливого, но не стабильно устойчивого сорта Хоней и восприимчивого сорта Кимберли. Опыт проводился в 2-кратной повторности, на каждый вариант обработки было использовано по 50 семян и гибридных семян каждого сорта. Искусственное заражение проводили по следующей схеме (табл. 1).

Таблица 1. Схема искусственного заражения селекционного материала земляники садовой патогенным грибом *Colletotrichum acutatum*

Объект обработки	Вариант обработки
1. Семена	Опрыскивание семян споровой суспензией патогена + выдерживание во влажной камере (24 ч) + посев
2. Сеянцы	а) Инокуляция семян в фазу 1–2 настоящих листа опрыскиванием суспензией спор
	б) Инокуляция корневой системы сеянцев при пикировке путем обмакивания корней в спорую суспензию

Исследования проводились в 2016–2017 гг. на кафедре плодовоовощеводства УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».

Патоген был размножен на картофельно-глюкозном агаре [1]. Стерилизацию питательной среды проводили, руководствуясь рекомендациями Н. А. Наумова в его работе «Методы микологических и фитопатологических исследований» [6]. Скарификацию семян проводили концентрированной серной кислотой в соответствии с указаниями Ю. Б. Архипова [7]. Опыт по искусственному заражению семян и гибридных сеянцев земляники садовой осуществляли, руководствуясь методическими указаниями по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов под редакцией М. К. Хохрякова, методическими указаниями предложенным В. Д. Поликсиной, А. К. Храмовым, С. Г. Пискуном и научным изданием *Basic Plant Pathology Methods* [8, 9, 10].

Перед началом эксперимента почва и посевной материал проходили стерилизацию, инфекционный материал проверяли на жизнеспособность и патогенность. Почву стерилизовали путем автоклавирования в течение часа при давлении 1 атм., семена стерилизовались в процессе скарификации концентрированной серной кислотой. Жизнеспособность оценивали по прорастанию спор (конидий) патогена. Спорую суспензию наносили каплями на предметные стекла и помещали их в чашки Петри для создания условий влажной камеры. Чашки ставили в термостат, где поддерживалась температура 26–28°C. Число проросших спор, подсчитывали через 6–8 часов в поле зрения микроскопа не менее чем в 10-ти каплях. Проросшими считаются споры, у которых длина ростовых трубок превышает длину спор. Для заражения растений используют инфекционный материал, в котором жизнеспособность спор составляет не менее 80 % [11]. Патогенность проверяли путем инокуляции тех органов растения, из которых патоген был выделен. Патогенный микроорганизм (*Colletotrichum acutatum*) выращивали на питательной среде картофельно-глюкозном агаре в термостате при температуре 23–25 °C в течение 10–15 суток, для использования в качестве инокулята. Оптимальная концентрация спор в суспензии для заражения земляники *C. acutatum* – (1×10^5) кон/мл [12]. Растения земляники изолировали, опрыскивали суспензией спор патогена и в течение 15 дней выдерживали под полиэтиленовой пленкой для поддержания высокой влажности. В контрольном варианте растения опрыскивали водой. В случае получения исходных симптомов (на листьях пятна фиолетового оттенка, неопределенной формы; растения с признаками увядания, на черешках и стеблях вдавленные темные язвочки) из пораженных органов выделяли искомым патоген с целью использования его в опыте по инокуляции растений земляники на раннем этапе развития. При инокуляции семенного материала – семена земляники, прошедшие предварительную скарификацию, распределяли тонким слоем на листе плотной бумаги и опрыскивали суспензией спор, которая готовилась с двухнедельной культуры гриба плотностью ($\times 10^5$) кон/мл. [13, 14, 15], до полного увлажнения, затем выдерживали их в условиях влажной камеры 24 ч, подсушивали (1 ч) и высевали [8].

При заражении сеянцев в фазу 1–2 настоящих листа (Вариант 2. а) – сеянцы опрыскивали споровой суспензией, приготовление суспензии описано выше. Перед инокуляцией сеянцы поливали до полного увлажнения субстрата и опрыскивали суспензией спор (20 мл суспензии на 0,5 л субстрата). В течение двух недель ящики с сеянцами находились под пленкой для поддержания

высокой влажности и предотвращения пересыхания субстрата. По истечению инкубационного периода фитопатогенных грибов (15 дней), проводили учеты [16].

Заражение корневой системы при пикировке (Вариант 2. б) путем обмакивания корней в спорую суспензию патогена проводили в фазе 2–3 настоящих листьев. Корни отмывали от субстрата, погружали их на 2–3 минуты в спорую суспензию, затем растения высаживали в кассеты. В контрольном варианте сеянцы погружали в воду. После пикировки через 4–5 дней учитывалась приживаемость, а через 2–3 недели поражение болезнью.

Исходя из того, что гриб *Colletotrichum acutatum* поражает все органы растения земляники, в том числе и корневую систему, что приводит к внезапному увяданию и гибели растений, заражая семена, предполагалось получить симптомы увядания сеянцев, что позволит на ранних этапах провести селекционный отбор ценных генотипов (рис. 1).

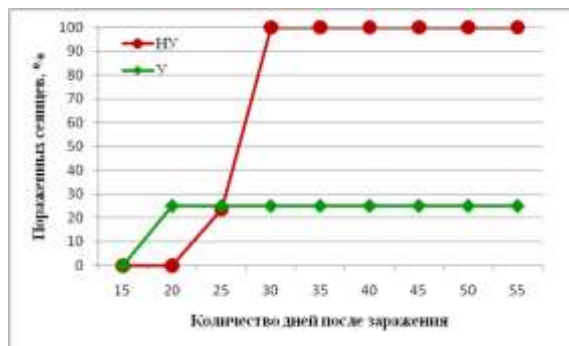


Рис. 1. Уровень поражения гибридных сеянцев земляники садовой при заражении семян путем опрыскивания споровой суспензией: НУ – гибриды неустойчивого сорта Кимберли; У – гибриды устойчивого сорта Хоней

После инокуляции семян опрыскиванием споровой суспензией патогена симптомы болезни наблюдались у 100 % сеянцев, полученных от свободного опыления восприимчивого сорта Кимберли, и у 25,0 % сеянцев, полученных от свободного опыления устойчивого сорта Хоней. В естественных условиях источником заражения антракнозом являются конидии патогена, которые разносятся ветром, дождем, насекомыми, легко прорастают и заражают здоровые листья земляники, проникая в их ткани через устьица или путем пробурывания эпидермы [17, 18]. На этом свойстве конидии основан способ искусственного заражения путем опрыскивания суспензией спор патогена.

При инокуляции сеянцев опрыскиванием суспензией спор *Colletotrichum acutatum* в фазу 1–2 настоящих листа, количество пораженных сеянцев восприимчивого к антракнозу сорта (Кимберли) составило 37,5 %, число пораженных сеянцев устойчивого сорта (Хоней) было на уровне 32,1 % (рис. 2).



Рис. 2. Уровень поражения гибридных сеянцев земляники садовой в фазе 1–2 настоящих листа при опрыскивании суспензией спор *C. Acutatum*

Одним из лучших способов заражения земляники патогенами, поражающими корневую систему, считается обмакивание корней в суспензию спор при пикировке, так как пересадка связана с повреждением корневой системы, что облегчает попадание инфекции в проводящую систему растения.

В результате искусственного заражения сеянцев земляники садовой путем обмакивания корневой системы в суспензию спор патогена во время пикировки, симптомы болезни наблюдались у 33,3 % сеянцев, полученных от свободного опыления восприимчивого сорта и 32,1 % сеянцев, полученных от свободного опыления устойчивого сорта (рис. 3).

Анализируя результаты искусственного заражения антракнозом растений земляники садовой на раннем этапе развития, можно отметить, что наиболее эффективно инокуляцию проводить на стадии

семенного развития. В этом случае все сеянцы, полученные от свободного опыления восприимчивого сорта Кимберли, были с симптомами болезни.

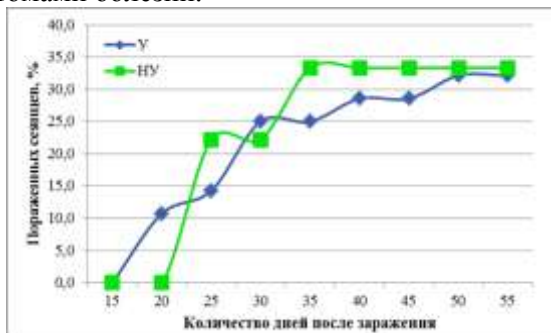


Рис. 3. Уровень поражения антракнозом гибридных сеянцев земляники садовой при обмакивании корневой системы в суспензию спор *S. acutatum*

У сеянцев, полученных от свободного опыления устойчивого сорта Хоней, количество пораженных растений было на уровне 25,0 %, что можно объяснить гибридным происхождением семенного материала (табл. 2).

Таблица 2. Эффективность различных способов заражения антракнозом селекционного материала земляники садовой

Способ заражения	Материнский сорт	Процент сеянцев погибших от повреждений антракнозом, %
1. Опрыскивание семян споровой суспензией патогена + выдерживание во влажной камере (24 ч) + посев	Кимберли	100,0
	Хоней	25,0
2.а) Инокуляция сеянцев в фазу 1–2 настоящих листа опрыскиванием суспензией спор	Кимберли	37,5
	Хоней	32,1
3.б) Инокуляция корневой системы сеянцев при пикировке путем обмакивания корней в споровую суспензию	Кимберли	33,3
	Хоней	32,1

При сравнении количества пораженных антракнозом гибридных сеянцев, полученных от свободного опыления сорта Кимберли с количеством пораженных гибридных сеянцев от сорта Хоней, во всех вариантах опыта, можно отметить, что сорт Хоней является ценным источником признаков в селекции земляники на устойчивость к антракнозу.

Полученные результаты не исключают необходимости в повторных заражениях. При однократной инокуляции есть вероятность непопадания инфекции на растение. В результате повторных заражений возможность получить устойчивый селекционный материал увеличивается. Таким образом, при искусственном заражении растений земляники садовой антракнозом на раннем этапе развития рекомендуется инокулировать семенной материал, затем проводить повторное заражение сеянцев вначале в фазу 1–2 настоящих листа, методом опрыскивания суспензией спор патогена, затем инокуляцию корневой системы при пикировке в фазу 2–3 настоящих листьев.

Заключение

Искусственное заражение антракнозом сеянцев земляники садовой наиболее эффективно работает на стадии семенного развития (100 % пораженных антракнозом сеянцев восприимчивого сорта, 25 % пораженных сеянцев устойчивого сорта). Однако это не исключает повторное заражение, которое увеличивает вероятность получения в конечном итоге устойчивого селекционного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пугачев, Р. М. Морфологические особенности фитопатогенных грибов земляники садовой на различных питательных средах [Текст] / Р. М. Пугачев, И. Г. Пугачева, В. Н. Купцов, Т. Н. Камедько // Земледелие и защита растений = Agriculture and Plant Protection : научно-практический журнал. – 2015. – № 6(103). – С. 30–33.
2. Пугачев, Р. М. Эффективность спороношения фитопатогенных грибов земляники садовой при культивировании на питательных средах / Р. М. Пугачёв, И. Г. Пугачева, Т. Н. Камедько, М. В. Сандалова // Інноваційний розвиток АПК України: проблеми та їх вирішення : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої пам'яті декана агро-номічного факультету М. Ф. Рибача (м. Житомир, 19–20 листоп. 2015 р.). – Житомир: ЖНАЕУ, 2015. – С. 187–188.
3. Скрипка, О. В. Антракноз *Colletotrichum acutatum* Simmonds - опасное заболевание земляники / О. В. Скрипка, И. П. Дудченко, М. Б. Копина, С. В. Никифоров // Карантин растений наука и практика 2014. 4/10 С. 28–30.
4. James, V. Sinclair, Onkar Dev Dhingra. Basic Plant Pathology Methods / CRC Press 1995 – 448 Pages.
5. Masny, A. Field performance of selected strawberry genotypes collected at the Research Institute of Pomology and Floriculture (RIPF), Skierniewice, Poland / A. Masny, E. Zurawicz // Acta Horticulturae. – 2004. – № 649. – P. 147–150.
6. Наумов, Н. А. Методы микологических и фитопатологических исследований / Н. А. Наумов – М., 1937. – 272 с.
7. Архипов, Ю. Б. Отбор и предпосевная подготовка семян при селекции земляники: автореф. дис.... канд. с.-х. наук: 06-534 – селекция и семеноводство плодовых культур / Ю. Б. Архипов; – Л., 1969. – 17 с.

8. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов / ВИЗР, под ред. М. К. Хохрякова: ВИЗР, 1974. – 69 с.
9. Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4 курса дневного отделения специальности «G 31 01 01 – Биология» / Авт.-сост. В.Д. Поликсенова, А. К. Храмцов, С.Г. Пискун. – Мн.: БГУ, 2004. – 36 с.
10. James, B. Sinclair, Onkar Dev Dhingra. Basic Plant Pathology Methods / CRC Press 1995 - 448 Pages.
11. Методы ускоренной селекции моркови столовой на комплексную устойчивость к грибным болезням: метод. указ. / ВНИИО; сост. В. И. Леунов, А. Н. Ховрин, Т. А. Терешонкова и др. – М., 2011. – 56 с.
12. Chandler, K. C. Resistance of selected strawberry cultivars to Anthracnose fruit rot and Botrytis fruit rot / K. C. Chandler, C. J. Mertely, N. Peres // *Acta Horticulturae*. – 2006. – №708. – P. 123 – 126.
13. Masny, A. Field performance of selected strawberry genotypes collected at the Research Institute of Pomology and Floriculture (RIPF), Skierniewice, Poland / A. Masny, E. Zurawicz // *Acta Horticulturae*. – 2004. – № 649. – P. 147–150.
14. Namai, K. Resistance to anthracnose is decreased by tissue culture but increased with longer acclimation in the resistant strawberry cultivar // K. Namai, Y. Matsushima, M. Morishima, M. Amagai, T. Natsuaki // *Journal of General Plant Pathology*. – 2013. – № 79(6). – P. 402–411.
15. Koike, T. S. Recent developments on strawberry plant collapse problems in California caused by *Fusarium* and *Macrophomina* / T. S. Koike, R. T. Gordon, O. Daugovish, H. Ajwa, M. Bolda, K. Subbarao // *International Journal of Fruit Science*. – 2013. – №13 – P. 76–83.
16. Żebrowska, J. I. Efficacy of resistance selection to *Verticillium* wilt in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) tissue culture / J. I. Żebrowska // *Acta agrobotanica / Soc. botanicorum poloniae*. – Lublin. – 2011. – № 64 (3). – P. 3–11.
17. Говорова, Г. В. Грибные болезни земляники: монография / Г. В. Говорова, Д. Н. Говоров. – М.: ВСТИСП, 2010. – С. 84–88.
18. Пидопличко, Н. М. Грибы-паразиты культурных растений: определитель: в 3 т. / Н. М. Пидопличко; Акад. наук Укр.ССР; Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного. – Киев: Наукова думка, 1977. – Т. 1: Грибы совершенные. – 296 с.; Пидопличко, Н. М. Грибы-паразиты культурных растений / Н. М. Пидопличко; Акад. наук Укр.ССР; Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного. – Киев: Наукова думка, 1977. – Т. 2: Грибы несовершенные. – 300 с.; Пидопличко, Н. М. Грибы-паразиты культурных растений / Н. М. Пидопличко; Акад. наук Укр.ССР; Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного – Киев: Наукова думка, 1978. – Т.3. Пикнидиальные грибы. – 231 с.