

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ИСКУССТВЕННОГО
ЗАРАЖЕНИЯ СЕМЯН ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ АНТРАКНОЗОМ
(*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds)**

Т. Н. КАМЕДЬКО

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

(Поступила в редакцию 29.06.2017)

Земляника садовая поражается многими грибными болезнями, по причине которых в отдельные годы урожайность этой культуры может снизиться до 94%. В 60-х гг. в нашей республике было изучено 4 грибные болезни (серая гниль, белая, бурая и угловатая пятнистости) земляники садовой [1]. В настоящее время патогенный состав разнообразнее, что связано с расширением площадей и ростом интереса к посадочному материалу иностранного производства. Представлены результаты исследований по искусственному заражению семенного материала земляники садовой фитопатогенным грибом *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. Проанализировано четыре варианта заражения семян - заражение путем посева в инфицированную почву, заражение путем опрыскивания суспензией спор патогена, заражение пророщенных семян путем опрыскивания суспензией спор патогена, заражение семян путем проращивания их на инокуле. Выявлены более эффективные и менее трудоемкие способы инокуляции. Лучшими вариантами заражения семян земляники садовой антракнозом стали заражение путем посева в инфицированную почву и заражение путем опрыскивания суспензией спор патогена.

Ключевые слова: земляника садовая, грибная болезнь, урожайность, патогенный состав, семенной материал.

Garden strawberry is affected by many fungal diseases, due to which in some years the yield of this crop can drop to 94%. In the 1960 s, four fungal diseases of garden strawberry (gray rot, white, brown and angular leaf spot) were studied in our republic. Currently, the pathogenic composition is more diverse, which is connected with the expansion of areas and the growing interest in planting material of foreign production. We have presented results of research into artificial contamination of the seed material of garden strawberry with phytopathogenic fungus *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. We have analyzed four variants of seed contamination: infection by seeding into infected soil, contamination by spraying with a pathogen spore suspension, infecting germinated seeds by spraying with a pathogen spore suspension, infecting seeds by germinating them on an inoculum. We have established more effective and less labor-intensive methods of inoculation. The best variants of contamination of garden strawberry seeds with anthracnose were contamination by seeding into infected soil and contamination by spraying with a pathogen spore suspension.

Key words: garden strawberry, fungal disease, yield, pathogenic composition, seed material.

Введение

В ходе научных исследований, проведенных в Беларуси по договору с БРФФИ № Б14-120 от 23.05.2014 г., из пораженных органов земляники (листья, ягоды) был выделен грибной патоген *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, вызывающий антракноз [5, 6]. О. В. Скрипка, заведующая лабораторией микологии ФГБУ «ВНИИКР» в своей работе [7] также утверждает, что из Беларуси в Воронежскую область с посадочным материалом был завезен патоген, вызывающий антракноз земляники садовой. В связи с этим можно утверждать о том, что единично, вероятнее всего, эта болезнь у нас в стране встречается. С расширением площадей под земляникой, существует большая вероятность массового распространения патогена. Антракнозом поражаются практически все органы растений земляники. В Европе гриб *C. acutatum* в связи с высокой вредоносностью включен в карантинный список стран Европейского союза. Кроме того, патоген является карантинным для Израиля и Чили [7]. Это доказывает необходимость работы в направлении получения устойчивого к антракнозу селекционного материала, который станет ресурсом для селекции на иммунитет.

Оптимизировать селекционные исследования, можно путем использования в селекционном процессе искусственное заражение, с помощью которого, работа по созданию устойчивых генотипов сокращается на несколько лет. Результаты исследований показали, что отобрать устойчивые к антракнозу образцы можно уже на стадии проростков, заражая семена земляники различными способами. Это дает как непосредственный экономический эффект, связанный с сокращением числа неустойчивых растений от нескольких тысяч до нескольких сотен уже до пикировки, так и дополнительные преимущества, связанные с сокращением площадей, занятых гибридными насаждениями, что соответственно сокращает агротехнические затраты, облегчает процесс оценки на хозяйственно ценные признаки небольшого числа растений, сокращает сроки внедрения новых устойчивых форм в производство.

Цель исследований – разработать и усовершенствовать методы заражения антракнозом семенного материала земляники садовой для отбора устойчивых форм на ранних этапах развития.

Основная часть

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

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

Объект обработки	Вариант обработки
Почва	Полив почвы споровой суспензией патогена + посев в инфицированную почву
Семена	Опрыскивание споровой суспензией патогена + выдерживание во влажной камере (24 ч) + посев
	Проращивание семян во влажной камере + опрыскивание суспензией спор + посев
	Проращивание семян во влажной камере на инокулюме + посев

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

Патоген размножали на картофельно-глюкозном агаре [6]. Приготовление и стерилизацию питательной среды проводили, руководствуясь рекомендациями Н. А. Наумова в его работе «Методы микологических и фитопатологических исследований» [8]. Перед инокуляцией проводили скарификацию семян концентрированной серной кислотой в соответствии с указаниями Ю. Б. Архипова [9]. Опыт по искусственному заражению семян осуществляли, руководствуясь методическими указаниями по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов под редакцией М. К. Хохрякова, методическими указаниями предложенным В. Д. Поликсеновой, А. К. Храмовым, С. Г. Пискуном и научным изданием Basic Plant Pathology Methods [10, 11, 12].

Важным условием перед началом эксперимента являлась стерилизация почвы, посевного материала и проверка жизнеспособности инфекционного материала. 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. Споровую 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 °С. 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 % [13].

Первый вариант опыта – заражение семян через посев в инфицированную почву – почву опрыскивали споровой суспензией патогена, которая готовилась с двухнедельной культуры гриба плотностью ($\times 10^5$) кон/мл. [14–16]. За два дня до посева субстрат проливали водой до полного увлажнения, затем опрыскивали суспензией спор (20 мл суспензии на 0,5 л субстрата), хорошо перемешивали, чтобы инфекция равномерно распределилась по почве, и высевали семена [17].

Второй вариант опыта – заражение семян путем опрыскивания споровой суспензией патогена – семена земляники, прошедшие предварительную скарификацию концентрированной серной кислотой, распределяли тонким слоем на листе плотной бумаги и опрыскивали суспензией спор до полного увлажнения, затем выдерживали их в условиях влажной камеры 24 ч, подсушивали (1 ч) и высевали [10].

Третий вариант опыта – заражение пророщенных семян споровой суспензией патогена [12] – семена земляники, прошедшие предварительную скарификацию концентрированной серной кислотой, распределяли тонким слоем в чашках Петри, дно и крышки которых были усиланы смоченной фильтровальной бумагой (влажная камера). Чашки Петри выдер-

живали в термостате при температуре 25 °С. По мере подсыхания, бумагу смачивали стерильной водой. В условиях влажной камеры семена находились не более 7 дней. За это время оболочка семени набухает и растрескивается, в отдельных случаях начинает появляться корешок зародыша семени. На 6–7 день семена опрыскивали суспензией спор патогена и через 24 ч высевали.

Четвертый вариант опыта – заражение семян через проращивание их на инокулюме во влажной камере [12] – семена земляники, прошедшие предварительную скарификацию концентрированной серной кислотой, распределяли тонким слоем в чашках Петри, дно и крышки которых были усиланы фильтровальной бумагой. Фильтровальная бумага на дне чашки смачивалась суспензией спор патогена, фильтровальная бумага на крышке смачивалась стерильной водой (влажная камера). Чашки Петри выдерживали в термостате при температуре 25 °С. По мере подсыхания, бумагу смачивали стерильной водой. На 6–7 день семена высевали.

В течение двух недель посевные ящики находились под пленкой для поддержания высокой влажности и предотвращения пересыхания субстрата. По истечении инкубационного периода фитопатогенных грибов (15 дней), проводили учеты [18]. Исходя из того, что гриб *Colletotrichum acutatum* поражает практически все органы растения земляники, в том числе и корневую систему, что приводит к внезапному увяданию и гибели растений, заражая семена, мы предполагали получить симптомы увядания сеянцев. Это позволит на ранних этапах провести селекционный отбор ценных генотипов.

Источником первичной инфекции является мицелий или конидий как на растительных остатках, в пораженных побегах, тканях растений земляники, сорняках так и в почве. Поэтому первым вариантом заражения семян антракнозом был посев в инфицированную почву. В результате антракнозом было поражено 93,8 % сеянцев, полученных от свободного опыления восприимчивого сорта Кимберли и 62,5 % гибридных сеянцев, полученных от свободного опыления устойчивого сорта Хоней (рис. 1). Второй вариант – заражение семян опрыскиванием споровой суспензией патогена, оказался эффективнее первого. У сеянцев восприимчивого сорта от антракноза погибло 100,0% растений, у сеянцев устойчивого сорта – 25,0 % (рис. 2).

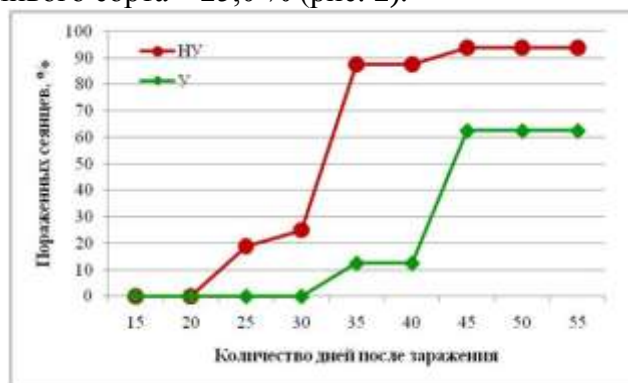


Рис. 1. Уровень поражения антракнозом гибридных сеянцев земляники садовой при заражении семян через посев в инфицированную почву:
НУ – гибриды неустойчивого сорта Кимберли;
У – гибриды устойчивого сорта Хоней

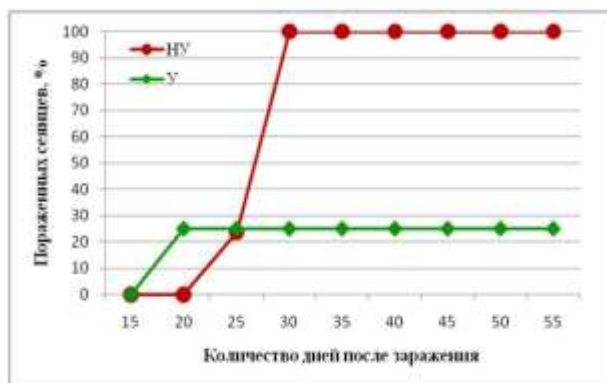


Рис. 2. Уровень поражения гибридных сеянцев земляники садовой при заражении семян путем опрыскивания споровой суспензией

В третьем варианте – заражение пророщенных во влажной камере семян путем опрыскивания их суспензией спор патогена – у сеянцев восприимчивого сорта симптомы болезни наблюдались у 87,5 % растений, у сеянцев устойчивого сорта у 38,9 % растений (рис. 3). Меньшее количество пораженных сеянцев восприимчивого сорта в этом варианте по сравнению со вторым вариантом, можно объяснить использованием в опытах гибридных сеянцев от свободного опыления, среди которых в результате расщепления признаков, вероятно, оказались устойчивые гибридные сеянцы. При заражении семян через проращивание их на инокулюме во влажной камере, все гибридные сеянцы от восприимчиво-

го сорта были поражены антракнозом, у сеянцев от устойчивого сорта признаки болезни наблюдались у 33,3 % растений (рис. 4).

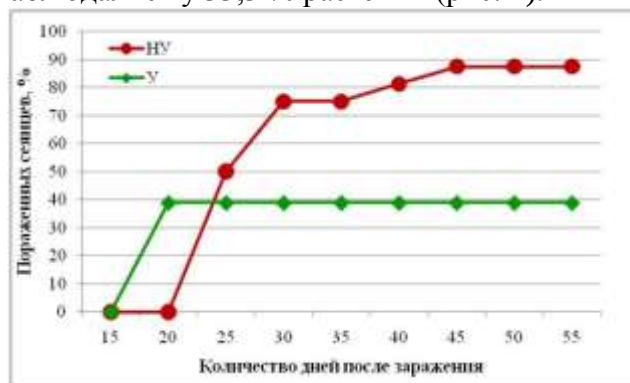


Рис. 3. Уровень поражения гибридных сеянцев земляники садовой при заражении пророщенных во влажной камере семян путем опрыскивания споровой суспензией

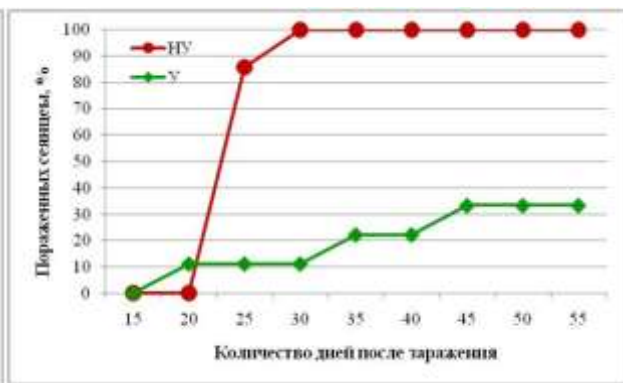


Рис. 4. Уровень поражения гибридных сеянцев земляники садовой при заражении пророщенных на инокулеуме во влажной камере семян

Анализируя результаты заражения различными способами семян земляники садовой антракнозом, можно отметить, что по своей эффективности они оказались относительно равнозначными. Разница в количестве пораженных сеянцев в различных вариантах была от 6 до 12 %. Что касается трудозатрат и простоты постановки опыта, то преимущество необходимо отдать заражению семян через посев в инфицированную почву и заражению семян путем опрыскивания их суспензией спор патогена (таб.).

Эффективность различных способов заражения антракнозом семенного материала земляники садовой

Способ заражения	Материнский сорт	Процент сеянцев погибших от поврежденных антракнозом, %
1. Полив почвы споровой суспензией патогена + посев в инфицированную почву	Кимберли	93,8
	Хоней	62,5
2. Опрыскивание семян споровой суспензией патогена + выдерживание во влажной камере (24 ч) + посев	Кимберли	100,0
	Хоней	25,0
3. Проращивание семян во влажной камере + опрыскивание суспензией спор + посев	Кимберли	87,5
	Хоней	38,9
4. Проращивание семян во влажной камере на инокулеуме + посев	Кимберли	100,0
	Хоней	33,3

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

Заключение

Лучшими способами инокуляции семенного материала земляники садовой фитопатогенным грибом *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, вызывающим антракноз, является заражение семян путем посева в инфицированную почву и заражение семян путем опрыскивания суспензией спор патогена. Преимущество этих методов инокуляции семян в простоте их выполнения и в эффективности использования (93,8 и 100,0 % пораженных антракнозом сеянцев восприимчивого сорта соответственно).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гришанович, А.К. Болезни земляники в условиях БССР и меры борьбы с ними: автореф. дис. канд. с.-х. наук: 06.540 – фитопатология / А. К. Гришанович ; МСХ БССР, Белорус. НИИ земледелия. – Минск: [б. и.], 1971. – 22 с. – Библиогр.: с. 22 (9 назв.). – Б. ц.
2. Натальина, О.Б. Болезни ягодников / О. Б. Натальина – М.: Изд-во с.-х. лит., журн. и плакатов, 1963. – 272 с.
3. Программа работ селекционера Научно-исследовательского института садоводства Сибири имени М. А. Лисавенко до 2030 г.: выпуск 3 / Россельхозакадемия. ГНУ НИИСС Россельхозакадемии. – Новосибирск, 2011. – 336 с.
4. Методические указания по борьбе с гнилями ягод земляники / составители О. З. Метлицкий, И. А. Ундрцова, Н. А. Холод. – М.: ВСТИСП, 2003. – 73 с.
5. 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.

6. Пугачев, Р.М. Эффективность спороношения фитопатогенных грибов земляники садовой при культивировании на питательных средах / Р. М. Пугачев, 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. Рибак (м. Житомир, 19–20 листоп. 2015 р.). – Житомир: ЖНАЕУ, 2015 . – С. 187–188.
7. 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.
8. Наумов, Н. А. М.: Сель- 272 с.
9. 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; - Ленинград, 1969. – 17 с.
10. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов / ВИЗР, под ред. М. К. Хохрякова: ВИЗР, 1974. – 69 с.
11. 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.
12. James B. Sinclair, Onkar Dev Dhingra. Basic Plant Pathology Methods / CRC Press 1995. – P. 448.
13. 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.
14. Chandler, K. C. Resistance of selected strawberry cultivars to Anthracnose fruit rot and Botrytis fruit rot / K.C. Chan – 126.
15. 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.
16. 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 Pa- P. 402–411.
17. Koike, T.S. Recent developments on strawberry plant collapse problems in California caused by *Fusarium* and *Macrophomina* / T. S. Koike, R. T. Gordon, O. Dugovich, H. Ajwa, M. Bolda, K. Subbarao // International Journal of Fruit Science. – 2013. – №13. – P. 76–83.
18. 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.