

УДК 634.23:632.4

## ИСКУССТВЕННОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ВИШНИ IN VITRO ВОЗБУДИТЕЛЕМ КОККОМИКОЗА

**А.А. Змушко, Н.Н. Волосевич**

РУП «Институт плодоводства»,

ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,

e-mail: belhort@it.org.by

### РЕЗЮМЕ

В настоящий момент одной из важнейших задач современной селекции вишни и черешни во всем мире является создание сортов, проявляющих высокую устойчивость к коккомикозу (*Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx.). Было проведено искусственное заражение сортов и гибридов вишни от скрещивания форм с разной степенью устойчивости к коккомикозу. Полученные результаты продемонстрировали отличия в реакции чувствительных и устойчивых к коккомикозу сортов. Значения среднего балла поражения для растений подвоев Измайловский и ВСЛ-2, культивируемых in vitro и традиционными методами, при искусственном заражении возбудителем коккомикоза в концентрации спор патогена равной  $1 \cdot 10^6$  достоверно не отличались. Выявленная закономерность может быть использована для разработки метода отбора устойчивых форм вишни в культуральных условиях.

Ключевые слова: вишня, коккомикоз, искусственное заражение, *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx., Беларусь.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из наиболее вредоносных заболеваний вишни и черешни является коккомикоз [1, 2]. Возбудителем коккомикоза является грибной патоген *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx. (syn. *Coccomices hiemalis* Higg., конидиальная стадия *Cylindrosporium Hiemalis* (Higg.)). Первое упоминание о коккомикозе относится к концу 19-го века, когда это заболевание было обнаружено на территории США [3]. В Европе появление коккомикоза, или листовой пятнистости, отмечено в 1939 г. в Венгрии, откуда болезнь распространилась повсеместно, в том числе и на территорию Советского Союза в 50-х годах 20-го века [3]. Вредоносность поражения коккомикозом вишни и черешни заключается в угнетении ассимиляционной и фотосинтетической активности растений, которое проявляется в преждевременном опадении листьев. Качество плодов на пораженных деревьях значительно ухудшается: снижается содержание сухих веществ, плоды имеют более бледную окраску и мягкую консистенцию. Кроме того, у пораженных растений значительно снижается устойчивость к абиогенным неблагоприятным факторам среды, особенно зимостойкость. В настоящий момент одной из важнейших задач современной селекции вишни и черешни во всем мире является создание сортов, проявляющих высокую устойчивость к коккомикозу [2].

Однако проблемой, с которой столкнулись селекционеры на начальных этапах работы при решении данной задачи, являлось то, что в генофонде вишни (*Prunus cerasus* L., syn. *Cerasus vulgaris* Mill.) и черешни (*Prunus avium* L., syn. *Cerasus avium* Moench.) отсутствуют образцы, полностью иммунные к данному заболеванию. Основным путем

решения этой селекционной задачи представляется отдаленная гибридизация вишни домашней и черешни с дикорастущими видами вишни, многие из которых обладают иммунитетом или проявляют высокую устойчивость к коккомикозу [4-7]. При скрещивании дикие виды выступают в качестве источников генов устойчивости к патогену.

По типу наследования признака устойчивости к коккомикозу в генетике вишни выделяют два типа устойчивости: моногенную и полигенную. Моногенная устойчивость вишни к коккомикозу обусловлена наличием доминантного гена А, который был идентифицирован при проведении исследований во ВНИИГСПР (г. Мичуринск) рядом ученых [8, 9]. Этот ген был введен в генофонд вишни в результате отдаленной гибридизации с *P. taackii*. Первым донором признака устойчивости к коккомикозу был получен сорт Алмаз, который является гетерозиготным по гену А. В настоящее время существует ряд форм – носителей этого гена, которые по комплексу хозяйственно ценных признаков являются хорошим исходным материалом для селекции.

Однако при отдаленной гибридизации селекционеры зачастую сталкиваются с трудностями, такими, как раннее опадение завязи и недоразвитость зародыша, что приводит к низкому выходу гибридного потомства. Эти проблемы решаются при помощи методов биотехнологии – искусственного культивирования зародышей [2]. Эмбриокультура *in vitro* в селекции вишни позволяет преодолеть половую само- и перекрестную несовместимость при межвидовых и межродовых скрещиваниях, повысить выход гибридных регенерантов в скрещиваниях с участием отдаленных форм при селекции на устойчивость к заболеваниям и неблагоприятным факторам среды [10].

## МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Целью исследований было изучить возможность отбора устойчивых к коккомикозу форм вишни в культуральных условиях.

### **Режимы культивирования и техника проведения стерильных работ**

Культуральные и аналитические работы были проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в лабораторных условиях. Скрещивания проведены в отделе селекции плодовых культур РУП «Институт плодоводства». Условия культивирования растений *in vitro*: освещение 2,5–3 тыс. люкс, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 часов. Длительность субкультивирования 4 недели. Растения культивировали в пробирках размером 200×22 мм с объемом питательной среды 5 мл. Приготовление сред, стерилизацию вспомогательного материала проводили по общепринятой методике [11].

### **Методика получения и культивирования *in vitro* гибридных зародышей**

При получении гибридных зародышей использовали методику «Культивирование изолированных зародышей *Cerasus Mill in vitro*» [12]. Использовали следующие питательные среды: на этапе введения в культуру – среда Мурасиге-Скуга, дополненная витаминами С – в концентрации 1 мг/л, РР, В<sub>6</sub>, В<sub>1</sub> – в концентрации 0,5 мг/л, сахарозой (30 г/л) и 6-бензиладенином (0,5 мг/л); на этапе размножения *in vitro* использовали среду MS, дополненную витаминами РР, В<sub>6</sub>, В<sub>1</sub> – в концентрации 0,5 мг/л, сахарозой (30 г/л) и гормонами (6-бензиладенин, гибберелловая кислота) в различных концентрациях.

### **Методика выделения возбудителя коккомикоза**

Выделение возбудителя коккомикоза проводили путем соскоба суспензии спор скальпелем со свежих и замороженных листьев. Гриб культивировали в чашках Петри на следующих питательных средах: сусло-агар (20 г агара, 20 г сусла, рН 5–6,5, автоклавирование – 30 минут, 1 атм.) для размножения гриба, вишневый агар (300 мл виш-

нёвого экстракта, 700 мл дистиллированной воды, 20 г агара, рН 3,8–4, автоклавирование – 5 минут, 1 атм.) для образования макроконидий гриба в количестве, достаточном для искусственного заражения растений.

#### **Выделение ДНК патогена и проведение ПЦР-анализа**

Для выделения ДНК патогена и проведения ПЦР-анализа небольшое количество (2 мг) свежего мицелия соскребали с питательной среды стерильным инструментом, прокалённым и обожжённым в пламени спиртовки (микробиологической петлёй или узким скальпелем). Мицелий помещали в эппендорфы и перемешивали с 30  $\mu$ л 0,01M Tris-Cl буфером. Предварительное выделение ДНК изучаемых образцов мицелия проводили по следующей схеме: образцы подвергали кипячению при +99 °С в течение 15 мин (в ПЦР-амплификаторе), затем эппендорфы немедленно помещали на 5 мин на лёд. Далее проводили центрифугирование образцов при 10 000 g в течение 2 минут. Супернатант переносили в чистые эппендорфы и использовали для дальнейшего ПЦР-анализа в качестве ДНК-матрицы.

Также ПЦР-реакция проводилась без предварительного выделения нуклеиновой кислоты гриба. Источником ДНК-матрицы служил мицелий гриба, добавленный в реакционную смесь.

Для проведения ПЦР-анализа использовали стандартную смесь реакционных компонентов для Taq-полимеразы. Реакционная смесь содержала: 18,2  $\mu$ л milliQ воды, 2,5  $\mu$ л 10X буфера, 1,5  $\mu$ л раствора MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ л раствора dNTP, 0,5  $\mu$ л праймера B<sub>j</sub>-F, 0,5  $\mu$ л праймера B<sub>j</sub>-R, 0,3  $\mu$ л Taq-полимеразы, 1  $\mu$ л ДНК-матрицы. Общий объем реакционной смеси составлял 25  $\mu$ л.

ПЦР-реакция проводилась при следующих заданных параметрах:

1 цикл: 94 °С – 5 мин;

35 циклов: 94 °С – 1 мин, 60 °С – 1 мин, 72 °С – 1,5 мин;

1 цикл: 72 °С – 10 мин.

Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле и 0,5 X TAE-буфере. Результаты анализировали с помощью аппаратного и программного обеспечения GelDoc.

#### **Методика искусственного заражения растений вишни *in vitro***

Молодые листья (в возрасте 1-4 дня) собирали с растений в начале вегетации (конец апреля – начало мая) (*in vivo*). Также для анализа брали листья растений-регенерантов (*in vitro*). Листья располагали основной жилкой вверх на чашки Петри, содержащие 1%-ный водный агар. Для инокуляции использовали суспензию спор с различной концентрацией. Концентрацию спор измеряли при помощи камеры Горяева. Для получения суспензии спор проводили смыв с поверхности агаризованного субстрата и с поверхности поражённых листьев (хранение при -5 °С). Для инокуляции листьев, взятых с растений в культуре *in vitro*, 60 мкл суспензии спор гриба помещали в центре растительной ткани. Листья, взятые с растений, культивируемых в поле, инокулировали 2-4 каплями суспензии (60 мкл), в зависимости от размера листа. Для инокуляции листьев, взятых с растений в культуре *in vitro*, в каждую чашку Петри помещали 10 листьев, которые являлись повторностями анализа. Для инокуляции листьев растений, выращиваемых в полевых условиях, на поверхность чашки Петри помещали от 2 до 4 листьев, в зависимости от их размера. Чашки Петри герметизировали при помощи парафиллума и инкубировали в темноте в течение 48 ч при комнатной температуре. Затем чашки Петри помещали в климатическую комнату на 14 дней с фотопериодом 16/8 ч и температурой +19...+22 °С. В качестве контроля листья обрабатывали стерильной дистиллированной водой.

### Методика оценки симптомов заболевания

Проявление симптомов изучали спустя 12 суток после инокуляции. Степень заражения оценивали в баллах (от 0 до 4) по следующей шкале (Schuster, 2004 [1]): 0 – нет симптомов, зеленый лист; 1 – отдельные небольшие пигментированные поражённые участки, хлоротические или некротические точки; 2 – более крупные поражённые участки, частично с воздушным мицелием и незначительными спорующими ацервулами; 3 – от 2 до 10 спорующих ацервул или пятен, покрывающих до 25 % поверхности листа; 4 – 11 или больше спорующих ацервул, или пятен, покрывающих до 100 % листа. Растения со средним баллом поражения от 0 до 2 считали устойчивыми, а с баллом 3 и 4 – восприимчивыми к коккомикозу.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведена гибридизация с участием устойчивых сортов Новелла и Долгожданная и неустойчивого сорта Каздангская (4 комбинации) в объеме 3750 цветков. На питательную среду было посажено: 4 зародыша, полученных в результате скрещивания Долгожданная x Каздангская; 14 зародышей от скрещивания Долгожданная x Новелла; 33 зародыша от скрещивания Каздангская x Новелла и 34 от скрещивания Каздангская x Долгожданная; 21 зародыш сорта Каздангская (свободное опыление), 30 зародышей сорта Долгожданная (свободное опыление). Всего в культуру было введено 136 зародышей. Зародыши были проведены через этап стратификации и пересажены на питательную среду для пролиферации (рисунок 1).

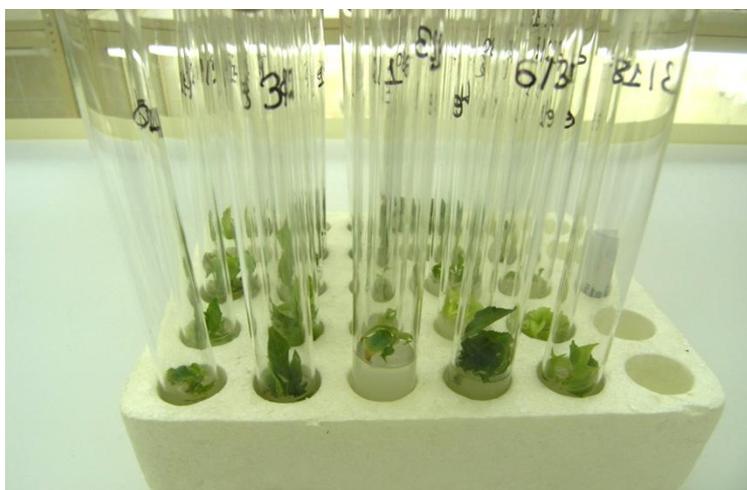


Рисунок 1 – Полученные гибриды на питательной среде для микроразмножения вишни.

Проведено выделение возбудителя коккомикоза из свежих листьев поражённых растений. Для выделения использовался сусло-агар (20 г агара, 20 г суслы, рН 5–6,5, автоклавирование – 30 минут, 1 атм.). Среда разливалась в стерильные чашки.

Было опробовано три способа стерилизации:

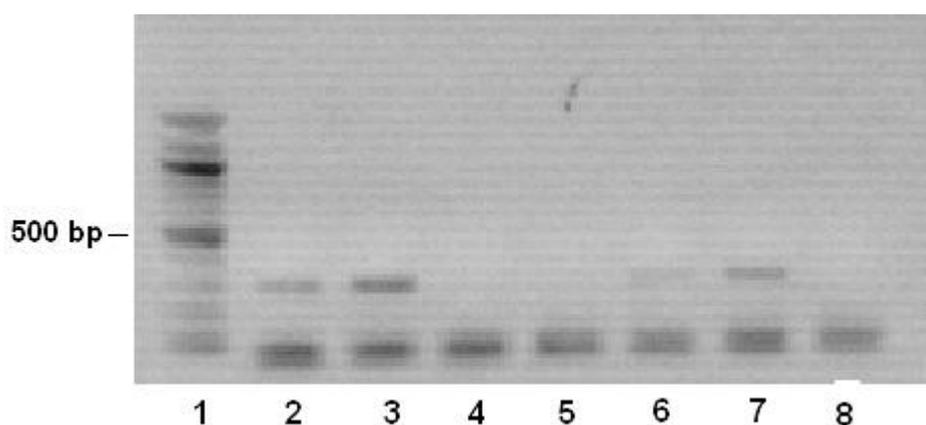
- 1) 30 секунд в 50%-ном этаноле, помещение в сосуд с проавтоклавированной водой;
- 2) 30 секунд в 70%-ном этаноле, помещение в сосуд с проавтоклавированной водой;
- 3) 20 секунд в 0,1%-ном стрептомицине, 30 секунд в 70%-ном этаноле, помещение в сосуд с проавтоклавированной водой.

Первый способ оказался непригодным, ввиду чрезвычайно высокого процента инфекции. Всего было засеяно возбудителем коккомикоза 82 чашки Петри. Из второго и третьего варианта стерилизации было отобрано по одной чашке Петри, содержащей колонии гриба, морфологически соответствующие колониям возбудителя коккомикоза, но не содержащей сапрофитной микрофлоры (рисунок 2). Полученная чистая культура микробиологической петлёй была рассажена на 23 чашки Петри с сусло-агаром.



Рисунок 2 – Колонии *Blumeriella jaarii* (Rehm) Arx. в 0 пассаже (выделенные с пораженных листьев).

Видовая принадлежность выделенного патогена была подтверждена с помощью молекулярно-генетических методов (рисунок 3).



1 – маркер 100 bp DNA Ladder (NEB); 2-4 – образцы мицелия после выделения ДНК; 5-7 – образцы мицелия без выделения ДНК; 8 – отрицательный контроль (вода вместо ДНК).

Рисунок 3 – Идентификация *Blumeriella jaarii* с применением ПЦР и видоспецифичной пары праймеров.

Можно отметить, что вес полученных фрагментов на дорожках 2, 3 и 6, 7 находился в районе 300 бр, что соответствует молекулярной массе маркерного фрагмента. Таким образом, наличие ДНК возбудителя коккомикоза можно считать подтверждённым. Также установлено, что ПЦР-диагностика гриба может быть проведена как с предварительным выделением ДНК из мицелия, так и без выделения ДНК. Следует, однако, отметить, что при использовании выделения ДНК из мицелия концентрация конечного ПЦР-продукта была выше.

Сравнивали между собой реакции растений сорта Каздангская (восприимчивый к коккомикозу) и *Prunus maackii* (устойчивый к коккомикозу) при искусственном заражении листьев. Изучали также реакцию на инокуляцию листьев следующих сортов и гибридов вишни: ВСЛ-2, Измайловский (устойчивый), Гизела, Ласуха, РНЛ, гибриды под № 1/22, 3/11, 3/23, 4/24, 6/10, 6/11.

**Динамика развития симптомов.** Был поставлен предварительный опыт по изучению вирулентности изолятов коккомикоза по отношению к различным сортам и формам вишни. Была получена суспензия спор изолятов возбудителя коккомикоза А и В в концентрации  $0,6 \cdot 10^6$ . Заражение проводили инокуляциями, содержащими споры изолятов А, В, а также их смесью в равной пропорции. Изучали реакцию на инокуляцию листьев микропобегов *Prunus maackii*, сортов Каздангская и GiSelA 5, гибридов 3/23, 4/24, 6/10 на 1%-ном водном агаре. Визуальный анализ симптомов проводили через 12 дней после инокуляции. Было отмечено, что изолят В вызывал появление более чётко выраженных симптомов. В дальнейшем для изучения динамики развития симптомов, вызываемых возбудителем коккомикоза, использовали изолят В.

Изучение динамики развития симптомов проводили по следующей схеме:

1. Использовали споровую суспензию изолята В (в концентрации спор  $0,6 \cdot 10^6$ ).
2. Использовали контрастные по устойчивости формы вишни (*Prunus maackii* (уст.), Каздангская (неуст.), GiSelA 5 (уст.) – листья растений-регенерантов (10 листьев на чашку Петри); Ласуха (2 листа) (уст.) и РНЛ (3 листа) (уст.) – листья растений, из адаптационной комнаты *ex vitro*. Учёт вели с двухдневным интервалом со 2-го по 12-й день после инокуляции.
3. Было изучено проявление симптомов у гибридов 1/22, 3/11, 4/24, 6/11, 6/10 на 12-й день после инокуляции (производили закладку 10 листьев микропобегов в 1 чашку Петри).

Полученные результаты продемонстрировали отличия в реакции чувствительных и устойчивых к коккомикозу сортов. Для чувствительного сорта Каздангская было отмечено наличие симптомов поражения уже на 2-й день после заражения, в то время как на устойчивых сортах Ласуха и РНЛ симптомы поражения на 2-й день отсутствовали. У РНЛ симптомы проявились на 4-й день, а у сорта Ласуха – только на 8-й. Устойчивый сорт GiSelA 5 на 8-й день после инокуляции демонстрировал изменение в тканях только 3 листьев (осветление, пятна), в то время как для сорта Каздангская было отмечено наличие некротических пятен на 8 листьях. Таким образом, сорта, контрастные по устойчивости, отличались также и реакцией на инокуляцию изолятом патогена. Была также отмечена определённая динамика развития симптомов: на 2-й день для сорта Каздангская было отмечено наличие некротических пятен на 5 листьях из 10, а на 12-й день – все листья были поражены возбудителем коккомикоза. Следует отметить, что симптоматика поражения на устойчивых формах (*P.maackii*, GiSelA 5): прозрачные пятна, осветление (реакция гиперчувствительности) – отличалась от симптомов поражения на чувствительных образцах (Каздангская): некроз коричневатого оттенка (рисунки 4, 5).



Рисунок 4 – Симптомы поражения коккомикозом у листьев микропобегов *Prunus maakii* (устойчив.), осветление части листовой пластинки (реакция гиперчувствительности).



Рисунок 5 – Симптомы поражения коккомикозом у листьев микропобегов сорта Каздангская, желтовато-бурые некротические участки.

Однако на листьях микропобегов, взятых из культуры *in vitro*, не всегда возможно провести различие между проявляемыми симптомами. Динамика развития симптомов у различных устойчивых сортов также варьировала. *P.maakii* демонстрировал на 8-й день изменения в тканях всех 10 изученных листьев, а GiSelA 5 – только на 3 из 10. Очевидно, реакция той или иной формы вишни на заражение зависела от генотипа. С целью обеспечить получение визуально чётко различимых симптомов, было изучено влияние различных концентраций споровой суспензии на контрастных по чувствительности сортах.

**Подбор оптимальной концентрации спор для получения максимально чётких визуально различимых симптомов.** Было изучено влияние концентрации спор в инокуляте на проявление симптомов на листьях растений-регенерантов контрастных по устойчивости форм вишни (сорт Каздангская – неустойчив к коккомикозу; *P.maakii* – устойчив). Споровые суспензии получали путём смыва стерильной водой конидий возбудителя коккомикоза с листьев черешни и вишни, заготовленных в период интенсивного развития болезни на растениях в саду. Для опыта были использованы две концентрации спор – стандартная ( $1 \cdot 10^6$ ) и половинная ( $0,5 \cdot 10^6$ ). Концентрацию спор измеряли при помощи камеры Горяева. Симптомы снимали на 12-й день после закладки опыта.

*P.maakii* продемонстрировала  $71,21 \pm 4,76$  % поражённых тканей от общего числа изученных при инокуляции споровой суспензией с концентрацией спор равной  $0,5 \cdot 10^6$  и  $75,67 \pm 7,52$  % при инокуляции суспензией с концентрацией  $1 \cdot 10^6$  (рисунок 6).



Рисунок 6 – Симптомы поражения (реакция гиперчувствительности) у *P.maakii* при инокуляции листьев споровой суспензией в концентрации  $0,5 \cdot 10^6$ .

Дисперсионный анализ показал, что различия между полученными данными недостоверны при уровне значимости 0,05. Инокуляция листьев микропобегов сорта Каздангская споровой суспензией с концентрацией  $0,5 \cdot 10^6$  привела к появлению симптомов (буровато-охристые пятна) на 83,33 % изученных листьев; инокуляция концентрацией  $1 \cdot 10^6$  привела к поражению 100,0 % изученных листьев (для сорта Каздангская число повторностей не было достаточным для проведения статистического анализа). Таким образом, повышение концентрации спор в инокуляте от  $0,5 \cdot 10^6$  до  $1 \cdot 10^6$  не привело к достоверной разнице в проявляемых симптомах.

Сравнение реакции устойчивых форм вишни, культивируемых *in vitro* и традиционными методами, на искусственное заражение возбудителем коккомикоза

Была изучена реакция устойчивых подвоев Измайловский и ВСЛ-2 на инокуляцию возбудителем коккомикоза в концентрации  $1 \cdot 10^6$ . Споровые суспензии получали путём смыва стерильной водой конидий возбудителя коккомикоза с листьев черешни и вишни. Степень заражения оценивали в баллах (от 0 до 4) по шкале [Schuster, 2004]. Во всех четырёх изученных случаях средний балл поражения оказался менее 1, что свидетельствует о высокой устойчивости изученных подвоев к коккомикозу (таблица).

Таблица – Реакция подвоев Измайловский и ВСЛ-2 на заражение возбудителем коккомикоза

Измайловский		ВСЛ-2	
полевые образцы, средний балл поражения	образцы <i>in vitro</i> , средний балл поражения	полевые образцы, средний балл поражения	образцы <i>in vitro</i> , средний балл поражения
0,56±0,18	0,59±0,09	0,55±0,16	0,79±0,07

Дисперсионный анализ показал, что значения среднего балла поражения для растений подвоев Измайловский и ВСЛ-2 *in vitro* и в полевых условиях достоверно не отличаются при уровне значимости 0,05. Таким образом, оценка их устойчивости к кок-

комикозу может вестись как инокулированием листьев, взятых с растений, выращиваемых на питомнике, так и с микропобегов растений-регенерантов, пассажируемых на питательных средах.

## ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что устойчивые и восприимчивые сорта и формы вишни отличаются по проявлению визуальных симптомов и динамике их возникновения при проведении искусственного заражения споровой суспензией возбудителя коккомикоза. Значения среднего балла поражения для растений подвоев Измайловский и ВСЛ-2, культивируемых *in vitro* и традиционными методами, при искусственном заражении возбудителем коккомикоза в концентрации спор  $1 \cdot 10^6$  достоверно не отличались. Таким образом, оценка их устойчивости к коккомикозу может вестись как инокулированием листьев, взятых с растений, выращиваемых на питомнике, так и с микропобегов растений-регенерантов, пассажируемых на питательных средах.

В литературе отсутствуют данные по заражению листьев растений вишни, культивируемых *in vitro*, для оценки их устойчивости к коккомикозу, однако описанный метод может быть использован для отбора устойчивых форм вишни в культуральных условиях.

## Литература

1. Schuster, M. Investigation on resistance to leaf spot disease (*Blumeriella jaapi*) in cherries / M. Schuster // J. Fruit Ornament Plant Res. Special ed. – 2004. – Vol. 12. – P. 275–279.
2. Малиновская, М.А. Коккомикоз вишни: проблемы и перспективы в селекции / М.А. Малиновская // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2010. – Т. 22. – С. 298–304.
3. Прохоров, В.П. Морфолого-физиологические особенности гриба *Cilindrosporium hiemale* Higgins возбудителя коккомикоза косточковых: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.11 / В.П. Прохоров; Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова. – Москва, 1973. – 20 с.
4. Чеботарева, М.С. Скрининг косточковых культур в селекции на устойчивость к коккомикозу / М.С. Чеботарева // Сб. науч. тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции / ВИР. – Санкт-Петербург, 1990. – Т. 132. – С. 97-103.
5. Колесникова, А.Ф. Реконструкция генома вишни [Межвидовая гибридизация в селекции на устойчивость к коккомикозу] / А.Ф. Колесникова, И.Э. Федотова // Генетические основы селекции растений. – М., 1995. – С. 117-122.
6. Чеботарева, М.С. Роль фенольных соединений в устойчивости образцов родов *Cerasus* Mill., *Padus* Mill., *Microcerasus* webb. emend. Spach., гибридов к коккомикозу / М.С. Чеботарева, С.А. Стрельцина // Науч.-техн. бюл. ВИР РАСХН. – 1992. – Вып. 221: Биохимия сельскохозяйственных растений. – С. 61-64.
7. Жуков, О.С. Адаптивная селекция вишни на современном этапе / О.С. Жуков [и др.] // Проблемы и перспективы адаптивного садоводства России. – М., 1994. – С. 44-48.
8. Щекотова, Л.А. Биологические особенности возбудителя коккомикоза вишни и источники устойчивости к болезни: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05 / Л.А. Щекотова; Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова. – Мичуринск, 1980. – 16 с.
9. Жуков, О.С. Генетические особенности получения сортов вишни, устойчивых против коккомикоза / О.С. Жуков // Генетика и наследование важнейших хозяйственных признаков плодовых растений: сб. докладов и сообщений XIV мичуринских чте-

ний, Мичуринск, 27-28 октября 1993 г. / ВНИИГСПР им. И.В. Мичурина; редкол.: Н.И. Савельев [и др.]. – Мичуринск, 1994. – С. 30-34.

10. Чеботарева, М.С. Культура зародышей *in vitro* рода *Cerasus* Mill. в селекции на устойчивость к коккомикозу / М.С. Чеботарёва // Биология культивируемых клеток и биотехнология: тез. докл. Междунар. конф., Новосибирск, 2–6 авг. 1988 г. / АН СССР, Сиб. отд., Ин-т цитологии и генетики, Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева; отв. ред. Р.Г. Бутенко. – Новосибирск, 1988. – Ч. 2. – С. 300-301.

11. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей растений и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.

12. Кухарчик, Н.В. Культивирование гибридных зародышей *Cerasus Mill in vitro* / Н.В. Кухарчик, М.С. Кастрицкая // Плодоводство: науч. тр. / Институт плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2004. – Т. 16. – С. 32–39.

### **ARTIFICIAL INFECTION OF CHERRY IN VITRO BY *BLUMERIELLA JAAPII* (REHM) ARX.**

A.A. Zmushko, N.N. Volosevich

#### **ABSTRACT**

Nowadays one of the most important questions of sour cherry and sweet cherry breeding is creation of cultivars resistant to cherry leaf spot (*Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx.). The artificial infection of cultivars and hybrids of cherry (received from breeding of forms with different degree of resistance to cherry leaf spot) was carried out. The obtained results showed the reaction difference of the cultivars susceptible and resistant to the leaf spot. Values of average marking damage scale of plants of Izmajlovski and VSL-2 stocks cultivated *in vitro* and using traditional methods were not significantly different at artificial inoculation by leaf spot causal agent at the concentration of pathogenic endospores equivalent  $1 \cdot 10^6$ . The revealed regularity can be used for elaboration of method for selection of cherry resistant forms in cultural conditions.

Key words: cherry, cherry leaf spot, artificial infection, *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx., Belarus.

*Дата поступления статьи в редакцию 10.04.2014*