

ВИДОВОЙ СОСТАВ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ АНТРАКНОЗА ВИШНИ

Ю. Г. КОНДРАТЁНОК, А. А. ТАРАНОВ, Т. А. ГАШЕНКО, И. С. ЛЕОНОВИЧ,
И. Г. ПОЛУБЯТКО, З. А. КОЗЛОВСКАЯ

Республиканское унитарное предприятие «Институт плодоводства»,
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: belhort@it.org.by

АННОТАЦИЯ

В статье представлены результаты изучения видового состава антракноза вишни. Определена зимующая стадия возбудителей антракноза, изучены их морфо-культуральные признаки, разработана диагностика вызываемого ими заболевания. Установлен видовой состав возбудителей антракноза с привлечением методов ПЦР-диагностики, который представлен двумя видами грибов рода *Colletotrichum* Sacc. (синоним *Gloeosporium* sp. Berk.), сведения о которых в базе данных международного генетического банка (NCBI) отсутствуют. Впервые в Беларуси создана коллекция чистых культур, включающая 12 штаммов возбудителей антракноза для создания искусственного инфекционного фона.

Ключевые слова: вишня, антракноз, возбудитель, вид, идентификация, штамм, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Высокая урожайность является одним из важнейших хозяйственно ценных признаков современного сортимента плодовых культур. Однако способность реализовать свой продуктивный потенциал во многом определяется сочетанием целого ряда факторов, среди которых устойчивость к патогенам, в том числе поражающим завязь и плоды, становится решающей. Поражаемость плодов болезнями в последнее время настолько возросла, что потребовалось внесение изменений в правила проведения защитных мероприятий и разработка новых технологий, обеспечивающих сохранность урожая [1].

Среди патогенов, поражающих завязь и плоды вишни, на первое место по вредоносности обычно ставят возбудителей монилиоза в форме монилиального ожога (*Monilia laxa*) и плодовой гнили (*Monilia fructigena*), коккомикоза (*Blumeriella jaapi*, син. *Coccomyces hiemalis*) и серой гнили (*Botrytis cinerea*) [2–4]. Однако полевые учеты поражаемости вишни болезнями в саду отдела селекции плодовых культур РУП «Институт плодоводства», проведенные в 2015–2016 гг., и лабораторные исследования образцов пораженных тканей показали, что основным патогеном, вызывающим потери урожая в период созревания является несовершенный гриб из рода *Gloeosporium*, возбудитель антракноза или горькой гнили.

Антракнозы проявляются в форме глубоких изъязвлений побегов, плодов, семян, пятнистостей листьев, поражают обширный спектр видов растений и обладают широкой специализацией. Подавляющее большинство возбудителей антракноза культурных растений относятся к двум родам – *Colletotrichum* Sacc. и *Gloeosporium* Berk., семейства *Melanconiaceae*, порядка *Melanconiales*, класса *Deuteromyces* (несовершенные грибы). Виды данных родов весьма близки по своим признакам друг к другу. Отличия между ними основываются на наличии либо отсутствии щетинок на спороносе. Однако данный признак не стабилен и зависит от факторов внешней среды (питающего растения-хозяина или состава среды), телеоморфы данных двух родов относятся к одному и тому же роду *Glomerella* Ces. et De Not. Поэтому разделение этих двух родов было поставлено под сомнение и, по сути, *Colletotrichum* Sacc. и *Gloeosporium* Berk. являются синонимами [5]. На вишне, согласно литературным данным, в качестве возбудителя антракноза идентифицирован вид *Colletotrichum fructigenum*.

Возбудители антракноза способны поражать как плоды вишни, так и скелетные части деревьев, вызывая потери части кроны вплоть до полной гибели дерева. Антракноз плодов в виде горькой (глеоспориозной) гнили является одной из важнейших причин потерь урожая, в том числе

во время хранения [6]. Опасность антракноза плодов заключается в том, что период его проявления совпадает с периодом созревания урожая, что исключает возможность использования химических средств защиты. Развитие болезни продолжается после съема урожая, во время хранения, что часто полностью приводит урожай в негодность. Даже незначительное поражение плодов делает их непригодными для употребления. В странах с развитым садоводством и большими площадями, занятыми вишней (Польша), горькая (глеоспориозная) гниль наносит значительный ущерб культуре [7]. В то же время исследований проблемы антракноза вишни, его видового состава и биологических особенностей возбудителя в Беларуси ранее не проводилось, что делает актуальными исследования в данной области.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в 2016–2017 гг. на базе коллекционных и опытных садов РУП «Институт плодоводства» и производственных насаждений РУП «Толочинский консервный завод», с использованием полевых и лабораторных методов.

Объектами исследования являлись пораженные завязи и плоды вишни; чистые культуры возбудителя антракноза; коллекция штаммов возбудителя антракноза.

Первичную диагностику антракноза проводили в ходе полевых учетов распространения и развития заболевания по внешним признакам. Для точной диагностики микроскопировали поврежденные болезнью органы и ткани растений в лабораторных условиях. Определение видовой принадлежности патогена осуществляли согласно общепринятым методикам с использованием справочников-определителей болезней сельскохозяйственных растений [2, 3, 8–10]. Выделение в чистую культуру патогенных грибов и изучение их морфо-культуральных признаков проводили согласно «Методическим указаниям по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов» [9–11]. Выделение моноспоровых изолятов осуществляли при помощи специальной насадки на объектив микроскопа [12]. Культивация коллекционных штаммов осуществлялась на питательной среде КГА (картофельно-глюкозный агар). Чашки с чистыми культурами штаммов инкубировали в термостате при температуре +20...+22 °С.

Изучение морфокультуральных признаков штаммов возбудителей антракноза проводили по достижении чистыми культурами 30-дневного возраста по следующим параметрам колонии: размер, мм; форма; край. Окраску колонии определяли по шкале А. С. Бондарцева (1954) [13]; плотность мицелия оценивали по 3-балльной шкале (1 – редкая (рыхлый мицелий), 2 – средняя, 3 – плотная); интенсивность спороношения определяли подсчетом количества конидий на единицу площади поверхности колонии. Определение степени агрессивности коллекционных штаммов возбудителя антракноза проводили по скорости роста колоний и интенсивности спороношения [14].

В ходе определения видового состава возбудителей антракноза и диагностики заболевания в чистую культуру было выделено 12 моноспоровых изолятов, на основе которых создана коллекция штаммов. Каждый штамм обозначался буквенно-цифровым сочетанием, где сочетание букв – обозначение сорта, с которого штамм был выделен, цифра – порядковый номер выделения штамма: Ливенская – Liv-1; Заранка – Zar-1; Русинка – Rus-7, Rus-9; Вянок – Ven-6, Ven-7; Рассвет – Ras-1, Ras-2; Сеянец №1 – Sz-2, Sz-7, Sz-8; Превосходная Колесниковой – P. K.-2.

Идентификацию возбудителей антракноза на молекулярно-генетическом уровне проводили с привлечением методов ПЦР-диагностики. Препараты ДНК выделяли из мицелия отобранных штаммов с использованием набора реагентов DNeasy Plant MiniKit фирмы Qiagen согласно методике производителя. Для проведения реакции использовали универсальные праймеры ITS1 и ITS4 («Праймтех», Беларусь) [15, 16]. Видовую идентификацию проводили в лаборатории генетики и биотехнологии ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» с помощью программы BLAST, GenBank и использования базы данных международного генного банка GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) [17, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификацию возбудителя антракноза в полевых условиях проводили по диагностическим признакам, проявляющимся на разных фазах развития плода. В начале на кожице созревающего или зрелого плода вишни появляется малозаметное плотное, темное пятно, которое быстро разрастается, увеличиваясь, углубляется, что приводит к деформации плода, мякоть приобретает горький вкус. На нем формируются мелкие черные бугорки – споролоча патогена, беспорядочно рассеянные либо располагающиеся концентрическими кругами. Во влажную погоду из плодовых тел выделяются скопления розовато-оранжевых конидий. На одном плоде может размещаться до 5 пятен, плод становится бесформенным, сморщивается и мумифицируется. Пораженные плоды с дерева не опадают (рисунок 1).



Рисунок 1 – Признаки поражения антракнозом плодов вишни

По результатам видовой идентификации с использованием традиционных методов и Справочника-определителя болезней [3] установлено, что поражение гнилью плодов вишни в период созревания вызвано грибом *Colletotrichum fructigenum* (Berk.) Vassil. (синоним – *Gloeosporium fructigenum* Berk.). Данный патоген в анаморфной, конидиальной стадии развития относится к семейству *Melanconiaceae*, порядка *Melanconiales*, класса *Deuteromyces* (несовершенные грибы); телеоморфа, сумчатая стадия развития представлена видом *Glomerella cingulata* (Ston.) Sp. et Schr. класс *Ascomycetes*. В жизненном цикле представлены обе стадии грибов.

Возбудитель антракноза был выделен в чистую культуру. Идентификация патогена по морфокультуральным признакам проведена при появлении спороншения. Длина конидий – 10–25 мкм, толщина – 3–6 мкм, конидии одноклеточные, слегка изогнутые, бесцветные, часто содержат 1–2 капельки масла. Мицелий тонкий, бесцветный, многоклеточный, умеренно ветвистый (рисунок 2).

В культуре возбудитель антракноза образует пушистые, войлочные колонии от светло-серого до темно-серого цвета, правильной округлой формы. На начальном этапе развития (возраст – 3–5 дней) центр у всех колоний оранжево-розовый, слизистый, представляющий собой массовое скопление конидий бесполой стадии развития гриба. В дальнейшем он полностью скрывается разросшимся мицелием. Плотность воздушного мицелия у различных штаммов изменяется от редкой (у темноокрашенных штаммов) до средней плотности (у светлоокрашенных штаммов). Концентричность колоний выражена слабо – отмечено образование небольшого концентрического валика по краю колонии. У всех колоний отмечено формирование центрального бугра. Края колоний у всех штаммов четкие, ровные. Высота колоний – 3–5 мм.

На основании описанных морфокультуральных признаков (окраска колонии, ее форма, край колонии, плотность мицелия, интенсивность спороншения, скорость роста колоний) коллек-

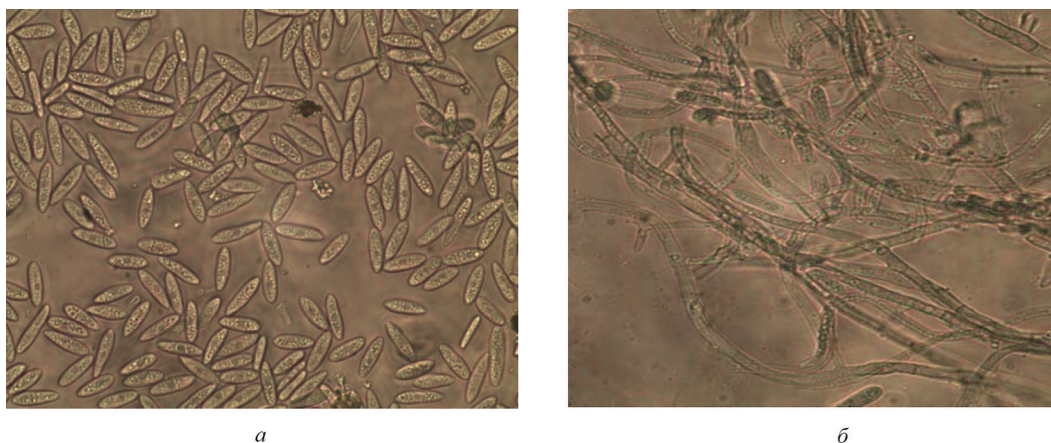
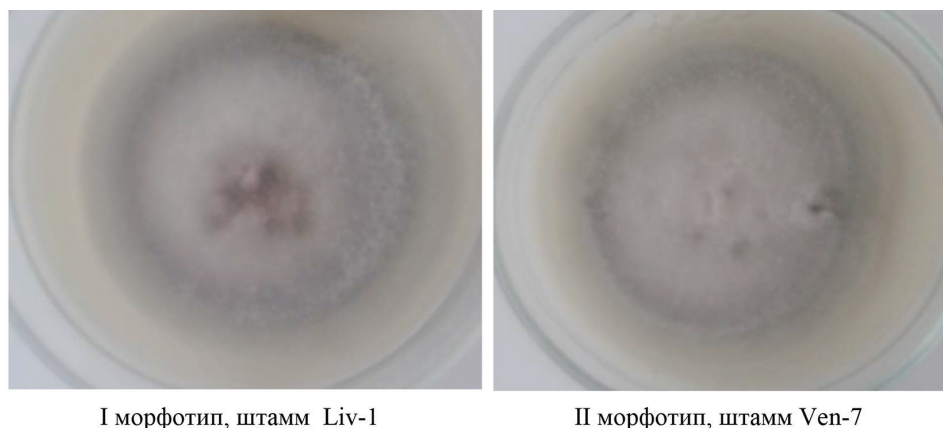


Рисунок 2 – Конидии (а) и мицелий (б) возбудителя антракноза (увеличение 600×)

ционных штаммов проведено изучение структуры популяции возбудителя антракноза *Colletotrichum sp.* Установлено наличие различий между коллекционными штаммами по плотности воздушного мицелия, его окраске и скорости роста колоний. На основании данных признаков все выделенные штаммы были разделены на два морфотипа (рисунок 3).



I морфотип, штамм Liv-1

II морфотип, штамм Ven-7

Рисунок 3 – Морфотипы возбудителя антракноза *Gloeosporium sp.*

I морфотип характеризуется колониями умеренной силы роста (30–50 мм) и рыхлым серым мицелием. Центральная бугор у 30-дневных колоний хорошо выражен, темно-серый, края колоний четкие, рыхлые. К первому морфотипу были отнесены штаммы Liv-1, Zar-1, Rus-9, Rus-7, выделенные с сортов вишни Ливенская, Заранка и Русинка.

Для II морфотипа характерны быстрорастущие (50–90 мм) колонии светло-серого цвета, воздушный мицелий средней плотности, центральная бугор у 30-дневных колоний светло-розоватый. Края колоний четкие, средней плотности, интенсивность спороношения высокая – 3000 конидий и более. Данный морфотип представлен штаммами Ven-6, Ven-7, Ras-1, Ras-2; Sz-2, Sz-7, Sz-8, P.K.-2, выделенными с пораженных плодов сортов вишни Вянок, Рассвет, Сеянец №1, Превосходная Колесниковой (таблица). Для штаммов обоих морфотипов отмечена высокая интенсивность спороношения – 3000 конидий и более. Различий в строении и толщине гиф мицелия, окраске, форме и параметрах конидий между штаммами разных морфотипов не выявлено.

С целью точной видовой идентификации возбудителей антракноза было проведено секвенирование продуктов амплификации рДНК, выделенной из чистых культур патогена, с универсальными праймерами ITS1и ITS4. Определение видов основывалось на анализе размеров ампликонов 18SRNA-ITS1-5, 8SRNA-ITS2-28RNA региона. Поскольку длина данного региона является величиной постоянной для каждого вида, его использовали в качестве диагностического

Таблица – Морфокультуральная характеристика коллекционных штаммов возбудителя антракноза

Морфо-тип	Штамм	Окраска, форма, край колонии	Размер колонии, мм	Плотность колонии, балл	Интенсивность споруляции, конидий на см ²
I	Liv-1, Zar-1, Rus-9, Rus-7	Мицелий серый, колонии правильной округлой формы, центральный бугор темно-серый, края колоний четкие, ровные, рыхлые	30–50	1	Высокая 3 000 и более
II	Ven-6, Ven-7, Ras-1, Ras-2; Sz-2, Sz-7, Sz-8, P.K.-2	Мицелий светло-серый, колонии правильной округлой формы, центральный бугор светло-розоватый, края четкие, средней плотности, ровные	50–90	2	Высокая 3000 и более

признака. Полученные фрагменты маркерного региона рДНК сверялись с базой данных NCBI GenBank с помощью программы BLAST [18]. Согласно полученным результатам, рДНК, выделенная с двух штаммов гриба, относящихся к разным морфотипам, не проявила 100 % совпадения ни с одним из зарегистрированных в базе данных видов рода *Gloeosporium* либо *Colletotrichum*. Фрагмент маркерного региона рДНК штамма Liv-1 первого морфотипа проявил 99 % совпадения с ранее не идентифицированным видом *Colletotrichum sp.* и отличается от имеющихся в базе GenBank видов данного рода отсутствием одного нуклеотида аденозина (А) (в нашем образце – повторяющийся фрагмент АА, в базе данных GenBank – ААА) (рисунок 4).

CCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAAAAAATTTGGGGGTTTAACGGCAAGAGTCCCTCC
GGATCCCAGTGCGAGACGTTAGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTAC
CTTTAAGGGCCACGTCGGCCGTGGGGCCCCAAAACCAAGCGGTGCTTGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCTCGCCAGAATGCTGGCGAGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCTGA
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCA

Рисунок 4 – Фрагмент маркерного участка региона рДНК штамма Liv-1.
Выделен повторяющийся фрагмент с делецией нуклеотида А

Маркерный регион штамма Ven-7 (второй морфотип) также проявил 99 % совпадения с ранее не идентифицированным видом *Colletotrichum sp.*, но отличается от известных одним нуклеотидом – цитозином (С) (в нашем образце – повторяющийся фрагмент СС, в базе данных GenBank – ССС), что может свидетельствовать о делеции (потере) этим видом одного нуклеотида (рисунок 5).

CGGGTAGTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAAAAAATTTGGGGGTTTAACGGCAA-
GAGTCCCTCCGGATCCAGTGCGAGACGTTAGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGG-
GTCCGCCACTACCTTTAAGGGCCACGTCGGCCGTGGGGCCCCAAAACCAAGCGGTGCTT-
GAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCTCGCCAGAATGCTGGCGAGCGCAATGTG-
CGTTCAAAGATTCTGATGATTCATGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTG-
CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAGTTTAAATTATTTGCTTGT-
GCCACTCAGAAGAGACGTCGTGTAATAGAGTTTGGTTTCCTCCGGCGGGCGCTCCGC-
CCCCGTGACGGGGCCGGCGCCGGGAGGGTCCGCCACGAGAGGCTTCCCCTGCCCGC-
CGAAGCAACGGTTAGGTATGTTTACAAAGGGTTGTAGAGCGGTAACCTCAGTAATGATC-
CCTCG

Рисунок 5 – Фрагмент маркерного участка региона рДНК штамма Ven-7.
Выделен повторяющийся фрагмент с делецией нуклеотида С

Результаты секвенирования свидетельствуют о том, что выделенные нами возбудители антракноза относятся к двум ранее не идентифицированным видам из рода *Colletotrichum* Sacc., сведения о которых в международной базе данных NCBI GenBank отсутствуют [17].

ВЫВОДЫ

1. Установлено наличие внутривидовой дифференциации по морфокультуральным признакам. Выделено два морфотипа, отличающиеся скоростью роста колоний, окраской и плотностью мицелия. В жизненном цикле представлены обе стадии грибов рода *Colletotrichum* Sacc.
2. Установлен видовой состав возбудителей антракноза с привлечением методов ПЦР-диагностики, который представлен двумя видами грибов рода *Colletotrichum* Sacc. (синоним *Gloeosporium* sp. Berk.), сведения о которых в базе данных международного генетического банка (NCBI) отсутствуют.
3. Создана коллекция чистых культур возбудителей антракноза, включающая 12 штаммов для создания искусственного инфекционного фона.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ищенко, Л. А. Эколого-физиологические и генетические основы устойчивости плодовых и ягодных растений к болезням: монография / Л. А. Ищенко. – Орел: Изд-во Орел ГТАУ, 2010. – С. 23–33.
2. Пересыпкин, В. Ф. Сельскохозяйственная фитопатология / В. Ф. Пересыпкин. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 364–381.
3. Определитель болезней растений. – 3-е изд., испр. / М. К. Хохряков [и др.]. – СПб., 2003. – С. 385–445.
4. Юшев, А. А. Вишня, черешня / А. А. Юшев, О. В. Еремина. – М.: Ниола-пресс, 2007. – С. 199–203.
5. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / В.И. Билай [и др.]; под ред. В. И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1988. – С. 187–195. – Определитель болезней растений. – С. 424.
6. Криворот, А. М. Технологии хранения плодов / А. М. Криворот. – Минск: ИВЦ Минфина, 2004. – С. 202–204.
7. Integrowana Produkcja Owoców Wiśnie / pod kierunkiem R. W. Olszaka. – Skierniewice, 2002. – S. 52–56.
8. Пидопличко, Н. М. Грибы – паразиты плодовых растений: определитель / Н. М. Пидопличко. – Киев, 1977. – Т. 1. – 298 с.
9. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. – М., 1987. – С. 79–131.
10. Хохряков, М. К., Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов / М. К. Хохряков. – Л.: ВИЗР, 1974. – 69 с.
11. Методы фитопатологических и энтомологических исследований в селекции растений. – М., 1977. – С. 184–193.
12. Дорожкин, Н.А. Методика выделения моноспоровых изолятов *Phytophthora infestans* / Н. А. Дорожкин, З. И. Ремнева, А. М. Кремнева // Доклад АН БССР. Сер. с.-х. наук. – 1968. – № 2. – С. 54–59.
13. Бондарцев, А. С. Шкала цветов / А. С. Бондарцев. – М., 1954. – 27 с.
14. Методические указания по оценке сравнительной устойчивости плодово-ягодных культур к основным заболеваниям: метод. указ. / Т. М. Хохрякова [и др.]; под ред. И. И. Минкевич. – Л., 1968. – С. 5–17, 30–37.
15. Баранов, О. Ю. Использование молекулярно-генетических маркеров для фитопатологического анализа семян и почвы в лесных питомниках / О. Ю. Баранов, С. В. Пантелеев, В. Е. Падутков // Современное состояние, проблемы и перспективы лесовосстановления и лесоразведения на генетико-селекционной основе: материалы междунар. науч. конф., Гомель, 8–10 сент. 2009 г. – Гомель, 2009. – С. 23–27.
16. White, T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White // PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications / eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. San Diego: Academic Press Inc. 1990. – P. 315–322.
17. www.ncbi.nlm.nih.gov. – Date of access: 04.11.2016.
18. <https://blast.cqi?PROGRAM=blastn&PAGE=blastsearch&LINKLOC=blasthome>. – Date of access: 04.11.2016.

SPECIES COMPOSITION AND CHARACTERISTICS OF ANTHRACNOSE PATHOGEN STRAINS ON CHERRY

Y. G. KONDRATYONOK, A. A. TARANOV, T. A. GASHENKO, I. S. LEONOVICH,
I. G. POLUBYATKO, Z. A. KOZLOVSKAYA

Summary

The article presents the results of cherry anthracnose species composition study. The wintering stage of anthracnose agent was determined, morphological and cultural features were studied, and the disease diagnosis was developed. The species composition of anthracnose pathogens was established using PCR methods, which is represented by two fungi species of the genus *Colletotrichum* Sacc. (synonym for *Gloeosporium* sp. Berk.), information about which is not available in the database of the International Genetic Bank (NCBI). For the first time in Belarus a collection of purified cultures was created, comprising 12 strains to create the artificial infectious background.

Keywords: cherry, anthracnose, pathogen, species, identification, strain, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 17.05.2018