¹А. А. Кузнецова, снс,

¹М. Б. Копина, снс, к. с.-х. н.,

²С. Е. Головин, внс, д. с.-х. н.

¹ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», п. Быково, Московская обл.,
Россия

²ФГБНУ «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и
питомниководства», г. Москва, Россия

¹kyyznec@bk.ru

УДК 632.4.01/.08

DOI 10.31676/2073-4948-2019-56-142-147

ВНУТРИВИДОВОЕ РАЗЛИЧИЕ КОМПЛЕКСА *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* SIMMONDS НА ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУРАХ

Резюме. В статье представлены результаты исследований по определению культурально-морфологических особенностей видов комплекса *Colletotrichum acutatum*. Было выделено 11 изолятов из пораженных плодовых и ягодных культур. В результате секвенирования установлена видовая принадлежность изолятов: *C. acutatum*, *C. nymphaeae* – земляника, *C. fioriniae* – груша, *C. godetiae* – яблоня декоративная, *C. fioriniae* – виноград. Наиболее оптимальными средами для роста и споруляции грибов комплекса *C. acutatum* являлись КГА, Mathur's Medium Modified, овсяной агар.

Ключевые слова: земляника, антракноз, комплекс видов, питательная среда, культурально-морфологические признаки, идентификация, ПЦР.

Summary. The results of studies to determine the culture-morphological peculiarities of *Colletotrichum acutatum* species complex are presented in the article. Eleven isolates from infected fruit and small fruit crops were revealed. As result of sequencing, the following species belonging to the isolates were determined: *C. acutatum*, *C. nymphaeae* - strawberry, *C. fioriniae* - pear, *C. godetiae* - ornamental apple tree, *C. fioriniae* - grapes. The most optimal environment for growth and sporulation of *C. acutatum* fungi complex were potatodextrose agar, Mathur's Medium Modified, oat agar.

Keywords: strawberry, anthracnose, species complex, culture media, culture-morphological characteristics, identification, PCR.

Введение

Комплекс вида *C. acutatum*, известный как возбудитель антракноза, является полифагом, поражающим широкий круг сельскохозяйственных и дикорастущих растений, в особенности землянику, где потери урожая могут достигать до 80%. С 2017 года *C. acutatum* внесен в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза и является

ограниченно распространенным объектом на территории России [1].

Основной путь распространения возбудителя антракноза в новых регионах – зараженный посадочный материал. В полевых условиях источником инфекции являются растительные остатки, мумифицированные ягоды. В природе распространяется ветром, насекомыми, капельной влагой, а также с помощью человека. Патоген очень жизнеспособен и сохраняется в почве более 3 лет. Болезнь опасна тем, что после заражения может не проявляться длительное время [2].

Характерными симптомами болезни являются появление углубленных бурых пятен, позже чернеющих язв, образование некрозов и разрушение тканей, приводящее к засыханию и гибели растения. При влажных условиях формируется характерное спороношение, выделяется экссудат слизистых клейких спор желто-оранжевого цвета [3].

Целью проводимых исследований являлось изучение внутривидового разнообразия комплекса *C. acutatum* по культурально-морфологическим признакам. В ходе работы были проанализированы 11 изолятов, выделенные с плодового и ягодного посадочного материала иностранного происхождения. Культуры гриба были получены с груши, персика, винограда, земляники садовой (происхождение Италия), с яблони декоративной (происхождение Бельгия), с земляники садовой (происхождение Нидерланды).

Материалы и методы

Изучение изолятов проводили на различных питательных средах, таких как картофельно-глюкозный агар (КГА), V8 (овощной агар из 8 соков), Mathur's Medium Modified [4], сусло-агар, агар с кусочками моркови, агар с кусочками земляники, овсяной агар, агар вишневого отвара. Культуры инкубировали в термостате при температуре 25 °С. Оценку прироста и описание колоний осуществляли на 4, 6, 8-е сутки. В работе оценивали строение, поверхность, окраску наружной и обратной стороны (реверзума), форму, скорость роста, характер края колонии, а также наличие образования экссудата в центре колонии. Морфологические признаки изолятов изучали методом микроскопирования и морфометрии. Постановку классической ПЦР проводили с праймерами TUB2Fd/TUB4Rd [5], которые амплифицировали продукт размером 400 п. о. с последующим секвенированием.

Результаты исследований

На первом этапе была проведена расшифровка нуклеотидных последовательностей участка гена *beta-tubulin* (TUB2), что позволило определить принадлежность выделенных культур к следующим подвидам комплекса *C. acutatum*: *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. acutatum*, *C. nymphaeae*. Изоляты *C. fioriniae* были выделены с культур груши, персика, винограда; *C. godetiae* – с яблони декоративной; *C. acutatum*, *C. nymphaeae* – с растений земляники.

Все подвида комплекса *C. acutatum* отличались между собой по культуральным признакам, сравнение которых позволило установить, что для всех изолятов оптимальной средой для стимуляции спороношения являются среды КГА, Mathur's Medium Modified, овсяной агар (рис. 1).

Рис. 1. Внешняя поверхность колоний (А) и обратная сторона колоний (реверзум) (Б) на 8-е сутки. (1) *C. acutatum* – земляника, (2) *C. nymphaeae* – земляника, (3) *C. fiorinii* – груша, (4) *C. godetiae* – яблоня декоративная, (5) *C. fiorinii* – виноград

Интенсивный рост с обильной структурой воздушного мицелия наблюдался на средах: картофельно-глюкозный агар (диаметр колоний 6,2-8 см), овсяной агар (диаметр колоний 6,8-8 см).

На агаре с кусочками земляники (диаметр колоний 6-7 см) и на морковном агаре (диаметр колоний 6-7,5 см) патогены проявляли себя как среднерастущие и среднеспорулирующие (диаметр колоний 6-7 см). На агаре вишневого отвара средний рост и наличие спороношения проявили неземляничные патогены *C. fioriniae* и *C. godetiae*. Минимальный рост изолятов был отмечен на среде V8, на которой наблюдался медленный рост колоний (диаметр колоний 3-4,5 см) и отсутствовало спороношение.

На сусло-агаре изоляты проявляли себя по-разному. *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae* достаточно хорошо росли и образовывали экссудат, при этом было заметно отсутствие обильного мицелия, как у культур на КГА. Изоляты *C. acutatum* на данной среде росли медленно и не спорулировали.

Изоляты *C. fioriniae* выделенные с груши и персика, обладали бархатно-опушенным строением, зональной ровной поверхностью серо-бежево-розового цвета с ровным светло-бежевым краем колонии, реверзном темно-розового цвета с серой серединой и с ярко-оранжево-лососевым экссудатом.

Изолят *C. fioriniae*, выделенный с винограда, характеризовался бархатно-опушенным строением, зональной ровной поверхностью темно-серого цвета со светло-бежевым ровным краем колонии, розово-серым реверзном, в центре колонии наблюдался оранжевый экссудат.

Изолят *C. godetiae*, выделенный с яблони декоративной, характеризовался бархатно-опушенным строением, зональной ровной поверхностью выраженного серо-оливкового цвета со светло-бежевым ровным краем колонии, светло-серым реверзном и оранжевым экссудатом.

Культуры с земляники двух подвидов – *C. acutatum* и *C. Nymphaeae* – отличались между собой цветом колоний и развитием на средах. Вид *C. nymphaeae* (происхождение растения-хозяина – Италия) характеризовался бархатно-опушенным строением, зональной ровной поверхностью, темно-серым цветом со светло-серым ровным краем; реверзном темно-серый, с характерным оранжевым экссудатом в середине колонии.

Изолят *C. acutatum* характеризовался бело-серым цветом со светло-белым слегка волнистым краем, реверзном бежевый с темно-розовой серединой, с характерным оранжевым экссудатом в середине колонии.

Стоит отметить, что подвиды *C. acutatum* (растение-хозяин земляника), *C. nymphaeae* (растение-хозяин земляника), *C. fioriniae* (растение-хозяин виноград), *C. godetiae* (растение-хозяин яблоня декоративная) достаточно похожи между собой по окраске и росту воздушного мицелия (светло-серого цвета), особенно это заметно на начальной фазе роста колоний.

Между тем подвиды *C. fiorinae* (растение-хозяин виноград) и *C. fiorinae* (растение-хозяин груша, персик) отличались между собой по окраске наружной поверхности колоний. На изоляте, выделенном с винограда, наблюдался воздушный мицелий темно-серого цвета, а на изолятах, выделенных с груши и персика – серый бежево-розовый.

Изоляты незначительно отличались по морфологическим признакам. При микроскопировании подвид *C. acutatum* отличался от других изолятов размером конидий: шириной от 3,3 до 4,6 мкм и длиной от 9 до 19,3 мкм (в среднем значение 4,03 x 15,7 мкм), более длинные и узкие, с острыми концами, слегка искривленные, чем другие подвиды комплекса *C. acutatum*. *C. Nymphaeae*: шириной от 3,1 до 4,8 мкм и длиной от 7,7 до 17,5 мкм (в среднем 4,3 x 13,2 мкм). *C. Fiorinae*: шириной от 3,7 до 6,5 мкм и длиной от 7,7 до 18,5 (в среднем 5,2 x 13,8 мкм). *C. Godetiae*: шириной от 4,5 до 6,4 и длиной от 8,6 до 15,9 мкм (в среднем 5,7 x 13,9 мкм) (рис. 2).

C. acutatum (растение-хозяин земляника)

C. nymphaeae (растение-хозяин земляника)

C. fiorinae (растение-хозяин персик, груша, виноград)

C. godetiae (растение-хозяин яблоня декоративная)

Рис. 2. Морфологические признаки конидий подвидов *C. acutatum*.

Выводы

В результате работы нами были получены изоляты комплекса вида *Colletotrichum acutatum*, которые были депонированы в коллекцию опасных фитопатогенов земляники ФГБУ «ВНИИКР».

Наиболее оптимальными средами для роста и споруляции грибов комплекса вида *C. acutatum* являлись КГА, Mathur's Medium Modified, овсяной агар.

Исследование показало, что изоляты комплекса *C. acutatum* достаточно разнообразны по культуральному росту и сходны по морфологическим признакам, что затрудняет достоверную идентификацию патогенов, поэтому необходимо подтверждение молекулярно-генетическими методами, основанных на применении специфичных праймеров к подвидам комплекса *C. acutatum*.

Список использованной литературы

1. Скрипка О. В., Дудченко И. П., Никифоров С. В., Копина М. Б. Антракноз *Colletotrichum acutatum* Simmonds -опасное заболевание земляники // Карантин растений. Наука и практика, 2014. - № 4. – С. 24-29.
2. Метлицкий О. З., Головин С. Е., Ундрцова И. А., Холод Н. А. Антракноз садовой земляники // Агро XXI, 2007. - № 4-6. – С. 40-41.
3. Кузнецова А. А., Дудченко И. П., Копина М. Б. Антракноз земляники, классические и современные методы диагностики // Современные подходы и методы в защите растений: Тезисы докл. Всерос. научно-практическая конференция с международным участием (Екатеринбург, 12-14 ноября 2018.). – Екатеринбург, 2018. – С. 125-128.
4. Correll J. C., Morelock T. E., Guerber J. C. Vegetative compatibility and virulence of the spinach anthracnose pathogen, *Colletotrichum dematium* // Plant Dis., 1993. – № 77. – P. 688-691.
5. Guerber J. C., Liu B., Correll J. C., Johnston P. R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility // Mycologia, 2003. – № 95. – P. 872-895.

¹A. A. Kuznetsova, ¹M. B. Kopina, ²S. E. Golovin

¹All-Russian Center of Plant Quarantine, Bykovo, Moscow region, Russia,

²FSBSI All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery,
Moscow, Russia

INTRASPECIFIC DIFFERENCE OF THE *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* SIMMONDS COMPLEX ON FRUIT AND SMALL FRUIT CROPS