

УДК 634.75:632.4

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ
ИСКУССТВЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ СЕМЯН
ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ ВЕРТИЦИЛЛЕЗОМ
(*VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEBAN,
VERTICILLIUM ALBO-ATRUM REINKE ET BERTHOLD)**

Т. Н. Камедько

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»
г. Горки, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 213407, Могилевская обл., г. Горки
ул. Мичурина, 5
e-mail: t.kamedko@yandex.by)

Ключевые слова: земляника садовая, устойчивость, вертициллезное увядание, заражение, семенной материал.

Аннотация. Представлены результаты исследований по искусственному заражению семенного материала земляники садовой фитопатогенными грибами *Verticillium dahliae* Kleban, *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold, вызывающими вертициллезное увядание растений. 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 инокулюме. Выявлены наиболее эффективные и менее трудоемкие способы инокуляции.

Лучшим вариантом заражения семенного материала земляники садовой вертициллезным увяданием стал способ инокуляции пророщенных во влажной камере семян споровой суспензией. Близким по значению, но менее технологичным, оказался результат заражения пророщенных семян во влажной камере на инокулюме.

**COMPARATIVE EVALUATION OF DIFFERENT METHODS
OF ARTIFICIAL INFECTED SEEDS STRAWBERRY
VERTICILLIUM (*VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEBAN,
VERTICILLIUM ALBO-ATRUM REINKE ET BERTHOLD)**

T. N. Kamedzko

Belarusian State Agricultural Academy
Gorki, Republic of Belarus
(Republic of Belarus, 213407, Mogilev region, Gorki, Michurin str., 5
e-mail: t.kamedko@yandex.by)

Key words: strawberry, resistance, verticillium wilt, infection, seed material.

Summary. Presented are the results of studies on the artificial infection of seed strawberry material with phytopathogenic fungi *Verticillium dahliae* Kleban, *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold, which cause the plant's verticillium wilt. Four variants of seed infection were analyzed: infection by seeding into infected soil, contamination by spraying with a spore suspension of the pathogen, contamination of germinated seeds by spraying with a spore suspension of the pathogen, infection of seeds by germination on a inoculum. The most effective and less time-consuming methods of inoculation were identified.

The best way to contaminate the strawberry seed material with verticillium wilt was the method of inoculation with a spore suspension of seeds sprouted in a moist chamber. Close in importance, but less technologically, was the result of infection germinated seeds in a moist chamber on a inoculum.

(Поступила в редакцию 31.05.2017 г.)

Введение. Одной из наиболее опасных грибных болезней земляники садовой является заболевание корней и корневой шейки растения, вызываемое группой фитопатогенных грибов рода *Verticillium*. Эти грибы поражают даже очень сильные, ничем не ослабленные растения. У зараженных растений урожайность снижается на 40-70%, выход рассады – на 43-90%. При возделывании восприимчивых сортов может поразиться до 100% растений, часто вызывая гибель 5-25% из них [1].

Важной частью ведения селекции на устойчивость к корневым гнилям является искусственное заражение патогенами на раннем этапе развития растений, что способствует ограничению количества сеянцев от нескольких тысяч до нескольких сотен уже до пикировки, упрощает процесс оценки по хозяйственно ценным признакам небольшого числа гибридных сеянцев, тем самым сокращая сроки внедрения новых устойчивых форм в производство.

В связи с этим одним из направлений наших исследований явилось использование различных способов инокуляции семенного материала, для того чтобы как можно раньше провести отбор устойчивых генотипов и облегчить процесс повторного заражения при пикировке сеянцев.

Цель работы: разработать и усовершенствовать методы заражения семенного материала земляники садовой вертициллезом для отбора устойчивых форм на ранних этапах развития.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в 2016-2017 гг. на кафедре плодовоовощеводства УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».

Объектами исследований служили фитопатогенные грибы *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold, *Verticillium dahlia* Kleban и гибридный материал земляники садовой, полученный от свободного

опыления восприимчивого сорта Фестивальная и устойчивого сорта Золушка. Опыт проводился в 2-кратной повторности, на каждый вариант обработки было использовано по 50 семян каждого сорта. Приготовление и стерилизацию питательной среды проводили, руководствуясь рекомендациями Н.А. Наумова [2]. Патоген *V. dahliae* размножали на синтетическом агаре Чапека, *V. albo-atrum* – на мальц-пептонном агаре [3]. Перед инокуляцией проводили скарификацию семян концентрированной серной кислотой в соответствии с указаниями Ю. Б. Архипова [4]. Опыт по искусственному заражению семян осуществляли, руководствуясь методическими указаниями М. К. Хохрякова, В. Д. Поликсеновой, А. К. Храмцовым, С. Г. Пискуном и научным изданием *Basic Plant Pathology Methods* [5, 6, 7].

Искусственное заражение проводили суспензией спор из смеси двух видов грибов по следующей схеме (таблица 1).

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

Объект обработки	Вариант обработки
Почва	1. Полив почвы споровой суспензией патогена + посев в инфицированную почву
Семена	2. Опрыскивание споровой суспензией патогена + выдерживание во влажной камере (24 ч) + посев
	3. Проращивание семян во влажной камере + опрыскивание суспензией спор + посев
	4. Проращивание семян во влажной камере на инокулюме + посев

Важным условием перед началом эксперимента являлось 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 [8].

Первый вариант опыта – почву опрыскивали споровой суспензией патогена, которая готовилась из двухнедельной культуры гриба плотностью $\times 10^5$ кон/мл [9]. 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 [10].

Второй вариант опыта – семена, 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 [5].

Третий вариант опыта – семена земляники, прошедшие предварительную скарификацию концентрированной серной кислотой, распределяли тонким слоем в чашках Петри, дно и крышки которых были услаены смоченной фильтровальной бумагой (влажная камера). Чашки Петри выдерживали в термостате при температуре 25°C. По мере подсыхания бумагу смачивали стерильной водой [7]. 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 – семена земляники, прошедшие предварительную скарификацию концентрированной серной кислотой, распределяли тонким слоем в чашках Петри, дно и крышки которых были услаены фильтровальной бумагой. Фильтровальную бумагу на дне чашки смачивали суспензией спор патогена, фильтровальную бумагу на крышке смачивали стерильной водой (влажная камера) [7]. Чашки Петри выдерживали в термостате при температуре 25°C. 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 [9].

Результаты исследований и их обсуждение. В первом варианте опыта симптомы болезни наблюдались у 50% семян, полученных от свободного опыления, восприимчивого к вертициллезу сорта Фестивальная, и у 65% семян, полученных от свободного опыления, устойчивого к вертициллезу сорта Золушка (рисунок 1).

Используя этот вариант опыта, исходили из того, что патогены *V. albo-atrum* и *V. dahliae* являются почвенными грибами, и заражение ими растений происходит через почву. Предполагалось, что когда семена начнут прорасти, инфекция попадет в раскрытые семена и произойдет заражение проростка.

В некоторых случаях патогенные грибы проникают в формирующиеся семена только по сосудистой системе больного растения (внутренняя инфекция) [11, 12]. Во втором варианте изучали возможность заражения растения через поверхностную инокуляцию семян. В результате исследований у семян восприимчивого сорта от вертициллеза погибло 28,6% растений, у семян устойчивого сорта – 72,0% (рисунок 2).

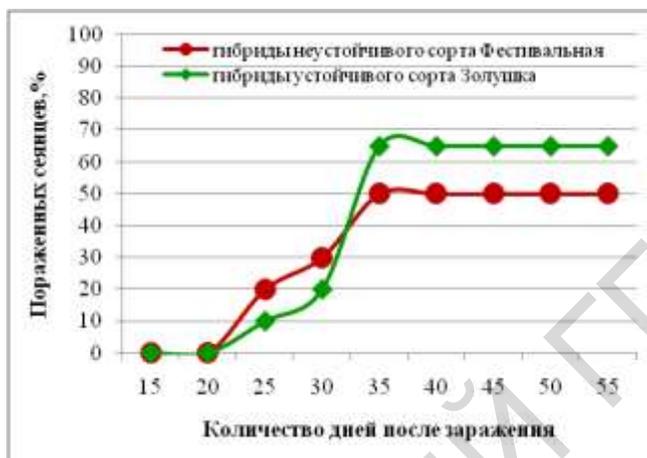


Рисунок 1 – Уровень поражения гибридных семян земляники садовой при заражении семян через посев в инфицированную почву



Рисунок 2 – Уровень поражения гибридных семян земляники садовой при заражении семян путем опрыскивания споровой суспензией

В третьем варианте опыта задачей было облегчить проникновение инфекции через оболочку семян путем помещения последних во влажную камеру, где происходит набухание и растрескивание семенной оболочки. В результате у семян восприимчивого сорта симптомы вертициллеза наблюдались у 96,3% растений, у семян устойчивого сорта признаки болезни наблюдались у 57,9% растений (рисунок 3).

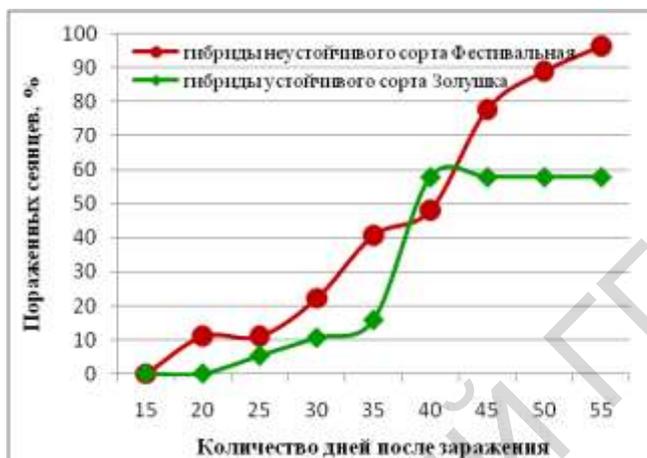


Рисунок 3 – Уровень поражения гибридных семян земляники садовой при заражении пророщенных во влажной камере семян путем опрыскивания споровой суспензией



Рисунок 4 – Уровень поражения гибридных семян земляники садовой при заражении пророщенных на инокулюме во влажной камере семян

Четвертый вариант опыта можно считать аналогичным третьему. Однако если в третьем варианте к моменту опрыскивания оболочка не всех семян могла растрескаться и инфекция в некоторые семечки могла не попасть, то в этом случае семена в течение 7 дней были пита-

тельной средой, на которой росли и развивались патогены, что увеличивает вероятность проникновения инокулюма. В результате, у гибридов восприимчивого сорта оказалось 71,4% растений с признаками болезни, у гибридов устойчивого сорта – 77,5%, (рисунок 4).

Высокий процент поражения сеянцев устойчивого сорта Золушка объясняется тем, что в опыте использовался гибридный материал, который, вероятно, не полностью унаследовал признаки устойчивости материнского сорта. Также необходимо учитывать, что устойчивый к вертициллезу материнский сорт Золушка был получен от скрещивания сортов Фестивальная × Зенга Зенгана, а, как известно [1], сорт Фестивальная является высоко восприимчивым к вертициллезу, что, очевидно, сыграло не малую роль при расщеплении признаков у гибридов.

Несмотря на то, что из-за использования в опытах семенного материала гибридов, полученных от свободного опыления, которые дали неоднозначный результат по инокуляции восприимчивых и устойчивых растений, удалось выделить лучший способ заражения семян земляники садовой вертициллезом, для отбора на раннем этапе развития растений (таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность различных способов заражения вертициллезом семенного материала земляники садовой

Способ заражения	Материнский сорт	Сеянцев, пораженных вертициллезом, %.
1. Полив почвы споровой суспензией патогена + посев в инфицированную почву	Фестивальная	50,0
	Золушка	65,0
2. Опрыскивание семян споровой суспензией патогена + выдерживание во влажной камере (24 ч) + посев	Фестивальная	28,6
	Золушка	72,0
3. Проращивание семян во влажной камере + опрыскивание суспензией спор + посев	Фестивальная	96,3
	Золушка	57,9
4. Проращивание семян во влажной камере на инокулюме + посев	Фестивальная	71,4
	Золушка	77,5

Только во втором варианте количество пораженных сеянцев сорта Фестивальная было на среднем уровне (28,6%), во всех остальных – на уровне 50% и выше. Что доказывает эффективность использования поверхностной инокуляции семян для отбора устойчивых форм на раннем этапе развития растений. Однако при постановке опытов важно учитывать трудозатраты и влияние различных факторов, которые могут определить исход заражения. Так, при длительной экспозиции зараженного семенного материала (4 вариант) во влажной камере существует вероятность появления несвойственных патогену видов грибов (вторичная инфекция). Посев в инфицированную почву и опрыскива-

ние семян споровой суспензией дают хороший положительный результат, просты в выполнении, однако вероятность попадания инфекции внутрь семян у них меньше, чем в 3 и 4 вариантах.

Заключение. Таким образом, в наших исследованиях заражение вертициллезом пророщенных во влажной камере семян споровой суспензией патогена оказалось наиболее эффективным. Количество пораженных сеянцев неустойчивого сорта было на уровне 96,3%, устойчивого сорта – 57,9%.

Близким по значению оказался результат заражения пророщенных семян во влажной камере на инокулюме (71,7% пораженных сеянцев неустойчивого сорта и 77,5% – устойчивого сорта). Однако этот способ менее технологичен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Говорова, Г. Ф. Земляника: прошлое, настоящее, будущее / Г. Ф. Говорова, Д.Н. Говоров – М.: ФГНУ «Росинформагоротех», 2004. – 348 с.
2. Наумов, Н. А. Методы микологических и фитопатологических исследований / Н.А. Наумов, М.: «Сельхозгиз», 1937. – 272 с.
3. Пугачев, Р. М. Эффективность соотношения 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. Рибака (м. Житомир, 19–20 листоп. 2015 р.). – Житомир: ЖНАЕУ, 2015. – С. 187-188.
4. 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.
5. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов / ВИЗР, под ред. М. К. Хохрякова: ВИЗР, 1974. – 69 с.
6. 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.
7. James V. Sinclair, Onkar Dev Dhingra. Basic Plant Pathology Methods / CRC Press 1995 - 448 P.
8. 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.
9. Żebrowska, J. I. Efficacy of resistance selection to Verticillium wilt in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) tissue cultur / J.I. Żebrowska // Acta agrobotanica / Soc. botanicorum poloniae. – Lublin. – 2011. – № 64 (3). – P. 3-11.
10. 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.
11. Наумова, Н. А. Анализ семян на грибную и бактериальную инфекцию / Н. А. Наумова – Л.: «Колос», 1970. – 208 с.
12. Шток, Д. А. О зараженности семян хлопчатника *Gossypium Hirsutum* грибом *Verticillium dahliae* Kleb / Д. А. Шток // Микология и фитопатология. – 1974. № 8,4. – С. 374-375.