

13. World-wide importance of Phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*) / B. D. L. Fitt [et al.] // *European Journal of Plant Pathology*. – 2006. – Vol. 114, no. 1. – P. 3–15.

14. Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape crops in China: costs and benefits / B. D. L. Fitt [et al.] // *Plant Pathology*. – 2008. – Vol. 57. – P. 652–664.

**EFFECT OF CULTIVATION CONDITIONS ON GROWTH RATE AND SPORE
FORMATION RATE OF CAUSAL AGENT OF RAPESEED PHOMOSIS
PHOMA LINGAM (TODE) DESM.
E.S. Byk, M.N. Shashko, Y.E. Piliuk**

*The research results of studying of a rapeseed root canker pathogen (*Phoma lingam* Tode. Desm.) under laboratory conditions with the purpose of determination of optimum conditions of phomosis pathogen cultivation in order to receive the maximum spore bearing culture to make an inoculum for plants infection are described in the paper. The research revealed that the composition of the artificial growth medium had a greater influence on growth rate and colony diameter than lighting conditions. For *P. lingam* colony growth, V-4 and CGA were optimal media. For the spore formation process of the pathogen, the lighting regime was the determining factor. Sun lamps significantly enhanced the ability of the fungus to produce spores.*

УДК 632.4:633.367(476)

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АНТРАКНОЗА
ЛЮПИНА В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ**

Ю.А. Дашкевич¹, научный сотрудник, **Ю.К. Шашко²**, доктор с.-х. наук

¹РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

²РУП «Институт почвоведения и агрохимии»

(Поступила 23.03.2022)

Рецензент: Шор В.Ч., кандидат с.-х. наук

Аннотация. В работе представлены результаты исследований по определению оптимальных питательных сред и условий культивирования возбудителя антракноза люпина (*Colletotrichum lupini*). Проведены наблюдения за характером и скоростью роста патогена, прорастанием спор и интенсивностью споруляции. Установлен оптимальный световой режим при культивировании возбудителя. Лабораторным методом определена агрессивность штаммов возбудителя антракноза на сорте люпина узколистного Миртан. Выявлено влияние инфекционного процесса на ростовые характеристики проростков люпина при инокуляции семян в споровой суспензии патогена.

Из всего комплекса болезней, встречающихся на люпине, наибольшую опасность представляет антракноз. Потери урожая в условиях сильной эпифи-

тотии от данной болезни достигают 90,0–100,0 % [1, 2, 3]. В Беларуси в 1998 г. болезнь распространилась по всей территории на люпине желтом. Массовое поражение посевов антракнозом привело к сокращению посевных площадей данной культуры [4, 5]. На узколистном люпине в естественных условиях развивается патоген того же вида, что и на желтом, однако в целом, узколистный люпин более устойчив к антракнозу [6].

Возбудителем антракноза люпина является несовершенный меланкониевый гриб *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (*Deuteromycota*, *Coelomycetes*, *Melanconiales*, *Colletotrichum*) [7]. В настоящее время возбудитель идентифицирован как *Colletotrichum lupini* (Bondar) Damm.

Антракноз поражает все надземные органы растений люпина: стебли, листья, черешки листьев, цветоносы, бобы и семена [5, 8, 10]. Учеными доказано, что антракнозом сильнее поражаются молодые ткани растений по сравнению с физиологически более зрелыми, а генеративные органы люпина быстрее инфицируются грибом, чем вегетативные [10, 11].

Для развития патогена благоприятна влажная, теплая погода со среднесуточной температурой не ниже +18 °С. По данным О.С. Кунгурцевой, оптимальная температура для развития гриба находится в интервале +20–25 °С, когда наблюдается максимум роста мицелия, интенсивный процесс конидиеобразования, а при заражении отмечается минимальный инкубационный период [9]. По данным Л.Ф. Савченко и О.Л. Рудаковой, возобновление роста чистой культуры гриба после длительного воздействия отрицательных температур происходит практически безболезненно. Хранение культуры возбудителя при -20 °С не влияет на его жизнеспособность [12]. Интенсивность развития болезни в полевых условиях в большей степени зависит от влажности воздуха. Если температура воздуха будет благоприятной для развития патогена (что и наблюдается практически все последние годы), но она не будет сочетаться с высокой влажностью (80 % и более) и часто выпадающими осадками, вредоносность антракноза будет незначительной [9].

Целью наших исследований являлось изучение биологических особенностей патогена, условий культивирования, а также изменчивости популяции возбудителя для создания искусственного инфекционного фона в полевых условиях и фитотронно-тепличном комплексе (ФТК).

Материалы и методика проведения исследований. Исследования проводили в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» в лаборатории иммунитета.

Возбудителя антракноза люпина выделяли в чистую культуру из пораженных вегетативных частей растений, створок бобов, собранных на территории республики при проведении маршрутных обследований. Небольшие кусочки ткани с признаками поражения промывали под струей проточной воды 30–40 минут, стерилизовали 96 % спиртом в течение 2 мин. с последующим трехкратным ополаскиванием в кипяченой воде. Затем раскладывали во влажную камеру (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой). Чашки помещали в термостат при температуре +22–25 °С. В течение 3–5 суток вокруг кусочков по-

раженной ткани образовывался мицелий гриба. С помощью иглы мицелий переносили на питательную среду в чашки Петри для дальнейшей инкубации [14]. Нами проводился подбор наиболее подходящей питательной среды. Изучались следующие питательные среды: картофельно-глюкозный агар (КГА); люпиново-глюкозный агар (ЛГА); горохово-глюкозный агар (ГГА); овощная среда (V-4); модифицированная среда Чапека (ЧЛМ); среда Чапека; дрожжевая среда [13].

Посев чистой культуры гриба проводили в стерильных условиях одновременно на различные среды в центр чашек Петри (в трех повторностях). На 3-и сутки после посева чистой культуры чашки Петри с изучаемыми средами были помещены в различные условия освещения. Наблюдения за ростом и развитием патогена (скорость роста, характер спороношения, внешний вид колоний и т.д.) проводили в течение 11 суток. Определяли диаметр колоний и рассчитывали их площадь.

Агрессивность штаммов возбудителя антракноза люпина определяли с использованием метода рулонов. Оценку проводили в лабораторных условиях при высокой инфекционной нагрузке возбудителя. Проростки находились в состоянии постоянного увлажнения, так как рулоны помещали в сосуды с водой. Для инокуляции семян использовали водную суспензию спор возбудителя, плотность инокулята не менее 3×10^6 спор в 1 мл раствора. Экспозиция при этом составляла 8–12 часов. Инокулированные семена раскладывали в рулоны по 25 шт. в 4-кратной повторности. Учитывали развитие болезни на 7–9-й день. Рулон разворачивали и оценивали каждый проросток по 5-ти бальной шкале [14] (рисунок 1).



Рисунок 1 – Шкала учета антракноза на проростках

0 – признаки поражения отсутствуют;

1 – небольшие светло-коричневые пятнышки на семядолях, штрихи на подсемядольном колене или корневой шейке;

2 – на семядолях оранжево-бурые язвы, приводящие к засыханию семядолей, пятна на подсемядольном колене или корневой шейке, занимающие до 1/3 окружности стебля;

3 – на подсемядольном колене или корневой шейке пятна с разрывом, охватывающие до 2/3 окружности стебля, побурение корешка;

4 – некроз охватывает весь стебель проростка, образуется перетяжка, полное побурение и засыхание корешка, мацерация и гибель проростка [15].

Результаты исследований и их обсуждение. Чашки Петри с изучаемыми питательными средами были помещены в различные условия освещения: без освещения в термостате; с освещением ближним УФ-светом под эритемной лампой с 12 часовым освещением; естественное (солнечное) освещение.

Исследования показали, что максимальный рост колоний на 5-е сутки наблюдался при культивировании чистой культуры возбудителя в темноте в термостате и под эритемной лампой с 12-и часовым режимом освещения на средах КГА, ЛГА, ГГА и V-4. Площадь колоний находилась в пределах 16,6–20,4 см². (таблица 1). Медленнее всего колонии гриба росли на среде ЧЛМ при естественном освещении – 2,5 см².

На 11-е сутки в термостате (без освещения) и под эритемной лампой с 12-и часовым режимом освещения на средах КГА, ЛГА, ГГА и V-4 колония гриба заполнила всю чашку Петри и ее площадь составила 63,6 см².

Таблица 1 – Скорость роста колоний возбудителя антракноза на разных питательных средах в зависимости от освещения

Питательная среда	Условия культивирования		
	термостат (без освещения)	эритемная лампа (с УФ-светом)	естественное освещение (солнечное)
Площадь колоний на 5-е сутки, см ²			
КГА	16,6	15,9	9,6
ЛГА	16,6	15,9	13,2
ГГА	20,4	19,6	13,8
V-4	18,1	17,3	15,2
ЧЛМ	4,5	3,8	2,5
Чапекa	4,9	4,9	4,9
Дрожжевая	15,2	15,2	11,3
<i>среднее</i>	<i>13,8</i>	<i>13,2</i>	<i>10,1</i>
Площадь колоний на 11-е сутки, см ²			
КГА	63,6	63,6	44,2
ЛГА	63,6	63,6	50,2
ГГА	63,6	63,6	49,0
V-4	63,6	63,6	46,5
ЧЛМ	26,4	18,1	13,8
Чапекa	23,7	21,2	14,5
Дрожжевая	50,2	45,3	43,0
<i>среднее</i>	<i>50,7</i>	<i>48,4</i>	<i>37,3</i>

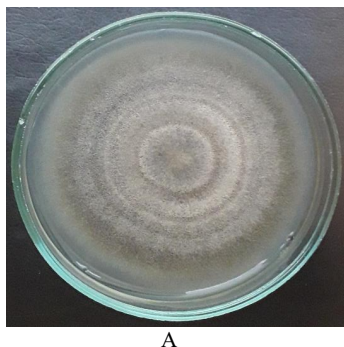
Результаты исследования показали, что обильное спороношение гриба наблюдалось при культивировании чистой культуры *Colletotrichum lupini* под

эритемной лампой с 12-и часовым режимом освещения на всех изучаемых средах. Плотность инокулюма колебалась в пределах $7,5\text{--}24,8 \times 10^6$ спор в 1 мл воды (таблица 2).

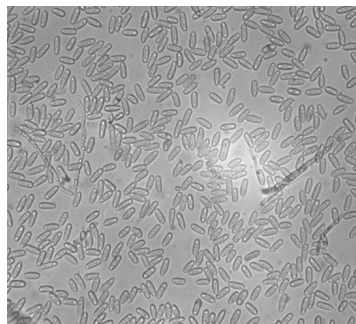
Таблица 2 – Влияние освещения на интенсивность спороношения патогена на 11-е сутки

Питательная среда	Плотность инокулюма, спор/1 мл воды		
	термостат (без освещения)	эритемная лампа (с УФ-светом)	естественное освещение (солнечное)
КГА	$4,5 \times 10^6$	$19,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
ЛГА	$4,7 \times 10^6$	$24,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
ГГА	$4,1 \times 10^6$	$11,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
V-4	$3,4 \times 10^6$	$13,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
ЧЛМ	$2,1 \times 10^6$	$10,5 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$
Чапекса	$3,7 \times 10^6$	$17,1 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
Дрожжевая	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$0,4 \times 10^6$

Максимальное спороношение на 11-е сутки наблюдалось на среде ЛГА – $24,8 \times 10^6$ спор в 1 мл воды, которая изготавливалась на основе вытяжки из семян люпина, что не противоречит данным литературных источников (рисунок 2 – А), а также на среде КГА ($19,8 \times 10^6$). По внешнему виду колония гриба на среде ЛГА правильно округлой формы, мицелий войлочный от светло до темно-серого оттенка. На мицелии появлялись ацервулы (конидиальные ложа). Они располагались концентрическими кругами по поверхности колонии. В ацервулах образовывались многочисленные конидии, придающие им розово-оранжевый цвет. Споры гриба овально удлинённые, эллипсоидальные, разных размеров $(11\text{--}24) \times (4\text{--}6)$ мкм, бесцветные, многочисленные (рисунок 2 – Б).



А



Б

Рисунок 2 – А - внешний вид колонии возбудителя антракноза люпина (*Colletotrichum lupini*), Б - конидии возбудителя антракноза при увеличении $\times 400$ (среда ЛГА)

Скорость прорастания спор *Colletotrichum lupini* связана с температурным фактором, важной фазой является образование ростковой трубки, которой осуществляется внедрение патогена в ткани растения-хозяина (рисунок 3).



Рисунок 3 – Прорастание спор *Colletotrichum lupini* через 3,0-3,5 часа

Для исследования готовили водную суспензию патогена с разведением 1:10 и 1 мл инокулюма помещали на предметное стекло с предварительно нанесенной агаризованной питательной средой. Препарат оставляли в чашке Петри с увлажненной фильтровальной бумагой для предотвращения испарения влаги. Наблюдения за прорастанием спор проводили под микроскопом через равные промежутки времени. Нами было установлено, что единичные споры начинали прорастать через 3,0–3,5 часа при температуре +22–25 °С. Большинство спор образовывали ростковые трубки через 6–7 часов. По нашим наблюдениям, единично расположенные споры прорастали быстрее, чем те, которые находились близко друг к другу. Возможно, это связано с большей площадью питания отдельно расположенной споры.

При помещении чашки Петри с препаратом в холодильную камеру при температуре +5 °С в течение трех суток прорастания спор не наблюдалось. Таким образом, если готовый для заражения растений люпина готовый инокулюм не был использован из-за неблагоприятных погодных условий или остался в достаточном количестве после заражения, возможно хранение готовой суспензии в условиях холодильной камеры в течение трех суток. В этот период времени споры находились в покоем состоянии без потери жизнеспособности.

Большое значение для инокуляции растений люпина антракнозом имеет агрессивность штамма патогена, то есть способность его в той или иной степени вызывать поражение растений. В лабораторных условиях методом рулонов был проведен опыт в фазу проростков для определения агрессивности штаммов возбудителя антракноза с сортом *Миртан*, обладающим повышенной устойчивостью к антракнозу (таблица 3).

Выявлено влияние инфекционного процесса антракноза на ростовые характеристики растений люпина. Заражение агрессивными штаммами возбудителя *Colletotrichum lupini* в значительной степени снижало длину проростков и корней, чем слабоагрессивных, по сравнению с контролем (таблица 3, рисунок 4).

При заражении агрессивным штаммом 17.12 длина проростка снизилась максимально и составила 4,1 см. При инокуляции штаммом 17.10 наблюдалось максимальное снижение длины корней (3,6 см) по сравнению с незараженными растениями (13,2 см). При заражении слабоагрессивными штаммами 17.3,

Таблица 3 – Агрессивность штаммов возбудителя антракноза люпина на сорте Миртан в фазу проростков

Штамм	Всхожесть, %	Развитие болезни, %	Спороношение, (шт/1 мл)	Ростовые характеристики	
				ср. длина проростка, см ±ДИ	ср. длина корня, см ±ДИ
Контроль	98,0	-	-	11,5±0,9	13,2±0,9
17.1	96,0	51,0	2,7×10 ⁶	9,4±1,1*	8,9±1,0*
17.2	98,0	70,5	2,4×10 ⁶	6,0±0,7*	6,0±0,6*
17.3	98,0	36,5	1,2×10 ⁶	11,2±0,9	11,8±0,9
17.4	94,0	72,0	5,0×10 ⁶	6,8±1,1*	6,2±0,7*
17.5	90,0	67,5	2,8×10 ⁶	7,1±0,9*	6,2±0,8*
17.6	92,0	62,0	4,0×10 ⁶	6,3±0,7*	6,5±0,7*
17.7	94,0	72,5	6,3×10 ⁶	6,1±0,8*	5,8±0,8*
17.8	98,0	64,0	3,8×10 ⁶	8,2±0,8*	8,0±0,9*
17.9	96,0	74,5	5,9×10 ⁶	5,4±0,6*	5,2±0,5*
17.10	92,0	97,0	2,5×10⁶	4,3±0,6*	3,6±0,4*
17.11	98,0	72,0	5,4×10 ⁶	9,0±0,9*	8,6±0,8*
17.12	92,0	88,0	4,8×10⁶	4,1±0,4*	4,3±0,7*
17.13	98,0	76,0	4,6×10 ⁶	6,6±0,7*	5,5±0,6*
17.14	94,0	64,0	3,0×10 ⁶	8,9±0,8*	8,8±0,8*
17.15	100,0	82,5	3,2×10 ⁶	5,7±0,7*	5,5±0,4*
17.17	90,0	74,0	6,0×10 ⁶	7,5±1,4*	7,2±1,6*
17.18	100,0	58,5	7,8×10 ⁶	9,6±0,8*	8,5±0,8*
17.19	92,0	40,5	1,5×10 ⁶	10,6±1,1	11,5±0,9
17.20	94,0	78,0	6,9×10 ⁶	9,3±0,8*	10,5±0,8*
17.21	98,0	58,5	5,7×10 ⁶	5,9±0,9*	5,6±0,8*
17.22	94,0	54,5	2,8×10 ⁶	8,6±0,7*	10,3±0,8*
17.23	98,0	41,0	1,2×10 ⁶	11,4±1,2	10,1±1,5

* - статистически меньше контрольного варианта

17.19, и 17.23 наблюдалось минимальное угнетение проростков от инфекции антракноза, средняя длина снизилась на 0,1–0,9 см по сравнению с контролем. Также при заражении данными штаммами наблюдалось незначительное снижение длины корней – 1,4–3,1 см.

При определении интенсивности спороношения было установлено, что у 12 штаммов наблюдалось обильное спороношение гриба, более 3,1×10⁶ спор в 1 мл воды (3,0×10⁶ считается оптимальной плотностью инокулюма для проведения искусственного заражения на инфекционном фоне, т.е. споровую суспензию, полученную из данных штаммов можно использовать без разбавления), у 6 штаммов менее интенсивное – 1,6–3,0×10⁶ (требуется концентрация споровой суспензии), у трех слабое – 1,2–1,5×10⁶.

Выводы

1. Для стимуляции спороношения и получения максимального количества инокулюма необходимо обязательное использование эритемной лампы ЭЛ-30 с12-и часовым режимом освещения. При этом оптимальными питательными

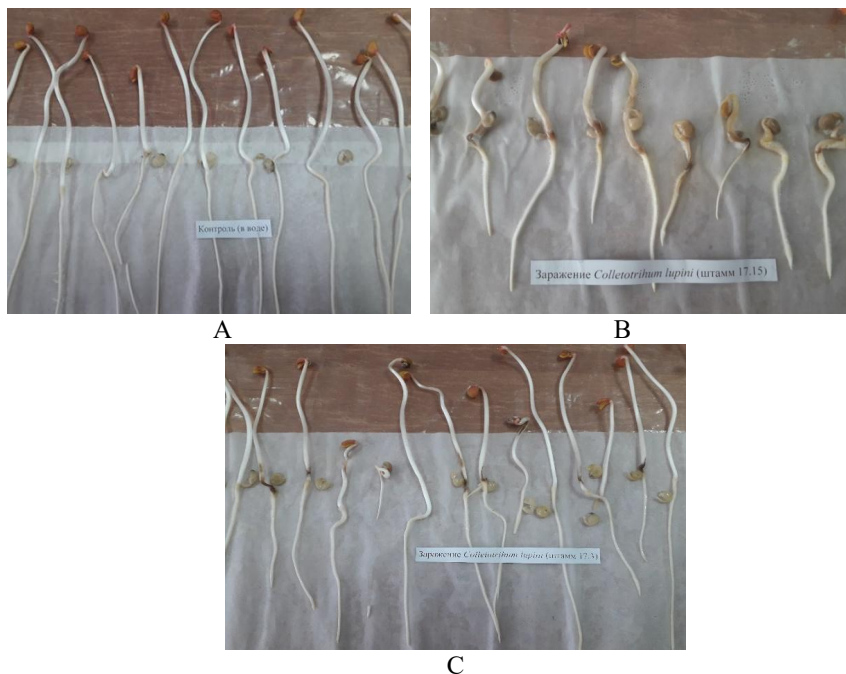


Рисунок 4 – Внешний вид проростков и корней растений люпина на 7-е сутки, А – контроль (в воде), В – при заражении агрессивным штаммом 17.15, С – при заражении слабоагрессивным штаммом 17.3

средами для культивирования возбудителя антракноза являются среды: ЛГА, плотность инокулюма $24,8 \times 10^6$ и КГА – $19,8 \times 10^6$ соответственно.

2. Готовую споровую суспензию можно хранить в условиях холодильной камеры при температуре $+5^\circ\text{C}$ в течение трех суток. В этот период времени споры находятся в покоем состоянии без потери жизнеспособности.

3. Высоко агрессивными оказались штаммы возбудителя антракноза 17,10 и 17,12, при инокуляции растений развитие болезни составило 88,0 и 97,0 %. Для получения высококачественного инокулюма при создании инфекционного фона необходимо использовать популяцию из смеси высокоагрессивных штаммов.

Литература

1. Рябичева, А.Е. Результаты и перспективы селекции желтого и узколистного люпина на устойчивость к антракнозу / А.Е. Рябичева [и др.] // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2014. – №4. – С. 72.
2. Вишнякова, М.А. Алкалоиды люпина узколистного как фактор, определяющий альтернативные пути использования и селекции культуры / М.А. Вишнякова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – №24(6). – С. 625–635.
3. Гатаулина, Г.Г. Технология возделывания белого люпина / Г.Г. Гатаулина [и др.] // Белгородский НИИСХ. – 2009. – С. 27.

4. *Иванюк, В.Г.* Антракноз люпина в Беларуси / В.Г. Иванюк, Д.О. Евсиков // Защита и карантин растений. – 2001. – №8. – С. 16–18.
5. *Гаджиева, Г.И.* Методические указания по определению зараженности семян люпина антракнозом / Г.И. Гаджиева, Н.С. Гутковская. – РУП «Институт защиты растений». – Минск, 2013. – 20 с.
6. *Евсиков, Д.О.* Антракноз люпина и разработка мер борьбы с ним в условиях Беларуси: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.01/ Д.О. Евсиков; БелИЗР. – Прилуки, 2002. – 20 с.
7. *Кунгурцева, О.В.* Методы мониторинга антракноза люпина / О.В. Кунгурцева // Методы мониторинга и прогноза развития вредных организмов. – С.-Пб.: ВИЗР, 2002. – С. 75–81.
8. *Корнейчук, Н.С.* Грибные болезни люпинов / Н.С. Корнейчук. – Киев: «Колобиг», 2010. – 376 с.
9. *Кунгурцева, О.В.* Биоэкологические особенности возбудителя антракноза люпина: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.11 / О.В. Кунгурцева; ВИЗР. – Пушкин, 2006. – 19 с.
10. *Пимохова, Л.И.* Агротехнические и химические приемы снижения поражаемости люпина антракнозом / Л.И. Пимохова, Ж.В. Царапнева // Защита сельскохозяйственных растений и леса от вредителей, болезней и вредных метеорологических факторов. – 2008. – № 6. – С. 41–43.
11. *Резвякова, С.В.* Защита люпина белого от антракноза / С.В. Резвякова, А.С. Архангельская // Вестник аграрной науки [Электронный ресурс] 3(72). – 2018. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/zaschita-lyupina-belogo-ot-antraknoza>. – Дата доступа: 06.01.2021.
12. *Савченко, Л.Ф.* Паразитические свойства возбудителя антракноза люпина / Л.Ф. Савченко, О.Л. Рудаков // Состояние и перспективы люпиносеяния: тез. докл. Междунар. научно-практ. конф.: ВНИИ люпина. Брянск. – 2001. – С. 58–60.
13. Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам: метод. Рекомендации; сост.: Е.Е Радченко [и др.]. – Москва, 2008. – 416 с.
14. *Шашко, Ю.К.* Создание инфекционных фонов возбудителя антракноза узколистного люпина (*Colletotrichum lupini*): методические рекомендации / Ю. К. Шашко [и др.] Жоди-но, 2014 – 22 с.
15. *Якушева, А.С.* Методика определения зараженности семян люпина антракнозом / А.С. Якушева, А.И. Самошкина // Сб. метод. рекомендаций по защите растений. – С.-Пб, 1998. – С. 230231.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LUPINE ANTHRACNOSE PATHOGEN IN BELARUS

Y.A. Dashkevich, Y.K. Shashko

*The results of studies on optimum nutrient media and cultivation conditions of lupine anthracnose pathogen (*Colletotrichum lupini*) are presented in the paper. The nature and growth rate of the pathogen, spore germination and sporulation rate were monitored. The optimum light regime for pathogen cultivation was determined. The aggressiveness of anthracnose pathogen strains on blue lupine variety Mirtan was determined by a laboratory method. The influence of infection process on growth characteristics of lupine seedlings during seed inoculation in spore suspension of pathogen was revealed.*