
БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.95 (470.333)

КОЛЛЕКЦИЯ ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ АНТРАКНОЗА ЛЮПИНА *COLLETOTRICHUM LUPINI* COMB. NOV. И ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ РОСТА *IN VITRO*

© И. Я. Нам¹, В. В. Заякин¹, Ю. К. Шашко², М. С. Кобозева¹, Л. А. Земскова¹, М. А. Новикова¹
I. Ya. Nam¹, V. V. Zayakin¹, Yu. K. Shashko², M. S. Kobozeva¹, L. A. Zemskova¹, M. A. Novikova¹

Collection of isolates of an anthracnose of lupine agent *Colletotrichum lupini* comb. nov.
and their growth characteristics *in vitro*

¹ ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет имени академика И. Г. Петровского»
241036, Россия, г. Брянск, ул. Бежицкая, д. 14. Тел.: +7 (919) 198-25-81, e-mail: vladimir.zajackin@yandex.ru

² РУП НПЦ по земледелию НАН Беларуси
222160, Республика Беларусь, г. Жодино, ул. Тимирязева, д. 1. Тел.: +375 (1775) 3 25 68, e-mail: shashko_y@tut.by

Аннотация. Собрана представительная коллекция из более 60 моноспоровых изолятов возбудителя антракноза люпина с территории разных районов Беларуси, Брянской и Смоленской областей России, с пораженного материала трёх культурных видов люпина и дикорастущего *Lupinus polyphyllus* Lindl., разных лет сбора (2012–2017 гг.). Изучены некоторые морфо-физиологические характеристики изолятов. По скорости роста выделяются три группы изолятов: большинство имеют среднюю скорость роста, небольшие группы изолятов растут примерно в два раза быстрее или медленнее основной группы. Наибольшее разнообразие по морфо-физиологическим признакам наблюдается среди изолятов, выделенных из поражённого растительного материала ВНИИ люпина (Россия, Брянская область), в котором собрана обширная коллекция сорто-образцов люпина разного географического происхождения и создан искусственный антракнозный инфекционный фон для селекции люпина на устойчивость.

Ключевые слова: антракноз люпина, *Colletotrichum lupini*, коллекция изолятов, рост *in vitro*.

Abstract. A representative collection of more than 60 monosporous isolates of *Colletotrichum lupini*, causing agent for lupin anthracnose disease was created. Isolates were obtained from infected plant material cultivated at different locations in Belarus and the Bryansk and Smolensk regions of Russia in 2012–2017 and they were collected from three agricultural lupin species (*Lupinus angustifolius* L., *L. luteus* L., *L. albus* L.) and wild-growing *L. polyphyllus* Lindl. The collection was investigated for colony growth characteristics. Most of isolates have middle growth rates, but some groups of isolates have nearly double or half growth rates. Most morphological and growth diversity of isolates was revealed at fields of Russian lupin (Michurinsky, Bryansk region). A great collection of lupin cultivars from different geographic locations is gathered.

Keywords: anthracnose of lupine, *Colletotrichum lupini*, collection of isolates, growth *in vitro*.

DOI: 10.22281/2307-4353-2018-2-43-49

Введение

Культурные виды люпина являются ценными белковыми кормовыми растениями для Средней полосы России. Их посевные площади сократились многократно в результате массового распространения заболевания антракнозом (Такунов, 1996). Под термином «антракноз» понимается большая группа заболеваний, вызываемых несовершенными грибами нескольких родов, преимущественно рода *Colletotrichum*, у сельскохозяйственных, декоративных и дикорастущих растений (Cannon et al., 2012). Несмотря на значительное число различий, считается, что в странах Средиземноморья и Америки антракноз культурных видов люпина вызывается, главным образом, *Colletotrichum lupini* (Nirenberg et al., 2002;

Damm et al., 2012), который является родоспецифичным, хотя чаще возбудитель антракноза видоспецифичен по отношению к растениям-хозяевам.

Биоразнообразие возбудителя антракноза люпина на территории России и Беларуси слабо изучено, в литературе имеются только единичные публикации белорусских учёных (Шашко, 2011). Целью данной работы является предварительное описание представительной коллекции изолятов возбудителя антракноза люпина, собранной на территории России и Беларуси по некоторым морфо-физиологическим характеристикам роста на питательной среде.

Материалы и методы

Коллекция изолятов возбудителя антракноза создавалась в 2015–2017 гг. путем высева на питательную среду Чапека материала из участков антракнозного поражения бобов, стеблей и листьев разных видов люпина и последующего выделения моноспоровых культур. Использовался предоставленный сотрудниками ВНИИ люпина поражённый растительный материал, собранный в 2011–2017 гг. с трёх культурных видов люпина на полях ВНИИ люпина (п. Мичуринский, Брянская область); растительный материал, собранный нами в 2014–2017 гг. на полях ВНИИ люпина и в ходе экспедиции в Беларусь и Смоленскую область (дикорастущий многолистный люпин и культурные виды люпина). Кроме того, сотрудники НПЦ по земледелию НАН Беларуси любезно предоставили для работы готовую коллекцию изолятов прошлых лет выделения.

Таким образом, в настоящий момент собрана достаточно представительная коллекция изолятов, как с дикорастущего многолетнего люпина многолистного (*Lupinus polyphyllus* Lindl.), считающегося основным природным резерватом возбудителя, так и с трёх основных культурных видов люпина (*Lupinus angustifolius* L., *L. luteus* L., *L. albus* L.), возделываемых в России и Беларуси (табл. 1–3). С одного поражённого растительного образца обычно выделяли 2–4 изолята, но в абсолютном большинстве случаев изоляты, выделенные из одного растительного образца, оказывались идентичными как по культуральным признакам, так и по молекулярно-генетическим данным ISSR-анализа. В таких случаях для дальнейшей работы оставляли по одному изоляту с образца. Именно такие изоляты показаны в табл. 1–3. Общее количество первоначально выделенных изолятов значительно больше. Исключением являются изоляты 52.1 и 52.2, а также 4.1м и 4.2м, которые значительно различаются по культуральным и генетическим характеристикам, хотя и были выделены из одного растительного образца. Вероятно, в этих случаях имела смешанная инфекция.

Таблица 1

Коллекция изолятов, полученных в НПЦ по земледелию (Республика Беларусь, г. Жодино)

№ п. п.	№ исходный и обозначение	Район сбора
Минская область		
1.	3ж	Березинский
2.	15ж	Смолевичский (г. Жодино)
3.	16ж	Осиповичский
4.	17ж	Джержинский
5.	18ж	Столбцовский
Могилёвская область		
6.	6ж	Горецкий
7.	7ж	Горецкий
8.	9ж	Бельнический
Витебская область		
9.	11ж	Витебский
10.	12ж	Дубровенский
11.	13ж	Оршанский
12.	14ж	Толочинский
Гродненская область		
13.	19ж	Кореличский
14.	20ж	Дятловский
15.	21ж	Новогрудский
Брестская область		
16.	23ж	Пружанский

Таблица 2

Изоляты *C. lupini*, выделенные из растительного материала, собранного в разные годы на полях ВНИИ люпина

№ п. п.	Обозначение изолята	Вид люпина, сорто-образец	Год сбора поражённого растительного материала	Год выделения изолята
1.	№ 3	Люпин узколистный, сорт Радужный	2012	2016
2.	№ 4	Л. узколистный, сорт Олигарх	2012	2016
3.	47	Л. жёлтый, сорт Престиж	2013	2016
4.	48	Л. белый, сорт Дега	2013	2016
5.	49	Л. белый, сорт Десянский	2013	2016
6.	52.1	Л. жёлтый, сорт Надежный	2015	2016
7.	52.2	Л. жёлтый, сорт Надежный	2015	2016
8.	53	Л. жёлтый, сорт Новозыбковский	2015	2016
9.	54	Л. белый, сорт Дега	2015	2016
10.	55	Л. узколистный, образец АИФ-15	2015	2016
11.	1.3	Л. узколистный, образец АИФ-14	2014	2015
12.	1.4	Л. узколистный, сорт Снежить	2014	2015
13.	1м	Л. белый, селекционный питомник	2016	2017
14.	2м	Л. узколистный в смешанных посевах	2016	2017
15.	3м	Л. белый, сорт Дега	2016	2017
16.	4.1м	Л. узколистный в смешанных посевах	2016	2017
17.	4.2м	Л. узколистный в смешанных посевах	2016	2017
18.	5м	Л. жёлтый, селекционный питомник	2016	2017
19.	6м	Л. жёлтый, селекционный питомник	2016	2017
20.	7м	Л. белый, сорт Дега	2016	2017
21.	17/1	Л. белый	2017	2017
22.	17/2	Л. белый	2017	2017
23.	17/3	Л. белый	2017	2017
24.	17/4	Л. белый	2017	2017
25.	17/5	Л. белый	2017	2017
26.	17/6	Л. белый	2017	2017
27.	17/7	Л. белый	2017	2017
28.	17/8	Л. белый	2017	2017
29.	17/9	Л. белый	2017	2017

Таблица 3

Изоляты *C. lupini*, выделенные из растительного материала, собранного в 2016 г. в Беларуси и Смоленской области России

№ п. п.	Обозначение изолята	Вид люпина	Место сбора поражённого растительного материала
1.	1Б	Люпин многолистный	г. Жодино
2.	2Б	Л. узколистный	Минская область, Смолевичский район, г. Жодино, инфекционный фон
3.	3Б	Л. узколистный	
4.	4Б	Л. узколистный (зеленоукосный)	
5.	5Б	Л. узколистный	
6.	6Б	Л. узколистный	
7.	8Б	Л. многолистный	Минская область, Смолевичский район, у г. Жодино, со старого антракнозного фона
8.	9Б	Л. многолистный	
9.	10Б	Л. многолистный	Витебская область, Толочинский район
10.	11Б	Л. многолистный	Минская область, Держинский район, н. п. Плоское
11.	12Б	Л. многолистный	Витебская область, Толочинский р-н, н. п. Рыжичи
12.	13Б	Л. многолистный	Витебская область, Оршанский район, г. Орша
13.	14Б	Л. многолистный	Витебская область, Дубровенский район
14.	15Б	Л. многолистный	Витебская область, Дубровенский район
15.	16Б	Л. многолистный	Витебская область, Дубровенский район
16.	17Б	Л. многолистный	Витебская область, Оршанский район, н. п. Бороздечи
17.	18Б	Л. многолистный	Могилёвская область, Горецкий район, н. п. Зубра
18.	19Б	Л. многолистный	Смоленская область, Рославльский район, г. Рославль
19.	20Б	Л. многолистный	Смоленская область, Рославльский район, г. Рославль
20.	21Б	Л. многолистный	Могилёвская область, г. Могилёв, мост через р. Днепр
21.	22Б	Л. многолистный	Могилёвская область, н. п. Прилесье

Каждую грибную культуру культивировали на свету при комнатной температуре на питательных средах, наиболее часто рекомендуемых для возбудителей антракноза люпина отечественными и зарубежными исследователями: среде Чапека и средах, содержащих картофельный отвар и отвар семян люпина (Гаджиева, 2013; Котова, 2014) в 3–4 биологических повторностях.

По предварительным данным молекулярно-генетического анализа по ITS-областям (внутренние транскрибируемые спейсеры кластеров рибосомальных генов), все изоляты относятся к кластеру (кладе) видов *Colletotrichum acutatum*, в который входит и *C. lupini* (в печати). Спорный анализ также подтверждает принадлежность изолятов к роду *Colletotrichum*.

При изучении скорости роста через определённые промежутки времени измеряли диаметр колоний в двух направлениях и для дальнейших расчётов использовали среднее значение. Отрезками на диаграммах (рис. 1–3) отмечены стандартные ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

Таким образом, в настоящее время в коллекции имеется более 60 изолятов возбудителя антракноза из четырёх видов люпина, нескольких различных регионов России и Беларуси, поражавших люпин с 2011 по 2017 гг. При получении изолятов из материала, хранившегося разное время, можно отметить, что по всей видимости, при хранении происходит потеря жизнеспособности спор возбудителя антракноза. Так из 4 образцов 2011 г. не удалось получить ни одного изолята, из 7 образцов 2012 г., несмотря на массивованные повторные посевы, удалось получить только два изолята; из образцов 2013 г., тоже только с помощью многократных посевов, удалось получить 3 изолята из четырёх образцов. То есть уже через 3 года подавляющая часть спор теряет жизнеспособность, а через пять лет происходит полная потеря их жизнеспособности. Эти данные согласуются с агротехническими рекомендациями для борьбы с антракнозом – проводить посев семенами, которые хранились не менее 2 лет.

Окраска колоний, плотность и вид воздушного мицелия, другие характеристики колоний варьируют не только в зависимости от среды, но и от условий культивирования, а также количества пассажей после изоляции с растительного материала. Иногда такие изменения могут быть очень резкими. По мере роста и старения культуры вид колоний также сильно меняется. Поскольку мы не имели возможности провести сравнение колоний всех изолятов сразу после выделения, анализ проводили после длительного культивирования в лабораторных условиях и многократного пересева, что привело к частичной стабилизации параметров роста изолятов. У части молодых колоний в период активного роста просматриваются оттенки розового цвета, у остальных – серого, особенно на агаре Чапека. В целом можно отметить, что на среде с картофельным отваром почти всегда окраска темнее, чем на агаре Чапека, а стареющие колонии приобретают тёмно-коричневый или чёрный цвет. Исключение составляют 12ж, 21ж, 11Б, 12Б, 16Б, 1.4, 52.2, 48 и 49 – светлоокрашенные, и 4.2М – бежевая на картофельном агаре и чёрно-коричневая на агаре Чапека. Отличаются от всех образцов: 5.1М – интенсивно красная в период активного роста на обеих средах, а 48 и 49 – жёлто-оранжевые с обратной стороны и светлые с сажистым налетом в виде колец при старении с верхней стороны. То есть разнообразие изолятов по внешним признакам значительно выше среди изолятов с полей ВНИИ люпина.

Как видно из представленных данных, большая часть изолятов за неделю образует колонии диаметром 20–35 мм и только два изолята 12ж и 21ж растут примерно в два раза медленнее, что проиллюстрировано линиями тренда на рисунке для образцов каждой из групп.

На рис. 2 показаны аналогичные данные для изолятов, выделенных из поражённого растительного материала узколистного и дикого многолистного люпинов, собранного в ходе поездки 2016 г. (табл. 3).

Подобно изолятам, представленным на предыдущем рисунке, большая часть вырастает за 6–8 дней до 25–40 мм (линия тренда для изолята 22Б). Изоляты 11Б и 16Б, наоборот, растут почти в два раза быстрее.

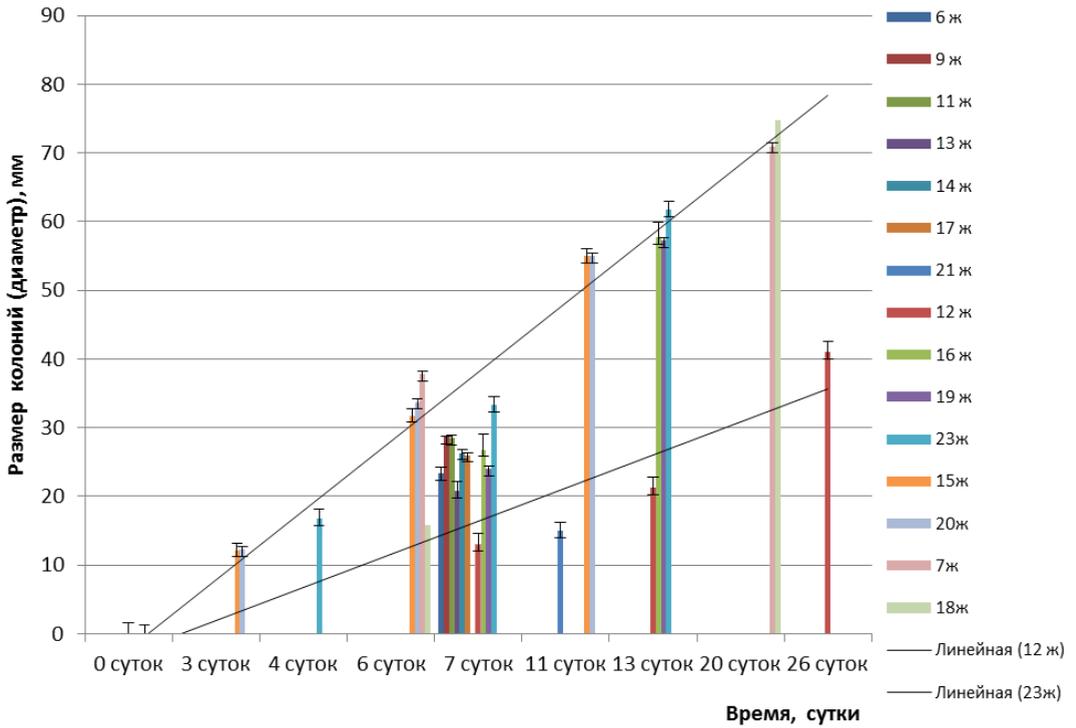


Рис. 1. Динамика роста на среде Чапека изолятов возбудителя антракноза из коллекции НПЦ по земледелию (Республика Беларусь, г. Жодино). Отрезками показаны ошибки среднего.

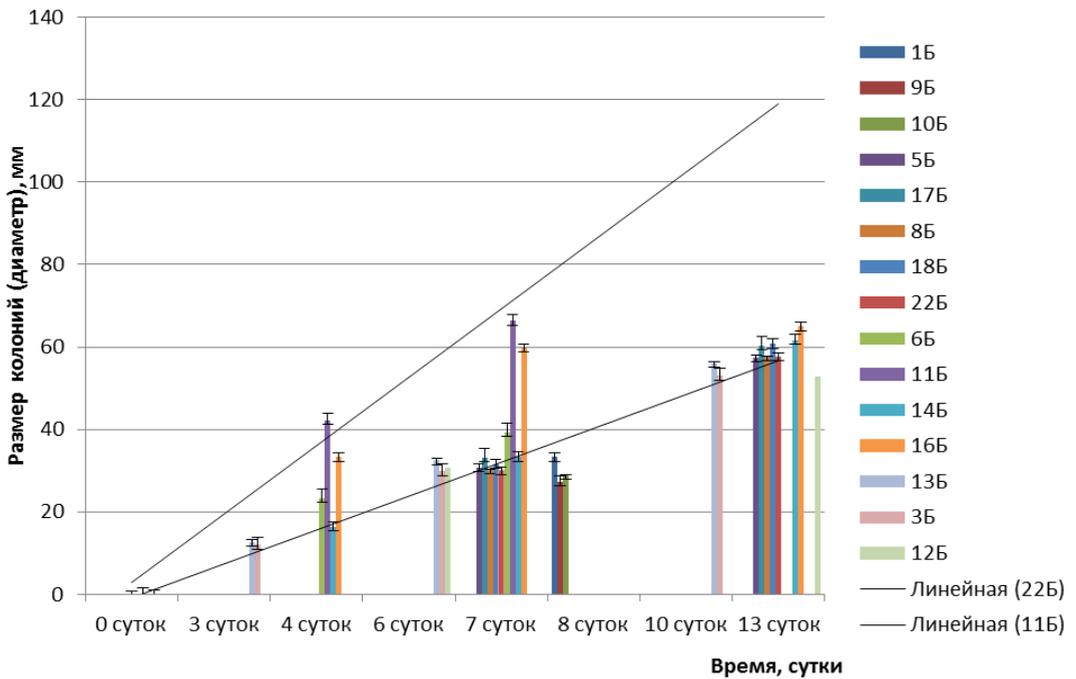


Рис. 2. Динамика роста на среде Чапека изолятов возбудителя антракноза, выделенных из материала, собранного в экспедиции 2016 г.

Наибольшее разнообразие по скорости роста наблюдается в коллекции изолятов, полученных из материала разных видов люпина, собранного на полях ВНИИ люпина (п. Мичуринский, Брянская область), как показано на рис. 3.

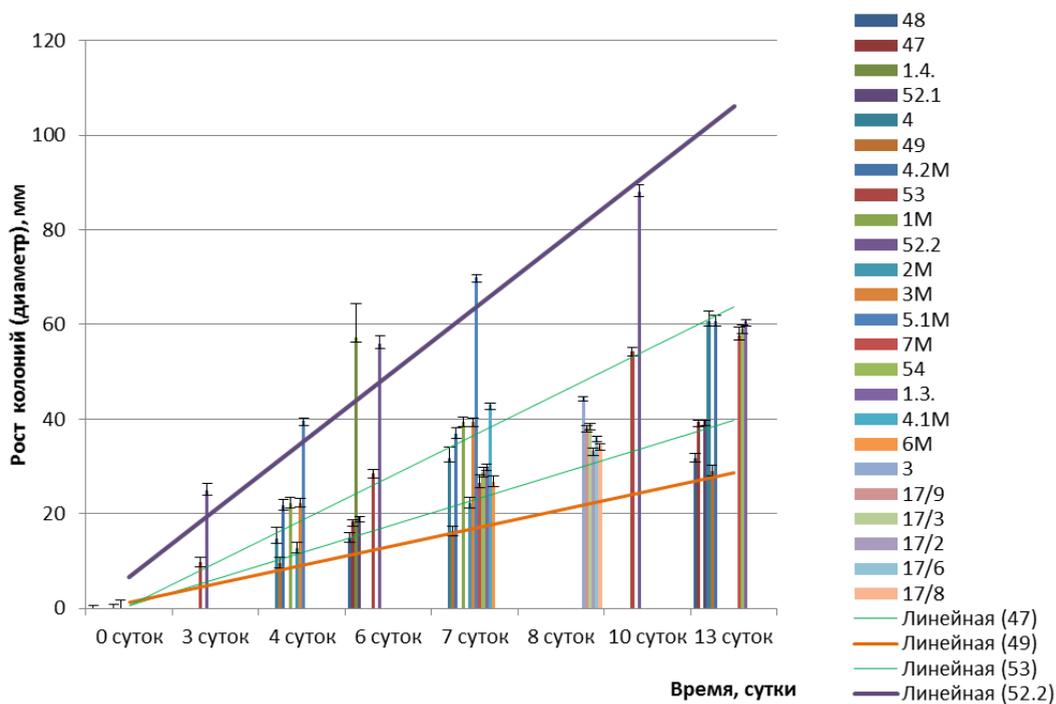


Рис. 3. Динамика роста на среде Чапека изолятов возбудителя антракноза, выделенного из материала ВНИИ люпина (п. Мичуринский, Брянская область).

Большая часть изолятов имеют среднюю скорость роста (20–40 мм за неделю), они сосредоточены между линиями тренда для изолята 47 и изолята 53.

Кроме того, можно выделить образцы с повышенной скоростью роста – это изоляты 52.2, 1.4. и 5.1M, они примерно в два раза опережают основную массу изолятов, как изоляты 11Б и 16Б на рис. 2, и имеют близкую к ним скорость роста (56–70 мм). Наоборот, изоляты 48 и 49 обладают более низкой скоростью роста, как образцы 12ж и 21ж (рис. 1).

На среде с картофельным отваром скорость роста изолятов в целом несколько выше (не существенно), но обнаруженные закономерности сохраняются.

Повышенное разнообразие изолятов из материала ВНИИ люпина, вероятно, связано с наличием в коллекции и селекционных питомниках института образцов люпина разных видов и различного географического происхождения, которые собраны для селекционных целей. С этими образцами могли быть собраны и разнообразные биотипы возбудителя антракноза. Кроме того, для селекционных целей создан и поддерживается антракнозный инфекционный фон. В таких условиях разнообразие возбудителя может определяться не только привезёнными штаммами, но и постоянно поддерживаться и даже развиваться за счёт рекомбинации при парасексуальном процессе, который характерен для несовершенных грибов.

В частности, для рода *Colletotrichum* наблюдается асексуальная рекомбинация с образованием анастомозов и слиянием ростовых трубок при прорастании спор (Pinto et al., 2012; Rosa et al., 2004). Понятно, что даже выделение моноспоровых изолятов не гарантирует отсутствия изменчивости и их стабильности.

Наряду с другими характеристиками скорость роста грибных колоний может влиять на вирулентность изолятов и их конкурентоспособность с другими грибами, в частности с грибами рода *Trichoderma*, которые могут использоваться для защиты растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-44-320985.

Список литературы

- Анохина В. С., Дебелый Г. А., Конарев П. М. 2012. Люпин: селекция, генетика, эволюция. Минск: Изд. Белорусского гос. ун-та. 271 с. [Anohina V. S., Debelyj G. A., Konarev P. M. 2012. Lyupin: selekciya, genetika, ehvolyuciya. Minsk: Izd. Belorusskogo gos. un-ta. 271 p.]
- Такунов И. П. 1996. Люпин в земледелии России. Брянск: Придесенье. 372 с. [Takunov I. P. 1996. Lyupin v zemledelii Rossii. Bryansk: Pridesen'e. 372 p.]
- Шашко Ю. К., Шашко М. Н., Долгова Е. Л. 2011. Об определении расового состава возбудителя антракноза люпина *Colletotrichum lupini* comb. nov. Минск: Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию. С. 128–136. [Shashko Yu. K., Shashko M. N., Dolgova E. L. 2011. Ob opredelenii rasovogo sostava vzbuditelya antraknoza lyupina *Colletotrichum lupini* comb. nov. Minsk: Nauchno-prakticheskij centr NAN Belarusi po zemledeliju. P. 128–136.]
- Cannon P. F., Damm U., Johnston P. R., Weir B. S. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions // *Studies in Mycology*. N 73, P. 181–213.
- Nirenberg H. I., Feiler U., Hagedorn G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms // *Mycologia*. N 94 (2). P. 307–320.
- Damm U., Cannon P. F., Woudenberg J. H. C., Crous P. W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex // *Studies in Mycology*. N 73. P. 37–113.
- Roca M. G., Davide L. C., Davide L. M., Mendes-Costa M. C., Schwan R., Wheals A. E. 2004. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. // *Mycol. Res.* Vol. 108. P. 1320–1326.
- Pinto J. M. A., Pereira R., Mota S. F., Ishikawa F. H., Souza E. A. 2012. Investigation phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* population // *Phytopatology*. N 102 (5). P. 490–497.

Сведения об авторах

Нам Ирина ЯнГуковна,

д. б. н., профессор кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: iyanam1@yandex.ru

Заякин Владимир Васильевич

д. б. н., профессор кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: vladimir.zajackin@yandex.ru

Шашко Юрий Константинович

к. с.-х. н., научный сотрудник
РУП НИЦ по земледелию НАН Беларуси, Жодино
E-mail: shashko_y@tut.by

Кобозева Марина Сергеевна

аспирант кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: bobunovamarina@mail.ru

Земскова Лолита Алексеевна

студентка естественно-географического факультета
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: lolita.zemskova.98@mail.ru

Новикова Марина Андреевна

студентка естественно-географического факультета
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: knovika98@mail.ru

Nam Irina YanGukovna

Sc. D. in Biology, Professor of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: iyanam1@yandex.ru

Zayakin Vladimir Vasil'evich

Sc. D. in Biology, Professor of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: vladimir.zajackin@yandex.ru

Shashko Yury Konstantinovich

Ph. D. in Agricultural Sciences, Science researcher
Scientific and practical center of the NAS of Belarus for agriculture, Zhodino
E-mail: shashko_y@tut.by

Kobozeva Marina Sergeevna

postgraduate of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: bobunovamarina@mail.ru

Zemskova Lolita Alexeevna

student of the Natural-Geographical faculty
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: lolita.zemskova.98@mail.ru

Novikova Marina Andreevna

student of the Natural-Geographical faculty
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: knovika98@mail.ru