

Классические и современные методы диагностики грибов рода *Colletotrichum* на землянике садовой

Ю.В. ЦВЕТКОВА, агроном лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИР»

А.А. КУЗНЕЦОВА, заведующая лабораторией микологии, старший научный сотрудник ИЛЦ ФГБУ «ВНИИР»

Аннотация. В статье представлен обзор информации о видах рода *Colletotrichum*, поражающих растения земляники, включая комплекс *Colletotrichum acutatum* и комплекс *Colletotrichum gloeosporioides*, а также трудности, связанные с непосредственной идентификацией патогенов. Описаны особенности диагностики микологических исследований и применение комплексного подхода с использованием классических и современных молекулярно-генетических методов для точного анализа в лабораторных условиях.

Ключевые слова. Карантин растений, антракноз земляники, комплекс *Colletotrichum acutatum*, комплекс *Colletotrichum gloeosporioides*, патогены земляники, микологические исследования.



ВВЕДЕНИЕ

Главной задачей для всех специалистов, работающих в сфере карантина растений, является своевременное выявление и точная идентификация грибных возбудителей болезней в подкарантинном материале. В связи с тем, что посадочный материал импортного происхождения регулярно ввозится на территорию РФ и существует высокая вероятность проникновения и распространения опасных карантинных грибных фитопатогенов, необходимо проводить быструю и достоверную диагностику, основываясь на применении классических и современных методов. К классическим методам относится закладка растительного материала во влажную камеру и на питательную среду, к современным – диагностика с использованием молекулярно-генетических методов. В процессе работы возникают трудности, связанные с непосредственной идентификацией патогена,

Conventional and modern methods for the diagnosis of *Colletotrichum* fungi on garden strawberry *Fragaria ananassa*

Y.V. TSVETKOVA, Agronomist of the Mycology Laboratory of the LTC of FGBU "VNIIR"

A.A. KUZNETSOVA, Head of the Mycology Laboratory of the LTC, Senior Researcher of FGBU "VNIIR"

Abstract. The article overviews information on the species of the genus *Colletotrichum* that affect strawberry plants, including the *Colletotrichum acutatum* and the *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes. It also specifies difficulties associated with the direct identification of pathogens and describes features of mycological research diagnosis and application of the complex approach using conventional and modern molecular genetic methods for precise in vitro analysis.

Keywords. Plant quarantine, strawberry anthracnose, *Colletotrichum acutatum* species complex, *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, strawberry pathogens, mycological research.

INTRODUCTION

The main task for all professionals working in the plant quarantine field is to timely detect and accurately identify fungal pathogens in regulated articles. Since foreign planting material is regularly imported into Russia and dangerous quarantine fungal phytopathogens are highly likely to enter and spread here, it is necessary to rapidly and reliably diagnose them with conventional and modern methods. Conventional methods include setting plant material up in a wet chamber and on a nutrient medium; modern methods imply diagnosis using molecular genetic methods. In the process of work, there are difficulties associated with direct pathogen identification, as well as the duration of methods used in mycological studies.



Рис. 1. Симптомы проявления антракноза на листьях земляники при искусственном заражении: а – возбудитель комплекса *Colletotrichum gloeosporioides*; б, в – возбудитель комплекса *Colletotrichum acutatum* (фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 1. Symptoms of anthracnose on strawberry leaves in case of artificial contamination: a – *Colletotrichum gloeosporioides* complex pathogen; б, в – *Colletotrichum acutatum* complex pathogen (photo by Y.V. Tsvetkova)

а также с длительностью используемых методов в проведении микологических исследований.

Одним из наиболее важных заболеваний земляники является антракноз. Возбудители антракноза относятся к группе видов рода *Colletotrichum*. Наиболее вредоносными являются грибы из комплекса *Colletotrichum acutatum*, который с 2016 года имеет карантинное фитосанитарное значение на территории Евразийского экономического союза и считается ограничено распространенным на территории РФ. Антракноз земляники является одним из наиболее вредоносных и опасных заболеваний, приводя к значительным потерям урожая, выпадению растений в маточниках, а также снижению товарных качеств плодов растений.

Особенностью комплекса *Colletotrichum acutatum* является то, что он является полифагом, поражает широкий круг растений: плодовые, бобовые, овощные, древесные, кустарниковые и травянистые культуры. Однако наибольший экономический ущерб возбудитель вызывает при поражении земляники садовой – *Fragaria ananassa* Duch. Также заболевание опасно тем, что после заражения может оставаться в латентном состоянии и при благоприятных условиях давать массовые эпифитотии.

Colletotrichum acutatum представляет собой комплекс из 31 вида [5]. В ходе работы из образцов земляники был выделен один вид из комплекса – *Colletotrichum nymphaeae*.

Патоген поражает все части растения земляники, вызывая темные некрозы на листьях, усах и стеблях, а также вдавленные темно-бурые до черных пятна на ягодах (с темными семечками внутри). При влажных условиях среды на пятнах выделяется желто-оранжевый экссудат клейких спор, который разносится на другие растения, являясь первичным источником инфекции. При сухих и жарких условиях пораженные ягоды чернеют и ссыхаются. *Colletotrichum acutatum* также проникает в корневую систему, стремительно разрушая ее. Пораженные рожки при разрезе становятся красновато-бурыми, главный и боковые корни постепенно отмирают, что приводит к полной гибели растения [6].

Сложность определения возбудителя заключается в том, что «антракнозное повреждение» земляники вызывают несколько видов грибов

Anthracnose is one of the most important strawberry diseases. Its pathogens belong to the species group of *Colletotrichum* genus. The most harmful are fungi from the *Colletotrichum acutatum* species complex which have been of quarantine phytosanitary importance in the Eurasian Economic Union since 2016 and are considered to be limitedly spread in Russia. Strawberry anthracnose is one of the most harmful and dangerous diseases, resulting in significant yield reduction, loss of plants in stock nurseries, as well as a decrease in the commercial quality of plant fruits.

Species of *Colletotrichum acutatum* complex are polyphages, affecting a wide range of plants – fruit, legumes, vegetables, tree, bushy and herbaceous crops. However, it is garden strawberry *Fragaria ananassa* Duch. that causes the greatest economic damage. The disease is also dangerous because it can remain in a latent state after infection and cause mass epiphytomy under favourable conditions.

Colletotrichum acutatum complex consists of 31 species [5]. During work, one species of the *Colletotrichum nymphaeae* complex was isolated from strawberry specimens.

The pathogen affects all parts of strawberry plants, causing dark necrosis on leaves, tendrils and stems, as well as depressed dark-brown to black spots on berries (with dark seeds inside). In humid conditions, sticky spores excrete yellow-orange exudate on the stains, which spreads to other plants and is the primary source of infection. In dry and hot conditions, the affected berries turn black and shrivel. *Colletotrichum acutatum* also penetrates the root system, rapidly destroying it. Affected branch crowns become reddish-brown when cut; the main and side roots gradually die back destroying the plant [6].

It is difficult to identify the pathogen because there are several fungi species of the *Colletotrichum* genus, for example, species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex, that cause anthracnose damage to strawberries. Like *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* is a polyphage and affects about 470 plant species.

из рода *Colletotrichum*, например, виды комплекса *Colletotrichum gloeosporioides*. Как и *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* является полифагом и поражает порядка 470 видов растений. *Colletotrichum gloeosporioides* также представляет собой комплекс из 23 видов [4, 8], которые отличаются своей специализацией к растениям-хозяевам, морфологическими и биологическими особенностями, географическим распространением [2].

Патогены имеют сходные внешние симптомы поражения вегетативной и генеративной частей растения (рис. 1).

Несмотря на то, что симптомы проявления на растениях выглядят одинаково, культуральные характеристики грибов комплексов *Colletotrichum acutatum* и *Colletotrichum gloeosporioides* различны (рис. 2). Колонии *Colletotrichum gloeosporioides* бархатисто-пушистые, иногда ватообразные с бугристой, не всегда однородной поверхностью. Окраска от белого до темно-серого. С возрастом колония темнеет. В культуре быстро теряются спорогенные свойства, часто образуются склероциеподобные структуры.

Колонии *Colletotrichum acutatum* характеризуются бархатно-опушенным строением, зональной поверхностью со слабоволнистым краем, цвет колонии в начальный период роста бело-серый со светло-белым слабоволнистым краем, на 14-й день колония становится серой с оранжевым экссудатом по всей поверхности, с образованием четких кругов.

Такое культуральное различие позволяют явно определить принадлежность культуры к тому или иному комплексу видов. Поэтому при диагностике возбудителей рекомендуется при наличии

Colletotrichum gloeosporioides also represents a complex of 23 species [4, 8], which differ in their specialization to host plants, morphological and biological characteristics, and geographical distribution [2].

Pathogens have similar external symptoms of damage to vegetative and generative plant parts (Fig. 1).

Although disease symptoms on plants look the same, the cultural characteristics of fungi belonging to *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* complexes are different (Fig. 2). The colonies of *Colletotrichum gloeosporioides* are velvety and downy, sometimes cottony with a humpy surface, which is not always homogenous. The colouration varies from white to dark grey. The colony gets darker with age. The culture quickly loses its sporogenic properties and forms sclerotium-like structures.

Colletotrichum acutatum colonies are characterized by a velvety and downy structure, a zonal surface with a weakly waved edge; the colony is white-grey with a light-white weakly waved edge in the initial growth period; it becomes grey with orange exudate across the surface and clear circles on the 14th day.

This cultural difference makes it possible to identify whether a culture belongs to a particular species complex. Therefore, when diagnosing pathogens, it is recommended to subculture the fungus and isolate pure culture if it shows itself in a wet chamber or on a nutrient medium.

The spores of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex in the pure culture, isolated in the laboratory, differed from the spores of the *Colletotrichum acutatum* species by a blunter, rounder edge, greater variability of the spore size, and spore quantity (Fig. 3).

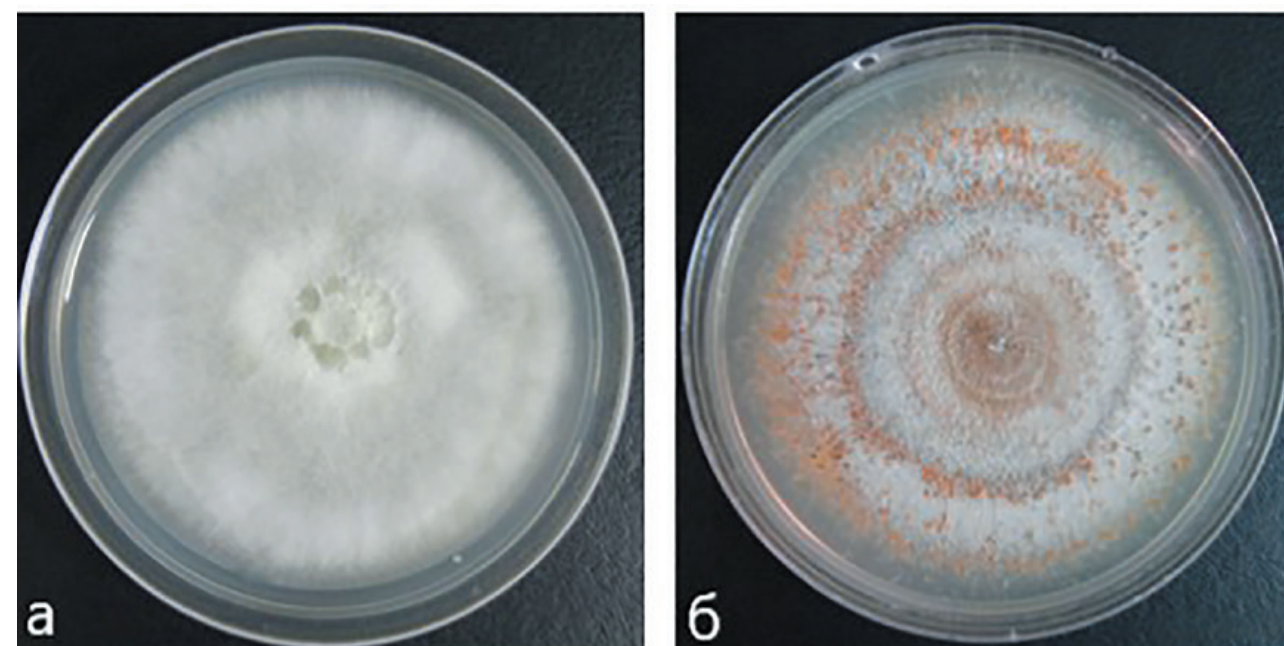


Рис. 2. Выделенные культуры грибов из зараженных листьев культуры на КГА: а – вид комплекса *Colletotrichum gloeosporioides*; б – вид комплекса *Colletotrichum acutatum* (фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 2. Isolated fungal cultures from contaminated leaves of a culture on PDA: а – *Colletotrichum gloeosporioides* complex species; б – *Colletotrichum acutatum* complex species (photo by Y.V. Tsvetkova)

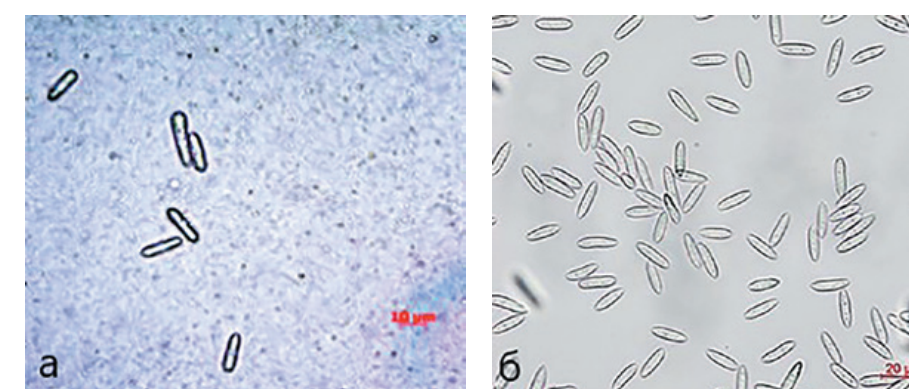


Рис. 3. Споры грибов в культуре: а – *Colletotrichum gloeosporioides*; б – *Colletotrichum nymphaeae* (фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 3. Fungal spores in a culture: а – *Colletotrichum gloeosporioides*; б – *Colletotrichum nymphaeae* (photo by Y.V. Tsvetkova)

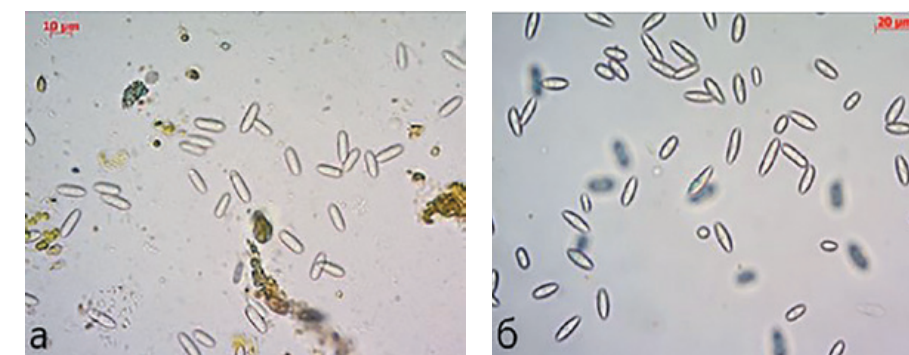


Рис. 4. Споры грибов на растении-хозяине – землянике садовой: а – *Colletotrichum gloeosporioides*; б – *Colletotrichum nymphaeae* (фото Ю.В. Цветковой)

Fig. 4. Fungal spores on garden strawberry, host plant: а – *Colletotrichum gloeosporioides*; б – *Colletotrichum nymphaeae* (photo by Y.V. Tsvetkova)

соответствующего проявления гриба во влажной камере или на питательной среде проводить пересев гриба с выделением чистой культуры.

Споры у видов комплекса *Colletotrichum gloeosporioides* в чистой культуре, выделенных в ходе работы лаборатории, отличались от спор видов *Colletotrichum acutatum* более тупым, округлым краем, большей вариабельностью размера спор, их количеством (рис. 3).

Однако при просмотре спор непосредственно на растении-хозяине споры видов можно перепутать друг с другом, в особенности при раннем обнаружении инфекции, в период формирования спор и при наличии незрелых спор (см. рис. 4).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились сотрудниками лаборатории микологии ФГБУ «ВНИИР» в период 2018-2019 гг.

Объектами исследования являлся подкарантинный посадочный материал земляники импортного происхождения (Италия, Сербия, Польша) и отечественного происхождения (Московская и Нижегородская области), завезенный из Нидерландов и Италии.

В исследовании использовали следующие методы:

Визуальный метод. В ходе первичного визуального осмотра растений земляники симптомы заболевания наблюдались только на некоторых исследуемых

However, when viewing spores directly on the host plant, species spores can be confused with each other, particularly at early detection of infection, during the formation of spores and when immature spores are present (see Fig. 4).

MATERIALS AND METHODS

The employees of the mycology laboratory of FGBU «VNIIR» conducted researches in the period from 2018 to 2019.

They researched both foreign quarantine strawberry plants (Italy, Serbia, Poland) as well as domestic ones (Moscow and Nizhny Novgorod Oblast), that were imported from the Netherlands and Italy.

The following techniques were used in the study:

Visual technique. During the initial visual examination of strawberry plants, only some tested samples showed disease symptoms; other plants did not have typical symptoms. However, asymptomatic plants were also selected for further examination to exclude latent infection.

Biological techniques. Setting up in a wet chamber. Setting up on a nutrient medium (2% potato glucose agar with the addition

of 1% streptomycin solution).

Parts of leaves, petioles, berries as well as rosettes and root system were selected, washed with running water for 10-15 minutes, sterilized in 96% alcohol for 1-2 minutes, and subsequently washed two times with sterile distilled water. Samples were then simultaneously set up on a nutrient medium and in a wet chamber (Fig. 5). Dishes were incubated at 25 °C.

Microscopy and morphometry techniques. The grown fungal mycelium was microscoped. Then it was selected when its microscopic characteristics coincided to be confirmed with PCR [3].

Molecular genetic technique. Conventional PCR using complex specific primers.

For accurate identification, the isolates were confirmed by molecular genetic method based on conventional PCR with complex specific primers CaInt2 (5'-GG-GGAAGCCTCGG-3') (Sreenivasaprasad et al., 1996) [7] and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATGATGC-3') (White et al., 1990) [9] with the size of the amplified area equal to 490 b.p.

It is possible to sample the mycelium directly from plant material for analysis because complex specific primers are used. However, it requires a sufficient amount of mycelium, i.e., heavy sporulation, which does

образцах, на остальных растениях типичные симптомы обнаружены не были. Однако для дальнейшего исследования были отобраны и бессимптомные растения для исключения латентной инфекции.

Биологические методы. Закладка во влажную камеру. Закладка на питательную среду (2% картофельно-глюкозный агар с добавлением 1% раствора стрептомицина).

Части листьев, черешков, ягод, а также розеток и корневой системы были отобраны, промыты в проточной воде в течение 10-15 мин и простерилизованы в 96% спирте 1-2 мин с последующим двукратным промыванием стерильной дистиллированной водой. Далее пробы закладывали на питательную среду и параллельно во влажную камеру (рис. 5). Чашки инкубировали при температуре 25 °C.

Метод микроскопирования и морфометрии. Выросший мицелий гриба микроскопировали и при совпадении микроскопических признаков отбирали для подтверждения с использованием ПЦР [3].

Молекулярно-генетический метод. Классическая ПЦР с применением комплексоспецифичных праймеров.

Для точной идентификации изоляты подтверждали молекулярно-генетическим методом, основанным на проведении классической ПЦР с комплексоспецифичными праймерами CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3') (Sreenivasaprasad et al., 1996) [7] и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) [9], с размером амплифицированного участка, равным 490 п.о.

Отбор образцов мицелия для анализа непосредственно с растительного материала возможен, т.к. в работе используются комплексоспецифичные праймеры, но необходимо присутствие достаточного количества мицелия, т.е. обильного спороношения, что не всегда проявляется во влажной камере и на питательной среде. Рекомендуется предварительно получить чистые культуры гриба. Чем быстрее гриб обнаружен и пересеван в отдельные чашки, тем меньше вероятность застарения чашек с влажной камерой и питательной средой сапротрофными и сопутствующими видами.

Также наличие чистой культуры гриба необходимо в качестве доказательного материала, а сравнение культуральных признаков может являться дополнительным диагностическим признаком.

Для отбора образцов брали участок мицелия гриба с минимальным захватом растительной ткани (1 см²), в случае отбора из чистой культуры – выщечку мицелия с минимальным захватом питательной среды, вносили в 1,5 мл пробирки, добавляли 200 мкл лизирующего буфера и растирали пестиком для микропробирок. Выделение ДНК проводили с использованием готового набора реагентов «М-СорбТуб» (ЗАО «Синтол», Москва), действие которого основано на использовании магнитных частиц. В ходе работы лаборатории было выявлено,

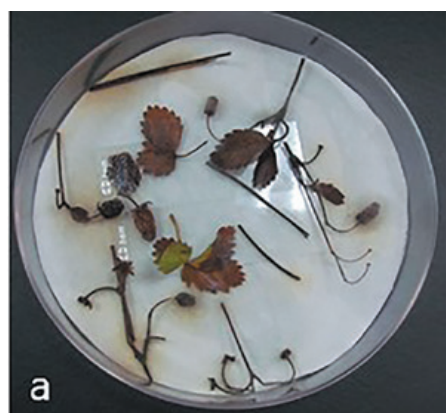


Рис. 5. Пораженные растения земляники во влажной камере (а) и развившийся мицелий *Colletotrichum acutatum* на КГА (б) (фото А.А. Кузнецовой)

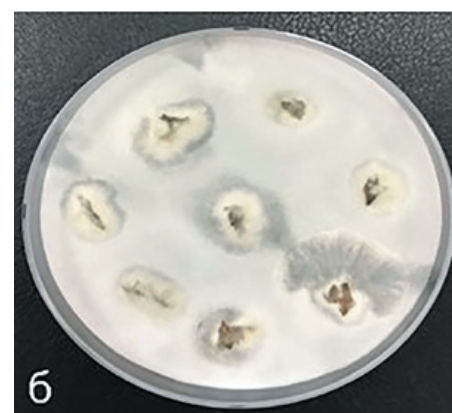


Fig. 5. Affected strawberry plants in a wet chamber (a) and developed *Colletotrichum acutatum* mycelium on PDA (b) (photo by A.A. Kuznetsova)

not always occur in a wet chamber and on a nutrient medium. It is recommended to obtain pure fungal cultures beforehand. The faster the fungus is identified and subcultured into individual dishes, the less likely it is that saprotrophic and associated species will colonize the dishes with a wet chamber and nutrient medium.

The pure fungal culture is also necessary to serve as evidence, and a comparison of cultural characteristics may be an additional diagnostic feature.

The fungal mycelium with minimum capture of plant tissue (1 cm²) was taken for sampling, and the mycelium cutting with minimum capture of the nutrient medium was used when sampling from a pure culture. Then they were placed into 1.5 ml tubes with adding 200 µl of lysing buffer and comminuted with a pestle for microtubes. DNA was extracted using M-Sorb-Tub reagent kit (ZAO Sintol, Moscow), which is based on magnetic particles. In the course of the laboratory work, these kits showed perfect suitability for DNA extraction from pure cultures of mycelial fungi.

PCR was performed in the T100 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad. The mixture of reagents for setting one 25 µl reaction contained 5 µl 5x Mas^{BD}TaqMix PCR buffer (Dialat Ltd., Moscow), 0.5 µM of each primer, 1 ng of target DNA, and sterile water.

Amplification conditions: 3 min – 94 °C; 30 cycles: 30 sec – 94 °C, 30 sec – 58 °C, 90 sec – 72 °C; 1 cycle: 7 min – 72 °C.

After amplification, 4 µl PCR-product was pipetted in tubes with 1.0% agarose gel with ethidium bromide in 0.5x TBE buffer and separated by electrophoresis. Later on, visualization was performed using a gel documenting system.

Afterwards, conventional PCR with universal primers ITS5/ITS4 was carried out to identify the species. After amplification, the products were electrophoretically separated. Then the samples were cleaned by Thermo Fisher commercial set (GeneJET PCR Purification Kit) and sequenced on the 3500 Applied Biosystems genetic analyzer according to the methodological recommendations [1]. The obtained sections of nucleotide sequences were processed and aligned in BioEdit software.

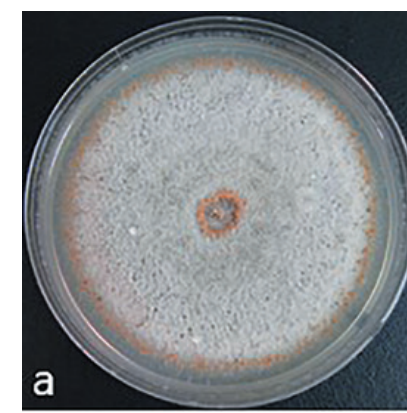


Рис. 6. Колония изолята, выделенного из растений земляники сербского происхождения (а), колония изолята, выделенного из растений земляники голландского происхождения (б), колония изолята, выделенного из растений земляники итальянского происхождения (в) (фото Ю.В. Цветковой, А.А. Кузнецовой)

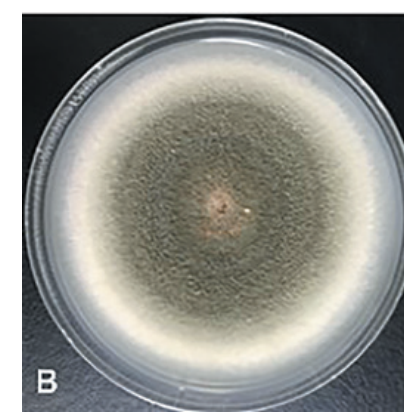
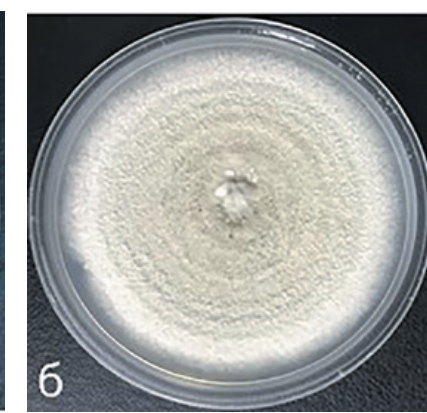


Fig. 6. Serbian strawberry plant isolate colony (a), Dutch strawberry plant isolate colony (b), Italian strawberry plant isolate colony (v) (photo by Y.V. Tsvetkova, A.A. Kuznetsova)

что данные наборы оптимально подходят для выделения ДНК из чистых культур мицелиальных грибов.

ПЦР проводили в термоциклере T100 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad. Смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл содержала 5 мкл 5x ПЦР-буфера Mas^{BD}TaqMix 2025 (ООО «Диалат Лтд», Москва), 0,5 µM каждого праймера, 1 нг целевой ДНК и стерильную воду.

Условия амплификации на приборе: 3 мин – 94 °C; 30 циклов: 30 сек – 94 °C, 30 сек – 58 °C, 90 сек – 72 °C; 1 цикл 7 мин – 72 °C.

После амплификации 4 мкл ПЦР-продукта раскапывали в лунки 1,0% агарозного геля с бромистым этидием в 0,5x TBE-буфере и разделяли с помощью электрофореза. В дальнейшем проводили визуализацию с использованием гель-документирующей системы.

В дальнейшем для определения видовой принадлежности проводили классическую ПЦР с универсальными праймерами ITS5/ITS4. После амплификации продукты разделяли электрофоретически. Затем образцы очищали с помощью коммерческого набора Thermo Fisher (GeneJET PCR Purification Kit) и проводили секвенирование на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems согласно методическим рекомендациям [1]. Полученные участки нуклеотидных последовательностей обрабатывали и выравнивали в программном обеспечении BioEdit.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через четыре дня после начала инкубации на чашках с питательной средой сформировался характерный бело-серый мицелий. На 7-е сутки на питательной среде бархатистый мицелий колонии развился и образовал оранжевый слизистый экссудат. На чашках с влажной камерой мицелий сформировался только на 10-14-й день.

Необходимо отметить, что на питательной среде КГА изоляты комплекса *Colletotrichum acutatum* отличались по культуральным признакам в зависимости от происхождения исследуемых образцов. Так, из посадочного материала происхождения из Италии были выделены изоляты комплекса *Colletotrichum acutatum*, которые характеризовались бархатно-опушенным строением, ровной зоной поверхности, темно-серым цветом со

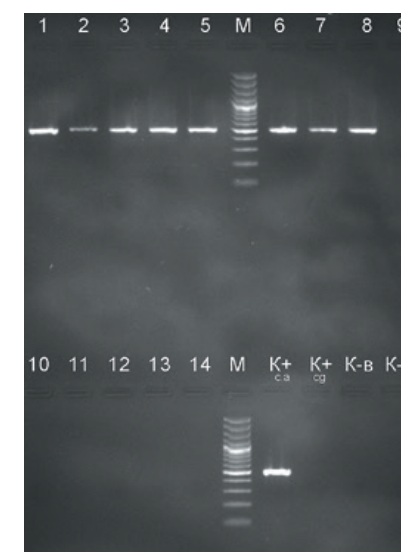


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами CaInt2/ITS4: № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – образцы комплекса *Colletotrichum acutatum*; № 9, 10, 11, 12, 13, 14 – образцы комплекса *Colletotrichum gloeosporioides*; K+c.a. – положительный контроль комплекса *Colletotrichum acutatum*; K+c.g. – положительный контроль комплекса *Colletotrichum gloeosporioides*; K-в – отрицательный контроль выделения; K-ч – отрицательный контроль чистой зоны

Fig. 7. Electropherogram of amplification products with CaInt2/ITS4 primers: No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – *Colletotrichum acutatum* complex samples; No. 9, 10, 11, 12, 13, 14 – *Colletotrichum gloeosporioides* complex samples; PC+c.a. – positive control of *Colletotrichum acutatum* complex; PC+c.g. – positive control of *Colletotrichum gloeosporioides* complex; NCI – negative control of isolation; NCC – negative control of cleanroom

RESULTS

Four days after the beginning of incubation, a characteristic white-grey mycelium appeared in dishes with a nutrient medium. On the 7th day, the velvety mycelium of the colony developed on the nutrient medium and formed

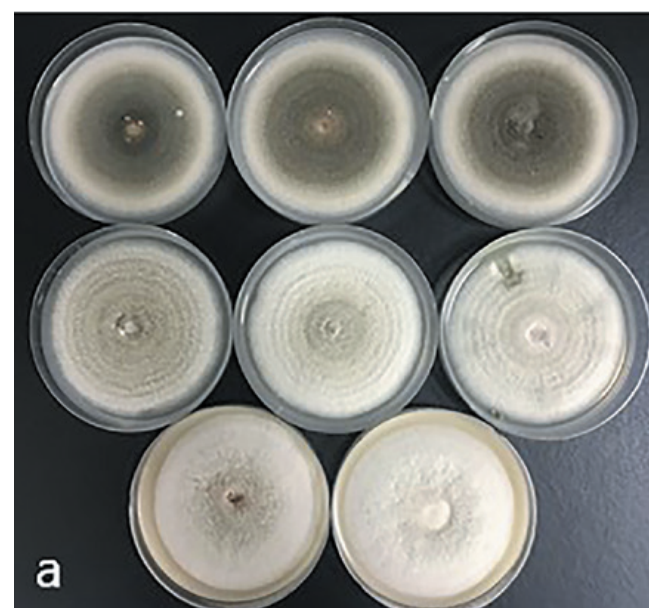


Рис. 8. Чистые культуры, выделенные из посадочного материала земляники: а – верхний ряд, слева направо – 1-й изолят – происхождение Италия, последующие 2 изолята – происхождение Нижегородская область, завезенные из Италии; средний ряд, слева направо – 1-й изолят – происхождение Сербия, 2-й изолят – происхождение Польша, 3-й изолят – происхождение Нижегородская область, завезенный из Нидерландов; нижний ряд, слева направо – 2 изолята – происхождение Московская область, завезенные из Нидерландов; б – чистые культуры изолятов, пересеянные для хранения в пробирки (фото А.А. Кузнецовой)



Fig. 8. Pure cultures isolated from strawberry planting material: а – top row, left to right – 1st isolate – origin from Italian, the next 2 isolates – origin from Nizhny Novgorod Oblast, imported from Italy; middle row, left to right – 1st isolate – origin from Serbia, 2nd isolate – origin from Poland, 3rd isolate – origin from Nizhny Novgorod Oblast, imported from the Netherlands; bottom row, left to right – 2 isolates – origin from Moscow Oblast, imported from the Netherlands; б – pure cultures of isolates, subcultured into test tubes for storage (photo by A.A. Kuznetsova)

светло-серым ровным краем; реверзум темно-серый, с характерным оранжевым экссудатом в середине колонии (рис. 6 в). Нидерландские изоляты характеризовались бархатно-опушенным строением, зональной поверхностью со слабоволнистым краем, цвет колонии в начальный период роста бело-серый со светло-белым слабоволнистым краем, на 14-й день колония становилась серой, оранжевый экссудат был хорошо заметен со стороны реверзума (рис. 6 б). А изоляты, выделенные из стран Сербии и Польши, имели бело-серый цвет со светлым краем с каплями ярко-оранжевого экссудата, реверзум бежевый с темно-розовой серединой, а также с оранжевым экссудатом в середине колонии (рис. 6 а).

Из образцов, отобранных от бессимптомных растений, был также выделен фитопатогенный гриб комплекса *Colletotrichum acutatum*, что доказывает необходимость отбора бессимптомных образцов для анализа латентной инфекции [2].

После анализа морфологических признаков принадлежность выделенных изолятов к комплексу *Colletotrichum acutatum* была подтверждена с использованием ПЦР и комплексоспецифичных праймеров (рис. 7).

Подтвержденный мицелий гриба отсеивали в пробирки с КГА для хранения в качестве подтверждающего материала (рис. 8).

Дальнейший анализ нуклеотидных последовательностей ITS-региона и сравнение с сиквенсами эталонных штаммов базы CBS показали, что выделенные изоляты принадлежат к виду *Colletotrichum*

orange mucous exudate. In dishes with a wet chamber, mycelium was formed only on the 10th-14th day.

It should be noted that isolates of *Colletotrichum acutatum* complex differed in cultural characteristics on the PDA medium depending on the origin of the samples. Thus, isolates of the *Colletotrichum acutatum* complex were isolated from the planting material originating from Italy, which were characterized by a velvety and downy structure, a flat zonal surface, dark-grey colour with a light-grey flat edge; the reverse side was dark-grey with a characteristic orange exudate in the middle of the colony (Fig. 6 в). The Dutch isolates were characterized by a velvety and downy structure, a zonal surface with a weakly waved edge; the colony was white-grey with a light white weakly waved edge in the initial growth period; on the 14th day the colony turned grey, and the orange exudate was well visible from the reverse side (Fig. 6 б). The Serbian and Polish isolates were white grey with a light edge with drops of bright orange exudate; the reverse side was beige with a dark-pink middle, and the orange exudate in the middle of the colony (Fig. 6 а).

The phytopathogenic fungi of the *Colletotrichum acutatum* complex were also isolated from the samples of asymptomatic plants, which proves that it is necessary to analyse asymptomatic samples for latent infection [2].

After analysing morphological characteristics, it was established that the isolated isolates belong to the

nymphaeae (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ948246.1>) [10].

Необходимо отметить, что в настоящий момент в карантинном перечне ограниченно распространенных объектов на территории РФ находится весь комплекс видов *Colletotrichum acutatum*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты говорят о том, что при применении современных методов диагностики возможно быстрое и точное определение фитопатогена, что соответствует фитосанитарным требованиям при досмотре подкарантинной продукции. Для возможности осуществления новых методов и их подтверждения также необходимо использование классических методов.

При диагностике возбудителя важным остается исследование латентной инфекции, то есть отбор бессимптомных растений. Отсутствие явных признаков поражения может быть связано с рядом причин. Во-первых, зачастую производители применяют большое количество пестицидов, которые действительно подавляют развитие гриба. В дальнейшем такие образцы требуют большего времени для проявления характерного спороношения и выявления гриба. Во-вторых, факультативные паразиты проявляют себя при ослаблении растений-хозяев, в то время как в здоровых растениях симптомов поражения не наблюдается.

Интересно отметить, что культурально-морфологические свойства выделенных изолятов не находят отражения в анализе нуклеотидных последовательностей по ITS-региону. Необходимо более детальное изучение нуклеотидных последовательностей изолятов по другим генам.

ВЫВОДЫ

1. Совмещение классических и молекулярно-генетических методов позволяет достоверно идентифицировать возбудителя антракноза земляники и повышает специфичность микологических исследований.
2. Исследуемые изоляты комплекса *Colletotrichum acutatum* отличаются по культуральным признакам (фенотипу) в зависимости от происхождения исследуемых образцов.
3. На данный момент основным видом рода *Colletotrichum* исследуемой подкарантинной продукции земляники является вид *Colletotrichum nymphaeae*.
4. Выделенные в ходе работы изоляты *Colletotrichum nymphaeae* отличимы от видов комплекса *Colletotrichum gloeosporioides* как по культуральным признакам, так и по современному молекулярно-генетическому ПЦР-методу, основанному на применении комплексоспецифичных праймеров CaInt2/ITS4.
5. Для ускорения микологической диагностики возбудителя антракноза земляники для бессимптомного подкарантинного материала следует использовать закладку на питательные среды с применением антибиотиков (стрептомицина или др. аналогов).
6. При обследовании подкарантинной продукции необходимо проводить отбор как растений с типичными признаками поражения, так и бессимптомных растений для выявления латентной инфекции.

Colletotrichum acutatum complex, which was confirmed by using PCR and complex specific primers (Fig. 7).

The confirmed fungal mycelium was subcultured in tubes with PDA for storage as confirmation material (Fig. 8).

Further analysis of the nucleotide sequences in the ITS region and comparison with sequences of reference strains from the CBS base showed that the isolates belong to the species *Colletotrichum nymphaeae* [10].

It should be noted that the entire *Colletotrichum acutatum* species complex is currently included in the quarantine list of objects with limited spread on the territory of Russia.

DISCUSSION

The results obtained show that it is possible to quickly and accurately identify the phytopathogen by using modern diagnostic methods which meet the phytosanitary requirements for the inspection of regulated products. The use of conventional methods is also necessary to make it possible to use new methods and confirm them.

It is important to study the latent infection, that is, the selection of asymptomatic plants, in the diagnosis of the pathogen. The absence of obvious signs of lesions may be due to several reasons. Firstly, producers often use lots of pesticides that do inhibit fungal development. Later on, such samples require more time to show distinctive sporulation and identify the fungus. Secondly, the facultative parasites reveal themselves when the host plants are weakened, while healthy plants show no symptoms of damage.

Notably, the cultural and morphological properties of the isolates are not reflected in the analysis of nucleotide sequences in the ITS region. It is necessary to study nucleotide sequences of isolates in other genes in greater detail.

CONCLUSIONS

1. The combination of conventional and molecular genetic methods allows to reliably identify the pathogen of strawberry anthracnose and increases the specificity of mycological research.
2. The studied isolates of the *Colletotrichum acutatum* complex differ in cultural characteristics (phenotype) depending on the origin of the tested samples.
3. At the moment, *Colletotrichum nymphaeae* is the main species of the *Colletotrichum* genus on the regulated strawberry products.
4. The isolates of *Colletotrichum nymphaeae* isolated in the course of the work differ from the species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex both by their cultural characteristics and by the modern molecular genetic PCR method based on the application of CaInt2/ITS4 complex specific primers.
5. Setting up on the nutrient media using antibiotics (streptomycin or other analogues) should be used to accelerate the mycological diagnosis of the strawberry anthracnose pathogen for asymptomatic regulated articles.
6. When studying regulated products, both plants with typical signs of lesions and asymptomatic plants should be selected to detect latent infection.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко Г.Н., Белкин Д.Л. и др. Методические рекомендации по проведению секвенирования при диагностике карантинных объектов и других организмов. – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2018. – 37 с.
2. Котова В.В., Кунгурцева О.В. Антракноз сельскохозяйственных растений. – СПб.: ВИЗР, 2014. – 132 с. (Приложение к журналу «Вестник защиты растений», № 11).
3. Петина В.В., Скрипка О.В. и др. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя антракноза земляники *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2013. – 22 с.
4. Damm U., Baroncelli R., Cai L. et al. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions // IMA Fungus, 2010. – Vol. 1. – P. 161-165.
5. Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Crous P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex // Studies in Mycology, 2012. – P. 37-113. DOI: 10.3114/sim0010.
6. Peres N.A., Timmer L.W., Adaskaveg J.E., Correll J.C. Life styles of *Colletotrichum acutatum* // Plant Disease, 2005. – Vol. 89, No. 8. P. 784-796. DOI: 10.1094/PD-89-0784.
7. Sreenivasaprasad S., Sharada K., Brown A.E., Mills P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry // Plant Pathology, 1996. – 45. P. 650-655.
8. Weir B.S., Johnston P.R. Damm U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex // Studies in Mycology, 2012. – Vol. 73. – P. 115-180. DOI: 10.3114/sim0011.
9. White T.J, Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. // PCR Protocols: A Guide to Methods and Amplifications. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1990. – P. 315-322.
10. The National Center for Biotechnology. *Colletotrichum nymphaeae* culture-collection CBS: 125959. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ948246.1>.

REFERENCES

1. Bondarenko G.N., Belkin D.L. et al. Methodological recommendations for sequencing in the diagnosis of quarantine objects and other organisms [Metodicheskie rekomendacii po provedeniyu sekvenirovaniya pri diagnostike karantinnyh ob"ektov i drugih organizmov]. M.: FGBU “VNIKR”, 2018: 37 pp. (in Russian).
2. Kotova V.V., Kungurtseva O.V. Anthracnose of agricultural plants [Antraknoz sel'skohozyajstvennyh rastenij]. *Prilozhenie k zhurnalu Vestnik zashchity rastenij*. SPb.: VIZR, 2014; 11: 132 pp. (in Russian).
3. Petina V.V., Skripka O.V. et al. Methodological recommendations for the detection and identification of strawberry anthracnose pathogen *Colletotrichum acutatum* [Metodicheskie rekomendacii po vyvavleniyu i identifikacii vozbuditelya antraknoza zemlyaniki *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds]. M.: FGBU “VNIKR”, 2013 (in Russian).
4. Damm U., Baroncelli R., Cai L. et al. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. *IMA Fungus*. 2010; 1: 161-165.
5. Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Crous P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*. 2012; 73: 37-113. DOI: 10.3114/sim0010.
6. Peres N.A., Timmer L.W., Adaskaveg J.E., Correll J.C. Life styles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*. 2005; 89 (8): 784-796. DOI: 10.1094/PD-89-0784.
7. Sreenivasaprasad S., Sharada K., Brown A.E., Mills P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*. 1996; 45: 650-655.
8. Weir B.S., Johnston P.R., Damm U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*. 2012; 73: 115-180. DOI: 10.3114/sim0011.
9. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Amplifications. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1990: 315-322.
10. The National Center for Biotechnology. *Colletotrichum nymphaeae* culture-collection CBS: 125959. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ948246.1>.

УДК 632.654

Некоторые замечания о биологии и проблемах диагностики красного томатного паутинного клеща *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Prostigmata: Tetranychidae)

И.О. КАМАЕВ, к.б.н., старший научный сотрудник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. Приводятся актуальные сведения о распространении, новая информация о растениях-хозяевах и вопросах диагностики красного томатного паутинного клеща (*Tetranychus evansi*) – карантинного объекта Единого перечня ЕАЭС. В статье даны оригинальные иллюстрации симптомов повреждения растений-хозяев и диагностических признаков вредителя.
Ключевые слова. Карантин растений, акарология, паутинные клещи, красный томатный паутинный клещ, диагностика.



красный томатный паутинный клещ *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (рис. 1), относящийся к отсутствующим карантинным объектам Единого перечня стран – участниц ЕАЭС, – один из агрессивных активно распространяющихся вредителей пасленовых культур, прежде всего томата. Значение этого вредителя для сельского хозяйства определяет интерес к данному виду со стороны широкого круга специалистов, включая акарологов, специалистов по защите растений и возделыванию культуры томата и фитосанитарии. На прошедшем XV Международном акарологическом конгрессе и совещании «Интегрированный контроль растительноядных клещей» Западнопалеарктической региональной секции Международной организации по биологической

UDC 632.654

Some comments on the biology and diagnostic problems of red spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Prostigmata: Tetranychidae)

I.O. KAMAYEV, PhD in Biology, Senior Researcher of the Entomological Research and Methodology Department of FGBU “VNIKR”

Abstract. The article provides current information on distribution, new data on host plants and diagnostic issues of the red spider mite (*Tetranychus evansi*) – a quarantine object of the Unified List of the EAEU. Original illustrations of host plant damage symptoms and diagnostic characters of the pest are given in the article.
Keywords. Plant quarantine, acarology, spider mites, red spider mites, diagnosis.

Red spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Fig. 1), which belongs to the quarantine objects that are not included in the Unified List of the EAEU member states, is one of the aggressive pests of solanaceous crops, primarily tomato, which spread actively. The importance of this pest for agriculture determines the interest of a wide range of specialists, including acarologists, plant protection experts, tomato cultivators and phytosanitary specialists. This species was repeatedly discussed in the reports of acarologist at the XV International Congress of Acarology and at the meeting