

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA*

Светлана НИКОЛАЕВА, Аркадий НИКОЛАЕВ, Виктория ШУБИНА, Леонид ВОЛОЩУК

Институт защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы

Având ca exemplu 10 izolate din ciuperca *Alternaria* și 20 de medii nutritive, lichide și agarizate, în cultura staționară și în profunzime, a fost demonstrată influența componenței mediului asupra creșterii miceliului și formării conidiilor.

It was demonstrated the influence of medium composition on mycelium and conidia formation by way of example of 10 isolates of *Alternaria* fungus and 20 nutrition media, liquid and agarized, in stationary and submerged culture.

Грибы рода *Alternaria* (преимущественно сапрофиты или факультативные паразиты) широко распространены в природе. На злаках они вызывают черный зародыш зерна, на хлопчатнике – черную гниль коробочек, на конопле – потемнение стеблей и мацерацию тканей. Пурпуровой пятнистостью, вызываемой альтернарией, поражаются все виды культурного лука. Распространен альтернариоз на капустных и сельдерейных культурах, ягодниках и цитрусовых, в период вегетации растений и во время хранения [1]. Во влажных субтропиках Грузии *Alternaria alternata* (Fv.) Keisch. поражает листья, почки, цветы и коробочки чая, верхние молодые листочки поражаются редко, но урожайность снижается значительно [2].

Альтернариоз (ранняя сухая пятнистость, возб. *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) J. et G.) – широко распространенное заболевание томата, картофеля, баклажана, перца и других представителей семейства *Solanaceae*. Заболевание практически повсеместно распространено в районах с теплым и засушливым климатом, включая Украину, Молдову, Беларусь, Россию, Румынию. По данным Н.Н. Балашовой [3], на территории Молдовы альтернариоз – одна из наиболее распространенных болезней томатов. Изучению альтернариоза пасленовых культур в Молдове много внимания уделяла Э.Д. Коган [4].

Потери урожая в Молдове от альтернариоза могут достигать 22-24%, а при сильном развитии заболевания – 50% [5]. В левобережной лесостепи Украины, по данным А.В. Кулешова [6], потери урожая достигают 40-55%. По данным румынских исследователей [7], в годы с обильными осадками альтернариоз в некоторых посадках томатов в районах Бухареста и Крайовы вызывал до 80% потери урожая.

Получение высоких урожаев томатов предусматривает высокую агротехнику, включая севообороты, использование сортов, относительно устойчивых к болезням и вредителям, систему защитных мероприятий. Разработка защитных мероприятий, в свою очередь, предусматривает создание искусственного инфекционного фона. Обычно для создания инфекционного фона используют конидиальную суспензию патогена, позволяющую создать более выравненный фон. Однако для грибов рода *Alternaria* получение конидий иногда может быть проблематично, поэтому исследователи для создания устойчивых к альтернариозу сортов томатов используют мицелиальную или конидиально-мицелиальную суспензию гриба [5].

Цель наших исследований – подобрать условия культивирования местных изолятов альтернарии, позволяющих получить максимальный выход конидий и мицелия патогена

### Материалы и методы исследований

В опытах использованы выделенные нами изоляты гриба *Alternaria*: 2 изолята гриба *Alternaria alternata*, выделенные из одного пятна плода томата сорта Рио Гранде и условно названные по внешнему виду колонии «войлочный» и «сажистый»; 1 изолят *Alternaria sp.*, выделенный с плода томата (А 9-1); 7 изолятов гриба *Alternaria solani*. Изоляты ГЛТ-3, ГЛТ-7 и ГЛТ-8, различающиеся по своим культурально-морфологическим признакам, выделены с гербарных образцов листьев томатов с характерными признаками ранней сухой пятнистости. Изоляты G 348-28, В-39, КТ 68-1, 2/07 выделены со свежих листьев томатов разных сортов. Образцы пораженных листьев и плодов отбирали с сортоучастка Института генетики и физиологии растений, с экспериментального участка Института

защиты растений и экологического земледелия (г. Кишинев) и с экспериментального участка Приднестровского НИИ сельского хозяйства (г. Тирасполь).

Изоляты выращивали на агаризованных и жидких средах (стационарная и глубинная культуры). Использованы среды: картофельно-глюкозная, Чапека, картофельно-морковная, морковная, капустная, перечная, томатная. Кроме стандартной картофельно-глюкозной среды (300 г картофеля и 20 г глюкозы на 1 л среды) использовали картофельно-глюкозную среду с разным содержанием и соотношением картофеля и глюкозы, разным объемом агаризованной среды в чашках Петри.

Схема опыта:

1. 300 г картофеля + 20 г глюкозы / л среды;
2. 200 г картофеля + 20 г глюкозы / л среды
3. 100 г картофеля + 20 г глюкозы / л среды
4. 300 г картофеля + 10 г глюкозы / л среды;
5. 200 г картофеля + 10 г глюкозы / л среды
6. 100 г картофеля + 10 г глюкозы / л среды
7. 300 г картофеля + 5 г глюкозы / л среды
8. 200 г картофеля + 5 г глюкозы / л среды;
9. 100 г картофеля + 5 г глюкозы / л среды;
10. 300 г картофеля + 0 г глюкозы / л среды;
11. 200 г картофеля + 0 г глюкозы / л среды
12. 100 г картофеля + 0 г глюкозы / л среды.

Картофельно-морковная среда содержала в 1 л 20 г картофеля и 20 г моркови; другие овощные отвары содержали по 40 г сырья в 1 л среды; 50% и 25% томатные среды содержали 50% и 25% томатного сока соответственно.

При выращивании патогена на агаризованных средах в чашки Петри наливали одинаковый объем питательной среды; при выращивании патогена на жидких питательных средах использовали колбочки Эрленмейера со 100 мл соответствующей среды (стационарная культура) или качалочные колбы с 200-250 мл среды (глубинная культура).

Биомассу гриба определяли весовым методом. Повторность опыта – 3-х и 6-кратная. Данные опытов обрабатывались статистически с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007.

### Результаты исследований

О пригодности той или иной среды для роста гриба судят по скорости его линейного роста на агаризованных средах в чашках Петри (радиусу или диаметру колонии в динамике) или по нарастанию биомассы. В таблице 1 представлены данные по линейному росту двух изолятов альтернативии. Как правило, «войлочный» изолят рос быстрее, чем «сажистый». Наиболее подходящей (из испытанных сред) для роста гриба была картофельно-глюкозная среда (табл.1).

Таблица 1

**Линейный рост изолятов альтернативии на агаризованных питательных средах**  
(среднее из 5 повторностей)

Среда	Изолят	Диаметр колонии (в мм) на сутки учета	
		5 суток	9 суток
Картофельно-морковная	Сажистый	28,8±1,0	73,0±1,6
	Войлочный	36,8±0,4	81,4±0,9
Морковная	Сажистый	32,3±1,5	70,3±2,9
	Войлочный	32,8±0,6	71,6±0,8
Томатная	Сажистый	28,3±0,5	63,8±1,0
	Войлочный	33,2±0,5	72,4±0,8
Капустная	Сажистый	30,8±0,8	63,7±1,3
	Войлочный	38,0±0,8	77,5±3,5
Картофельно-глюкозная	Сажистый	47,3±0,9	65,3±1,2 <sup>*)</sup>
	Войлочный	57,5±0,7	75,6±3,4 <sup>*)</sup>

Примечание к таблице 1: <sup>\*)</sup> – 7 суток

Выращивание этих изолятов на 3-х жидких средах (картофельно-глюкозной, 50% и 25% томатной) в условиях глубинной культуры и в стационарных условиях показало, что оба изолята хорошо росли на этих средах, но на картофельно-глюкозной лучше, чем на томатных, а в глубинной культуре лучше, чем в стационарной.

Отбор проб 4-суточной культуры изолятов альтернании (по 50 мл каждая проба) для определения биомассы показал, что на картофельно-глюкозной среде биомасса была настолько густой, что за 2 часа фильтрации удалось отфильтровать всего несколько капель культуральной жидкости, в то время как фильтрация проб с томатных сред шла очень быстро. Количество воздушно-сухой биомассы на картофельно-глюкозной среде было больше, чем на томатных, примерно в 2-3 раза.

Просмотр фильтров на предмет наличия конидий показал обилие конидий гриба на всех 3-х средах для «войлочного» изолята и незначительное количество конидий на фильтрах всех вариантов «сажистого» изолята. Высушенные фильтры с биомассой гриба отличались своим внешним видом: в вариантах с большим количеством конидий фильтры черные и снаружи, и внутри, а там, где конидий мало, фильтры имеют черную окраску только с внутренней стороны.

В следующем опыте на примере «войлочного» изолята альтернании мы испытывали в чашках Петри влияние на линейный рост альтернании агаризованной картофельно-глюкозной среды с разным содержанием картофеля и глюкозы, разным соотношением картофеля и глюкозы, разным содержанием питательной среды (таблица 2).

Таблица 2

**Линейный рост альтернании на среде с разным содержанием и соотношением картофеля и глюкозы (диаметр, в мм)**

Номер варианта	Содержание (г/л)		Сутки роста	
	Картофель	Глюкоза	4 суток	7 суток
25 мл среды в чашке Петри				
1	300	20	44,0±3,0	68,7±8,8
2	200		53,3±1,8	85,0±4,3
3	100		53,7±0,9	86,3±0,9
4	300	10	50,0±1,1	83,7±0,9
5	200		44,7±0,9	75,0±0,6
6	100		54,7±0,3	89,3±0,7
7	300	5	45,7±2,3	72,3±1,4
8	200		53,3±0,7	79,7±1,7
9	100		51,7±1,8	78,3±3,9
10	300	0	48,5±0,5	74,5±0,5
11	200		49,3±0,7	85,0±0,6
12	100		49,7±0,3	83,0±0
20 мл среды в чашке Петри				
1	300	20	46,8±2,4	76,3±2,5
2	200		54,8±0,5	86,3±0,9
3	100		55,0±0,5	98,5±0,5
4	300	10	49,0±0,6	79,8±1,6
5	200		44,8±0,3	76,8±1,3
6	100		43,8±0,9	75,8±2,2
7	300	5	39,5±2,8	68,3±2,0
8	200		50,5±0,5	85,3±0,5
9	100		52,3±0,5	86,8±1,2
10	300	0	46,3±0,5	75,8±1,1
11	200		48,0±0,7	81,0±0,7
12	100		47,5±1,3	79,5±2,5
15 мл среды в чашке Петри				
1	300	20	37,3±3,7	59,7±4,9
2	200		45,3±2,6	76,7±4,6
3	100		56,7±0,3	88,0±1,1

4	300	10	42,3±2,6	67,3±2,3
5	200		43,0±3,0	70,7±5,3
6	100		53,7±0,7	87,3±0,7
7	300	5	49,3±0,3	81,7±0,9
8	200		50,7±0,3	81,3±3,2
9	100		53,0±0,6	85,3±0,3
10	300	0	44,0±0,6	76,0±0
11	200		49,3±0,7	83,0±1,5
12	100		48,1±0,3	82,3±0,3
10 мл среды в чашке Петри				
1	300	20	50,0±0,8	78,8±2,2
2	200		55,8±1,1	87,0±0,4
3	100		60,0±0	87,3±0,7
4	300	10	50,5±1,0	83,5±1,3
5	200		44,3±1,3	75,5±0,5
6	100		54,0±0,6	87,7±0,3
7	300	5	50,0±0	81,7±0,9
8	200		52,3±0,3	88,0±0,7
9	100		52,5±1,0	85,5±0,3
10	300	0	43,3±0,7	72,3±1,1
11	200		47,3±0,8	80,3±2,2
12	100		43,8±1,1	70,5±1,6

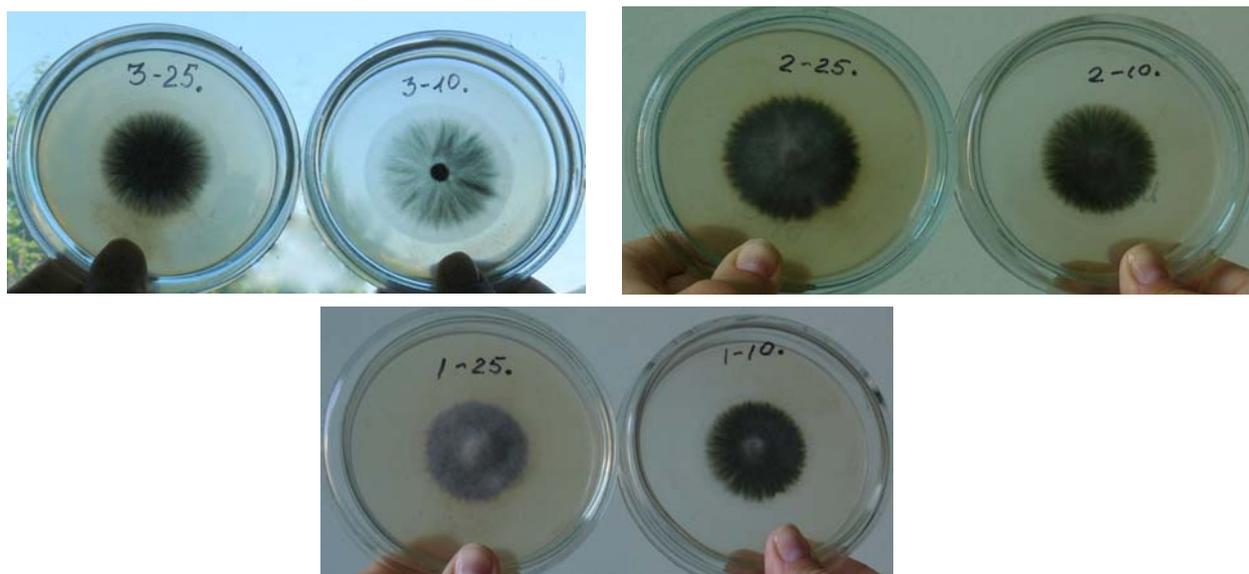
Какой-либо четко выраженной закономерности по влиянию указанных факторов на величину колонии патогена выявить не удалось. Однако когда мы по внешнему виду колоний сгруппировали чашки Петри с одинаковым количеством среды, оказалось, что варианты опыта выстроились в такой ряд:

- 1 - 4 - 7 - объединила доза картофеля 300 г / л;
- 2 - 5 - 8 - объединила доза картофеля 200 г/л;
- 3 - 6 - 9 - объединила доза картофеля 100 г/л.

Варианты 10 - 11 - 12 (без глюкозы) отличались слабым ростом мицелия, мицелий был более светлый, по диаметру колоний варианты не уступали предыдущим.

Количество среды в чашках Петри в большей степени сказалось на мощности развития мицелия, нежели на величине колонии гриба (табл.2, рис.1).

Содержание глюкозы в среде четко отразилось на воздушно-сухой биомассе мицелия (рис.2).



**Рис.1.** Внешний вид колоний гриба *альтернария* (войлочный изолят) в вариантах с разным содержанием, соотношением картофеля и глюкозы и количеством среды в чашке (первая цифра на чашке – номер варианта, вторая – количество среды в чашке).

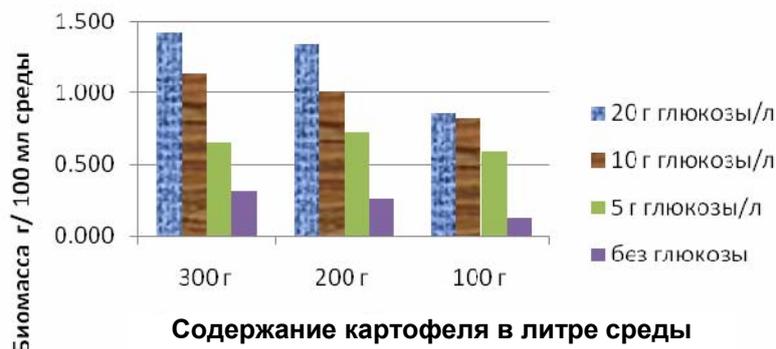


Рис.2. Воздушно-сухая биомасса „войлочного” изолята *альтернарии* на картофельно-глюкозной среде с разным содержанием и соотношением картофеля и глюкозы.

Аналогичные данные по линейному росту и биомассе *альтернарии* получены на изолятах G 348-28, ГЛТ – 7 и А 9 – 1. Как видно из данных, представленных на рис.3, существенных различий между линейным ростом изолятов на различных агаризованных питательных средах не выявлено. Четкие различия между вариантами отмечены по мощности развития мицелия (рис.3).

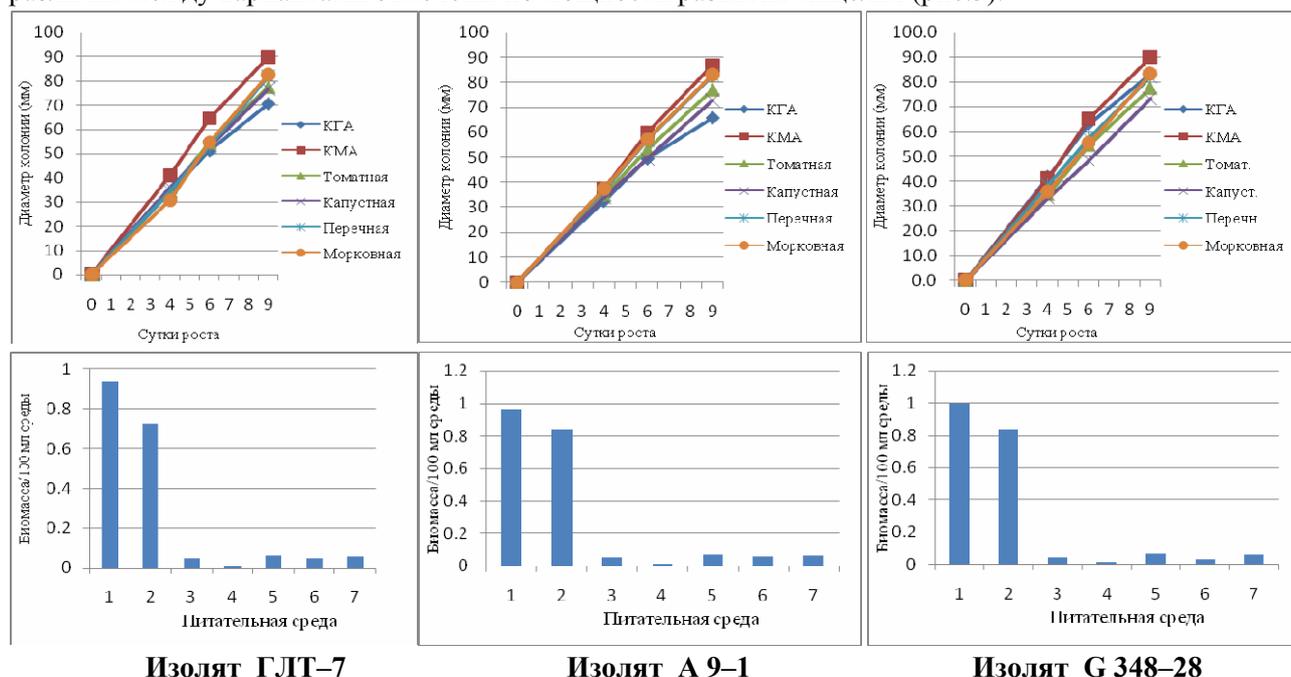


Рис. 3. Линейный рост и воздушно-сухая биомасса изолятов *альтернарии* на разных питательных средах  
 Обозначение агаризованных сред: 1 – картофельно-глюкозная; 2 – чапека; 3 – картофельно-морковная; 4 – томатная; 5 – капустная; 6 – перечная; 7 – морковная

Из агаризованных сред лучшими были картофельно-глюкозная и Чапека, наихудшей – томатная. Сравнение 7-ми жидких питательных сред (картофельно-глюкозная, Чапека, картофельно-морковная, морковная, капустная, перечная и томатная) по нарастанию биомассы гриба *альтернарии* показало, что наибольший выход биомассы отмечен на картофельно-глюкозной среде, несколько уступала ей среда Чапека (87%), на остальных средах биомасса колебалась в пределах 1,2 – 7,3% от биомассы на картофельно-глюкозной среде. По результатам оценки воздушно-сухой биомассы изолятов можно выстроить следующий ряд:

- G 348-28 КГ > Чапека > капустная ≥ морковная > картофельно-морковная > перечная > томатная;
- ГЛТ – 7 КГ > Чапека > капустная ≥ морковная > картофельно-морковная = перечная > томатная;
- А 9-1 КГ > Чапека > капустная ≥ морковная > перечная ≥ картофельно-морковная > томатная.

Извлекая из колбочек мицелий гриба разных изолятов альтернрии (для определения биомассы), мы обратили внимание на то, что у одних изолятов мицелиальная масса очень плотная, а у других – рыхлая, губчатая, удерживающая много жидкости. Поэтому величина сырой биомассы менее информативна, чем воздушно-сухой (табл.3).

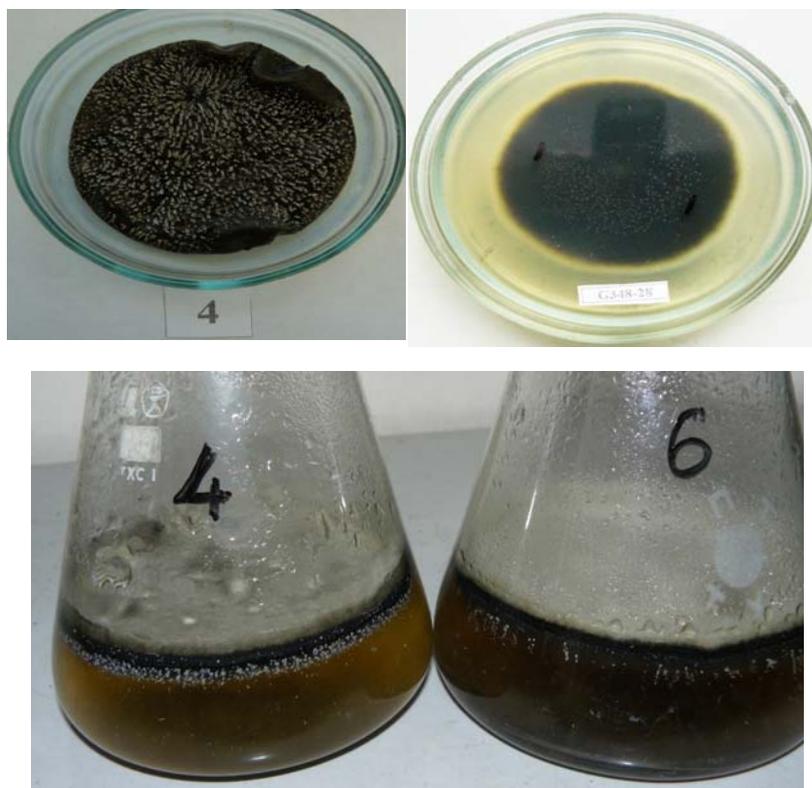
Таблица 3

**Сырая и воздушно-сухая биомасса изолятов *альтернрии*, выращенных на жидкой картофельно-глюкозной среде (20-дневная стационарная культура)**

Изолят	Сырая биомасса		Воздушно-сухая биомасса	
	г/100 мл среды	% к эталону	г/100 мл среды	% к эталону
G 348-28 (эталон )	9,26	—	0,95	—
ГЛТ -3	18,76	202,3	0,91	95,8
ГЛТ -7	10,80	116,6	0,94	98,9
ГЛТ -8	14,39	155,4	1,00	105,3
ВИ -39	15,78	170,4	0,92	96,8
КТ 68-1	14,03	151,5	0,93	97,9
2/07	9,47	102,3	0,79	83,2

Как видно из данных, представленных в таблице 3, изоляты незначительно различаются между собой по воздушно-сухой биомассе (максимум 17% ) и до 1,5 – 2 раз по сухой биомассе.

Разнообразие изолятов гриба и условий культивирования позволило выявить особенности некоторых изолятов. Так, изолят ГЛТ–7 расщеплялся на четкие секторы от серого до вишневого цвета только на капустной среде, а у нескольких изолятов только на картофельно-глюкозной среде (как агаризованной, так и жидкой) на подложке отмечены «звездочки» (рис.4).



**Рис.4.** Кристаллы («звездочки») на мицелии изолята G 348-28 и ГЛТ-7.

Вверху: слева – нижняя сторона мицелия G 348-28 (жидкая среда), справа – подложка мицелия G 348-28 на агаризованной среде. Внизу – слева изолят G348-28, справа ГЛТ–7.

Самыми многочисленными и крупными они были у изолята G 348-28, в меньшем количестве и меньшего размера – у изолята ГЛТ–7. В одной из статей, посвященных грибу *Alternaria*, есть упоминание о выделении грибом кристаллов радицина, напоминающих наши «звездочки». Связано ли это с патогенными свойствами, штаммов пока сказать затрудняемся.

### **Выводы**

Наиболее благоприятной для наработки биомассы местных изолятов альтернэрии была картофельно-глюкозная среда.

Воздушно-сухая биомасса лучше, чем линейный рост на агаризованных средах, характеризует степень пригодности среды для культивирования гриба.

Использование набора питательных сред позволяет выявить особенности изолятов альтернэрии.

Конидии гриба образовывались не только на картофельно-морковной, но и на других бедных питательных средах (капустная, перечная, томатная).

### **Литература:**

1. Болезни сельскохозяйственных культур: В 3-х томах / Под. ред. В.Ф. Пересыпкина. Т.3: Болезни овощных и плодовых культур. - Киев, 1991. - 208 с.
2. Моцкобили Н., Берадзе Л. Альтернэриоз чая в Грузии. // Первая Международная Закавказская конференция по фитопатологии. 25-27 сентября, Тбилиси, Грузия. Тезисы докладов. - Тбилиси, 2008, с.21.
3. Балашова Н.Н. Иммунологические проблемы в связи с селекцией устойчивых сортов сельскохозяйственных растений // Известия АН МССР. Серия Биол. и хим. науки, 1981, №3, с.59-66.
4. Коган Э.Д. Возбудитель альтернэриоза томатов // Грибные и вирусные болезни сельскохозяйственных культур в Молдавии. - Кишинев, 1977, 6-11.
5. Демидов Е.С., Садыкина Е.И., Сайчук А.И. Методы селекции томата на устойчивость к альтернэриозу. - Тирасполь, 2006. - 99 с.
6. Кулешов А.В. Макроспориоз томата и разработка мер борьбы с ним в условиях левобережной лесостепи УССР: Автореф. дисс. канд. с.-х. наук. - Киев, 1989. - 20 с.
7. Săvulescu A., Hulea A. și Bucur E. Protecția plantelor în sprijinul zonării producției agricole în R.P.R. - București: Editura Academiei Republicii Populare Române, 1960. - 416 p.

*Prezentat la 31.05.2011*