

ПОЛУЧЕНИЕ ИНОКУЛИОМА *ALTERNARIA* КУЛЬТИВИРОВАНИЕМ ПАТОГЕНА НА БУМАЖНЫХ ФИЛЬТРАХ

Виктория ШУБИНА

Институт защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы

OBȚINEREA INOCULULUI DE *ALTERNARIA* PRIN CULTIVAREA PATOGENULUI PE FILTRE DE HÂRTIE

Pentru obținerea inoculului, fitopatogenul a fost cultivat pe filtre de hârtie înmuiate în mediu de nutriție lichid. Mediul de nutriție a fost pregătit pe bază de decoct de tomate, ardei, varză sau cartof-morcov, la care s-a adăugat 0,2% zaharoză. Incubația a durat 7 zile, la temperatura de 24,5°C, o fotoperioadă de 12 ore.

Cuvinte-cheie: *Alternaria*, sporulație, concentrat de inocul.

PRODUCTION OF INOCULUM OF *ALTERNARIA* WAS ACHIEVED BY CULTURING THE PATHOGEN ON PAPER FILTERS

When obtaining conidia the moistened paper filters, wetted with liquid nutritive media, prepared on the base of one of the following cultures: tomato, paper, cabbage or potato and carrot liquor have been used. The liquid contained 0,2% sucrose. Time and temperature of incubation were 7 days, 24°C under a 12-hours photoperiod.

Keywords: *Alternaria*, sporulation, inoculum concentration.

Альтернариозы, вызываемые грибами рода *Alternaria*, встречаются повсеместно. Растениями-хозяевами гриба *Alternaria* являются разнообразные сельскохозяйственные культуры: томаты, картофель, баклажаны, перец, морковь, разные виды капусты, табак, цитрусы, множество декоративных растений и сорняки [7]. Поражает *Alternaria* вегетативную часть растений и плоды (в период вегетации и хранения).

Фитопатологи и селекционеры в своей работе используют искусственный инфекционный фон для тестирования химических и биологических препаратов, определения вирулентности гриба, отбора устойчивых сортов сельскохозяйственных культур.

В естественной среде не всегда имеется достаточное количество инфицированного материала, и оценка может быть недостоверной вследствие неравномерного распределения инфекции на обследуемой площади, поэтому на практике чаще всего создаются искусственные инфекционные фоны.

При создании инфекционного фона для болезней, вызываемых грибными патогенами, поражающими вегетативную часть растений, обычно рекомендуется инокуляция растений суспензией спор гриба. Отмечено, что грибы рода *Alternaria* относительно хорошо растут на искусственных питательных средах, однако не всегда удается добиться хорошего спороношения. На отсутствие споруляции или слабую споруляцию при культивировании изолятов *Alternaria* *in vitro* указывают многие авторы [1, 5, 6, 10], в связи с чем много работ посвящено стимуляции конидиеобразования гриба *Alternaria*.

Для получения инокулюма предлагаются различные методы стимулирования споруляции гриба: воздействие светом различных ламп (ультрафиолетовое облучение, флуоресцентное освещение, лампы белого накаливания), изменение фотопериода, разрушение и удаление воздушного мицелия микробиологическими инструментами, выращивание на фильтровальной бумаге, выращивание на средах специального состава и различные комбинации этих методов. При использовании этих методик споруляция сильно варьирует, что препятствует получению стабильного количества инокулюма.

Важнейшими факторами споруляции гриба являются условия питания, температура, влажность и световые условия.

Японскими учеными Ohmori Kaori & Nakajima Mitsuo [9] отмечалось, что эффективность споруляции *Alternaria kikuchiana* Tanaka зависела не только от среды и температуры, но и от удаленности флуоресцентных ламп от мицелия. При высокой температуре и увеличении удаленности мицелия от ламп споруляция гриба уменьшалась, но увеличивался рост воздушного мицелия и, наоборот, при низкой температуре и близком расположении к лампам споруляция гриба увеличивалась. Спорообразование гриба было обильным и при стимулировании мицелия ультрафиолетовыми лампами при низкой температуре и небольшой удаленности от ламп.

Masangkay R.F. et al. [8] отмечали влияние состава среды и освещенности на споруляцию. Споруляция гриба при близком расположении к ультрафиолетовым лампам при температуре 28°C заметно увеличивалась на среде V-8, но существенно уменьшалась на среде ½ КГА (картофельно глюкозный агар). В темноте происходило обратное: на среде ½ КГА было получено самое большое количество конидий, на среде V-8 число конидий существенно снизилось.

В работе Carvalho D.D.C. et al. приводится сравнительная характеристика методологических подходов к стимулированию конидиеобразования изолятов альтернэрии, выделенных с цитрусов. При сравнении действия ламп с различными характеристиками наряду с мицелиальным стрессом, связанным с механическим повреждением и холодовым шоком при 12 и 24 часах освещенности, проводилось инокулирование стерильной ткани цитрусовых. Первоначально гриб выращивали на среде КГА в течение 5 дней при температуре 25°C с 12-часовым фотопериодом, затем блоками гриба инфицировали кусочки ткани и через 4 дня наблюдали рост мицелия. Эта методика удобна для проверки фитотоксичности изолятов гриба [5].

Методика, разработанная Shahin E.A. & J.F. Shepard [11], является одной из успешных попыток получения обильного конидиеобразования. Эта методика двухфазная. Сначала гриб выращивали на первичной среде, каковой являлся КГА (лучшей для мицелиального роста гриба) [2, 5, 6, 8, 11, 12]. Затем использовали S-среду с добавлением карбоната кальция для получения обильного спороношения. Работая ранее по этой методике, мы внесли в нее некоторые коррективы, подходившие для наших условий [3]. Это было обусловлено тем, что на среде КГА при температуре 25°C в темноте [10] нам не удавалось получить колонии без воздушного мицелия. В наших опытах колонии росли медленно и образовывали пышный воздушный мицелий без конидий. При этом ни в темноте, ни при естественном фотопериоде (при освещении как верхней, так и нижней стороны колоний) конидии не образовывались ни при 25°C, ни при 19°C, вплоть до высыхания среды в чашках Петри. Колонию гриба разрезали стерильным скальпелем на прямоугольные блоки, которые переносили на чашки Петри со средой, содержащей CaCO₃ [3,11]. Спороношение получали уже после 2-х суток культивирования.

В практике получения конидий на искусственных питательных средах не всегда, используя тот или иной метод, удается получить стабильное количество необходимого инокуляционного материала. Одним из методов получения стабильного количества инокулюма может являться использование бумажных фильтров [4, 6, 10].

Методика использования бумажных фильтров также является двухфазной. Первичная стадия наработки мицелия может быть различна. В случае Dhingra O.D. & Sinclair J. [6], наработка первичного инокулюма идет во встряхиваемой культуре до тех пор, пока не сформируется достаточный мицелий. Мицелий собирается путем центрифугирования, измельчается в блендере и повторно центрифугируется. Осадок ресуспендируют и распределяют на сухие бумажные фильтры в чашки Петри. Никакого питания на бумажные фильтры не добавляют.

При изучении влияния состава питательных сред на рост гриба *Alternaria* (гриб выращивали в стационарной и глубинной культуре, при определении биомассы гриба использовали бумажные фильтры), мы обратили внимание на массовое спорообразование гриба как на самом мицелии, так и на внутренней и наружной сторонах фильтра [2]. Поэтому наше внимание привлекла методика получения инокулюма альтернэрии культивированием патогена на бумажных фильтрах [4]. Методика была разработана для *Alternaria helianthi* – серьезного патогена подсолнечника. Культуру гриба выращивали на среде КГА в чашках Петри, а затем переносили растиранием агаризованного блока с мицелием гриба на бумажные 3-слойные фильтры, смоченные экстрактом семян подсолнечника и 0,2% сахарозы (для получения повторного спороношения). Чашки Петри с фильтрами стерилизовали при 0,5 атм 15 минут. После стерилизации фильтры инокулировали агаризованными блоками с мицелием гриба *Alternaria helianthi*. Инокулированные фильтры инкубировали при температуре 23-25°C при 12-часовом фотопериоде. Многочисленные конидии получали в течение 7 дней и после полного высыхания фильтров хранили их в чашках Петри при комнатной температуре. Жизнеспособность конидий сохранялась более 12 месяцев. Титр конидий не определяли. Спороношение оценивалось как обильное или слабое, Allen et al. [4].

Цель нашего исследования – адаптировать методику Allen et al. [4], разработанную для *Alternaria helianthi*, для альтернэрии с пасленовых культур.

Методика и материалы исследований

Источником получения конидий служили два изолята гриба *Alternaria* (БП 2 и Ран.49). Изолят БП 2 выделен с плода баклажана, изолят Ран.49 – с листьев томата сорта Ранний 83. Изоляты выращивали на среде КГА.

Основываясь на методике [4] и на ранее проделанных нами работах [2,3,], для стимулирования споруляции изолятов *Alternaria* были взяты отвары томата, перца сладкого, капусты и картофельно-морковный.

Для приготовления 1 литра среды было взято:

- для томатной среды – отвар 40 г томата, 2 г сахарозы;
- для перечной среды – отвар 40 г перца, 2 г сахарозы;
- для капустной среды – отвар 40 г капусты, 2 г сахарозы
- для картофельно-морковной среды (КМ) – отвар 20 г картофеля, 20 г моркови, 2 г сахарозы.

Отвары фильтровали через несколько слоев медицинской марли и доводили до необходимого объема водой с добавлением сахарозы. После этого среду разливали по 100 мл в колбочки Эрленмейера и стерилизовали при 1атм 30 минут. По методике [4] среду заливали в чашки Петри непосредственно на фильтры и затем стерилизовали, фильтры инокулировали после стерилизации. Опробовав именно эту схему проведения опыта, мы столкнулись с некоторыми трудностями. При автоклавировании фильтры размягчались и разрывались при дальнейшем их инокулировании. Поэтому среду стали вносить на сухие стерильные фильтры и сразу после этого инокулировать их мицелием гриба на агаризованном блоке. В другом опыте для получения более равномерного газона конидий фильтры инокулировали не мицелиальным блоком, а опрыскивали конидиальной суспензией.

После инокулирования чашки Петри с фильтрами помещали на стеллаж с лампами (12-часовой фотопериод при температуре 24,5°C). Через 7 дней появлялось обильное спороношение. Смыв конидий проводили 40 мл воды с помощью кисточки. После смыва конидий чашки Петри с фильтрами повторно инкубировали для получения второго “урожая” конидий. Титр полученной суспензии определяли с помощью камеры Горяева.

Повторность опыта 3-кратная.

Результаты

При определении титров не выявлено больших различий между испытанными средами и изолятами альтернрии (таблица 1).

Таблица 1**Титр конидиальной суспензии изолятов альтернрии на различных питательных средах (КОЕ/мл, среднее по 3-м повторностям)**

Изолят	Питательная среда			
	Перечная	Капустная	Карт. – морк.	Томатная
БП 2	$7,5 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$8,3 \times 10^5$
Ран. 49	$7,1 \times 10^5$	$8,9 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$

После повторного смыва конидий с бумажных фильтров, титр был не ниже 10^4 КОЕ/мл (таблица 2).

Таблица 2**Титр конидиальной суспензии изолятов альтернрии на различных питательных средах (КОЕ/мл, среднее по 3-м повторностям, повторный смыв)**

Изолят	Питательная среда			
	Перечная	Капустная	Карт. – морк.	Томатная
БП 2	$1,6 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$
Ран. 49	$2,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$

Таким образом, один и тот же фильтр можно использовать для получения суспензии дважды.

Титр конидий равномерного конидиального газона был на уровне 10^5 КОЕ/мл: на капустной среде $5,1 \times 10^5$ спор/мл; томатной среде $3,4 \times 10^5$ спор/мл; КМ среде $2,7 \times 10^5$ спор/мл; перечной среде $2,3 \times 10^5$ спор/мл (использовали только изолят Ран.49, рис.1).



Рис.1. Чашка Петри с конидиями альтернарии (изолят Ран.49, фильтр пропитан жидкой картофельно-морковной средой).

Фильтры с конидиями до использования могут храниться в лаборатории без потери жизнеспособности в течение довольно продолжительного времени. Нами установлено, что конидии жизнеспособны в течение полугода. Наблюдения по сохранению жизнеспособности конидий продолжаются.

Выводы

1. Подобраны питательные среды для продуцирования конидий на бумажных фильтрах изолятов *Alternaria*, выделенных с пасленовых культур.

2. При использовании одной и той же инфицированной чашки Петри, можно получить повторный сбор конидий для получения суспензии.

Библиография:

1. ДЕМИДОВ, Е.С., САДЫКИНА, Е.И., САЙЧУК, А.И. *Методы селекции томата на устойчивость к альтернариозу*. Тирасполь, 2006. 99 с.
2. НИКОЛАЕВА, С.И., НИКОЛАЕВ, А.Н., ШУБИНА, В.Э., ВОЛОЩУК, Л.Ф. Влияние состава питательной среды на рост грибов рода *Alternaria*. В: *Studia Universitatis. Seria Științe reale și ale naturii*, 2011, №1(41), p.117-123.
3. ШУБИНА, В.Э., НИКОЛАЕВА, С.И., НИКОЛАЕВ, А.Н. Метод инициации конидиеобразования *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Groun на искусственной питательной среде. В: *Материалы докладов Международного симпозиума «Защита растений – достижения и перспективы»*. Кишинев, 2009, с.209-210.
4. ALLEN, S.J., BROWN, J.F., KOCHMAN, J.K. Production of inoculum and field assessment of *Alternaria helianthi* on sunflower. In: *Plant disease*, 1983, №39, p.665-668.
5. CARVALHO, D.D.C., ALVES, E., BATISTA, T.R.S., CAMARGOS, R.B., LOPES, E.A.G.L. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. In: *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008, №39, p.792-798.
6. DHINGRA, O.D., SINCLAR James. *Basic plant pathology methods*. 1995. 434 p.
7. FRANKLIN, L. *Alternaria diseases*. <http://anrcatalog.ucdavis.edu>
8. MASANGKAY, R.F., PAULITZ, T.C., HALLETT, S.G., WATSON, A.K. *Biocontrol science and technology*, 2000, vol.10, №4, p.385-397.

9. OHMORI, K., NAKAJIMA, M. Effect of light on sporulation of *Alternaria kikuchiana* Tanaka. In: *The Phytopathological Society of Japan*, 1970, vol.36, №1, p.11-16.
10. RODRIGUES, T.T.M.S., MAFIA, L.A., DHINGRA, O.D., MIZUBUTI, E.S.G. In vitro production of conidia of *Alternaria solani*. In: *Tropical plant pathology*, 2010, vol.35, №4, p.203-212.
11. SHAHIN, E.A., SHEPARD, J.F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. In: *Phytopathology*, 1979, №69, p.618-620.
12. SINGH, U.P., SINGH, S.K., SARMA, B.K. Time-dependent sporulation, conidial size and germ tube formation in *Alternaria tenissiana* (Kunza ex Pers.) Wiltshire on different media. In: *J. Phytopathology*, 2000, №148, p.413-416.

Prezentat la 25.09.2013