

МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬТЕРНАРИОЗА КАРТОФЕЛЯ В ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЕ

Елена Сергеевна Мельникова, аспирант кафедры биологии и защиты растений
Елизавета Айрапетовна Мелькумова, доктор биологических наук,
профессор кафедры биологии и защиты растений

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

С изменением климата в сторону потепления произошла активизация грибов рода *Alternaria*, прежде считавшихся сапротрофами. Из-за сложившихся климатических условий отдельные виды этого рода сменили свой статус и приобрели признаки факультативного паразитизма на многих культурных растениях, включая картофель. На данной культуре в условиях Центрального федерального округа представлено два вида этого рода: *A. solani* и *A. alternata*. Внешние симптомы проявления заболевания на листьях трудно различимы, однако известно, что первый вид более агрессивен для картофеля. Объектами исследований являлись три сорта картофеля: Ред Скарлет, Рокко и Пикассо, на листьях которых представлены симптомы поражения альтернариозом в виде темно-буро-коричневых концентрических пятен. Выделение грибов *A. alternata* и *A. solani* в чистую культуру проводили по общепринятым методикам. Для этого с пораженных листьев картофеля извлекали их биологический материал, который помещали на различные питательные среды: синтетическую (среда Чапека), полусинтетическую (картофельно-глюкозный агар) и натуральную (ломтики картофеля). Известно, что на паразитическую активность возбудителей существенное влияние оказывают состав и качество питательной среды с учетом источников питания. Лучшей средой для культивирования и выявления различий между штаммами оказалась среда Чапека. Двадцатидневные спорулирующие культуры на этой среде могут использоваться для дальнейшего заражения сортового материала картофеля. В ходе проведенных исследований установлено, что на территории Воронежской области на картофеле преобладает популяция вида *A. alternata*, при культивировании которого на среде Чапека в режиме 20-22°C и полном отсутствии источника света произошла дифференциация и выявлено четыре штамма, отличавшихся друг от друга морфолого-культуральными признаками: размером, консистенцией и цветом колоний. Таким образом, различия, обнаруженные у штаммов, свидетельствуют о сложном внутривидовом составе этого гриба.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альтернариоз картофеля, выявление заболевания, питательные среды, штаммы, активность возбудителей.

Climate changes towards warming have led to an increase in the activity of fungi of the genus *Alternaria* previously considered to be saprotrophs. Due to newly established climatic conditions some species of this genus have changed their status and acquired the characteristics of facultative parasitism on many cultivated plants including potato. In the Central Federal District parasites on this culture are represented by two species of this genus: *A. solani* and *A. alternata*. External symptoms of the disease on leaves are difficult to be distinguished; however, it is known that the first of the mentioned species is more aggressive for potatoes. The objects of research were three potato varieties: Red Scarlett, Rocco and Picasso, the leaves of which presented with the symptoms of potato blight in the form of dark-brown concentric spots. The *A. alternata* and *A. solani* fungi were isolated into pure culture using conventional techniques. For this purpose their biological material was taken from the affected potato leaves and placed on different culture media: synthetic (Czapek's medium), semisynthetic (potato-glucose agar) and natural (potato slices). It is known that parasitic activity of causative agents is significantly influenced by the composition and quality of culture medium with the account for nutrition sources. The best medium for cultivation and identification of differences between strains was Czapek's medium. Twenty-day-old sporulating cultures on this medium can be used for further infestation of potato cultivars. In the course of research it was established that on the territory of Voronezh Oblast potatoes are predominantly infested with *A. alternata* species. As a result of their cultivation on Czapek's medium at 20-22°C in total absence of light their differentiation occurred and four strains were identified differing from each other by morphological and cultural characteristics, such as size, consistency and color of colonies. Thus, the differences identified in strains indicate a complex intraspecific composition of this fungus.

KEY WORDS: potato blight, disease detection, culture media, strains, activity of causative agents.

Введение. Выделение грибов в чистую культуру позволяет изучить морфолого-культуральные признаки, благодаря которым можно уточнить видовую принадлежность возбудителя и определить характер его паразитизма. Виды рода *Alternaria*, несмотря на гембиотрофный образ жизни, в сложившихся условиях проявляют черты паразитизма. В различные годы проводились исследования по выделению грибов в чистую культуру на озимой пшенице, сахарной свекле и других культурных растениях [4, 5, 9, 10].

В качестве возбудителей альтернариоза пасленовых, в том числе и картофеля, в литературе упоминаются мелкоспоровые виды: *A. alternata* (Fries) Keissler [3, 14], *A. tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) [2, 8], *A. infectoria* [17] и *A. avenicola* [2, 17], которые поражают многие другие растения [12, 17]. Причем, *A. alternata* представлен как наиболее часто встречающийся, повсеместно распространенный вид рода, в то время как некоторые авторы указывают на наличие специализированных форм внутри этого вида [11, 13, 15]. По данным Э.Г. Симмонса [16], вид *A. alternata* в узком смысле встречается относительно редко, а его разделение на патотипы некорректно. Такое противоречие объясняется неточностями идентификации, которые присутствуют во многих исследовательских работах и являются следствием нестандартных условий выращивания чистых культур в установлении видов только по морфологическим особенностям конидий [8].

Методика эксперимента. Выделение грибов *A. alternata* и *A. solani* в чистую культуру проводили с использованием стандартных микробиологических методов [6].

Посев осуществляли в чашки Петри на агаризованную питательную среду – картофельно-глюкозный агар (КГА), а также в пробирки: на жидкую синтетическую питательную среду Чапека, полусинтетическую среду – КГА и натуральную – ломтики очищенного картофеля, помещенные в пробирки и простерилизованные в автоклаве при 0,5 атм. в течение 30 минут.

Выделение гриба рода *Alternaria* проводили с пораженных листьев сортов картофеля Ред Скарлет, Рокко и Пикассо, используя биологический материал. Культивирование осуществляли при температуре 22°C, а через каждые 7-10 суток на протяжении месяца проводили морфологическое описание колоний. После изучения полученного в пробирках материала использовали чашки Петри с питательными средами: синтетическая питательная среда Чапека и полусинтетическая питательная среда – КГА.

Методом укола в центр чашки Петри проводили посев полученного в пробирках мицелия на питательную среду Чапека и КГА в 6-кратной повторности.

Спустя 10 дней проводили описание колоний. При описании цвета колоний использовали шкалу цветов А.С. Бондарцева [1].

Результаты и их обсуждение. Через неделю в пробирках, где на питательную среду Чапека помещена пораженная ткань сорта Рокко, наблюдался сдержанный рост колоний мицелиального типа серого (в 4) цвета, в то время как на КГА отмечался интенсивный рост вегетативного мицелия, который захватил всю поверхность «скоса». Колония также имела серый окрас. На естественной питательной среде наблюдался рост ватобразного мицелия белого (д 3) цвета.

При помещении в пробирки пораженного биологического материала сорта картофеля Ред Скарлет на питательную среду Чапека и на кусочки стерильного картофеля отмечался умеренный рост колоний мицелиального типа серого (в 4) цвета, а на КГА – активный рост воздушного белого (д 3) мицелия, который имел сдержанный характер роста, то есть не захватывал всю поверхность «скоса».

При исследовании пораженного биологического материала сорта Пикассо с использованием синтетической среды Чапека наблюдался также умеренный рост колоний мицелиального типа, имеющий серый (в 4) окрас.

На 14-й день с момента начала эксперимента на естественной питательной среде (ломтики картофеля) с использованием пораженной ткани сорта Пикассо появился ватообразный налет пепельно-серого (к 2) цвета мицелиального типа. На картофельно-глюкозной питательной среде в пробирках отмечен ватообразный налет темно-серого (а 2) цвета. На границе питательной среды и налета обнаружено угольно-черное спороношение (а 1), а питательная среда впоследствии радиально растрескивалась. На полусинтетическом КГА и питательной среде Чапека отмечен ватообразный налет мицелиального типа белого (д 3) цвета. На границе питательной среды и налета появилось углубление в субстрат с бледно-песочным (к 3) окрасом.

На пораженных кусочках ткани сорта Ред Скарлет, помещенных на ломтики картофеля в пробирках, наблюдался слизистый налет рыжеватого (ж 2) цвета, в то время как на КГА – ватообразный мицелиальный налет, верхушка которого имела мышино-серый (а 4) окрас, а ближе к субстрату зафиксирован переход с угольно-черным (а 1) оттенком, при этом граница с питательной средой была четкой. На питательной среде Чапека налет уплотненный ватообразный переходящего цвета: ближе к субстрату – угольно-черный, выше – темно-серый (а 2), с белой верхушкой (д 3). При этом граница между налетом и питательной средой четкая.

На естественной питательной среде, при использовании пораженной ткани сорта Рокко, налет ватообразный, состоящий из мицелия гриба бледно-серовато-фиолетового (а 5) цвета. На картофельно-глюкозном агар-агаре граница между субстратом и бархатистым черным (а 1) налетом имела четкие границы. Налет на питательной среде темно-серого (а 2) цвета. Культура гриба на среде Чапека имела четкую с переходом от черного (а 1) к серому (в 4) цвету границу между субстратом и ватообразным белоснежным (д 3) налетом мицелия с переходом от черного (а 1) к серому (в 4) цвету, а с обратной стороны чашки Петри питательная среда радиально растрескивалась.

В пробирках, в которых посев на питательные среды проводился спустя 6 дней, также произошли изменения. С использованием пораженной ткани сорта картофеля Пикассо на питательной среде картофельно-глюкозного агар-агара образовался воздушный ватообразный мицелий белоснежного (д 3) цвета. Граница между налетом и субстратом носила ярко выраженные очертания оранжево-красного (н 4) оттенка, при этом питательная среда радиально растрескивалась. На питательной среде Чапека – воздушный налет белоснежного (д 3) мицелия, гриб углублен в субстрат, граница между питательной средой и налетом цвета слоновой кости (б 6 + д 3).

С использованием пораженных фрагментов листа сорта Ред Скарлет культура гриба с питательными средами Чапека и КГА выглядела одинаково: границы с субстратом четкие, угольно-черного (а 1) цвета, переходящие в мышино-серый (а 4) и в пепельный (к 2) оттенки.

На биологическом материале сорта Рокко в пробирках отмечена граница между черным (а 1) ватообразным налетом мицелия с переходом в мышино-серый (а 4) цвет и субстратом. На питательной среде Чапека граница между средой и темно-серым (а 2) ватообразным налетом четкая черная (а 1).

В чашках Петри на биологическом материале, взятом с сорта Пикассо, на питательной среде Чапека наблюдалось наличие налета, состоящего из мицелия и спороношения гриба, причем в одной из чашек Петри он воздушный, белоснежного (д 3) цвета и распространен по всей поверхности (диаметр колоний 4,1 × 4,3 см), в другой – ватообразный бледно-серовато-фиолетового (а 5) цвета, диаметром 3,8 × 3,9 см. На КГА признаки роста гриба отсутствовали.

На среде Чапека при выделении *A. alternata* из пораженных листьев сорта Ред Скарлет получены сходные результаты, в то время как на КГА рост мицелия зафиксиро-

ван лишь в одной чашке Петри. Размер ватообразной колонии $7,1 \times 7,4$ см, белого (д 3) цвета, переходящий в темно-серый (а 2), края четко ограничены, темно-оливковые (е 4).

Спустя 10 дней после начала культивирования произошли значительные изменения внешнего вида и характера колоний. Там, где присутствовал биологический материал сортов Ред Скарлет и Пикассо, отмечалось израстание мицелия, на материале сорта Рокко на питательной среде Чапека дифференцировано четыре штамма гриба *A. alternata* (см. табл.).

Характеристика штаммов *A. alternata*, выделенных с сорта картофеля Рокко

Питательная среда	Штаммы			
	1	2	3	4
Среда Чапека	Колонии быстрорастущие с умеренным воздушным мицелием, с интенсивным спороношением. Конидии мелкие обратнобулавовидные, оливковые (н 1) с поперечными перегородками			
	Диаметр колоний $5,2 \times 5,2$ см. Колонии беловатого цвета с темно-гнедыми вкраплениями. Центр колоний темно-пепельного окраса	Диаметр колоний $6,1 \times 5,6$ см, края ватообразные, беловатого окраса. Центр колоний серовато-фиолетовый, приближенный к темно-гнедому	Диаметр колоний $6,6 \times 6,5$ см. Колонии беловатого цвета с темно-гнедыми вкраплениями. Центр колоний серовато-фиолетовый, приближенный к темно-гнедому	Диаметр колоний $3,6 \times 3,2$ см. Края ватообразные, белого цвета, в центре темно-оливковый окрас
КГА	Признаки роста отсутствуют	Брак	Признаки роста отсутствуют	Признаки роста отсутствуют

Для определения устойчивости сортовых особенностей картофеля к альтернариозу рассчитаны среднеарифметические значения ($M \pm m$) колоний гриба в чашках Петри по общепринятой методике.

Размер первого, второго, третьего и четвертого штаммов соответственно составил:

$$M \pm m_1 = (5,2 \pm 1,0) \times (5,2 \pm 0,9);$$

$$M \pm m_1 = (6,1 \pm 0,9) \times (5,6 \pm 0,9);$$

$$M \pm m_1 = (6,6 \pm 0,8) \times (6,5 \pm 0,8);$$

$$M \pm m_1 = (3,6 \pm 1,5) \times (3,2 \pm 1,6).$$

Выводы. В ходе проведенных исследований установлено, что на территории Воронежской области на картофеле преобладает вид *A. Alternata*, при культивировании которого на среде Чапека произошла дифференциация с выявлением четырех штаммов, отличающихся друг от друга морфолого-культуральными признаками: размером, консистенцией и цветом колоний. Различия, обнаруженные у штаммов, свидетельствуют о сложном внутривидовом составе этого гриба.

Список литературы

1. Бондарцев А.С. Шкала цветов. Пособие для биологов при научных и научно-прикладных исследованиях / А.С. Бондарцев. – Москва : Изд-во Академии наук СССР, 1954. – 18 с.
2. Ганнибал Ф.Б. Видовой состав, таксономия и номенклатура возбудителей альтернариоза листьев картофеля / Ф.Б. Ганнибал // Приложение к журналу «Вестник защиты растений»: Лаборатория микологии и фитопатологии им. А.А. Ячевского, ВИЗР. – Санкт-Петербург : ВИЗР, 2007. – С. 142-148.
3. Иванюк В.Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В.Г. Иванюк, С.А. Банадысев, Г.К. Журомский. – Минск : РУП «Белорусский НИИ картофелеводства», 2003. – 550 с.
4. Ищенко Л.А. Изучение внутривидового состава гриба *Septoria ribis* Desm. в зависимости от условий выращивания / Л.А. Ищенко, Е.А. Мелькумова // Бюллетень ЦГА им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1979. – № 32. – С. 38-41.
5. Мелькумова Е.А. Биолого-экологические особенности развития возбудителя септориоза озимой пшеницы / Е.А. Мелькумова // Микология и фитопатология. – 1990. – Т. 24. – № 2. – С. 156-161.
6. Никитина Е.В. Методы общей и специальной микробиологии : учеб. пособие / Е.В. Никитина, О.А. Решетник. – Казань : Казанский государственный технологический университет, 2006. – 123 с.
7. Орина А.С. Видовое разнообразие, биологические особенности и география грибов рода *Alternaria*, ассоциированных с растениями семейства Solanaceae / А.С. Орина, Ф.Б. Ганнибал, М.М. Левитин // Микология и фитопатология. – 2010. – № 44 (2). – С. 150-159.
8. Орина А.С. Видовой состав и патогенные свойства грибов рода *Alternaria*, обнаруженных на пасленовых культурах / А.С. Орина, Ф.Б. Ганнибал // Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика : мат. Международной науч.-практ. конф., посвященной 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. – Большие Вяземы, 2012. – С. 152-159.
9. Стогниенко О.И. Культурально-морфологический и физиолого-биохимический статус *Cercospora beticola* Sacc / О.И. Стогниенко, Е.А. Мелькумова // Тезисы докладов второго съезда микологов России. – Москва, 2008. – Т. 2. – С. 208.
10. Стогниенко О.И. Характеристика культурально-морфологических показателей штаммов *Cercospora beticola* Sacc / О.И. Стогниенко, Е.А. Мелькумова // Материалы второго всероссийского съезда по защите растений и фитосанитарное оздоровление экосистем. – Санкт-Петербург, 2005. – Т. 1. – С. 218-221.
11. Brandwagt B.F. A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisins / B.F. Brandwagt, L.A. Mesbah, F.L. Takken et al // Plant Pathology. – 2000. – Vol. 97, No. 9. – P. 4961-4966.
12. Halfon-Meir A. Internal mold caused in sweet pepper by *Alternaria alternata*: fungal ingress / A. Halfon-Meir, I. Rylski // Phytopathology. – 1983. – Vol. 73, No. 1. – P. 67-70.
13. Morris P.F. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs / P.F. Morris, M.S. Connolly, D.A. Clair // Mycological Research. – 2000. – Vol. 104, No. 3. – P. 286-292.
14. Pellegrini M.G. In vitro analysis of defense mechanism in the system *Solanum tuberosum* – *Alternaria alternata* / M.G. Pellegrini, A.R. Garbuglia, S. Guerrazzi // Phytopathology. – 1990. – Vol. 130, No. 2. – P. 134-146.
15. Pryor B.M. Morphological, Pathogenic and Molecular Characterization of *Alternaria* Isolates Associated with *Alternaria* Late Blight of Pistachio / B.M. Pryor, T.J. Michailides // Phytopathology. – 2002. – Vol. 92, No. 4. – P. 406-416.
16. Simmons E.G. *Alternaria* themes and variations (63-72) / E.G. Simmons // Mycotaxon. – 1993. – Vol. 48. – P. 91-107.
17. Rotem J. The genus *Alternaria* / J. Rotem. – Israel : APS Press, 1994. – 326 p.