

Выделение и агрессивность возбудителей болезней родов *Fusarium* и *Alternaria* на моркови столовой



Л.М. Соколова

Во многих регионах РФ и странах ближнего зарубежья отмечено усиление вредоносности болезней моркови, вызванных грибами рр. *Fusarium* и *Alternaria*. В зависимости от погодных условий и фитосанитарного состояния посевов распространённость болезней может достигать 70 – 80 %, а урожайность корнеплодов снижается на 35-50 %. Одним из путей, обеспечивающих целенаправленное ведение селекции на устойчивость, является выделение местных изолятов возбудителей болезней, методы ускоренной оценки на основе определения агрессивности новых штаммов и применение их в селекционной работе. Цель работы: выделить местные изоляты возбудителей болезней и

определить их агрессивность. Отбор пораженного материала для исследований проводили на опытных делянках ФГБНУ ВНИИО (Московская обл.). Опыты по определению агрессивности выделенных штаммов возбудителей рр. *Alternaria* и *Fusarium* проводили с 2007 по 2014 гг. лабораторным методом. В результате проделанной работы создана коллекция наиболее агрессивных местных штаммов патогенов: *Fusarium avenaceum* Sacc (Т7 - F1), *Fusarium oxysporum* Schlecht (ПОЗ – F3), и ШЗ, *Alternaria radicina* M., Dr. Et E - BC-1-1A; BC-2-1A; M – 2 – 3A; A-1 и A-3. Приведено описание мицелия по штамму р. *Fusarium*: ШЗ – штамм формирует пушистую бело-розовую колонию и обильное спороношение. Рассмотрена градация варьирования штаммов р. *Fusarium* – от белых войлочных и слизистых до бело - розовых пушистых. Выделенные наиболее агрессивные штаммы используются в селекционной работе над повышением устойчивости моркови столовой при проведении опытов по опрыскиванию суспензией спор по листовой пластине моркови столовой и при создании искусственных инфекционных фонов. Продолжается работа по выделению, идентификации и определению агрессивности возбудителей альтернариоза и фузариоза столовой моркови, а также по подбору образцов моркови столовой - контролей устойчивости к болезням.

Ключевые слова: штаммы, агрессивность, *Alternaria*, *Fusarium*, диски-вырезки, корнеплоды, морковь столовая.

Во многих регионах РФ и странах ближнего зарубежья отмечено усиление вредоносности болезней моркови, вызванных грибами родов *Fusarium* и *Alternaria*. В зависимости от погодных условий и фитосанитарного состояния посевов распространённость болезней может достигать 70–80%, а урожайность корнеплодов снижается на 35–50%. Среди путей, обеспечивающих целенаправленное ведение селекции на устойчивость, – выделение местных изолятов возбудителей болезней, методы ускоренной оценки на основе определения агрессив-

ности новых штаммов и применение их в селекционной работе.

Большое распространение получают болезни моркови столовой, вызываемые грибами рода *Fusarium*. Частота их встречаемости составляет 67% [1].

В современной селекции большое внимание уделяют проблеме повышения устойчивости сортов и гибридов к возбудителям наиболее вредоносных болезней и их комплексу [2]. Поражение растений вредоносными организмами происходит на всех этапах их роста и развития, поэтому важное значение имеет свое-

временное выявление первых признаков заболевания, их правильная диагностика [3].

Из литературных источников известно множество различных методов и способов искусственного заражения растений возбудителями грибных заболеваний, которые позволяют контролировать устойчивость генотипов моркови в различные фазы развития растения [4].

Цель работы – выделение местных изолятов возбудителей болезней и определение их агрессивности.

Задачи исследований:

- выделить возбудителей родов *Alternaria* и *Fusarium* с растений моркови столовой;
- получить чистые культуры грибов родов *Alternaria* и *Fusarium*;
- провести оценку агрессивности изолятов *Alternaria* и *Fusarium*.

Условия, материалы и методы. Отбор пораженного материала и опыты по определению агрессивности выделенных штаммов возбудителей для исследований проводили на базе ФГБНУ ВНИИО (Московская обл.) в 2007–2014 годах.

Исследования проводили на трех сортах и двух линиях столовой моркови с известной устойчивостью. Для изучения агрессивности изолятов использовали метод заражения дисков корнеплодов блячками культуры грибов (лабораторный метод). Повторность трехкратная по каждому образцу:

1. Нюанс – восприимчивый;
2. Леандр – устойчивый;
3. 1238 П – средневосприимчивый;
4. 690 П – средневосприимчивый;
5. Витаминная б, средневосприимчивый.

Грибы выделяли из пораженных корнеплодов, листьев или черешков моркови столовой методом влажной камеры. Пораженные корнеплоды отмывали от почвенных частиц, затем скальпелем делали вырезку больной ткани и закладывали в цел-

лофановый пакет с мокрой ватой. Через два дня делали пересев проявившихся штаммов на питательную среду.

Метод раскладки пораженного материала в чашки Петри. На границе пораженной и здоровой ткани стерильным скальпелем отрезали небольшие кусочки и раскладывали в приготовленные чашки Петри с фильтровальной бумагой. Через 2–3 суток появившийся грибной на-

лет просматривали под микроскопом. Затем, с целью получения чистой культуры, делали пересевы на питательную среду. Для культивирования грибов использовали агаризованную питательную среду Чапека.

При выделении грибных организмов в чистые культуры наблюдается рост контаминирующих бактерий и мукоровых грибов, для подавления роста которых использовали питательную среду с добавлением ан-

тибиотика. В наших исследованиях мы использовали наиболее доступный антибиотик «Гентамицин», который добавляли в концентрации 1 г/л питательной среды [1].

Метод закладки опыта выделенных штаммов Alternaria и Fusarium на дисках-вырезках корнеплодов моркови столовой. Корнеплоды образцов-тестеров отмывали в дистиллированной воде. Стерилизацию корнеплодов проводили в стеклянной посуде с добавлением в дистиллированную воду 0,1% KMnO₄, экспозиция - 10 мин., затем промывали в дистиллированной воде. Нарезали диски, отступая от кончика 2 см. Толщина диска составляла 0,5 мм. Диски помещали в кювету с заранее увлажненной дистиллированной водой фильтровальной бумагой. В середину диска помещали кусочек мицелия 2×2 мм. Возраст культуры грибов от 10 до 15 дней [4]. Кюветы помещали в бокс с температурой от 20 до 25 °С.

Учеты проводили на 5, 10 и 15 суток после закладки.

Шкала учета развития болезни на дисках моркови столовой:

0 баллов – признаков поражения нет;

1 балл – поражение не выходит за контуры источника инфекции; появляется слабовыраженное пятно и незначительное разрастание мицелия;

2 балла – зона поражения в два раза превышает контур нанесенной инфекции;

3 балла – зона поражения увеличивается в три раза, возникает углубленная язва с разрастанием мицелия от слабого до обильного;

4 балла – зона поражения в четыре раза и более превышает зону инфекционного пятна, часто покрывает всю поверхность диска, язва глубокая, мицелий обильный.

Большое преимущество метода дисков-вырезов – его оперативность. Результаты испытания можно получить уже через две недели от момента заражения. Метод дает хорошие, но недостаточно полные результаты. Не удается обнаружить устойчивость, связанную с морфо-анатомическими особенностями, поскольку инокулом вносят внутрь органа или в ткань, минуя, либо разрушая те преграды, которые могли предотвратить заражение [5]. Описанный метод имеет смысл использовать также для первичного тестирования агрессивности вновь выделенных изолятов возбудителей и контроля уровня агрессивности «старых» мно-

Таблица 1. Оценка агрессивности трех штаммов рода *Fusarium* методом дисков-вырезов на моркови столовой, 2007-2009 годы

Штамм	Балл поражения	Характеристика мицелия в чистой культуре
Леандр		
Ш 1	1,5	белый, войлочный
Ш 2	1,5	белый, слизистый
Ш 3	2,5	бело-розовый, пушистый
1238 П		
Ш 1	2	белый, войлочный
Ш 2	2	белый, слизистый
Ш 3	2	бело-розовый, пушистый
Нюанс		
Ш 1	2	белый, войлочный
Ш 2	2,5	белый, слизистый
Ш 3	2,5	бело-розовый, пушистый
690 П		
Ш 1	2,5	белый, войлочный
Ш 2	2,5	белый, слизистый
Ш 3	3,5	бело-розовый, пушистый

Таблица 2. Оценка агрессивности штамма рода *Alternaria* на модельных образцах моркови столовой методом (дисков) 2007-2009 годы

Образец	Наименование штамма	Балл поражения	Характер мицелия в чистой культуре
Леандр	А	1	черный, пушистый
1238 П	А	1,5	черный, пушистый
Нюанс	А	1,5	черный, пушистый
690 П	А	1,5	черный, пушистый

Таблица 3. Оценка агрессивности штаммов *Alternaria* на тест-образцах сорта Леандр и линии 690 П методом дисков-вырезов, 2009-2011 годы

Штамм	Балл поражения		Происхождение штаммов патогена
	Леандр	690 П	
А (К)	1	1,5	контроль
М – 2 – 3 А	2,4	2	с растений второго года
П 1 – Т 1	-	2,25	с листовой пластинки
В С – 1 – 1 А	3,3	2,2	корнеплоды с поля
В С – 2 – 1 А	4,0	-	корнеплоды из хранилища
В С – 1 – 2 А	1,7	-	с листовой пластинки
П 1 – 4 А	0	0,5	с растений первого года
Ш – 4	-	0,5	с растений первого года

Таблица 4. Оценка агрессивности штаммов рода *Alternaria* на трех тест-образцах моркови столовой методом дисков-вырезов, 2007-2009 годы

Штамм	Леандр	Витаминная 6	690 П
	балл поражения		
<i>Alternaria radicina</i> M., Dr. et E.			
A-4	1,2	0,8	1
A-3	1,4	1,1	1,5
A-2	0,3	0,5	1,5
A-1	1,3	0,1	0,25
Среднее значение	1,05	0,6	1

Таблица 5. Оценка агрессивности штаммов рода *Fusarium* на тест-образце моркови столовой сорта Леандр методом дисков-вырезов, 2009-2011 годы

Название штамма	Средний балл поражения	Происхождение штаммов патогена
Ш 3 (К)	2,5	с зонтика растения второго года (контроль)
Т 7	3,1	с зонтика растения второго года
ПО 3	2,6	с растения второго года (лист, стебель)

Таблица 6. Оценка агрессивности штаммов рода *Fusarium* на моркови столовой методом дисков-вырезов, 2009-2011 годы

Штамм	Леандр	Витаминная 6	690 П
	балл		
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.			
F- 8	2,3	0,5	0,6
F- 3	2,2	2,1	3,1
F- 2	1,4	0,2	0
F- 1	3,9	2,9	3,6
F- 6	1,5	0	1,5
F- 5	1,5	2	0,4
F- 4	2,8	1,7	2
F- 7	0,4	0	1,3

гократно пересеваемых на искусственной среде изолятов (рис. 1).

Результаты. В ходе исследований было выделено пятнадцать изолятов возбудителей фузариоза. Из них три штамма по результатам лабораторных испытаний показали наиболее высокий балл поражения

восприимчивого и средневосприимчивого контрольных вариантов. Наиболее агрессивным (развитие болезни наблюдалось уже на пятый день) был штамм Ш 3 (табл. 1, рис. 2). Этот штамм формирует пушистую бело-розовую колонию и обильное спороношение (рис. 3).



Рис 1. Учет поражения дисков моркови столовой грибами pp. *Alternaria* (слева) и *Fusarium* (на седьмые сутки)

Характер мицелия у выделенных фузариев варьировал от белых войлочных и слизистых до бело-розовых пушистых (табл. 1). У грибов рода *Fusarium* штаммы, формирующие пушистые колонии, как правило, имеют большую агрессивность по сравнению с войлочными. Реакция штаммов по Я.Е. Ван Дер Планк (1972).

По альтернариозу с 2007 по 2009 год был выделен только один штамм. Он оказался патогенным, но слабоагрессивным – развитие симптомов болезни не наблюдалось даже на 13 сутки (рис. 1). В дальнейшем проводили поиск более агрессивных изолятов. Мицелий на чистой культуре штамма характеризовался как черный, пушистый.

С 2011 по 2014 годы было введено десять штаммов по *Alternaria* (из которых семь штаммов выделены в культуру) и два штамма *Fusarium*, выделенных с различных пораженных органов растений моркови (табл. 2, 3). По культуральным и морфологическим признакам выделенные штаммы грибов были отнесены к *Alternaria radicina* M., D. et E.

В качестве тест-образцов для изучения патогенности и агрессивности вновь выделенных изолятов использовали линию 690 П (средневосприимчивая) и сорт Леандр (устойчивый). Повторность в опыте трехкратная. Учеты проводили на 5, 10 и 15 сутки, оценку развития заболеваний проводили по вышеприведенной шкале. Результаты испытаний представлены в таблицах 3 и 4.

В опыте было изучено семь штаммов, при этом высокую агрессивность по отношению к контролю (штамм А) показали штаммы ВС – 1–1 А; ВС – 2–1 А и М – 2–3 А. Эти штаммы мы отобрали для дальнейшей работы.

Штаммы П 1–4 А и Ш – 4 проявили слабую реакцию, они оказались непатогенными по отношению к моркови столовой. Возможно также, что в процессе выделения были получены сапрофитные штаммы.

По мере выделения новых штаммов проводили повторный цикл выделения в чистую культуру и оценки патогенности и агрессивности. Дополнительно были получены восемь новых штаммов грибов рода *Alternaria*, которые были выделены с различных частей растений: черешка, листа и шейки корнеплода. Контрольные варианты в данном опыте были: сорт Леандр – устойчивый, сорт Витаминная 6 – средневосприимчивый и линия 690 П – средне-



Рис. 2. Характер мицелия *F. avenaceum* и *A. radicina*



Рис. 3. Штамм Ш3 – *F. avenaceum* на сорте Леандр и линии 1238 П

устойчивая. Результаты испытаний представлены в **таблицах 4 и 5**.

Среди оцененных штаммов достаточно высокую агрессивность имели только 4 штамма (**табл. 4**). Наиболее агрессивными были штаммы А-1 и А-3, которые отличаются высокой скоростью развития симптомов.

Также как и с *Alternaria*, с *Fusarium* было проведено два цикла определения агрессивности штаммов. Два новых штамма Т 7 (*Fusarium avenaceum* Sacc) и ПО 3 (*Fusarium oxysporum* Schlecht.) показали в опыте достаточно высокую агрессивность (средний балл – 3,1 и 2,6 соответственно) по отношению к контролю, полученному в 2007 году, и были отобраны для дальнейших испытаний (**табл. 5**).

Агрессивность еще шести новых штаммов грибов рода *Fusarium* в сравнении с двумя выделенными

ся ранее (F1 и F3) была проведена с использованием в качестве стандартов устойчивости сорта Леандр – устойчивый, сорта Витаминная 6 – средневосприимчивого и линии 690 П – среднеустойчивой (**табл. 6**).

Выделенные нами штаммы F1 и F3 показали наиболее высокую агрессивность по отношению к остальным.

Выводы. В результате работы создана коллекция наиболее агрессивных местных штаммов патогенов: *Fusarium avenaceum* Sacc (Т7 – F1), *Fusarium oxysporum* Schlecht (ПО3 – F3), и Ш3, *Alternaria radicina* M., Dr. Et E – BC-1-1A; BC-2-1A; M – 2-3 A; A-1 и A-3. Наиболее агрессивные из них используются в качестве инокулюма при проведении иммунологических экспериментов и в качестве стандартов агрессивности при испытании вновь выделенных изолятов патогенов. Работа по выделению, идентификации и определению агрессивности возбудителей альтернариоза и фузариоза столовой моркови, а также по подбору образцов моркови столовой для контроля устойчивости к обеим болезням будет продолжена.

Библиографический список

- Егорова А.А., Соколова Л.М. Приготовление постоянных препаратов патогенных штаммов из рр. *Alternaria* и *Fusarium* для селекции моркови столовой на устойчивость // Вестник Алтайского Государственного Аграрного Университета. 2016. № 5 (139). С. 20–25.
- Власова Э.А., Федоренко Е.И. Методы оценки исходного и селекционного материала моркови на устойчивость к болезням // Науч.-тех. бюл. ВИР. М., 1986. Т. 161. С. 28–34.
- Алексеева К.Л., Иванова М.И. Болезни зеленных овощных культур (диагностика, профилактика, защита). М: ФГБНУ «Росинформагротех», 2015. 188 с.
- Першина Г.Ф., Тимина Л.Т. Оценка устойчивости моркови к сухой фузариозной гнили // Научно техн. бюл. ВИР. Л., 1989. Т. 192. С. 46–49.
- Соколова Л.М. Причины увядания семенников моркови столовой. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2015. № 5 (127). С. 20–25.

Об авторе

Соколова Любовь Михайловна, канд. с.-х. наук, с.н.с. лаборатории селекции столовых корнеплодов и луков отдела, Всероссийский научно-ис-

следовательский институт овощеводства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр овощеводства».

E-mail: Isokolova74@mail.ru

Isolation and aggressiveness of pathogens *Fusarium* and *Alternaria* on carrot

L.M. Sokolova, PhD, senior research fellow of laboratory of root crops and onions, All-Russian Scientific Research Institute of Vegetable Growing – branch of the Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center of Vegetable Growing».

E-mail: Isokolova74@mail.ru

Summary. In many regions of the Russian Federation and the countries of the near abroad, there was an increase in the severity of carrot diseases caused by fungi of *Fusarium* and *Alternaria*. Depending on the weather conditions and the phytosanitary condition of crops, the prevalence of diseases can reach 70-80%, and the yield of root crops is reduced by 35-50%. One of the ways ensuring targeted selection of sustainability is the isolation of local isolates of pathogens, rapid assessment methods based on the aggressiveness of new strains and their use in breeding. Objective: to isolate local isolates of pathogens and determine their aggressiveness. Selection of the affected material for the studies was carried out on experimental plots of the FGBNU VNIIO (Moscow region). Experiments to determine the aggressiveness of isolated strains of pathogens *Alternaria* and *Fusarium* were conducted from 2007 to 2014 years of laboratory method. As a result of the work done, a collection of the most aggressive local strains of pathogens was created: *Fusarium avenaceum* Sacc (T7 - F1), *Fusarium oxysporum* Schlecht (PO3 - F3), and III, *Alternaria radicina* M., Dr. Et E - BC-1-1A; BC-2-1A; M - 2-3A; A-1 and A-3. The description of the mycelium on the strain of *Fusarium* is given: III - the strain forms a fluffy white-pink colony and abundant sporulation. The gradation of variation in the strains of *Fusarium* - from white felt and mucous to white - pink fluffy. Highlighted most aggressive strains are used in breeding work to increase the stability of carrots canteen when conducting experiments on spraying spore suspension on a plate of carrot dining room and when creating artificial infectious backgrounds. Work continues on the identification, identification and determination of the aggressiveness of pathogens of *Alternaria* and *Fusarium* of carrots, as well as the selection of carrot samples - disease resistance control.

Keywords: strains, aggressiveness, *Alternaria*, *Fusarium*, cutting discs, root vegetables, carrot.