

Защита растений и иммунология

**ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА
ИСКУССТВЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ
ПОДСОЛНЕЧНИКА ВОЗБУДИТЕЛЕМ
ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЫ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ОПЫТНЫХ ОБРАЗЦОВ
МИКРОБИОПРЕПАРАТОВ**

Л.В. Маслиенко,

доктор биологических наук

Н.М. Арасланова,

кандидат сельскохозяйственных наук

М.А. Ковчигина,

младший научный сотрудник

ФГБНУ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@yandex.ru

УДК 632.44.2:632.937:633.854.78

Ключевые слова: подсолнечник, ложная мучнистая роса, метод искусственного заражения, микробиопрепараты, антагонисты

Для разработки микробиологического метода защиты подсолнечника от ложной мучнистой росы проводили поиск оптимального метода искусственного заражения возбудителем болезни в лабораторных условиях. В результате испытаний существующих методов искусственного заражения подсолнечника возбудителем ложной мучнистой росы нами модифицированы два метода: в растеньях с фильтровальной бумагой инокулировали проростки с оптимальной длиной корешка и в растеньях с песком инокулировали проростки в фазе коленица, не снимая лузки с семенной оболочкой, что позволяло длительное время сохраняться на проростках препаративной форме опытных образцов микробиопрепаратов и проявлять защитный эффект на высоком фоне заражения. По результатам оценки части коллекции лаборатории биометода выделен штамм антагониста Xk-1 *Chaetomium olivaceum*, перспективный для защиты подсолнечника от ЛМР.

Search of optimal method of artificial inoculation of sunflower with Downy Mildew pathogen with purpose to determine efficiency of test samples of microbiopreparations.

Maslienko L.V., doctor of biology

Araslanova N.M., candidate of agriculture

Kovchigina M.A., junior researcher

FGBNU VNIIMK

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Тел.: (861) 275-85-19

biometod@yandex.ru

UDC 632.44.2:632.937:633.854.78

Key words: sunflower, Downy Mildew, a method of artificial inoculation, microbiopreparations, antagonists

The optimal methods of artificial inoculation with pathogen in laboratory conditions were searched for development of a microbiological method of sunflower protection against Downy Mildew. As a result of researches of artificial inoculations with downy mildew pathogen there were modified two methods. In first case, seedlings with optimal root length were inoculated in germinators with filter-paper. In second one, the seedlings with husks and seed-coat were inoculated in phase of hypocotyl in germinators with sand. The husk with seed-coat left on seeds for inoculation allowed keeping the testing preparations on seedlings for a long time and protecting it on a high level at heavy infection. The strain of antagonist Xk-1 *Chaetomium olivaceum* was assigned from collection

of the laboratory of biological methods as perspective for downy mildew control in sunflower sowings.

Введение. Особую опасность для многих сельскохозяйственных культур – подсолнечника, табака, свёклы, огурца, капусты, моркови, лука, винограда и др. – представляет ложная мучнистая роса (ЛМР). Особенно остро в последние годы стоит проблема защиты от этой болезни подсолнечника. В связи с появлением новых агрессивных рас возбудителя ранее устойчивые сорта и гибриды поражаются болезнью в сильной степени, что приводит к существенному снижению урожая и его качества.

Ведущая роль в защите подсолнечника от ложной мучнистой росы принадлежит устойчивому сортименту и химической защите. Постоянные процессы, происходящие в популяциях возбудителя болезни, существенно снижают эффективность этих мероприятий. Так, резкое повышение вредоносности болезни на американском континенте привело к необходимости повсеместного использования против семенной и почвенной инфекции высокоэффективного препарата апрон, действующим веществом которого является металаксил. Однако в результате появления устойчивости к этому препарату его эффективность в большинстве стран мира снизилась [1].

Решение проблемы защиты от болезней связано с разработкой комплекса мероприятий, включающих создание устойчивых сортов, разработку химического, агротехнического методов, а также разработку микробиологического метода. При этом разработка микробиопрепаратов кроме решения защитных и экологических проблем приобретает ещё большее значение, так как биоагенты – продуценты биопрепаратов, снижают риск возникновения резистентности популяций фито-патогенов к пестицидам.

В России микробиологические препараты для защиты сельскохозяйственных культур от возбудителей ложной мучнистой росы отсутствуют.

Во ВНИИМК в лаборатории биометода многие годы ведутся исследования по разработке микробиологических средств защиты масличных культур от болезней. Создана уникальная коллекция штаммов грибов и бактерий – антагонистов возбудителей белой, серой гнилей, фузариоза и фомопсиса, продуцентов микробиопрепаратов для защиты масличных культур от болезней [2]. При разработке микробиопрепаратов следующим этапом после выделения потенциальных штаммов антагонистов идет этап скрининга штаммов методом двойных или встречных культур с возбудителем болезни в чашках Петри. Так как возбудитель ложной мучнистой росы подсолнечника *Plasmopara halstedtii* (Fart) Berl. et De Toni (син. *Plasmopara helianthii* Novot.) – облигатный паразит, то для скрининга коллекции микроорганизмов необходимо использовать сразу метод искусственного заражения в лабораторных условиях. Для этого семена подсолнечника обрабатывают разными препаративными формами микробиопрепаратов (жидкой культурой, пастой или порошком), выдерживают обработанными 2–3 дня и затем заражают возбудителем болезни.

Цель настоящей работы заключается в получении экспериментальных данных по подбору или модификации метода искусственного заражения подсолнечника возбудителем ложной мучнистой росы для определения эффективности опытных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов из коллекции лаборатории биометода.

Материалы и методы. Методы инокуляции проростков подсолнечника, применяемые исследователями, в принципе одинаковы, но имеются и некоторые отличия. Так, во ВНИИМК в 60-е годы был разработан метод заражения растений подсолнечника в тепличных условиях с использованием в качестве субстрата смеси земли и песка, который применя-

ется до настоящего времени [3]. Растения заражали путем опрыскивания суспензией гриба почвы и проростков. Подобный метод рекомендовали также американские учёные [4], только в качестве субстрата ими использовалась перлитная смесь. В Харьковском институте им. Юрьева (Украина) проростки подсолнечника помещали в бумажные рулоны, которые ставили в суспензию гриба и затем проращивали под светоустановкой [5]. Во ВНИИМК в лаборатории иммунитета семян подсолнечника после проращивания в рулонах помещали в растильни, заполненные песком и выстланные фильтровальной бумагой, и заражали суспензией зооспор [6]. В Вейделевском институте подсолнечника проростки подсолнечника раскладывали в пластмассовые растильни, перекладывая их фильтровальной бумагой. Заражали семена подсолнечника путем погружения корешков в суспензию гриба [7; 8].

Следует заметить, что во всех описанных методах перед инокуляцией семена раскладывали в рулоны и проращивали 2–3-е суток, затем снимали лужу и семенную оболочку для того, чтобы убедиться в отсутствии поражения другими патогенами.

Нами испытывались методы инокуляции проростков подсолнечника ложной мучнистой росой, разработанные для массовой оценки селекционного материала в лабораторных условиях [5; 6; 7; 8].

Подробное описание испытываемых методов инокуляции проростков подсолнечника возбудителем ЛМР в лабораторных условиях приведено в разделе «Результаты». Испытания проводили на неустойчивом к ЛМР сорте подсолнечника ВНИИМК 8883.

Инокулом ЛМР получали путем смыва налета спороношения гриба с пораженных болезнью растений дистиллированной водой. Полученную суспензию зооспор использовали для инокуляции. Концен-

трацию зооспорангиев в полученной суспензии определяли с помощью камеры Горяева (гемоцитометра). Под микроскопом проводили подсчет зооспорангиев в 50 больших квадратах одной камеры, что соответствует 1/5000 мл. Сумму спор, подсчитанную в этих квадратах, увеличивали в 5000 раз, что соответствовало концентрации зооспор гриба в 1 мл. Нужную концентрацию суспензии – 104 зооспоры в 1 мл, получали путем серийных разведений [8].

Результаты и обсуждение. Для установления возможности применения метода искусственного заражения подсолнечника возбудителем ложной мучнистой росы и для определения эффективности опытных образцов микробиопрепаратов изначально мы испытали несколько методов инокуляции проростков подсолнечника возбудителем ЛМР в лабораторных условиях:

1. В растильни с песком высаживали инокулированные проростки с оптимальной длиной корешка, со снятой лузгой и семенной оболочкой (рис. 1):

- семена раскладывали в рулоны и проращивали 2–3-е суток;

- отбирали проростки с длиной корешка 1–1,5 см, снимали лузгу и семенную оболочку, помещали в небольшой емкости и заливали суспензией зооспор гриба;

- устанавливали температуру 16–18 °С на 4 ч;

- инокулированные проростки высаживали в растильни с песком по 25 шт., повторность 3-кратная;

- растильни ставили под свет, устанавливали температуру 22–24 °С на 6–8 суток, песок увлажняли по мере подсыхания;

- на 7–9-е сутки создавали влажную камеру, снижали температуру до 16–18 °С на сутки;

- проводили учет.



Рисунок 1 – Инокулированные суспензией зооспор ЛМР проростки подсолнечника с оптимальной длиной корешка, без лузги и семенной оболочки, высаженные в растильни с песком

2. В растильнях с фильтровальной бумагой, инокулировали проростки, с оптимальной длиной корешка, со снятой лузгой и семенной оболочкой (рис. 2):

- семена подсолнечника закладывали в рулоны увлажненной фильтровальной бумаги, ставили в сосуд с небольшим количеством воды и проращивали 2–3-е суток;

- отбирали проростки с длиной корешка 2–2,5 см, снимали лузгу и семенную оболочку и раскладывали в растильни с увлажнённой фильтровальной бумагой по 25 шт. в каждой, при этом проростки накрывали увлажнёнными полосками фильтровальной бумаги, сложенными вдвое, повторность опыта 3-кратная;

- проростки заливали суспензией зооспор гриба и снижали температуру в помещении до 16–18 °С на 4 ч (до суток);
- далее проростки ставили под свет, устанавливали температуру 22–24 °С и проращивали 6–8 суток;
- на 7–9-е сутки растительные ставили во влажную камеру, снижали температуру до 16–18 °С, оставляли на сутки;
- проводили учет.



Рисунок 2 – Инокулированные проростки подсолнечника с оптимальной длиной корешка, без лузги и семенной оболочки в растильнях с фильтровальной бумагой

3. В рулоны из фильтровальной бумаги помещали инокулированные проростки с оптимальной длиной корешка, со снятой лузгой и семенной оболочкой (рис. 3):

- семена раскладывали в рулоны и проращивали 2–3-е суток;

- отбирали проростки с длиной корешка 2–2,5 см, снимали лузгу и семенную оболочку и заливали суспензией зооспор гриба;
- устанавливали температуру 16–18 °С на 4 ч;
- раскладывали инокулированные проростки в рулоны;
- устанавливали температуру 22–24 °С на 6–8 суток;
- затем снижали температуру до 16–18 °С на сутки;
- учет.



Рисунок 3 – Инокулированные проростки подсолнечника с оптимальной длиной корешка, без лузги и семенной оболочки, помещённые в рулоны из фильтровальной бумаги

4. Рулоны из фильтровальной бумаги с проростками, с оптимальной длиной корешка, со снятой лузгой и семенной оболочкой, помещали в сосуды с суспензией зооспор. Семена раскладывали на различную высоту от уровня суспензии ЛМР:

- семена раскладывали в рулоны и проращивали 2–3-е суток;

- отбирали проростки с длиной корешка 2–2,5 см, снимали лузгу и семенную оболочку и раскладывали в рулоны по 25 шт., повторность 3-кратная. В каждом варианте семена раскладывали на разной высоте от уровня воды и суспензии – верхний ярус, средний и нижний;

- рулоны помещали в сосуды с суспензией зооспор гриба, устанавливали температуру 22–24 °С на 6–8 суток;

- на 7–9-е сутки температуру снижали до 16–18 °С на сутки;

- учет.

Установлено, что все испытанные методы, кроме варианта 4, вызывали заражение проростков подсолнечника возбудителем ЛМР.

В варианте с рулонами из фильтровальной бумаги при размещении проростков на различную высоту от уровня суспензии ЛМР (вариант 4) наблюдалось загнивание проростков, особенно в рулонах, где проростки были ближе к воде или суспензии зооспор. При закладке в рулоны из фильтровальной бумаги уже инокулированных проростков (вариант 3) хотя и происходило заражение, но во время роста проростков корни переплетались, при разворачивании рулонов происходило стирание налета с листьев, что затрудняло учет. Поэтому на обработанных микробиопрепаратами семенах подсолнечника испытывали два метода искусственного заражения ЛМР (вариант 1 и 2).

Установлено, что если перед инокуляцией семян снимали лузгу и семенную оболочку, одновременно с лузгой убирали и пропагулы штаммов антагонистов, которыми обрабатывали семена подсолнечника, что, естественно, снижало защитный эффект во многих вариантах испытаний опытных образцов микробиопрепаратов. Поэтому при дальнейшей оценке коллекции перспективных штаммов антагонистов использовали модификацию методов в растильнях с песком и фильтровальной бумагой без снятия лузги и семенной оболочки с семян, что позволяло длительное время на семянках сохраняться опытным

образцам микробиопрепаратов и проявлять защитный эффект на высоком фоне заражения. При этом в растильнях с песком инокулировали проростки подсолнечника суспензией ЛМР в фазе коленца.

Заключение. В результате испытаний существующих методов искусственного заражения подсолнечника возбудителем ложной мучнистой росы нами модифицированы два метода: в растильнях с фильтровальной бумагой инокулировали проростки с оптимальной длиной корешка и в растильнях с песком инокулировали проростки в фазе коленца, не снимая лузги с семенной оболочкой, что позволяло длительное время сохраняться на проростках препаративной форме опытных образцов микробиопрепаратов и проявлять защитный эффект на высоком фоне заражения.

По результатам оценки части коллекции лаборатории биометода выделен штамм антагониста *Xk-1 Chaetomium olivaceum*, перспективный для защиты подсолнечника от ЛМР.

Список литературы

1. Gulya T.J., Draper M., Harbour J., Holen C., Knodel J., Lamey A. Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew in North America // Proc. of the 21th sunfl. research workshop. January 14–15, 1999. – P.118–127.
2. Маслиенко Л.В. Обоснование и разработка микробиологического метода борьбы с болезнями подсолнечника // Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Краснодар, 2005. – 48 с.
3. Панченко А.Я. Ускоренный метод оценки подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе // Селекция и семеноводство. – 1965. – № 2. – С. 65–66.
4. Gulya T.J., Sackston W.E., Viranyi F., Masirevic S., Rachid K.Y. New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North America // Phytopathology. – 1991. – V. 132. – P. 167–171.
5. Колесник Ф.П. Отбор растений подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе // Труды 5 Всесоюзного совещания по иммунитету растений. – Киев, 1969. – С.112–123.
6. Антонова Т.С. Селекция подсолнечника на иммунитет // История научных исследований во ВНИИМКе за 90 лет. – Краснодар, 2002. – С. 175–190.

7. Якуткин В.И., Ахтулова Е.М. Мониторинг вирулентности популяции возбудителя ложной мучнистой росы и оценка устойчивости подсолнечника к болезни // Методические рекомендации. СПб, 2003. – 24 с.

8. Ахтулова Е.М. Биологические особенности возбудителя ложной мучнистой росы в связи с селекцией подсолнечника на устойчивость к болезни в условиях Центральной Чернозёмной зоны России // Дис. на соиск. ... канд. биол. наук. – СПб, 2009. – С. 96–107

References

1. Gulya T.J., Draper M., Harbour J., Holen C., Knodel J., Lamey A. Metalaxyl resistance in sunflower Downy Mildew in North America / Proc. of the 21th Sunfl. Research Workshop. January 14-15, 1999. –P.118–127.

2. Maslienko L.V. Obosnovanie i razrabotka mikrobiologicheskogo metoda bor'by s boleznyami podsolnechnika // Avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk. – Krasnodar, 2005. – 48 s.

3. Panchenko A.Ya. Uskorennyy metod otsenki podsolnechnika na ustoychivost' k lozhnoy muchnistoy rose // Seleksiya i semenovodstvo. –1965. – № 2. – S.65–66.

4. Gulya T.J., Sackston W.E., Viranyi F., Masirevic S., Rachid K.Y. New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and America // Phytopathology. – 1991. – V. 132. – P.167–171.

5. Kolesnik F.P. Otbor rasteniy podsolnechnika na ustoychivost' k lozhnoy muchnistoy rose // Trudy 5 Vsesoyuznogo soveshchaniya po иммунитету растений. – Kiev, 1969. – S.112–123.

6. Antonova, T.S. Seleksiya podsolnechnika na иммунитет // Istoriya nauchnyh issledovaniy vo VNIIMKe za 90 let. – Krasnodar, 2002. – S. 175–190.

7. Yakutkin V.I., Akhtulova E.M. Monitoring virulentnosti populyatsii vozбудителя lozhnoy muchnistoy rosy i otsenka ustoychivosti podsolnechnika k bolezni // Metodicheskie rekomendatsii. – Sankt-Peterburg, 2003. – 24 s.

8. Akhtulova, E.M. Biologicheskie osobennosti vozбудителя lozhnoy muchnistoy rosy v svyazi s seleksiey podsolnechnika na ustoychivost' k bolezni v usloviyah Tsentral'noy Chernozemnoy zony Rossii // Dis. ... kand. biol. nauk. – SPb., 2009. – S. 96–107.