

КУЛЬТИВУВАННЯ ВИДУ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* В УМОВАХ *IN VITRO*

Доведено, що ізоляція виду *Phytophthora infestans* у чисту культуру - це складний процес, перебігу якого перешкоджають різні фактори біотичної та абіотичної природи. Культивування збудника фітофторозу в умовах *in vitro* значно полегшується із використанням картопляно-глюкозного агарового середовища.

Постановка проблеми

Phytophthora infestans – це облигатний фітопатогенний організм, який викликає захворювання різних сільськогосподарських культур [2]. Цей вид викликає захворювання картоплі, зокрема фітофтороз бульб, листків і стебел. Великої шкоди *Ph. infestans* спричиняє як у період вегетації картоплі, так і в період зберігання бульб. Розвитку фітофторозу сприяють недотримання умов зберігання і тривала тепла й волога погода під час вегетації. У окремі роки (роки масових епіфітотій) втрати врожаю можуть сягати понад 50 % [2, 3, 4]. Тому не даремно цю хворобу визнають найбільш шкідливим захворюванням грибного походження [5].

Доведено, що для захисту врожаю бульб немає нічого кращого ніж використання високо стійких сортів картоплі [2]. Встановлення стійкості до фітофторозу перспективних гібридів проводиться шляхом інфікування їх видом *Ph. infestans* у лабораторних умовах, практикується також вирощування дослідного матеріалу на спеціальних провокаційних фонах. Випробування перспективних гібридів на стійкість до фітофторозу в лабораторних умовах здійснюється на бульбах і листках картоплі, що передбачає наявність гриба *Ph. infestans* в чистій культурі на поживному середовищі. Проте оскільки збудник фітофторозу є облигатним патогеном,

* Науковий керівник – д.с.-г.н., В.М. Положенець

© В.М. Положенець, Н.М. Плотницька

культивування даного мікроорганізму ускладнюється надзвичайною чутливістю до поживного середовища і факторів оточуючого середовища.

Завданням нашого дослідження було: виділення виду *Ph. infestans* у чисту культуру, порівняння його анатомо-морфологічних особливостей з описаними в офіційних джерелах та виявлення такого поживного середовища, в умовах якого розвиток культури збудника фітофторозу картоплі відбуватиметься без перешкод і зі збереженням їх фітопатогенних властивостей.

Об'єктом досліджень виступали анатомо-морфологічні та фізіологічні особливості ізолятів виду *Ph. infestans*.

Методика досліджень

Виділення ізолятів *Ph. infestans* в чисту культуру здійснювали перенесенням спороношення патогена на поживне середовище. Джерелом інфекції фітофторозу слугували хворі листки картоплі з типовими ознаками ураження збудником цього захворювання. Для отримання добре розвиненого спороношення *Ph. infestans* інфікований матеріал розміщували у вологій камері [1, 6]. З цією метою використовували чашки Петрі із вологим фільтрувальним папером, куди і поміщали листки. Спороношення збудника фітофторозу мікробіологічною петлею за загальноприйнятою методикою [6] переносили на пластирі картоплі, отримані з візуально здорових, вимитих у проточній воді, дезінфікованих спиртом та обпалених над полум'ям пальника бульб без ознак позеленіння. Пластирі із бульб картоплі використовували для збереження фітопатогенних властивостей виділених ізолятів грибів. Для отримання чистої культури виду *Ph. infestans* здійснювали кількаразове пересівання ізолятів.

Вивчення анатомо-морфологічних особливостей фітопатогенних культур збудника фітофторозу проводили за загальноприйнятою методикою із використанням світлового мікроскопа [1].

Визначення впливу живильного середовища на розвиток міцелію та інтенсивність спороношення *Ph. infestans* здійснювали із використанням картопляно-глюкозного агару (КГА), яке слугувало за еталон, вівсяного (ВА) та житнього (ЖА) агаризованих середовищ. Ступінь розвитку патогена визначали методом мікрометричного вимірювання діаметру міцелію через 14 діб культивування за сприятливих умов температури (19-20⁰С) і вологості повітря (70 %). Повторність експерименту п'ятиразова.

Результати досліджень

За результатами виділення ізолятів збудника фітофторозу картоплі із хворих листків нами були виявлені позитивні наслідки від використання вологих камер, котрі сильно полегшують цей процес та дозволяють отримати добре розвинене спороношення гриба *Ph. infestans*. Проте слід відмітити, що уражений матеріал, зібраний у вологу погоду (особливо зранку) не потребує

вологих камер взагалі або тривалого їх використання. Оскільки в такому випадку вони можуть бути використані лише як тимчасове сховище для транспортування. Це пояснюється тим, що за умов підвищеної вологості повітря на листках картоплі, зокрема з нижньої їх поверхні, утворюється біле павутинисте спорonoшення виду *Ph. infestans* (рис. 1).



Незважаючи на спосіб отримання інфікованого матеріалу, який слугує джерелом збудника фітофторозу, виділенню гриба *Ph. infestans* у чисту культуру перешкоджає наявність інших патогенних мікроорганізмів, зокрема *Alternaria solani* та різних видів роду *Fusarium*.

Ці мікроорганізми інтенсивно розвивалися на середовищі, куди висівали спорonoшення *Ph. infestans*. Швидкість розвитку їх міцелію набагато перевищувала ріст грибниці збудника фітофторозу, в першу чергу це стосується видів роду *Fusarium*. Окрім переважання у розвитку вони також пригнічували життєдіяльність *Ph. infestans* і призводили до її загибелі.

За результатами очищення отриманих ізолятів збудників фітофторозу було виділено в чисту культуру лише 4,3 і 2,8 % зразків (табл. 1). Встановлено, що при використанні вологої камери частка ізолятів, виділених у чисту культуру, більша, ніж без її використання.

При перевірці тих ізолятів *Ph. infestans*, з яких не вдалося отримати чисті культури патогена, було встановлено, що в цих зразках інтенсивно росли і розвивалися лише гриби роду *Fusarium* і вид *A. solani*. Ознаки розвитку грибів *Ph. infestans* не спостерігалися або були виявлені у незначній мірі.

Крім того, отримані чисті культури *Ph. infestans* характеризувалися високою патогенністю, що пояснюється використанням поживного середовища природного походження, а саме пластирів із бульб картоплі.

Дослідження анатомо-морфологічних особливостей виділених у чисту культуру ізолятів збудника фітофторозу показало, що вони не відрізняються від описаних у вітчизняних та закордонних літературних джерелах і являються типовими представниками цього виду.

Таблиця 1. Результати виділення *Phytophthora infestans* у чисту культуру (2005-2007 рр.)

Джерело інфекції	Кількість ізолятів, шт.	Виділено в чисту культуру, шт.	
		всього	патогенних
із використанням вологої камери	116	5	5
без використання вологої камери	72	2	2

Вони характеризуються несептованим, багатоядерним міцелієм. Гіфи гриба безбарвні, гіллясті з добре вираженою зернистістю протопласту. Конідії безбарвні, лимоноподібні, зрідка кулеподібні або іншої форми, одноклітинні із сосочковидним горбочком на вершині. При температурі нижче 14°C в краплині води вони перетворюються в зооспорангії, вміст яких розпадається на окремі частки, в результаті чого звичайно утворюється 6–16 рухомих джугутикових зооспор.

Експериментальне вивчення розвитку гриба *Ph. infestans* на поживних середовищах показало, що найкращий розвиток культури цього виду був при використанні картопляно-глюкозного агаризованого середовища (табл. 2).

Таблиця 2. Розвиток міцелію *Phytophthora infestans* в залежності від складу поживного середовища (2005-2007 рр.)

Тип середовища	Діаметр міцелію, мм					
	ФЛ-1	ФЛ-2	ФЛ-3	ФЛ-4	ФЛ-5	середнє
КГА (еталон)	73,2	69,1	77,4	76,6	78,2	74,9
ВА	60,4	59,4	58,3	62,2	66,7	61,4
ЖА	67,8	64,5	57,5	63,1	59,6	62,5

Так, на 14 добу культивування культур п'яти штамів виду *Ph. infestans* (ФЛ-1, ФЛ-2, ФЛ-3, ФЛ-4 і ФЛ-5) діаметр їх міцелію на КГА становив

відповідно 73,2, 69,1, 77,4, 76,6 та 78,2 мм, що в середньому в 1,2 рази перевищувало подібні показники при вирощуванні патогена на ВА і ЖА.

Розвиток *Ph. infestans* на ВА і ЖА практично не відрізнявся у жодної з культур і становив відповідно у ФЛ-1 – 60,4 та 67,8 мм; у ФЛ-2 – 59,4 та 64,5 мм; у ФЛ-3 – 58,3 та 57,5 мм; у ФЛ-4 – 62,2 та 63,1 мм і у ФЛ-5 – 66,7 та 59,6 мм. Слід відмітити, що діаметр міцелію лише двох культур (ФЛ-3 і ФЛ-5) при вирощуванні на ВА був дещо інтенсивнішим, ніж при вирощуванні на ЖА, тоді як у інших варіантах та в цілому спостерігалася зворотна залежність. Проте суттєвої різниці у розвитку *Ph. infestans* на ВА і ЖА не спостерігали.

Висновки

1. Використання вологих камер у значній мірі полегшує виділення *Ph. infestans* у чисту культуру, але їх застосування за умов підвищеної вологості, особливо зранку, коли ще не зійшла роса, не є обов'язковим.

2. Значних перешкод при виділенні в чисту культуру ізолятів збудника фітофторозу завдають *Alternaria solani* та різні види роду *Fusarium*, які пригнічують розвиток *Ph. infestans*.

3. При культивуванні збудника фітофторозу на поживному середовищі доцільно використовувати картопляно-глюкозний агар, розвиток міцелію *Ph. infestans* на якому в 1,2 раза перевищує його ріст на вівсяному та житньому агаризованих середовищах.

Перспективи подальшого дослідження

Перспективним напрямком даного дослідження повинно бути подальше випробування різних за складом поживних середовищ та виявлення з-поміж них таких, розвиток культури *Ph. infestans* на яких був би найбільш інтенсивним. Також слід проводити експериментальне вдосконалення методики отримання чистої культури збудника фітофторозу з інфікованих листків картоплі.

Література

1. Бельтюкова К.Г. Методы исследования возбудителей болезней растений / К.Г. Бельтюкова, М.С. Метьшевская, М.Д. Куликовская. – К.: Наук. думка, 1968. – 316 с.
2. Дорожкин Н.А. Клубневые гнили картофеля / Н.А. Дорожкин, С.И. Бельская, И.В. Викторчик [и др.]. – Минск: Наука и техника, 1989. – 135 с.
3. Положенець В.М. Захист картоплі від хвороб і шкідників в агроценозі малопродуктивних земель Полісся / В.М. Положенець, І.Л. Марков, П.О. Мельник, Л.В. Немерицька. – К., 2002. – 199 с.
4. Попкова К.В. Общая фитопатология / К.В. Попкова. – М.: Агропромиздат, 1989. – 399 с.

-
5. *Попкова К.В.* Фитофтора картофеля / *К.В. Попкова.* – М.: Колос, 1972. – 176 с.
6. *Кирай З.* Методы фитопатологии: пер. с англ. *С.В. Васильевой* / *З. Кирай, З. Клемент.* – М.: Колос, 1974. – 343 с.
-