

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО"

Кафедра микробиологии и физиологии растений

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРИБОВ *ALTERNARIAALTERNATA*,
ПАЗАЗИТИРУЮЩИХ НА ЯБЛОНЯХ НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ
ОБЛАСТИ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата

06.03.01 Биология

Биологического факультета

Султановой Олеси Олеговны

Научный руководитель:

кандидат биол. наук, доцент _____ А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой:

доктор биол. наук, профессор _____ С. А. Степанов

Саратов 2020

Введение

Актуальность темы. Заболевания различных культурных, дикорастущих и сорных растений, именуемые альтернариозами, известны всем фитопатологам и работникам системы защиты растений. Причиной альтернариозов является поражение растений микроскопическими несовершенными грибами рода *Alternaria*. Виды этого рода встречаются по всему миру. Некоторые из них являются безобидными сапротрофами, другие же, паразитические виды, вызывают вредоносные заболевания сельскохозяйственных культур. В России экономическое значение как патогены растений имеют около 10 видов *Alternaria*. В первую очередь это возбудители альтернариозов картофеля, томатов, капусты, рапса, моркови, подсолнечника, а также виды, связанные с заражением семян зерновых культур [1].

Идентификация многих микромицетов и, в частности, видов *Alternaria*, сопряжена с рядом трудностей, таких как сходство морфологических характеристик разных видов и одновременно внутривидовая вариабельность признаков. Определение видов *Alternaria* и мониторинг альтернариозов осложняется номенклатурной путаницей и отсутствием полноценных русскоязычных определительных ключей, учитывающих современную систематику рода.

В определенных случаях дополнительной трудностью при мониторинге заболеваний и идентификации патогенов становится то, что с одним видом растений нередко связано несколько видов *Alternaria*, которые могут вызвать схожие симптомы. Несмотря на сходство проявления заболеваний, возбудители могут значительно отличаться по патогенности, токсигенности, степени специализации, генетике взаимоотношений с растением-хозяином, вредоносности, чувствительности к фунгицидам и т.д. То есть, разные виды обладают совершенно разными экологическими особенностями и хозяйственной значимостью [2].

Грибы рода *Alternaria alternata* являются возбудителями многих патологий яблонь: листовой пятнистости (leafblotch), гнили поверхности плодов (corkrot) и сердцевинной гнили (corerot). При поражении листьев снижается урожайность деревьев. При поражении плодов не только ухудшается товарный вид яблок, но в них могут накапливаться токсичные для человека метаболиты этих грибов. Известны случаи обнаружения в яблоках и яблочном соке таких токсинов *Alternaria*, как альтернариол и монометилвый эфир альтернариола.

Широкое распространение альтернариоза листьев яблони было отмечено в Японии, США, Югославии, Корее. В США зафиксировано массовое появление сердцевинной гнили яблок. С начала XXI в южных регионах европейской части России регистрируется существенное увеличение поражённости яблонь альтернариозом, проявляющимся как в листовой, так и в плодовой форме. В работе В.Н. Копица [3] приводятся данные о выделении *A. alternata* с поверхности усыхающих побегов яблонь на территории Беларуси в 1994-1995 гг. Но этот вид указывается там как сопутствующий основным возбудителям. На территории Саратовской области в последние годы данный вид является основным возбудителем усыхания скелетных частей яблонь [4]. При этом не отмечается одновременного проявления листовой и плодовой формы этого заболевания. Поэтому возник вопрос о способности штаммов, вызывающих усыхание скелетных частей деревьев, вызывать плодовую и листовую форму альтернариоза яблонь.

Цель и задачи исследования. Целью работы стало изучение биологических свойств штаммов *Alternaria alternata*, изолированных со скелетных частей яблонь с признаками микозного усыхания.

Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Создать коллекцию штаммов грибов *Alternaria alternata*, изолированных с пораженных скелетных частей яблонь в разных районах Саратовской области.

2. Выявить у этих штаммов целлюлолитическую активность и способность к мацерации растительных тканей классических тест-объектов (моркови, картофеля, свёклы).

3. Определить способность исследуемых штаммов к росту на тканях плодов яблонь разных сортов и к их мацерации в условиях *invitro*.

4. Установить способность данных штаммов вызывать поражение листовых пластинок разных сортов яблонь в условиях *invitro*.

5. Выявить сорта яблонь, наиболее восприимчивые к листовой и плодовой формам альтернариоза

Материал и методы исследования. Материалом для микробиологических исследований послужили побеги яблонь с признаками микозного усыхания из 5 районов Саратовской области: Екатериновского, Саратовского, Энгельсского, Новоузенского и Александрово-Гайского. Всего было исследовано 26 деревьев.

При изучении способности штаммов, изолированных с усыхающих скелетных частей яблонь, вызывать какие-либо поражения тканей плодов и листьев яблонь *invitro*, были использованы плоды и листья 9 сортов яблонь с разными сроками созревания, которые наиболее широко культивируются в нашем регионе: летние сорта Грушовка Московская, Белый налив, Мальт Багаевский, осенние сорта Уэлси, Жигулёвское, Беркутовское, зимние сорта Северный синап, Симиренко, Чудное.

Посевы фрагментов поражённых побегов проводили методом отпечатка на среду PDA (картофель – 200 г, агар-агар – 15 г, глюкоза – 20 г, вода – 1 л) для выделения фитопатогенных грибов, культивировали в течение 5-7 суток при +28°C. Затем проводили количественный учёт грибов и рассев на питательную среду для получения чистых культур.

Видовую принадлежность изолятов определяли по культуральным и морфологическим свойствам с помощью определителя Симмонса [5].

На первом этапе работы у исследованных штаммов выявлялись факторы фитопатогенности по стандартной методике: способность к мацерации тканей картофеля, свёклы, моркови и целлюлолитическую активность.

На поверхность голодного агара в чашках Петри помещали фильтровальную бумагу, на которую накладывали диски, вырезанные из картофеля, свёклы и моркови площадью 1 см². На разложенные диски петлёй наносили 5-суточную культуру исследуемого штамма гриба. Контролем служили диски с нанесённым на них физиологическим раствором. Учёт результатов проводили на 7 суток.

Для проверки целлюлолитической активности производили посев на среду с целлюлозой в качестве единственного источника углерода, инкубировали в термостате при +28°C 5 - 7 суток.

В качестве объектов для мацерации были использованы ткани плодов и листьев яблонь разных сроков созревания. В стерильные чашки Петри заливали голодный агар, по мере застывания помещали на него фильтровальную бумагу, на которую накладывали диски, вырезанные из плодов яблонь площадью 1 см². На разложенные диски петлёй наносили 5-суточную культуру исследуемого штамма гриба. Учёт результатов проводили на 7, 14, 21 сутки.

При определении способности исследуемых штаммов вызывать поражения листовых пластинок, использовали листья тех же сортов яблонь, что и в предыдущих экспериментах. В стерильные чашки Петри заливали голодный агар, на который помещали листовую пластинку. На центральной жилке делали надрез стерильным лезвием длиной около 5 мм и в этот надрез петлёй вносили 5-суточную культуру исследуемого штамма гриба. Все посеы культивировали при +28 °C во влажной камере. Учёт результатов проводили на 7, 14, 21 сутки.

Для сравнения полученных результатов нами была разработана шкала, позволяющая оценить степень поражения тканей яблонь *invitro*: 0 баллов — отсутствие поражений, 1 балл — поражено не более 50%, 2 балла — поражено 50-90%, 3 балла — поражено 90-100% площади тест-объекта.

Для выявления достоверности различий в чувствительности разных сортов к поражению грибами *A.alternata* использовали критерий Фридмана. Критерий Фридмана - это непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений. Критерий применяется для сопоставления показателей, измеренных в s условиях ($s \geq 3$) на одной и той же выборке из n испытуемых. Критерий Фридмана позволяет установить, что величины показателей от условия к условию изменяются.

Критерий Фридмана является обобщением критерия Вилкоксона на большее, чем два, количество условий измерения. Нулевая гипотеза $H_0 = \{ \text{между полученными в разных условиях показателями существуют лишь случайные различия} \}$.

Структура и объём работы. Работа изложена на 52 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 4 таблицами и 19 рисунками. Список использованных источников включает 46 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных об особенностях биологических свойств штаммов *Alternaria alternata*, изолированных со скелетных частей яблонь с признаками микозного усыхания.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о фитопатогенных грибах *Alternaria alternata*.

На первом этапе работы были проведены исследования по выявлению у выделенных штаммов альтернативных факторов фитопатогенности: целлюлолитической активности и способности к мацерации тканей классических тест-объектов.

Было выявлено, что все исследованные штаммы кроме №7 проявляли целлюлолитическую активность.

Наиболее широко и разнообразно у бактерий и грибов представлены ферменты, деградирующие пектиновые вещества срединных пластинок клеточных стенок растений. Совместное действие различных ферментов приводит к эффективной деградации пектиновых веществ и последующему использованию образующихся пектиновых олигомеров в качестве источника углерода для роста микроорганизмов. Однако наши штаммы на классических тест-растениях мацерацию растительных тканей не осуществляли. Лишь штаммы №2 и №3 давали слабopоложительную реакцию на тканях корнеплодов свёклы. Но мы предположили, что отсутствие мацерации тканей овощей не обязательно будет говорить о невозможности мацерировать ткани плодов яблонь, которые сильно отличаются по своему химическому составу (концентрации сахаров, кислотности и т.д.) от клубней и корнеплодов овощей.

Поэтому на следующем этапе работы было проведено изучение способности этих штаммов к росту на тканях плодов яблонь разных сортов и к их мацерации.

Наши исследования показали, что все штаммы, изолированные с усыхающих скелетных частей яблонь, способны расти на тканях плодов яблонь и вызывать их мацерацию. Поражения плодов развивались постепенно. Уже на 7-е сутки на инфицированных поверхностях отмечался заметный рост грибов. Наибольший рост проявляется у штаммов 8, 18, 20. Слабая мацерация растительных тканей была выявлена у всех штаммов, но не на всех образцах яблок. Каких-либо чётких закономерностей в преимущественном поражении плодов тех или иных сортов выявлено не было. Некоторые штаммы давали более интенсивный рост на плодах летнего сорта Белый налив, осеннего сорта Жигулёвское, единичные штаммы давали более сильный рост на плодах летнего сорта Грушовка московская и зимних сортов Чудное и Смиренко. Максимальная степень поражения тканей плодов не превышала 2-х баллов. К 14-м суткам интенсивность поражения

плодов существенно увеличилась. Теперь на многих сортах степень поражения достигала 3-х баллов. К числу сортов с наибольшим поражением относились примерно те же сорта, что и на 7-е сутки эксперимента: Смиренко, Чудное, Жигулёвское, Белый налив, Грушовка Московская. Мацерация в той или иной степени отмечалась на большинстве использованных тест-объектов. К 21-м суткам эксперимента ситуация изменилась мало. По-прежнему лишь часть использованных тест-объектов имела максимальное поражение в 3 балла.

Таким образом, наблюдалось постепенное увеличение поражений тканей плодов яблонь, и к 21-м суткам 48% проб имели поражения в 2-3 балла. Однако пробы без поражений или с поражением в 1 балл даже к концу эксперимента составляли 51%.

Наиболее восприимчивыми к плодовой форме альтернариоза оказались летние сорта Грушовка московская и Белый налив, плоды которых имели максимальную степень поражения в 3 балла при инфицировании 77,8% и 55,6% исследуемых штаммов *A.alternata* соответственно. Плоды сортов Жигулёвское, Чудное и Смиренко максимальные поражения имели лишь при инфицировании 44,5% исследуемых штаммов грибов. Относительно устойчивыми оказались сорта Мальт Багаевский, Уэлси, Беркутовское, Северный синап. Их плоды даже к 21 суткам эксперимента не имели поражения в 3 балла ни в одном из вариантов заражения. Интересен тот факт, что именно на сортах Уэлси и Беркутовское ранее проводились исследования альтернариоза скелетных частей яблонь, и при этом авторы исследований указывали, что плодовая форма альтернариоза даже на сильно поражённых деревьях встречалась редко [4]. Вероятно, на этих сортах альтернариоз проявляется преимущественно в стволовой форме, а их плоды к альтернариям более устойчивы.

Далее мы попытались выяснить, существуют ли различия в интенсивности поражения плодов яблонь штаммами альтернарий, выделенными в разных районах Саратовской области. В анализ были

включены данные, полученные к окончанию эксперимента, т.е. к 21-м суткам после инфицирования.

Штамм 2, выделенный на северо-западе области в Екатерининском районе в большей степени поражал плоды летних сортов Белый налив и Гушовка Московская. Штаммы 3, 5 и 18, выделенные в Саратовском районе, особенно поражали плоды летнего сорта Грушовка московская. Штаммы 16 и 18 поражения в 3 балла давали также на плодах летнего сорта Белый налив, а штаммы 3 и 5 на плодах осеннего сорта Жигулёвское. Самыми устойчивыми оказались плоды сортов Северный синап, Беркутовское и Мальт Багаевский. Штаммы 7 и 8, выделенные в Энгельском районе, в большей степени поражали плоды летнего сорта Грушовка московская, штамм 8 максимальную степень поражения в 3 балла давал на плодах Белого налива. Штаммы 17 и 20, выделенные на юго-востоке области в Александрово-Гайском и Новоузенском районе, также в большей степени поражали плоды летнего сорта Грушовка московская. Штамм 20 проявил также высокую поражающую активность в отношении плодов Белого налива и Чудного. Следует отметить, что только этот штамм показал максимальную степень поражения на плодах зимнего срока созревания (Чудное). Статистически значимых различий в интенсивности поражения плодов яблонь разными штаммами альтернатив выявлено не было (Фридмана; $p \leq 0.05$). Более низкая активность статистически была показана только для штамма 7 из Энгельского района. Штаммы из всех районов наиболее эффективно поражали ткани плодов летних сортов Белый налив и Грушовка московская. Расчёт коэффициента Фридмана показал достоверное отличие чувствительности этих сортов к плодовой форме альтернативоза ($p \leq 0,05$). Однако третий летний сорт, использованный в работе – Мальт Багаевский – был достаточно устойчив к заражению всеми исследуемыми штаммами. В литературе имеются сведения о том, что деревья этого сорта яблонь почти никогда не поражаются чёрным раком.

Альтернариоз на скелетных частях даёт такие же симптомы [3,4], и в садоводческой литературе его часто путают с чёрным раком. Поэтому можно предположить, что этот сорт имеет устойчивость и к стволовой, и к плодовой форме альтернарроза.

Нашими исследованиями было доказано, что штаммы, изолированные с поражённых скелетных частей яблонь, могут вызывать некротические поражения листовых пластинок яблонь, характерные для листовой формы альтернариоза.

При заражении листовых пластинок яблонь разных сортов результаты были более однотипные по сравнению с заражением плодов.

На 7-е сутки эксперимента в большинстве вариантов наблюдалось незначительная зона некроза (степень поражения 1 балл). Исключение составили штаммы 2, 7, 17 и 20, которые на листьях Грушовки московской и Белого налива давали более существенную зону некроза (степень поражения 2 балла). На 14-е сутки после заражения ситуация практически не изменилась: у большинства образцов отмечалась степень поражения в 1 балл, большие площади некроза регистрировались при инфицировании теми же штаммами и тех же сортов, которые проявили соответственно наибольшую агрессивность и большую чувствительность на 7-е сутки эксперимента. На 21-е сутки после инфицирования результат эксперимента практически не изменился. Единственным отличием стало то, что штамм 20 вызвал полный некроз листовых пластинок яблонь сортов Грушовка московская и Белый налив. Как видно из рисунка 19, поражения листовых пластинок меньше изменялись во времени, по сравнению с поражениями плодов. Уже на 7-е сутки 74% образцов имела поражение в 1 балл, и к 21-м суткам эта группа увеличилась до 90%. Пробы с максимальной степенью поражения в 3 балла появились только к 21-м суткам, и их доля составила всего 3%.

Чувствительность разных сортов яблонь к листовой форме альтернариоза также оказалась разной. Расчёт коэффициента Фридиана показал, что статистически значимую ($p \leq 0.05$) более высокую

восприимчивость к листовой форме альтернариоза имеют те же сорта, которые оказались более чувствительными к плодовой форме альтернариоза: Грушовка московская и Белый налив.

Наиболее агрессивными штаммами, способными вызывать листовую форму альтернариоза у восприимчивых сортов оказались штаммы 2, 7, 17, 20. Причём все эти штаммы были изолированы из разных районов Саратовской области. Следовательно, на всей территории региона циркулируют штаммы *A. alternata*, способные вызывать листовую форму альтернариоза у восприимчивых сортов.

Выводы

1. Грибы *Alternaria alternata* доминировали на поверхности усыхающих скелетных частей яблонь во всех исследованных районах Саратовской области.
2. Целлюлолитической активностью обладали 89% выделенные штаммы *A. alternata*, способностью к мацерации растительных тканей классических тест-объектов - 22,3% штаммов
3. Штаммы, изолированные с поверхности скелетных частей яблонь, в условиях *invitro* были способны вызывать поражения тканей плодов и листовых пластинок яблонь, типичные для плодовой и листовой форм альтернариоза яблонь.
4. Статистически значимых различий в интенсивности поражения плодов яблонь разными штаммами альтернарий выявлено не было. Наиболее агрессивными штаммами, способными вызывать листовую форму альтернариоза у восприимчивых сортов оказались штаммы 2, 7, 17, 20.
5. Наиболее восприимчивыми к плодовой и листовой формам альтернариоза оказались летние сорта Грушовка московская и Белый налив.

Список использованных источников

1. Ганнибал, Ф. Б. Альтернариозы сельскохозяйственных культур на территории России / Ф.Б. Ганнибал // Защита и карантин растений. – 2010. – № 5. – С. 30-32.
2. Ганнибал, Ф. Б. Видовой состав, систематика и география возбудителей альтернариозов подсолнечника в России / Ф.Б. Ганнибал // Вестник защиты растений. – 2011. – №1. – С. 13-19.
3. Копица, В.Н. Раковые заболевания скелетных частей яблони в Беларуси / В.Н. Копица // Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь. – 1997. – №. 4. – С. 58–62.
4. Мохамед, Х.А. Особенности микробных ассоциаций скелетных частей яблонь (*Malus domestica* Borkh., 1803) при микозных усыханиях на территории Саратовской области: автореф. дис...канд. биол. наук: 03.02.03/ Х.А. Мохамед –Саратов. –2017.– С. 22.
5. Serdani, M. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa / M. Serdani // Mycol. Resc. – 2002. – № 6. – P. 561-569.
6. Желдакова, Р. А., Мямин, В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин - Минск: БГУ. – 2006. – С. 246.