



УДК 632.4: [635.9:582.572,226]

Ю.А. Каштанова, О.О. Белошапкина
Yu.A. Kashtanova, O.O. Beloshapkina

ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ РОДА *PENICILLIUM SP.* НА ТЮЛЬПАНАХ: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, ВИДОВОЙ СОСТАВ, ЗАЩИТНЫЕ СРЕДСТВА

PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF THE GENUS *PENICILLIUM SP.* ON TULIPS: PREVALENCE, SPECIES COMPOSITION AND PROTECTIVE EQUIPMENT

Ключевые слова: тюльпаны, фитопатогенные грибы, пенициллез, распространенность, ПЦР-анализ, чистая культура, пестициды и агрохимикаты, биологическая эффективность.

Keywords: tulips, phytopathogenic fungi, penicilliosis, prevalence, PCR (polymerase chain reaction) test, pure culture, pesticides and agrochemicals, biological efficiency.

Цель работы – выявить распространенность и видовой состав грибов рода *Penicillium sp.* на тюльпанах в открытом и защищенном грунте. Задачи – уточнение видового состава возбудителей, подбор эффективных препаратов и их концентрации при разных способах применения в чистой культуре патогенов. При проведении работ использовали следующие методики: визуальную оценку распространенности (Р%) и развития (R%) болезни, биологической эффективности препаратов (БЭ%), методы влажной камеры, культивирования *Penicillium sp.* на питательной среде КГА, микроскопирования, а также метод ПЦР-анализа. По результатам ПЦР-анализа установлено, что тюльпаны в защищенном грунте в основном поражаются видами *Penicillium gladioli* (McCulloch et Thom) и *P. hirsutum* (Dierckx), при этом распространенность пенициллеза в среднем за 2011–2013 гг. колебалась от 5 до 8%, а в открытом грунте – от 10 до 12%. В ходе скрининга из 6 испытываемых препаратов (Максим, КС, 0,02%, Фитолавин, ВРК, 0,2%, Фармайод, ВК, 0,03–0,05%, Фитоспектр, ВКР, 0,04–0,06%, Силиплант, КХМ, 0,3%, Циркон, Р, 0,01%) наиболее эффективным оказался Фитолавин (БЭ = 54,3%) на основе фитобактериомицина. По характеру метода внесения наиболее эффективным является метод внесения препаратов в охлажденную среду. Внесение препаратов *in vitro* методом мостика оказалось наиболее эффективно (БЭ = 32,4%) только для кремнийсодержащего препарата «Силиплант». Метод опрыскивания себя не оправдал и был исключен из дальнейших исследований.

The research goal was to identify the prevalence and species composition of fungi of the genus *Penicillium sp.* on tulips in open and protected ground. The following research objectives were involved: adjusting the species composition of the pathogens and selecting effective drugs and their concentrations in different applications in a pure culture of the pathogens. The following techniques were used: visual estimate of prevalence (P%) and development (R%) of the disease and biological efficacy of the drugs (BE%), humidified incubator method, the cultivation of *Penicillium sp.* on potato-glucose agar, microscopy and PCR test. The PCR test revealed that protected ground tulips were mainly affected by the species *Penicillium gladioli* (McCulloch et Thom) and *P. hirsutum* (Dierckx); the average prevalence for 2011–2013 ranged from 5% to 8%, while in open ground it ranged from 10% to 12%. During the screening of the 6 tested formulations (Maksim, KS 0.02%; Fitoflavin, VRK, 0.2%; Pharmaiod, VK, 0.03–0.05%; Fitospektr, VKR, 0.04–0.06%; Siliplant, KKhM, 0.3%; Tsircon, R, 0.01%) – the most effective product was Fitoflavin (BE = 54.3%) based on fitobakteriomitsin. In terms of application technique, the product application into a cooled medium is the most effective. The application *in vitro* by bridge method proved to be the most effective (BE = 32.4%) only for silicon-containing product Siliplant, while spraying application was not effective and was left out.

Каштанова Юлия Андреевна, аспирант, каф. защиты растений, Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева. E-mail: Ulij_kashtanova@mail.ru.

Kashtanova Yuliya Andreyevna, Post-Graduate Student, Chair of Plant Protection, Russian State Agricultural University – Timiryazev Moscow Agricultural Academy. E-mail: Ulij_kashtanova@mail.ru.

Белошاپкина Ольга Олеговна, д.с.х.н., проф., каф. защиты растений, Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева. E-mail: beloshapkina@timacad.ru.

Beloshapkina Olga Olegovna, Dr. Agr. Sci., Prof., Chair of Plant Protection, Russian State Agricultural University – Timiryazev Moscow Agricultural Academy. E-mail: beloshapkina@timacad.ru.

Тюльпаны являются распространенной цветочно-декоративной культурой как для выгонки, так и для озеленения в открытом грунте. Их успешное выращивание напрямую связано с соблюдением технологий и защитными мероприятиями по предотвращению комплекса болезней [2]. Грибы рода *Penicillium* sp., принадлежащие к классу Ascomycetes, порядку Eurotiaceae, семейству Trichocomycete, вызывают пенициллез различных луковичных культур и ряда овощных. У тюльпанов болезнь приводит к сильному угнетению и отставанию растений в росте. При данном заболевании поражаются не только луковицы в период хранения, но и в период вегетации совместно с наземными частями [1].

В задачи работы входило выявить распространенность пенициллеза на тюльпанах в открытом и защищенном грунте; уточнить видовой состав возбудителей; подобрать эффективные препараты и их концентрации при разных способах применения в чистой культуре патогенов.

Использовали визуальную оценку распространенности (P%) и развития (R%) болезни, биологической эффективности препаратов (БЭ%) по стандартным формулам; методы влажной камеры, культивирования *Penicillium* sp. на питательной среде КГА, микроскопирования [1]. Метод ПЦР-анализа проводили на базе Центра «Биоинженерия» РАН (г. Москва) [5]. Скрининг препаратов (Максим, КС, 0,02% (д.в. флудиоксонил), Фитолавин, ВРК, 0,2% (д.в. фитобактериомицин), Фармайод, ВК, 0,03-0,05% (д.в. йод с неогенным ПАВ), Фитоспектр, ВКР, 0,04-0,06% (д.в. сапонины), Силиплант, КХМ, 0,03% (д.в. активный кремний), Циркон, Р, 0,01% (д.в. гидроксикоричная кислота) проводили в чистой культуре грибов. Препараты применяли 3 способами: введением их в питательную среду перед разливом в чашки Петри, опрыскиванием культуры гриба с помощью пульвизатора, увлажняя ими мостик из фильтровальной бумаги, помещенный в центр среды в чашке Петри.

В результате мониторинга болезней в период с 2011 по 2013 гг. по 4 базовым сортам установили, что в открытом грунте самая высокая распространенность пенициллеза была в 2012 г. и составила 5,6%. Наиболее пораженным сортом был Стронг Голд

(P = 11,6%), а наиболее устойчивым – Эль де Франс (P = 3,2%).

В защищенном грунте при сравнении различных технологий выращивания на различных субстратах в 2012 г. распространенность болезни при технологии +5°C составила 11%, при технологии +9°C с использованием почвенного субстрата – 14,2%, а на гидропонном субстрате – 21,6%. Наиболее пораженным был, как и в открытом грунте, сорт Стронг Голд – 18%, а наименее – Династия – 3,6%. Высокий процент распространенности пенициллеза при технологии +9°C на гидропонном субстрате обусловлен нарушением технологического процесса и резкими температурными перепадами [4].

Грибы рода *Penicillium* sp. отличаются многообразием видов. Для более детальной диагностики видового состава мы использовали метод ПЦР-анализа. Предварительно были наработаны в чистой культуре на агаровой питательной среде мицелий гриба и органы спороношения. Изоляты выращивали в течение 8 сут. при температуре 25°C затем замораживали при температуре -70°C. ДНК выделяли и амплификацию проводили по методике Cubero и соавт. [5, 6] при следующих режимах: начальный цикл денатурации 94°C в течение 4 мин., а затем на 25 циклов при 94°C в течение 1 мин., 56°C в течение 1 мин. и 72°C в течение 1 мин., последний цикл – синтез при 72°C в течение 10 мин. Очищенная двухцепочечная ДНК была секвенирована прямым методом с синтезированными праймерами к 10 видам *Penicillium* sp., следуя инструкциям производителя [7].

При проведении скрининга видов *Penicillium* sp. были выделены 10 изолятов гриба с различных частей растений.

В результате установили, что тюльпаны в защищенном грунте преимущественно поражались видами *P. gladioli* (1 из 10 совпадений) и *P. hirsutum* (7 из 10 совпадений), 2 изолята имели смешанную структуру и идентификации не подлежали.

Для оптимизации химических средств защиты против пенициллеза тюльпана провели *in vitro* скрининг препаратов с различными действующими веществами и механизмами действия. Расчёт биологической эффективности проводили в сравнении с эталонным фунгицидом «Максим».

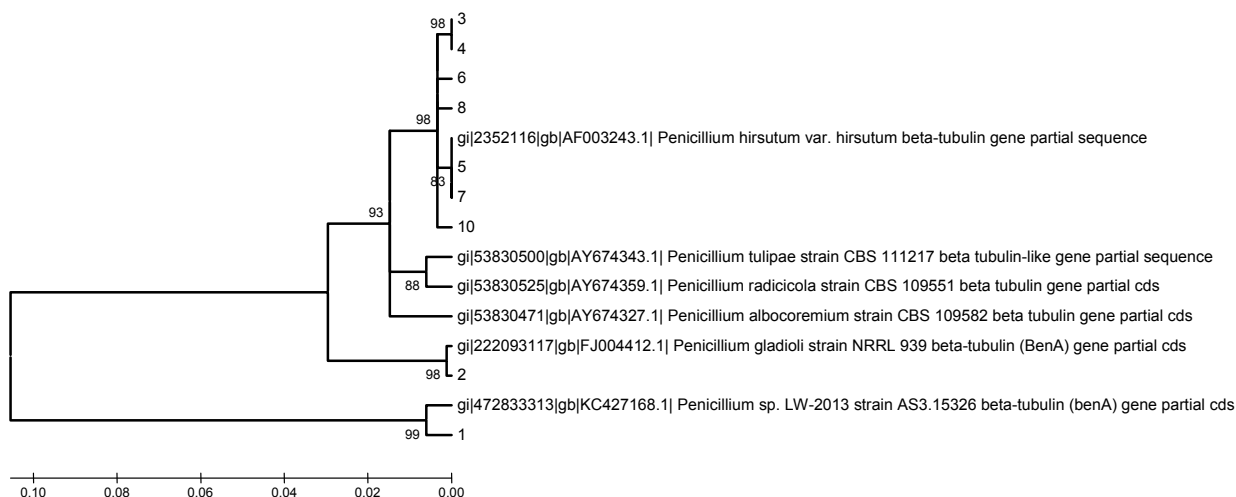


Рис. 1. Дендрограмма сравнения грибов рода *Penicillium* sp., выделенных с тюльпана по видовому составу

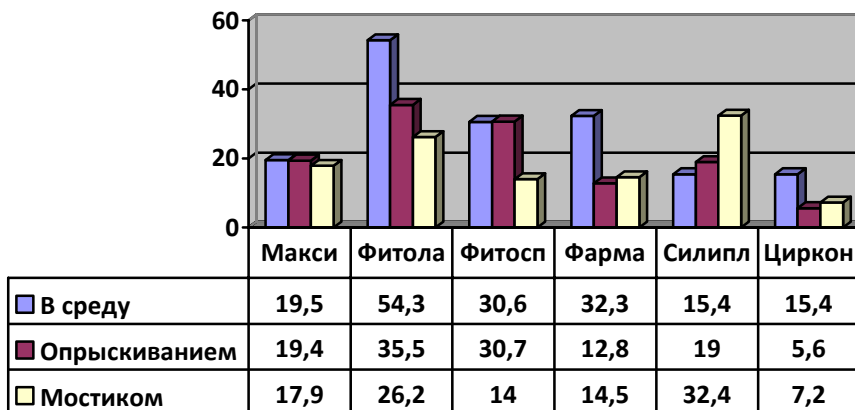


Рис. 2. Влияние препаратов и методов их внесения на рост и развитие колоний *Penicillium* sp., мм (12-й день после посева)

В ходе проделанной работы выяснили, что наибольшей эффективностью обладал препарат «Фитолавин» (БЭ = 54,3%), при внесении его в среду происходило активное подавление мицелия и, как следствие, приостановление роста колонии. Наиболее эффективным методом является непосредственное внесение препаратов в охлажденную среду. Внесения препаратов *in vitro* методом мостика оказалось наиболее эффективно (БЭ = 32,4%) только для кремнийсодержащего препарата «Силиплант», под действием которого изначально наблюдалось снижение динамики роста мицелия, а затем его активное подавление. Метод опрыскивания себя не оправдал и был исключен из дальнейших исследований.

Библиографический список

1. Выгонка тюльпанов: обзор публикаций ИВС Хиллегем Голландия/ Объединение гол-

ландских авторов; Международный Центр Луковичных Цветов (ИВС) – 2011. – С. 21-34.

2. Ахатов А.К., Джалилов Ф.С., Белошапкина О.О., Стройков Ю.М., Чижов В.Н. Защита растений от болезней в теплицах: справочник. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2002. – С. 464.

3. Dopazo J. Estimating errors and confidence intervals for branch lengths in phylogenetic trees by a bootstrap approach // Journal of Molecular Evolution. – 1994. – Vol. 38 (3). – R. 300-304.

4. Зайцева Е.Н., Былов В.Н. Технология выращивания луковиц тюльпанов для выгонки: метод. указания. – М.: Агропромиздат, 2008. – С. 56.

5. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). – 2004. – Vol. 101 (30). – R. 11030-11035.

6. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731-2739.

7. Rzhetsky A., Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1992. – Vol. 9 (5). – R. 945-967.

References

1. Vygonka tyul'panov. Obzor publikatsii IBC Khillegom Gollandiya / Ob"edinenie golandskikh avtorov / Mezhdunarodnyi Tsentr Lukovichnykh Tsvetov (IBC) – 2011. – S. 21-34.

2. Akhatov A.K. Zashchita rastenii ot boleznei v teplitsakh: spravochnik). – M.: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK. – 2002. – S. 464.

3. Dopazo J. Estimating errors and confidence intervals for branch lengths in phylogenetic trees by a bootstrap approach // *Journal*

of Molecular Evolution. – 1994. – Vol. 38 (3). – R. 300-304.

4. Zaitseva E.N. Bylov V.N. Tekhnologiya vyrashchivaniya lukovits tyul'panov dlya vygonki (metod. ukazaniya). – M.: Agropromizdat. – 2008. – S. 56.

5. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. – 2004. – Vol. 101 (30). – R. 11030-11035.

6. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731-2739.

7. Rzhetsky A., Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1992. – Vol. 9 (5). – R. 945-967.

