

М.М. КИРИК, Т.І. ЗУБОВА

Національний аграрний університет
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

**МОРФОЛОГО-БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ
PYTHIUM ULTIMUM VAR. *ULTIMUM* TROW —
ЗБУДНИКА КОРЕНЕВОЇ ГНИЛІ
BRASSICA NAPUS L.**

Ключові слова: *Pythium ultimum* var. *ultimum* Trow, *Brassica napus* L.

Гриби роду *Pythium* Pringsh широко розповсюджені у природі в дуже різноманітних умовах існування. Одні трапляються у воді і ґрунті на рештках рослинного і тваринного походження, інші відомі як паразити вищих рослин, водоростей, грибів, тваринних організмів на всіх континентах [5, 9].

Здатність до існування в паразитному та сапротрофному стані забезпечує виживання цієї групи грибів та високий ступінь її екологічної пластичності. Ряд авторів [3—5, 7, 8] вказують, що види роду *Pythium* спричиняють появу досходової та післясходової кореневої гнилі різних сільськогосподарських культур (овочевих, бобових, бавовнику, цукрового буряка) у багатьох країнах світу, зокрема і в СНД. Наводяться дані про те, що кореневі та прикореневі гнилі хрестоцвітих зумовлюють *P. debaryanum* Hesse, *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. arrhenomanes* Drechsler, *P. irregulare* Buisman, *P. monospermum* Pringsh, *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix, *P. ultimum* Trow, *P. hydnosporum* (Mont.) Schroter [1, 7], гниль проростків (сходів) — *P. debaryanum* Hesse, *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix [1], білу гниль гіпокотилей проростків — *P. megalacanthum* de Bary [12], судинний некроз — *P. irregulare* Buisman [1].

Т.М. Хохлаков, Н.Л. Полозова і Т.Е. Вахрушева [11] збудниками корневих гнилей *Brassica napus* вважають *P. spinosum* Sawada, *P. debaryanum* Hesse, *P. splendens* Braun., *P. artotrogus* (Mont.) de Bary. A.J. Van der Plaats-Niterink [13] вказує на можливість паразитування *P. ultimum* на *Brassica napus*. Проте морфолого-культуральні та біологічні особливості цих патогенів, зокрема *P. ultimum* var. *ultimum*, досліджені недостатньо [1].

Матеріали і методи досліджень

Метою наших досліджень було виділення в чисту культуру збудника кореневої гнилі *Brassica napus*, ідентифікування та дослідження його морфолого-біологічних особливостей. Для цього ми обирали рослини із типовими ознаками захворювання: засохлі або із потоншеною кореневою шийкою і зруйнованими тканинами коріння. Для вилучення грибів роду *Pythium* поверхнево дезинфіковані корінці витримували у воді 2—3 доби, міцелій, що розвивався, пересівали на голодний агар (ГА). Молекулярну ідентифікацію гриба проводили визначенням нуклеотидної послідовності генів (використані ділянки: 18S (частково) -ITS1-5.8S-ITS2- 28S (частково)) спільно зі співробітниками Мікробіологічного інсти-

© М.М. КИРИК, Т.І. ЗУБОВА, 2007

AGGCACAAACGGGAGTATCACCCCTCGATGCTGTCTCTTCCAAGGAACCTATCCCAAATA 60
 GCTGCACTGACAGCGCCTCTATAGACTACAATTCGCCATGCAAAACTTGCATAGAGATTT 120
 TAAGCTTGAGCTCTTCCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGGAATCCTGGTTAGTTTCTTT 180
 TCCTCCGCTTATTAATATGCTTAAAGTTCAGCGGGTAGTCTTGTCTGATATCAGGTCCAAT 240
 TGAGATACCATACACAATCTTGCAATTGACAATGATACAAAATTTCCCAAATCAATCTCT 300
 CTACGCAACTAAATGCAGCGTCTCCATACATCGTGAAAATGCTCTACTAAACAATCACTT 360
 ACGGTTCAAACCGACAACCTCTAGTACACCTCAAGGCACAAACAAGACCACACACAATT 420
 ACGCAACATTTGTGCGAGCCGAAGCCTAACATACCACGAATTGAGCTAGTCTCCATACGTT 480
 ATACCGAAGTCGCCAAAAGCCGCCAGCAATCCGAAAATCACTGCCTTCCAACCATTACAC 540
 TTCATAGAAACCATAGAAAAGACCGTGTCCATTTAAAAGGACTCGACAGATTCTCGATCG 600
 AAAAAACGAACGCAACCATGCGAGACACTTCCATCTGCACATTCATCCCTGACTACAC 660
 AGAAAAAGAAAGCAAGTTTGATT 684

Рис. 1. Нуклеотидна послідовність фрагменту рибосомальних генів *Pythium ultimum* var. *ultimum*

Fig. 1. Nucleotide sequence of ribosomal genes fragments in *Pythium ultimum* var. *ultimum*

туту Іннсбрукського університету (Австрія) проф. Р. Пьодером та д-ром М. Кірх-маером.

Характеристики росту повітряного міцелію та оптичну щільність гіф визначали за методиками, наведеними у «Методах експериментальної микології» [6].

Результати досліджень та їх обговорення

При пересіві міцелію на ГА ми спостерігали субстратний ріст несептованого міцелію завтовшки 6—10 мкм та утворення на другу-третю добу оогоніїв і ооспор. Чисту культуру вилученого гриба ідентифіковано за допомогою ПЛР-методу [10] як *P. ultimum* var. *ultimum* з вірогідністю 99 % (рис. 1).

Цей вид ми виявили у 75 % зразків, рідше траплявся *P. artotrogus* — 12 %. Інші гриби даного роду становили 13 %.

Вирощуючи *in vitro*, ми спостерігали швидкий ріст *P. ultimum* var. *ultimum* на трьох середовищах: картопляно-глюкозному (КГА), вівсяному (ВА), та морквяному (МА) агарах. Так, через 48 годин гриб утворював досить щільний пухнастий високий білий міцелій, що покривав усю поверхню чашки Петрі і легко руйнувався при її відкриванні. На кукурудзяному агарі (КА) міцелій був менш щільним (табл. 1), а на ріпаковому (РА) та гороховому (ГорА) агарах повітряний міцелій формував купки де-не-де на поверхні середовища. На ГА та середовищі Чапека (СЧ) спостерігався тільки субстратний його ріст. Щільність гіф колонії в одному полі зору мікроскопа за 100-кратного збільшення коливалася у межах 68 937,5—79 125,0 мкм на ГорА, ВА і КГА та у межах 20 312,5—36 687,5 мкм — на решті середовищ.

Таблиця 1. Розвиток повітряного міцелію *P. ultimum* var. *ultimum* на живильних середовищах на другу добу культивування

| Живильне середовище | Висота повітряного міцелію, мм | Щільність міцелію, бали | Оптична щільність гіф колоній, мкм у полі зору |
|---------------------|--------------------------------|-------------------------|--|
| КА | 10 | 3 | 36 687,5 |
| ВАр | 10 | 4 | 78 812,5 |
| КГА | 12 | 5 | 79 125,0 |
| МА | 10 | 3 | 33 750,0 |
| ГА | 1 | 1 | 20 312,5 |
| ГорА | 6 | 2 | 68 937,5 |
| РА | 5 | 2 | 21 687,5 |
| СЧ | 1 | 1 | 24 437,5 |

При культивуванні на живильних середовищах на другу-третю добу починають з'являтися оогонії (рис 2). Вони здебільшого термінальні, округлі, з гладенькими стінками, 20—24 мкм у діаметрі. Антеридії по одному, інколи по три на оогоній, мішкоподібні, здебільшого моноклінні, іноді гіпогінні. Ооспори поодинокі, аплеротичні, кулясті, у діаметрі 23—24 мкм, із коричневою оболонкою, товщиною близько 2 мкм. У *P. ultimum* var. *ultimum* гіфи, зазвичай, завтовшки від 7 до 11 мкм, септовані лише у старому віці. Спорангії утворюються рідко, вони верхівкові, шароподібні, 12—28 мкм у діаметрі, проростають лише ростковою трубкою, без зооспор. Цю особливість відзначає ряд авторів [3, 5, 13].

Як ми встановили раніше, ріст *P. ultimum* var. *ultimum* та утворення ооспор залежать від температури і живильного середовища [2].

Товщина гіф ізоляту (табл. 2) за температури +10 °С на всіх середовищах коливалася у межах 6,6—7,9 мкм, з підвищенням температури до +25 °С вона зростала до 9,2—10,5 мкм на КГА, ГорА, МА; до 7,9 мкм — на КА, РА; на СЧ та ГА не змінювалася. Розмір ооспор при +10 °С коливався у межах 19,7—25,0 мкм. Підвищення температури до +25 °С зумовило збільшення цього показника до 27,6 мкм на РА, МА; до 23,7—26,3 мкм — на ГА, ГорА, КГА. Розмір ооспор залишався без змін на КА і був найменшим (21,0 мкм) на ВА.

Температура та склад живильного середовища суттєво впливали на чисельність ооспор *P. ultimum* var. *ultimum*. За температури +10 °С перші ооспори ми відзначали на третю добу, а на п'яту — їх чисельність зросла до 55 одиниць на КА (найбільша кількість). На ВА, ГА, МА їхня кількість становила 14—16. Найменшою чисельність ооспор була на ріпаковому агарі (одна), на решті середовищ вони не утворювались.

За температури +25 °С на живильних середовищах МА, КА, РА перші ооспори сформувалися вже на другу добу, на ВА, ГА, ГорА — на третю, а на середовищі Чапека — через 7 діб після посіву. Найбільша чисельність ооспор зафіксована на ВА — 255, що в 16 разів перевищує їх кількість під час вирощування за +10 °С. На КГА, КА, МА цей показник коливався у межах 125—150. Невисоку чисельність (15—30 ооспор) відзначено на ГА, ГорА, РА. Варто зауважити, що максимальну чисельність (450—550 ооспор у полі зору мікроскопа) спостерігали на 8-му добу на вівсяному агарі. З часом цей показник не змінювався.

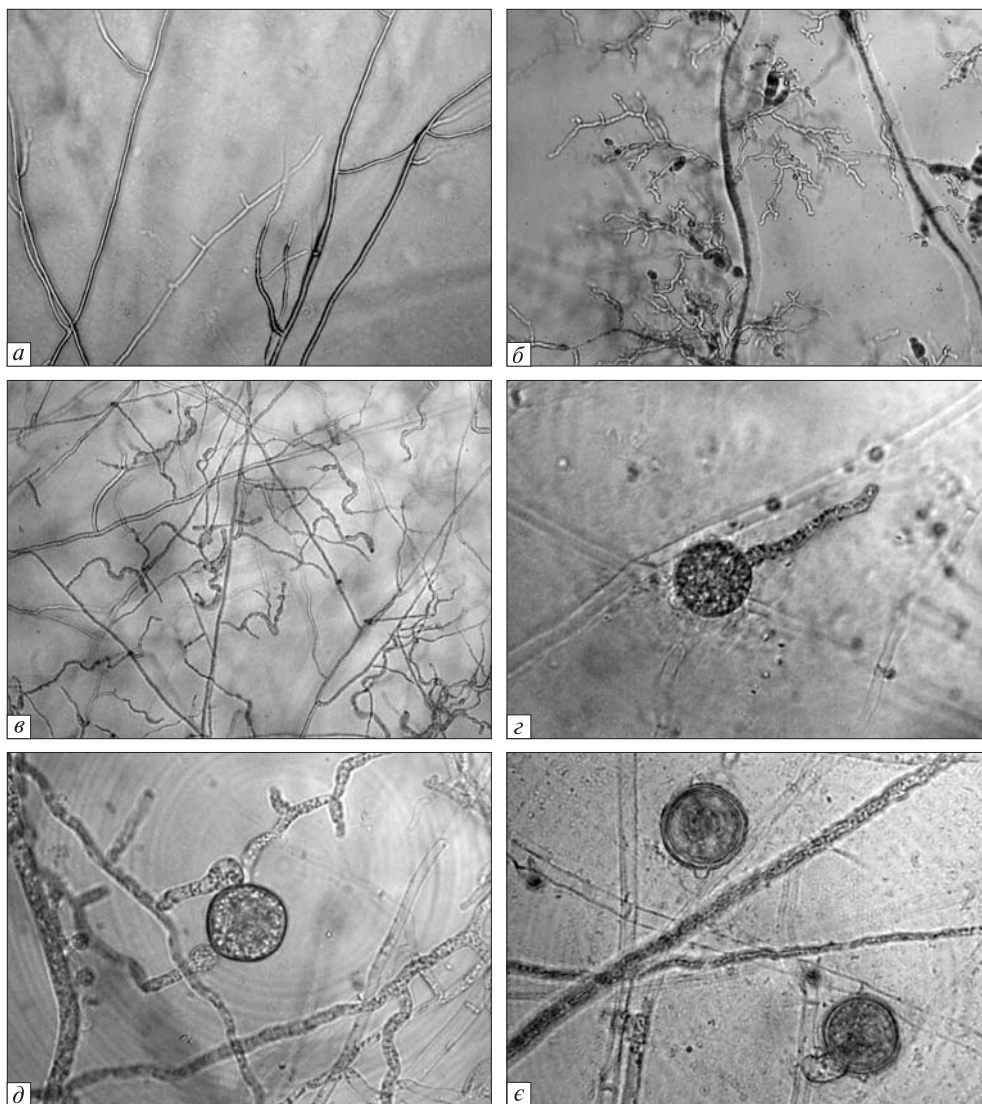


Рис. 2. Мікроскопічна будова *P. ultimum* var. *ultimum*: *a* — нормальний розвиток; *б* — надмірне галуження; *в* — здуття на вегетативних гіфах; *г* — проростання спорангія в міцелій; *д* — оогоній та антеридії; *е* — ооспори. (*a, б, в* — $\times 100$; *г, д, е* — $\times 400$)

Fig. 2. The microscopis structure *P. ultimum* var. *ultimum*: *a* — normal development of hyphae; *б* — forced branching; *в* — swallowings on vegetative hyphae; *г* — germination of sporangium into mycelium; *д* — oogonia and anteridia; *е* — oospores. (*a, б, в* — $\times 100$; *г, д, е* — $\times 400$)

Чисту культуру *P. ultimum* var. *ultimum* ми використали для перевірки патогенності в лабораторних умовах. З цією метою її вносили у стерильний ґрунт, у який висівали дезінфіковане насіння ріпаку. Цей вид виявився дуже патогенним (табл. 3), оскільки за найменшої кількості інокулюму (4,5 млн. ооспор/м²) із 83 % рослин, що зійшли, 80 % було уражено. Серед хворих сходів 35 % загинуло протягом перших діб після їх появи. У подальшому всі рослини були з ознаками захворювання. Із

Таблиця 2. Вплив температури на середній розмір гіф і ооспор та чисельність ооспор *P. ultimum* var. *ultimum* на різних живильних середовищах

| Живильне середовище | Середній розмір | | | | Кількість ооспор у полі зору мікроскопа ($\times 100$) на 5-ту добу, екз. | |
|---------------------|----------------------|----------------|-------------------------|----------------|---|--------|
| | товщина гіф, +/- мкм | | діаметр ооспор, +/- мкм | | +10 °C | +25 °C |
| | +10 °C | +25 °C | +10 °C | +25 °C | | |
| КА | 6,6 \pm 0,6 | 7,9 \pm 0,1 | 25,0 \pm 0,5 | 25,0 \pm 0,3 | 55 | 150 |
| ВА | 7,9 \pm 0,1 | 7,9 \pm 0,1 | — | 21,0 \pm 0,1 | 16 | 255 |
| КГАр | 7,9 \pm 0,1 | 10,5 \pm 0,1 | — | 23,7 \pm 0,1 | 0 | 140 |
| МА | 6,6 \pm 0,6 | 9,2 \pm 0,8 | 19,7 \pm 0,3 | 27,6 \pm 0,1 | 14 | 135 |
| ГА | 6,6 \pm 0,6 | 6,6 \pm 0,6 | 25,0 \pm 0,6 | 23,7 \pm 0,6 | 16 | 20 |
| ГорА | 7,9 \pm 0,1 | 9,2 \pm 0,6 | — | 26,3 \pm 0,1 | 0 | 15 |
| РА | 6,6 \pm 0,6 | 7,9 \pm 0,1 | 21,0 \pm 0,1 | 27,6 \pm 0,3 | 1 | 30 |
| СЧ | 6,6 \pm 0,6 | 6,6 \pm 0,6 | — | — | 0 | 0 |

Примітка: «—» ооспори відсутні на час проведення вимірювань.

Таблиця 3. Вплив інфекційного навантаження ооспор *P. ultimum* var. *ultimum* на розвиток кореневої гнилі *Brassica napus* L.

| Кількість ооспор, внесених у ґрунт, млн.шт./м ² | Зійшло рослин, % | Кількість хворих рослин після появи сходів, % | | | |
|--|------------------|---|----------------|---------------|----------------|
| | | через тиждень | | через 2 тижні | |
| | | всього | з них загинуло | всього | з них загинуло |
| Контроль | 100,0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4,5 | 83,0 | 80,0 | 35,0 | 100,0 | 44,0 |
| 9,0 | 73,0 | 90,1 | 40,9 | 100,0 | 50,0 |
| 13,5 | 17,0 | 100,0 | 80,0 | 100,0 | 80,0 |
| 18,0 | 0 | — | — | — | — |

Таблиця 4. Вплив температури ґрунту на патогенність *P. ultimum* var. *ultimum**

| Температура, °C | Зійшло рослин, % | Кількість хворих рослин після появи сходів, % | | | |
|-----------------|------------------|---|----------------|-----------|----------------|
| | | 14-та доба | | 21-а доба | |
| | | всього | з них загинуло | всього | з них загинуло |
| 0 | 85,0 | 24,0 | 8,0 | 26,7 | 8,0 |
| 5 | 58,0 | 74,0 | 45,3 | 76,0 | 52,3 |
| 10 | 31,3 | 89,0 | 52,3 | 100,0 | 95,0 |
| 15 | 98,0 | 18,0 | 14,0 | 26,7 | 16,0 |
| 20 | 62,3 | 32,0 | 24,0 | 58,0 | 26,7 |
| 25 | 58,0 | 80,0 | 45,0 | 88,7 | 45,0 |

*Примітка. Ґрунт, інфікований *P. ultimum* var. *ultimum*, витримувався за наведеної вище температури протягом 7 діб до посіву насіння ріпаку. У подальшому дослід проводився за стабільної температури (21—22 °C).

підвищенням інфекційного навантаження інтенсифікувався розвиток хвороби, що призводило до повної загибелі рослин у перші доби (варіант із 18 млн. ооспор/м²).

Було встановлено, що оптимальна температура ґрунту для розвитку гриба та його патогенності становить +5—+10 °C (табл. 4). У цьому випадку ми спостеріга-

ли низький відсоток схожості рослин (31 %) та загибель 89 % на 14-ту добу. Крім того, високою патогенність гриба є і за +25 °С.

Зауважимо, що за зберігання культури (із обов'язковими пересівами час від часу) патогенність гриба не зменшувалася, і за сприятливих умов він спричинював загибель 100 % рослин.

Висновки

1. Із ураженої кореневої системи *Brassica napus* L. вилучено у чисту культуру гриб *P. ultimum* var. *ultimum*.

2. Найкращими ріст і розвиток повітряного міцелію ізоляту є на картопляно-глюкозному агарі, а найвища кількість ооспор утворюється на вівсяному агарі. На картопляно-глюкозному, гороховому агарах і середовищі Чапека ооспори за +10 °С тривалий час не утворювались.

3. Стабільний ріст і розвиток гриба за зміни температури спостерігали на голлодному та кукурудзяному агарах.

4. Оптимальною для росту та розвитку гриба є температура +25 °С. Висока патогенність *P. ultimum* var. *ultimum* для *Brassica napus* L. встановлена за температури ґрунту +5—+10 та +25 °С.

5. Патогенні властивості *P. ultimum* var. *ultimum* не втрачаються при зберіганні.

1. Дурьнина Е.П., Великанов Л.В. Почвенные фитопатогенные грибы. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. — 108 с.
2. Зубова Т.І. Розвиток *Pythium ultimum* var. *ultimum* на різних середовищах залежно від температури // Мікробіол. журн. — 2005. — № 5. — С. 50—57.
3. Котова В.В. Гниль семян и проростков гороха и меры борьбы с ней // Зап. Ленинг. СХИ. — 1971. — 156. — С. 95—98.
4. Котова В.В. Корневая гниль гороха, вызываемая грибом *Pythium arthrotrogus* (Mont.) dBy // Тр. ВИЗР. — 1981. — С. 61—65.
5. Котова В.В. Заболевание хлопчатника, вызываемое *Pythium ultimum* Trow v. *Ultimum* // Микол. и фитопатол. — 1992. — 26, № 4. — С. 281—288.
6. Методы экспериментальной микологии // Ред. В.И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 552 с.
7. Новотельнова Н.С., Пыстина К.А. Корневые и прикорневые гнили культурных растений. — Л.: Наука, 1978. — 80 с.
8. Пыстина К.А. Грибы рода *Pythium* Pringsh.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1975. — 26 с.
9. Пыстина К.А. Экологические особенности грибов рода *Pythium* Pringsh. // Микол. и фитопатол. — 1993. — 27, № 4. — С. 52—56.
10. Ташута С.Г. Полімеразно-ланцюгова реакція: Метод. рекомендації. — К., 2002. — С. 28.
11. Хохрякова Т.М., Полозова Н.Л., Вахрушева Т.Е. Определитель болезней кормовых культур нечерноземной зоны. — Л.: Колос, 1984. — 200 с.
12. Hershman D.E., Perkins D.M. Etiology of canola blackleg in Kentucky and seasonal discharge patterns of *Leptosphaeria maculans* ascospores from infested canola stubble // Plant Disease. — 1995. — № 12. — P. 1225—1229.
13. Van der Plaats-Niterink A.J. Monograph of the genus *Pythium* // Studies in Mycology. — 1981. — № 21. — 242 p.

Рекомендує до друку
І.О. Дудка

Надійшла 14.03.2007

Н.Н. Кирик, Т.И. Зубова

Национальный аграрный университет, г. Киев

**МОРФОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
PYTHIUM ULTIMUM VAR. ULTIMUM TROW — ВОЗБУДИТЕЛЯ
КОРНЕВОЙ ГНИЛИ BRASSICA NAPUS L.**

Выделен в чистую культуру возбудитель корневой гнили *Brassica napus* L. — *Pythium ultimum* var. *ultimum*. Изучены его морфолого-биологические особенности и микроскопическое строение. Отмечена высокая патогенность гриба, которая не теряется при пересевах.

Ключевые слова: *Pythium ultimum* var. *ultimum*, *Brassica napus*

М.М. Курык, Т.И. Зубова

National Agrarian University, Kyiv

**MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL PECULIARITIES
OF PYTHIUM ULTIMUM VAR. ULTIMUM TROW — AGENT
OF ROOT ROT BRASSICA NAPUS L.**

Agent of root rot of *Brassica napus* L. — *Pythium ultimum* var. *ultimum* is isolated in pure culture. Morphological and biological peculiarities and microscopic structure were studied. High pathogenicity of fungus, which doesn't decrease through numeral passages is stated.

Key words: *Pythium ultimum* var. *ultimum*, *Brassica napus*.