

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА АНАЛИЗА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ СЕМЯН ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

Рецензент: канд. с.-х. наук Крупенько Н.А.

Аннотация. Представлены результаты фитопатологической экспертизы семян льна масличного биологическим методом анализа инкубирования семян во влажной камере и на питательных средах различного состава. Показана зараженность семян льна масличного бактериозом, крапчатостью, сапротрофными и патогенными грибами. Установлено, что для определения посевных качеств семян и зараженности их крапчатостью предпочтительнее метод влажной камеры. Для выявления, изоляции и культивирования патогенов грибной и бактериальной природы – инкубирование семян на картофельно-глюкозном агаре, а для патогенной микрофлоры (*Fusarium* spp., *Colletotrichum lini* Mans et Bolley, *Aureobasidium pullulans* f. *Lini* (Laff) Cokke) – сусло-агаре.

Ключевые слова: лен масличный, семена, фитопатологическая экспертиза, влажная камера, питательная среда, сусло-агар, картофельно-глюкозный агар, картофельно-морковный агар, среда Чапека, патогенная микрофлора, сапротрофная микрофлора, бактерии, крапчатость, энергия прорастания, лабораторная всхожесть.

Введение. Высокое качество семян является одним из основных агрономических требований, обеспечивающих при прочих оптимальных условиях получение высоких и устойчивых урожаев сельскохозяйственных культур. Качество семенного материала льна масличного имеет первостепенное значение для успешного выращивания и расширения площадей данной культуры в Беларуси. Семена часто являются одним из основных источников распространения инфекции на льне. Цветков С.Г. из 144 видов грибов отмечал на семенах льна присутствие 32 видов [7]. Посев зараженными семенами приводит к передаче болезней на вегетирующие растения, создавая тем самым очаги инфекции и ее распространение в поле.

Микрофлора, встречающаяся на семенах, представлена как сапротрофными, так и патогенными видами грибов. Плесневение семян в основном вызывается грибами-сапротрофами: *Alternaria*

spp. (альтернариозная черная плесень), *Cladosporium* spp. (кладоспориозная оливково-черная плесень), *Mucor* spp. (серая плесень), *Penicillium* spp. (пенициллезная плесень), *Aspergillus* spp. (зеленая плесень), *Rhizopus* spp. (черная плесень) и др. Некоторые из них в определенных условиях способны переходить к паразитированию и частично или полностью разрушать семена. При этом значительный ущерб они причиняют в период хранения семян, снижая их качество и зачастую вызывая гибель. Основными патогенами на семенах, вызывающих патологический процесс в период вегетации культуры, являются: *Colletotrichum lini* Manns et Bolley (антракноз), *Fusarium* spp. (фузариоз) и *Aureobasidium pullulans* f. *lini* (Laff) Cokke (полиспороз). Предварительная проверка семян на зараженность болезнями имеет важное значение наравне с определением всхожести семян и других хозяйственных признаков [2].

Для выявления болезней и зараженности семян патогенами методы оценки качества семян подбираются в каждом отдельном случае с учетом особенности культуры, особенности заражения и локализации паразита в тканях, внешних признаков поражения. Фитопатологический анализ семян проводят специальными методами экспертизы [4].

В настоящее время при проведении фитопатологической экспертизы посевного материала льна масличного наиболее часто применяется биологический метод анализа семян во влажной камере или на питательных средах различного состава. Поэтому основной целью данной работы являлось сравнение разных модификаций биологического метода анализа, позволяющего более точно установить зараженность семян льна масличного возбудителями болезней.

Материалы и методика проведения исследований. Исследования проводили в РУП «Институт защиты растений» в 2015–2016 гг. Материалом для исследования служили семена льна масличного, используемые для посева на опытных участках и в производственных условиях. Фитопатологическую экспертизу посевного материала льна масличного проводили посредством инкубации семян во влажной камере и на питательных средах различного состава: сусло-агаре, картофельно-глюкозном агаре, картофельно-морковном агаре и среде Чапека [2, 3].

Сусло-агар: неохмеленное пивное сусло разбавляли водой до 7° по ареометру Баллинга. К разбавленному суслу добавляли 1,5–2,0% агар-агара. Смесь подогревали и в горячем виде разливали в колбы. Стерилизацию проводили при 0,5–1,0 атм. в течение 1 часа.

Картофельно-глюкозный агар: 200 г очищенного, вымытого картофеля, нарезанного ломтиками, заливали 1 л воды и кипятили в

течение 40 минут. Затем жидкость отфильтровывали через четыре слоя марли, восстанавливали до первоначального объема, добавляли 1,5–2,0 % агар-агара, кипятили 20 минут, после чего вносили 20 г глюкозы, разливали в колбы и стерилизовали в автоклаве при давлении 1,0 атм. в течение 30 минут.

Картофельно-морковный агар: картофель (немолодой) – 20,0 г, морковь – 20,0 г, агар – 20,0 г, вода – 1,0 л. Тщательно вымытые, очищенные и измельченные клубни кипятили в воде 1 час и протирали через сито. Затем добавляли агар-агар, растворяли его и стерилизовали среду 20 мин при давлении 1,0 атм.

Среда Чапека: NaNO_3 – 2,0 г; KH_2PO_4 – 1,0 г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г; KCl – 0,5 г; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г; сахароза – 30,0 г; агар-агар – 20,0 г; вода – 1000 мл. Параметры стерилизации среды: 30 минут при 1,0 атм [5].

Семена перед закладкой не подвергали дезинфекции, закрытые чашки Петри с семенами помещали в термостат для проращивания на 7 суток при температуре +22–25 °С.

Зараженность семян оценивали в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 12044-93 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями» [1].

Результаты исследований и их обсуждение. Фитопатологическая экспертиза посевного материала льна масличного, проведенная в 2015 г. методом влажной камеры, позволила установить посевные качества семян льна масличного (энергию прорастания, лабораторную всхожесть) и их инфицированность патогенами. Данные таблицы 1 свидетельствуют о высоком уровне зараженности семян крапчатостью (до 55,5 %) и бактериальной инфекцией (10,0–20,5 %), при этом общая инфицированность семян льна масличного варьировала от 15,5 до 76,0 %.

Проведенная в дальнейшем работа по выявлению оптимального метода фитопатологической экспертизы семян льна масличного показала, что только инкубирование семян во влажной камере позволяет установить пораженность семян крапчатостью. Данный возбудитель болезни образовывал только мицелий. На семядолях и корешках наблюдали кирпично-красную точечность и штрихи той же окраски.

В производственных условиях чаще всего ограничиваются анализом семян во влажной камере. Однако результаты наших исследований свидетельствуют о том, что данный метод учета недостаточно информативен с точки зрения выявления возбудителей таких болезней, как антракноз и фузариоз. Следовательно, необходим более точный детальный анализ на питательных средах.

Таблица 1 – Посевные качества и инфицированность посевного материала льна масличного (лабораторный опыт, метод влажной камеры, РУП «Институт защиты растений», 2015 г.)

Сорт	Область	Энергия прорастания, %	Лабораторная всхожесть, %	Распределение зараженных семян по болезням, %			Грибы-сапрофиты (плесневение семян), %	Бактериоз, %	Общая зараженность семян, %
				Фузариоз	Антракноз	Крапчатость			
Опус	Вт	80,5	81,0	0,0	0,0	29,5	1,5	20,5	51,5
Салют	Вт	41,0	79,0	0,0	0,0	19,0	0,0	16,0	35,0
Опус	Вт	78,0	79,0	0,0	0,0	32,0	1,0	19,0	52,0
Салют	Вт	69,5	80,5	0,0	0,0	2,5	0,5	12,5	15,5
Грант	Вт	59,0	69,5	0,0	0,0	2,5	0,0	20,5	23,0
Билтон	Гр	70,5	81,0	0,0	0,0	38,0	1,0	18,5	57,5
Лирина	Гр	65,0	85,0	0,0	0,0	11,0	1,0	10,0	22,0
Лирина	Мн	68,0	77,0	0,0	0,0	55,5	0,5	20,0	76,0
Брестский	Мн	87,0	87,5	0,0	0,0	16,0	0,5	20,0	36,5

Примечание. Мн – Минская, Вт – Витебская, Гр – Гродненская, Бр – Брестская области.

Проведенная в дальнейшем фитопатологическая экспертиза данных партий семян на питательной среде (картофельно-глюкозный агар) показала, что семенная инфекция льна масличного представлена, преимущественно, грибами из родов *Alternaria* (4,5–84,0 %), *Fusarium* (до 1,0 %), *Penicillium* (1,0–39,0 %), *Colletotrichum* (до 13,0 %), *Cladosporium* (до 6,0 %), *Aspergillus* (до 84,5 %), *Mucor* (до 2,5 %), *Rhizopus* (2,0–46,0 %), *Botrytis* (до 1,0 %) и *Sclerotinia* (до 2,5 %) (табл. 2).

Следует отметить, что данный метод позволил выявить патогенную микрофлору (*Colletotrichum* spp. и *Fusarium* spp.). Возбудитель антракноза на питательной среде образовывал типичные студенистые колонии ярко-оранжевого, слегка бурого цвета, хорошо заметные на глаз при просматривании чашек с верхней стороны. Возбудители фузариоза на семенах развивали белые, розовые или желтые пушистые мицелии. Инкубирование на питательной среде показало реальную общую зараженность семян грибами, которая в зависимости от партии составила 30,0–100 %, в то время как метод влажной камеры показал общую зараженность семян 15,5–76,0 %.

Таблица 2 – Зараженность посевного материала льна масличного фитопатогенными и сапротрофными микроорганизмами (лабораторный опыт, РУП «Институт защиты растений», картофельно-пшеничный агар, 2015 г.)

Сорт	Область	Бактерии, %	Заражено грибами, %										Общая заражённость семян грибами, %	
			<i>Fusarium</i> spp.	<i>Colletotrichum lini</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Sclerotinia</i> spp.	<i>Botrytis</i> spp.		Другие
Опус	Вт	7,0	0,0	0,0	2,5	5,5	34,0	1,0	0,0	44,0	0,0	0,0	0,0	87,0
Салют	Вт	10,0	1,0	3,5	0,5	0,0	67,5	1,5	2,0	3,5	0,0	1,0	1,5	81,0
Опус	Вт	3,0	0,0	0,0	6,0	5,0	31,5	1,0	0,0	46,0	0,0	0,0	0,5	90,0
Салют	Вт	2,0	1,0	0,0	6,0	28,0	5,5	5,5	4,0	2,0	2,0	0,5	1,0	50,0
Грант	Вт	1,5	0,0	0,0	2,5	10,5	4,5	4,0	2,5	5,5	0,0	0,0	0,5	30,0
Билтон	Гр	5,0	1,0	0,0	0,0	7,5	84,0	3,0	1,5	3,5	0,5	0,0	0,0	100
Лирина	Гр	1,5	0,0	0,0	3,5	4,5	9,5	29,5	0,5	38,0	2,5	0,5	0,0	88,5
Лирина	Мн	45,5	0,5	13,0	0,0	84,5	37,0	1,0	1,0	3,5	0,0	0,0	0,0	100
Брест-ский	Мн	6,5	1,0	0,5	6,0	16,5	5,0	39,0	2,0	4,0	0,0	0,0	2,0	76,0

Примечание. Мн – Минская, Вт – Витебская, Гр – Гродненская, Бр – Брестская области.

Таблица 3 – Влияние вида питательной среды на выявление грибных контаминантов семян льна масличного (лабораторный опыт, РУП «Институт защиты растений», сорт Брестский)

Пита- тель- ная среда	Здоровые, %	Бактериальные конта- минанты, %	Заражено грибами, %										Общая зараженность семян грибами, %	
			<i>Fusarium</i> spp.	<i>Colletotrichum lini</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Sclerotinia</i> spp.	<i>Aureobasidium pullulans f. lini</i>		
2015 г.														
СА	46,0	30,5	1,5	0,0	7,0	0,5	5,0	7,0	0,0	4,0	0,0	1,5	25,5	
КГА	44,5	41,5	0,0	0,0	6,0	0,0	6,0	2,0	0,0	2,0	0,5	2,0	18,5	
КМА	60,0	27,5	0,0	0,0	7,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,5	0,0	1,5	14,0	
СЧ	45,0	42,5	1,0	0,0	5,0	0,0	0,5	5,5	0,0	1,5	0,0	0,0	13,5	
2016 г.														
СА	46,0	30,0	1,3	1,0	7,0	0,0	12,0	2,0	0,5	1,0	0,0	0,3	25,0	
КГА	34,0	45,0	1,8	0,3	6,5	0,0	9,5	2,0	0,0	1,5	0,3	0,0	22,5	
КМА	75,5	22,5	0,5	0,0	2,5	0,0	9,0	0,5	0,0	1,0	0,0	0,0	12,5	
СЧ	55,0	18,0	1,5	0,3	9,0	1,3	23,0	1,5	0,0	0,3	0,0	0,0	27,3	

Примечание. СА – сусло-агар; КГА – картофельно-глюкозный агар; КМА – картофельно-морковный агар; СЧ – среда Чапека.

Дальнейшие исследования питательных сред для выявления контаминантов семенного материала льна масличного проводили на семенах сорта Брестский, выращенный на опытном поле РУП «Институт защиты растений». Установлено варьирование частоты изоляции грибов в зависимости от используемой для биологического метода анализа фитопатологической экспертизы вида питательной среды. Общая инфицированность семян грибными контаминантами в 2015–2016 гг. была практически одинаковой и составила 13,5–25,5% и 12,5–27,3% соответственно (табл. 3).

Установлено, что использование картофельно-морковного агара меньше всего из анализируемых питательных сред позволяет выявить зараженность семян грибными патогенами. Общая зараженность семян грибами при использовании данной питательной среды составила всего от 12,5 до 14,0%, в то же время при инкубировании семян на сусло-агаре – от 25,0 до 25,5%. Данные

таблицы 3 показывают, что картофельно-глюкозный агар, сусло-агар и среда Чапека позволяют обнаружить основных грибных контаминантов семян льна масличного. В то же время, следует отметить, что картофельно-глюкозный агар оказался наиболее универсальной средой для обнаружения бактериальных и грибных фитопатогенов (процент здоровых семян варьировал от 34,0 до 44,5). Для обнаружения и индентификации патогенной микрофлоры (*Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. и *Aureobasidium* spp.) предпочтительным был сусло-агар.

Следует отметить, что при проведении фитопатологической экспертизы наблюдали различия в прорастании семян на питательных средах. Так, на картофельно-морковном агаре семена льна масличного прорастали полностью, проростки были хорошо развиты и по длине в несколько раз превышали длину семени, что дополнительно создавало трудности при визуальном осмотре семян на зараженность их фитопатогенами. На всех остальных питательных средах (сусло-агар, картофельно-глюкозный агар и среда Чапека) семена не прорастали, что облегчало диагностику.

Заключение. Биологический метод анализа фитопатологической экспертизы семян льна масличного во влажной камере позволяет более точно определить посевные качества семян (энергию прорастания и лабораторную всхожесть), а также поражённость семян крапчатостью и бактериозом. В то же время, биологический метод фитопатологической экспертизы семян на питательных средах более информативный и предпочтительный для определения грибных контаминантов (фитопатогенной и сапротрофной микрофлоры). По результатам исследования данный метод можно рекомендовать для определения и идентификации грибов на семенах льна масличного. При проведении биологической экспертизы анализа на питательных средах для выявления бактериальной и грибной микрофлоры рекомендуется использовать наиболее универсальную питательную среду – картофельно-глюкозный агар, а для обнаружения на семенах льна масличного патогенных грибов – сусло-агар.

Список литературы

1. ГОСТ 12044-93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. – М.: Стандартинформ, 2011. – 55 с.
2. Методические указания по инвентаризации болезней и микрофлоры льна и конопли / ВИР; под ред. Г.Г. Давидяна. – Л.: ВИР, 1979. – 199 с.
3. Методические указания по фитопатологической оценке устойчивости льна-долгунца к болезням / сост.: Н.И. Лошаковой [и др.] – М.: Россельхозакадемия, 2000. – 52 с.

4. Наумова, Н.А. Анализ семян на грибную и бактериальную инфекцию / Н.А. Наумова. – Ленинград: Колос, 1970. – 208 с.
5. Саскевич, П.А. Управление вредными организмами льна-долгунца: монография. / П.А. Саскевич, С.Н. Козлов. – Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2010. – 348 с.
6. Семенов, С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. / С.М. Семенов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
7. Цветков, С.Г. Микофлора и главнейшие болезни льна-долгунца в Новгородской области: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 06-540 / С.Г. Цветков. – Ленинград-Пушкин, 1970. – 24 с.

S.I. Nekhvedovich, D.V. Voitka

RUE «Institute of Plant Protection», a/c Priluki, Minsk district

FEATURES OF BIOLOGICAL ANALYSIS METHOD DURING PHYTOPATHOLOGIC EXAMINATION OF SEED OIL FLAX

Annotation. The results of phytopathologic oil flax seeds expertise by incubation in moist chamber and on different composition nutritive media are presented. Oil flax seeds infection by bacteriosis, mottledness, saprotroph and pathogenic fungi is shown. It is determined that for sowing seeds quality determination moist chamber method is more preferable. For revealing, isolation and cultivation of fungal and bacterial origin pathogens – seeds incubation on potato-glucose agar and for pathogenic microflora (*Fusarium* spp., *Colletotrichum lini* Mans et Bolley, *Aureobasidium pullulans* f. *lini* (Laff) Cokke) – wort agar.

Key words: oil flax , seeds, phytopathological expertise, moist chamber, nutritive medium, wort-agar, potato-glucose, potato-carrot, Chapek medium, pathogenic microflora, saprotroph microflora, bacteria, mottledness, germination energy, laboratory germination.