

БРЗИНА НА ПОРАСТОТ НА КОЛОНИИТЕ ОД *PHYTOPHTHORA PARASITICA* var. *NICOTIANAE* ВО ЗАВИСНОСТ ОД ХРАНЛИВАТА ПОДЛОГА

Искра Христовска¹, Југослав Зибероски²

¹ЈНУ Институт за тутун- Прилеп

²Земјоделски факултет- Скопје

ВОВЕД

Црнилката на тутунот (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) е една од најдеструктивните и најопасните болести на тутунот. Прв пат е забележана во 1893 на Далечниот Исток, на островите Јава и Суматра. Подоцна, (1915год) се појавува во САД, каде се одгледуваат широколисните тутуни од типот вирџинија и берлеј. Оваа болест претставува проблем и кај земјите производители на ориенталските тутуни и тутуните за пури.

Црнилката е полифаген паразит и предизвикува штети кај повеќе домаќини. Габата *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, покрај сите видови од родот *Nicotianae*, ги напаѓа и другите културни растенија (домат, пиперки, рицинус, јагода и др.). Раширена е во реоните на потопла клима, во Европа, Африка, Азија, Америка и Австралија, и тоа претежно на површини кои се наводнуваат. Нејзиното присуство е забележано и во нашите соседни земји Бугарија и Грција. Во Бугарија, црнилката е најмногу застапена во Пиринска Македонија по должината на реката Струма. Во земјите од англиското говорно подрачје, оваа болест се среќава под

името "Black shank", што значи црно стебло.

Во Р.Македонија оваа болест е забележана во прилепскиот произведен реон во 1986 година. Во 1987 година, црнилката е регистрирана кај поголем број парцели и загубите изнесуваат 10-15%. Во 1988 година оштетувањата се движат од 20-40% (Ј.Мицковски, 1988). Оттогаш па наваму, до 1997 година, појавата на болеста варира и поголем замав зема во влажни и топли години (при спарно време).

Во овој научен труд, ќе изнесеме дел од нашите испитувања. По изолирањето на габата *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, вршени се истражувања во насока на изнаоѓање на најадекватна хранлива подлога за одгледување на патогенот во лабораториски услови.

Изнаоѓањето на најкомпатибилна хранлива подлога е значајно заради успешно проучување на биологијата на причинителот и неговите морфолошки карактеристики и за изнаоѓање на најадекватни мерки за елиминирање на овој опасен паразит на тутунското растение.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

Паразитот што ја предизвикува црнилката на тутунот, според Van Breda de Haan (1896) и Tucker (1931) е габата *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Таа спаѓа во фамилијата *Peronosporaceae*, ред *Peronosporales*, класа *Oomycetes*, пододдел *Mastigomycotina*

(вистински зооспорни габи). Изолацијата на овој паразит е вршена од заразени растенија кои беа земени од нашите полски опити лоцирани во прилепскиот регион. Во опитите беа застапени две сорти - Прилеп 12-2/1 и Јака 125/3, а секоја сорта се наоѓа во пет

повторувања. Изолатијата е вршена во текот на 1996 и 1997 година. Во овој труд ќе бидат презентирани просечните резултати од двете години.

Патогенот е изолиран од различни делови на тутунските растенија (корен, коренов врат, стебло, лист) и од почвата каде се произведува расадот и почвата каде е поставен опитот. Почвени проби и проби од растенија беа земани и од различни локалитети во прилепскиот регион. Пробите беа поставени на седум различни хранливи подлоги, во 20 повторувања, со цел да се изнајде најадекватната подлога за изолација на причи-

нителот. Тоа понатаму ни овозможи успешно проучување на црнилката и на влијанието на еколошките фактори врз појавата на овој опасен паразит кај тутунското растение. Сите овие истражувања се неопходни за изнаоѓање на можни мерки за заштита на тутунското растение од оваа болест.

Изолацијата на патогенот се вршеше на следниве хранливи подлоги:

1. Компир-гликозен агар, 2. пченичен агар, 3. овесен агар, 4. малт агар, 5. чапеков агар, 6. скробно-амонијачен агар, 7. течна хранлива подлога.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Кај сите изолати добиени од различните делови на тутунските растенија, на различна хранлива подлога и во 20 повторувања, вршени се мерења на брзината на порастот на колониите од причинителот на црнилката. Заради скратување на обемот на трудот, ќе бидат прикажани само просечните резултати од 20-те повторувања.

Подлогите беа излеани во петриевите кутии, освен течната хранлива подлога, која беше поставена во колби. После беше извршено засејување на културата на различни хранливи подлоги. Потоа, беа испитувани морфолошките својства на паразитот, окуларно и микроскопски. Окуларно се проучуваше изгледот на колонијата и формата на работ. Раб во вид на зраци има на компир-гликозниот и на пченичниот агар. Кај другите подлоги има повеќе или помалку рамен раб, а на малт агар има брановиден раб.

Микроскопските набљудувања ги вршевме директно од петриевите кутии, онаму каде имаше развиена и разгранета воздушна мицелија.

Приготвувавме и водена култура со стерилна вода на предметно стакло на кое нанесувавме дел од габата. Потоа вршевме микроскопирања при кои забележавме постоење на безбојна несептирана мицелија, карактеристична за класата *Phycomyceteeae*, спорангиофори со спорангии и спорангии во фаза на ртење, хламидоспори. Овие фази на развој ги забележавме кај сите подлоги, освен кај минералните, кај кои забележавме постоење само на мицелија. Спорангиите имаат лимонеста форма (со изразена папила), карактеристична за родот *Phytophthora*.

Хранливите подлоги: компир-гликозен агар, пченичен агар, овесен агар, малт агар, чапеков агар, скробно-амонијачен агар, се наоѓаат во течна агрегатна состојба при приготвувањето, меѓутоа по излевањето на подлогата во петриевите кутии (со пречник 90mm), таа се лади и се стврдува. Цврстите хранливи подлоги се погодни за проучување на морфолошките карактеристики на паразитот, а течната хранлива подлога е најадекватна за добивање на културален филтрат од габата одгледувана на таа хранлива средина.

Следејќи го развојот на паразитот (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) врз испитуваните хранливи подлоги, заклучивме дека тој развива два типа на колонии, што воедно претставуваат и две различни раси (биотипови) од истиот патоген микроорганизам. Едната раса има супстратна и воздушна мицелија, која е густа, бела и има изглед на густе памучни влакна. Другата раса има исто така бела боја, помала густина, поизразена воздушна мицелија (ја зафаќа целата петриева кутија до нејзиниот капак) и личи на крзно. Овие колонии се најразвиени и најразгранети на малт агар, што веројатно е резултат на високата хранлива вредност на оваа подлога. Таа содржи многу висок процент на минерали и витамини. Од посебна важност се витамините од Б-комплексот, кои се неопходни за растот и развојот на црнилката, а нив во малт агарот ги има во голема количина. Б-комплексот го има и во овесниот и пченичниот агар, но не во толку голем процент, како во малт агарот. Минералните подлоги (Чапеков и скробно-амонијачен агар) не се погодни за развој на габата, бидејќи недо-

стигаат витамините од Б-групата.

Течната хранлива подлога ја употребивме за одгледување на габата и добивање на културален филтрат од *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* и утврдување на неговата активност. За добивање на културален филтрат габата се култивира на течна хранлива средина во ерленмаерова колба, на тој начин што во колбата се внесува дел од цврстата подлога на која има развиена мицелија од габата.

По извршената инокулација на течната хранлива средина, култивирањето се врши во тек на 12 дена на температура од 25°C, во статична положба на колбата. За тоа време се развива мицелијата од габата на површината на подлогата. Потоа мицелијата се одделува со филтрирање преку филтер-хартија и концентрацијата се намалува на 10% од првобитниот обем на добиениот културален филтрат. Културалниот филтрат се стерилизира

студено преку Millipore filter. Од него со посебна постапка се добива пречистен токсин од габата, кој понатаму може да се користи за утврдување на отпорноста или осетливоста на тутунските растенија спрема габата. Ова се работи при селекција на отпорни сорти со *in vitro* техника. Тоа е возможно, бидејќи е утврдена корелација помеѓу отпорноста кон патогенот *in vivo* и отпорноста во културата на ткиво кон токсичните метаболити продуцирани од патогенот (Earle, 1982; Gendlof et al., 1987; Ishida i Kumashiro, 1988)

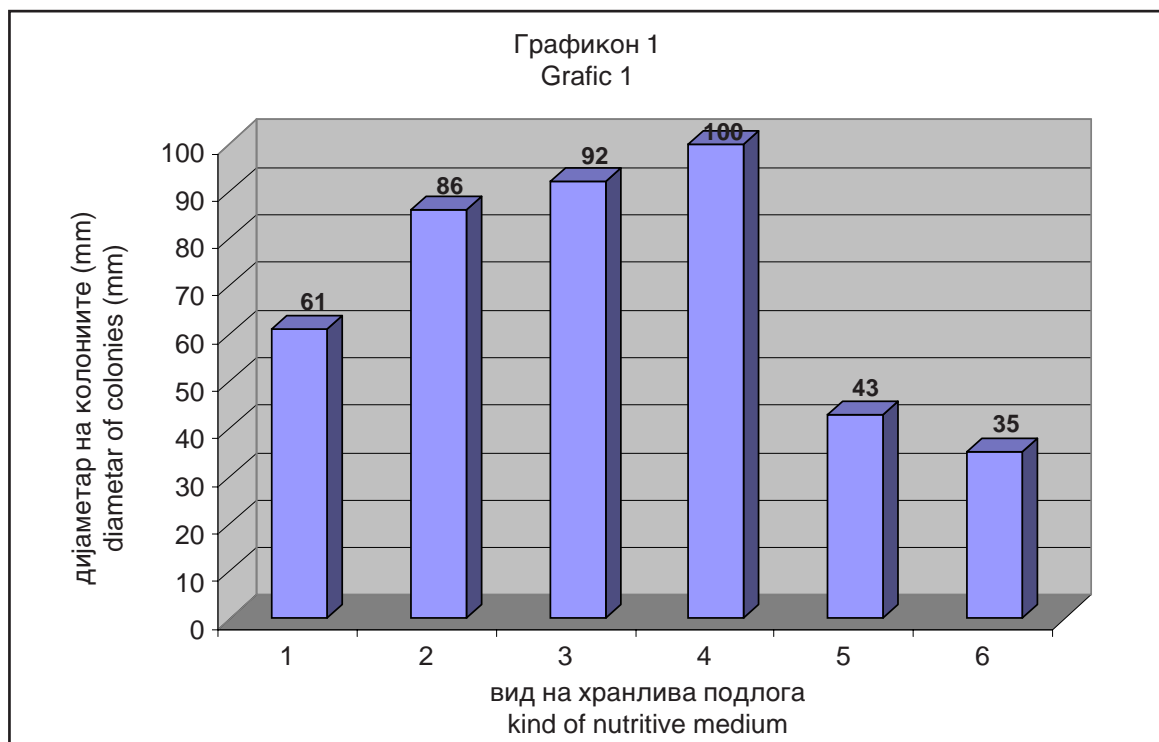
Кај течната хранлива подлога колониите од габата ја зафаќаат целата површина на подлогата во колбата по дванаесеттиот ден.

Кај цврстите хранливи подлоги вршени се секојдневни мерења на порастот на колониите од габата *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* и истите се прикажани табеларно и со графикон:

БРЗИНА НА ПОРАСТ НА КОЛОНИИТЕ ОД ГАБАТА *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*
ВО ЗАВИСНОСТ ОД ХРАНЛИВАТА ПОДЛОГА (сорта ПРИЛЕП 12-2/1)
RAPIDITY OF GROWTH OF *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*
DEPENDING ON THE KIND OF NUTRITIVE MEDIUM (variety Prilep 12-2/1)

Табела 1. Дијаметар на колониите (mm)
Table 1. Diameter of colonies (mm)

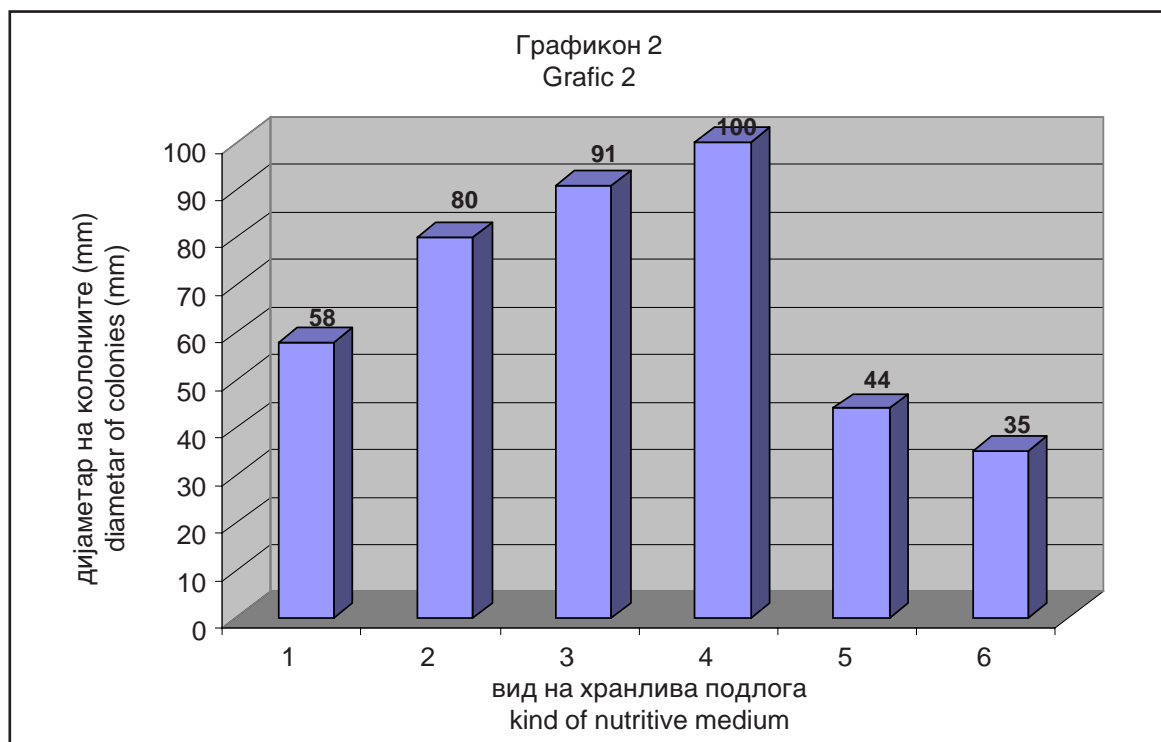
бр. ден. nb. day	подлога medium	компир- гликозен агар (1) potato- succrose agar	пченичен агар (2) wheat agar	овесен агар (3) oat agar	малт агар (4) malts agar	чапеков агар (5) chapec agar	скробно- амонијачен агар (6) amilo-amonia agar
1	/	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	/	2	/	/
3	/	/	2	3	6	/	/
4	1	9	10	18	1	1	1
5	7	20	22	29	4	5	5
6	17	35	37	38	10	9	9
7	21	42	45	47	15	13	13
8	29	59	61	63	20	17	17
9	39	73	78	79	26	23	23
10	43	80	83	93	31	28	28
11	46	84	91	100	38	32	32
12	55	86	92	100	43	34	34
13	61	86	92	100	43	35	35
14	61	86	92	100	43	35	35



БРЗИНА НА ПОРАСТ НА КОЛОНИИТЕ ОД ГАБАТА *Phytophthora parasitica var. nicotianae*
ВО ЗАВИСНОСТ ОД ХРАНЛИВАТА ПОДЛОГА (сорта ЈАКА 125/3)
RAPIDITY OF GROWTH OF *Phytophthora parasitica var. nicotianae*
DEPENDING ON THE KIND OF NUTRITIVE MEDIUM (variety Jaka 125/3)

Табела 2. Дијаметар на колониите (mm)
Table 2. Diametar of colonies (mm)

подлога medium	компир- гликозен агар (1) potato- succrose agar	пченичен агар (2) wheat agar	овесен агар (3) oat agar	малт агар (4) malts agar	чапеков агар (5) чапес агар	скробно- амонијачен агар (6) amilo-amonia agar
бр. ден. nb. day						
1	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	2	/	/
3	/	/	1	5	/	/
4	1	2	5	17	/	1
5	6	11	13	28	2	3
6	13	19	24	34	12	7
7	19	27	36	45	16	10
8	24	38	47	63	21	14
9	35	47	58	77	26	20
10	40	58	71	88	32	25
11	45	64	81	97	39	31
12	51	71	90	100	44	34
13	58	80	91	100	44	35
14	58	80	91	100	44	35



ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на добиените резултати можат да се извлечат следниве поважни заклучоци:

1. При засејување на габата *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* врз хранлива подлога таа развива колониите.

2. Брзината на порастот и развојот на колониите од паразитот зависат од видот и составот на хранливата подлога.

3. Според нашите испитувања, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* дава најразвиен и најразгранет мицелиум врз малт агар.

4. Врз малт агар *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* дава два вида на колониите, што воедно претставуваат и две различни физиолошки раси од патогенот.

5. Течната хранлива подлога служи за култивирање на габата, која подоцна се отстранува со филтрирање, подлогата се концентрира и таа тогаш претставува културален филтрат.

6. Со посебна постапка од културалниот фитрат се издвојува фитотоксинот, кој понатаму може да послужи како селективен агент за *in vitro* селекција на отпорни растенија.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baker R., 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annu. Rev. Phytopathology* 6:263-293.

2. English J.T., 1986. Relationships of soil-borne microbial communities to infection of root systems of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Ph.d.dissertation. University of Florida, Gainesville. 178 pp.

3. Earle E.D., 1982. Cytoplasm-specific

effects of *Helminthosporium maydis* race T toxin on corn protoplast and mitochondria. In: Variability in plants regenerated from tissue cultured by E D Earle and J. Demarly, Praeger publ., New York, pp. 351-367.

4. Ferrin D. J., 1986. Influence of initial density and distribution of inoculum on the epidemiology of tobacco black shank. *Phytopathology* 76:1153-1158.

5. Gendloff E. H., R. P. Sheffer, S. C. Somerville, 1987. An important bioassay for victorin based on the use of oat protoplasts. *Physoil. Mol. Plant Pathol.* 31:421-427.
6. Hendrix J. W., 1976. Ecological factors affecting soil populations of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, the black shank, fungus. Proceed. the ninth. Inter. Tobacco. Scien. Congress. Tokyo.
7. Ishida J., T. Kumashiro, 1988. Expression of tolerance to the host specific toxin of *Alternaria alternata* (A. T. toxin) in cultured cells and isolated protoplasts of tobacco. *Plant Dis.* 72:89
8. Kannwischer M. E. and Mitchell D. J., 1981. Relationships of numbers of spores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. *Phytopathology* 71:69-73.
9. Мицковски Ј., 1988. Болести на тутунот, 54-66.
10. Mitchell D. J., Kannwischer-Mitchell M. E. and Zentmyer G. A., 1986. Isolating, identifying and producing inoculum of *Phytophthora* spp. Pages 63-66 in: *Methods for evaluating pesticides for control of Plant Pathogens*. K. D. Hickey, ed. American Phytopathological Society St. Paul. 312pp.
11. Nushbaum C. J. 1952. Host-parasite relations of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in roots of resistant and susceptible tobacco varieties. (Abstr.) *Phytopathology* 42:286.
12. Славов Б. С., 1995. Автореферат на докт. дисертација, Селекција за устојчивост на чернилка по тјутјуна с използване на културален филтрат от *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*, 14- 21pp, Софија.

RAPIDITY OF GROWTH OF *PHYTOPHTHORA PARASITICA* var. *NICOTIANAE* DEPENDING ON THE KIND OF NUTRITIVE MEDIUM

I. Hristovska¹, J. Ziberoski²

¹Tobacco institute, Prilep

²Faculty of agriculture, Skopje

SUMMARY

Subject of investigation in this scientific work are biological and morphological characteristics of the fungus *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, the causing agent of "black shank" on tobacco and its attributes depending on the kind of nutritive medium.

From the two-year laboratory assays we conclude that for growth of this fungus artificial nutritive medium made by cereals: malts agar, oat agar and wheat agar are suitable, because they are rich with nutrients, essentially with vitamins. The most suitable medium is malt agar, on which the fungus has the most speed of growth of their plantations. The mineral mediums are not suitable for growth and development of "black shank".

During the fungus growth on organic nutritive media in laboratory assays, the fungus shows many specificities and we isolated two various races of "black shank".

The fluid nutritive medium was good for the growth of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and we acquire cultural filtrate and from filtrate we obtain selective agent for in vitro selection of resistant plants.

Author's address:

Iskra Hristovska

Tobacco institute- Prilep

Representative office in Skopje

III Makedonska brigada bb- Makadonija Tabak

1 000 Skopje, Republic of Macedonia