

## ВЛИЈАНИЕ НА ХРАНЛИВАТА ПОДЛОГА ВРЗ СПОРУЛАЦИЈАТА, ГОЛЕМИНАТА НА КОНИДИИТЕ И ПРИНОСОТ НА СУВАТА БИОМАСА НА *ALTERNARIA ALTERNATA* КАЈ ТУТУНОТ

Биљана Гвероска, Петре Ташкоски  
Институт за тутун - Прилеп

### ВОВЕД

Бројните габни, вирусни и бактериски болести на тутунот го намалуваат неговиот принос и квалитет. Тука спаѓа и болеста кафена дамкавост, предизвикана од патогената габа *Alternaria alternata*, која во последно време е сè присутна во тутунопроизводството на Р. Македонија. Оваа болест ги напаѓа сите типови, деградирајќи го квалитетот на тутунот. Со тоа е намален неговиот економски ефект, а земајќи го предвид социоекономското значење на тутунот за Р. Македонија, оваа болест може да има големо негативно влијание врз тутунопроизводството.

Штетите можат да бидат уште поголеми бидејќи е потврдено дека покрај тутунот, нејзиниот причинител паразитира и на други растителни видови како доматот, пиперката, компирот, модриот патлиџан (Јованчев, 1997).

Поради тоа, проучувањето на патогенот *A. alternata* е од особен интерес пред сè за фитопатолошката наука, а потоа и за решавање на проблемите поврзани со болеста кафена дамкавост кај тутунот.

Еколошките фактори имаат влијание врз нејзиниот развој, но и врз други особини на патогенот, што целокупно влијае врз

патологијата на болеста.

Влијанието на хранливата средина врз развојот на овој патоген е испитувано од страна на Гвероска (2006), при што се утврдени разлики во брзината на развој на колонијата, обоеноста и конзистенцијата.

Исто така, постојат и разлики во спорулацијата на *A. alternata* во зависност од хранливата средина. Rotem (1994) истакнува дека сите видови *Alternaria* подобро спорулираат на хранливи подлоги сиромашни со шеќер. Simmons (1992) предлага три подлоги за подобрување на спорулацијата.

Составот на хранливата средина може да влијае и врз морфологијата на габата, што доведува до одредени заблуди (Misaghi et al., 1978)

Методолошкиот пристап во областа на фитопатологијата е од големо значење за разрешување на одредени дилеми при истражувањата, па продлабочувањето на методите на истражување и во случајот на овој патоген е од голема корист. Поради тоа, нашата цел во ова истражување беше со примена на неколку методи да се утврди влијанието на хранливата средина врз *A. alternata* кај тутунот.

### МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

Во истражувањата беше користена чиста култура од габата, изолирана од преодниот дел меѓу здравото ткиво и кафената дамка на инфицирани тутунски листови. Изолацијата беше извршена по стандардна лабораториска метода, на воден агар, а потоа културата беше пресеана на компирдекстрозен агар и инкубирана 15 дена на температура од 25°C. Добиената чиста култура од габата беше користена за засејување

во следните истражувања.

За да се утврди влијанието на хранливата подлога врз спорулацијата и морфолошките особини на габата, односно големината на конидиите, беа користени повеќе хранливи подлоги: компирдекстрозен агар, овесов агар, Чапеков агар, агар од морков, грашок, лук и V-8 џус подлога (Marković, 1979). Подлогите беа подготвувани по соодветни рецептури, стерилизирани во

автоклав и разлевани во петриеви кутии.

Опитите беа изведувани три пати, а при секое повторување беа засеани по 5 петриеви кутии од секоја подлога со фрагменти (3-5 mm<sup>2</sup>) од чистата култура. Засеаните петриеви кутии беа инкубирани 15 дена на температура од 25°C. Секојдневно беа следени порастот на колонијата, брзината на развото, видот и обоеноста на самата колонија. По 15 дена беше одредуван интензитетот на создавање на конидии со директно набљудување на колонијата под микроскоп, како и микроскопирање на препарати од приготвената суспензија од конидии од габата одгледана на различни хранливи подлоги. Оцената ја вршевме со помош на самостојно изградените критериуми низ претходните изоляции при проучувањето на проблемот на оваа патогена габа. Во зависност од густината на конидиите, интензитетот на спорулацијата беше класифициран во четири групи: +- - слаба, + - добра, ++ - многу добра и +++ - обилна спорулација.

Влијанието на секоја хранлива подлога врз морфологијата на габата беше одредувано со микроскопски мерења на големи-

ната (должина и ширина) на конидиите.

Мерењата беа вршени со помош на окулармикрометар, по претходно баждарење и одредување на факторот на соодветното зголемување според методата на Зибероски (1998). Беа подготвени по 5 микроскопски препарати за секоја хранлива подлога, од култура стара 7-10 дена. Должината и ширината на конидиите беа мерени на 100 примероци случајно избрани при микроскопирањето на препаратите.

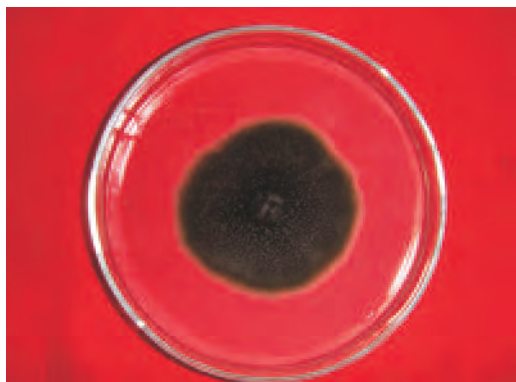
Влијанието на хранливата подлога врз приносот на сува биомаса на колонијата беше одредувано според методата на Sarić (1986). Испитуваните подлоги се подготвуваа како течни, се разлеваа по 20 ml во епрувети. По стерилизацијата се разлеваа во петриеви кутии со дијаметар од 90 mm. Подлогите се засејуваа со фрагменти од воздушната мицелија со помош на стерилна игла, а потоа беа инкубирани на 25°C. По 15 дена беше вршено одделување (филтрирање) на габата од течната подлога, а потоа сушење на температура 25-28°C до 3 последователни мерења со константна вредност. Средната вредност од сите повторувања го прикажува приносот на сува биомаса изразена во mg.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

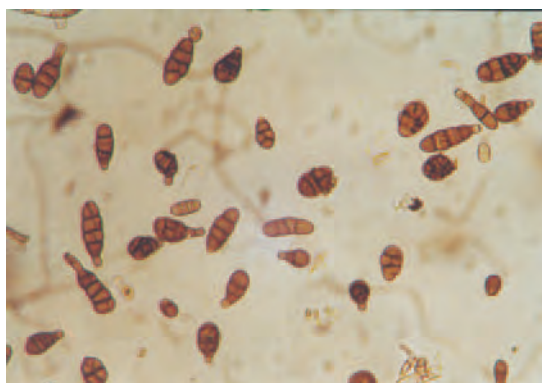
### Влијание на хранливата подлога врз спорулацијата

При изолатија на патогената габа *A. alternata* по стандардна лабораториска метода на компирдекстрозен агар (КДА) и инкубација на 25°C се добива колонија која најчесто има темносива до кафена боја, со светол прстен на крајот на колонијата, која се развива радијално (Сл. 1). Колонијата често има изразита воздушна мицелија, но кај некои изола-

ти има многу слаб пораст на воздушната мицелија. Хифите од габата се испреплетени, септирани и се гранат под различен агол. Формираните конидии на КДА имаат кафена боја, различна форма, најчесто елипсовидна, крушковидна или цилиндрична и различна големина (Сл.2). Тие се септирани, со различен број надолжни и напречни септи.



Сл. 1 *A. alternata* - Колонија  
Ph. 1 *A. alternata* - The colony



Сл. 2 *A. alternata* - Конидии во чиста култура  
Ph. 2 *A. alternata* - Conidia in the pure culture

Хранливата средина има големо влијание врз развојот на оваа габа. Исто така, таа има влијание врз интензитетот на образување на конидии (Табела 1).

Кај подлогите V-8 џус и подлогата од лук констатирана е слаба спорулација. На

комбирдекстрозната, овесовата и подлогата од грашок спорулацијата на *A. alternata* е добра, а на подлогата од морков спорулацијата е многу добра. Но, габата обилно спорулира на Чапековиот агар.

Табела 1. Влијание на различни хранливи подлоги врз интензитетот на образување на конидии, големината на конидиите и сувата биомаса на колонијата

Table 1. The effect of nutrient medium upon the intensity of conidia formation, conidia size and dry mass of the colony

| Хранлива подлога<br>Nutrient medium | Интензитет на образување на конидии<br>Intensity of conidia formation | Големина на конидиите (µm)<br>Size of conidia (µm) |                 | Просечна големина на конидиите (µm)<br>Average size of conidia (µm) | Сува маса (mg)<br>Dry mass (mg) |
|-------------------------------------|---|--|-----------------|---|---------------------------------|
|                                     |   | должина<br>length                                  | ширина<br>width |   |                                 |
| КДА/ PDA                            | +   | 24,00 - 52,00                                      | 10,00 - 14,00   | 31,68 x 11,48   | 120,00                          |
| Овесов агар<br>Oat agar             | +   | 24,00 - 48,00                                      | 8,00 - 16,00    | 28,20 x 12,16   | 30,00                           |
| V-8 џус<br>V-8 juice                | + -   | 16,00 - 36,00                                      | 8,00 - 14,00    | 26,60 x 10,40   | 50,00                           |
| Агар од морков<br>Carrot agar       | ++  | 20,00 - 32,00                                      | 8,00 - 12,00    | 25,28 x 9,72  | 106,00                          |
| Агар од грашок<br>Pea agar          | +   | 20,00 - 40,00                                      | 8,00 - 14,00    | 32,13 x 10,45   | 45,00                           |
| Чапеков агар<br>Chapek agar         | +++   | 26,00 - 38,00                                      | 8,00 - 14,00    | 32,46 x 11,85   | 202,00                          |
| Агар од лук<br>Garlic agar          | + -   | 16,00 - 28,00                                      | 8,00 - 12,00    | 21,80 x 10,40   | 95,00                           |

+ - слаба спорулација; + добра; ++ многу добра; +++ обилна спорулација  
+ - poor sporulation; + good; ++ very good; +++ abundant sporulation

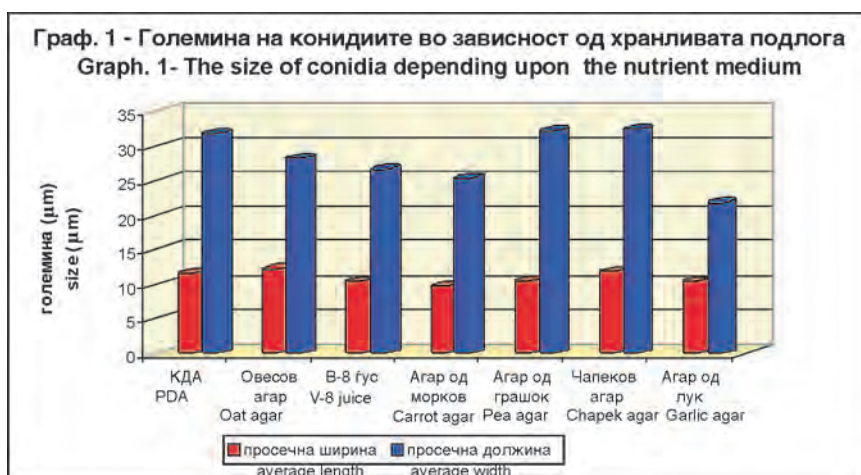
### Влијание на хранливата подлога врз големината на конидиите

Во зависност од хранливата средина, *A. alternata* образува конидии со различна големина. Така, според Табела 1, конидиите можат да имаат должина од 16 до 52 µm. Најмала должина имаат конидиите на агарот од лук (16,00 до 28,00 µm), а најголема на комбирдекстрозниот агар - 24-52 µm и на Чапековиот агар- 26-38 µm, каде има помали варирања на вредностите.

Најмалата ширина на конидиите на

повеќето подлоги изнесува 8,00 µm. Кај агарот од морков и лук конидиите имаат најголема ширин 12,00 µm, кај агарот од грашок, V-8 џус подлогата и Чапековиот агар 14,00 µm. Најголема ширина на конидиите е констатирана кај комбирдекстрозниот агар (10,00 - 14,00 µm).

Просечната големина на конидиите е најмала кај агарот од лук (21,80 x 10,40 µm), а најголема кај Чапековиот (32,46 x 11,85 µm).



### Влијание на хранливата подлога врз приносот на сува биомаса

Хранливата средина има влијание и врз приносот на сува биомаса на колонијата од *A. alternata*. Според податоците од Табела 1 и Графикон 2, тој е најмал кај овесовиот агар (30,00 mg), а најголем кај Чапековиот агар (202,00 mg). Кај останатите подлоги се движи од 50,00 mg кај V-8 џус подлогата до 120,00 mg кај компирдекстрозната подлога.

Во нашите истражувања утврдивме дека постојат разлики во интензитетот на образување на конидии и големината на образваните конидии. Но, хранливата подлога влијае и врз приносот на сувата биомаса на колонијата.

Слични резултати истакнуваат и други автори.

Јованчев (1997), на хранливата подлога агар со кромид, покрај најслабиот развој на колонијата констатирал и најслаба спорулација, како и конидии со најмали димензии. Според Misaghi et al. (1978), повеќе елементи на сустратот врз кој се одгледува габата (првенствено односот C/N) влијаат врз нејзината морфологија.

Наведувајќи ги разликите во спорулацијата во зависност од хранливата средина, Simmons (1992) предлага три подлоги за подобрување на спорулацијата: агар од морков (PSA), HAU-подлога од природно

разградени растенија и подлога V-8 џус.

Спротивно на овие податоци, во нашите истражувања кај V-8 џус подлогата утврдивме слаба спорулација.

Во истражувањата на Ivanović и Jovanović (1994), најдобра спорулација на *A. alternata* изолирана од тутун, е постигната на подлога од морков и тутун, а најслаба на воден агар и на подлога од јаболко. Исто така и Rotem (1994) истакнува дека повеќето патогени добро спорулираат на хранлива подлога ако во неа е додаден екстракт од растението-домаќин.

Хранливата подлога влијае и врз приносот на сува биомаса на колонијата. Во нашите истражувања тој е најголем кај Чапековиот, а најмал кај овесовиот агар.

Гвероска (2006) утврдува разлики во изгледот на колонијата, односно колониите одгледани на овесовиот агар и V-8 џус подлогата се ретки, а пак на агарот од грашок габата се развива најслабо.

Тоа влијае на малиот принос на сува биомаса на колонијата одгледана на овие подлоги. Исто така, кај подлогите каде има подобар развој на колонијата, но и каде конидиите се покрупни (КДА и Чапековиот агар), приносот на сува биомаса е поголем.

### ЗАКЛУЧОЦИ

- ❖ Хранливата подлога влијае врз патогената габата, т.е. врз нејзината спорулација, големината на конидиите и приносот на сува биомаса на колонијата.
- ❖ Спорулацијата беше најдобра на Чапековиот и на агарот од морков, а најслаба на подлога од лук и V-8 џус.
- ❖ Големината на конидиите варира

помеѓу одделните хранливи подлоги. Конидии со најмали димензии се создаваат на хранливата подлога агар од лук, а најголеми на Чапековиот и компирдекстрозниот агар.

- ❖ Приносот на сува биомаса на колонијата е најголем кај Чапековиот, а најмал кај овесовиот агар.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гвероска Б., 2006. Влијание на хранливата подлога врз равојот на *Alternaria alternata* кај тутунот. Тутун/ Tobacco, Vol. 56, No. 11-12, 211-216.
2. Ivanović M., Jovanović D., 1994. *Alternaria alternata* - nov parazit duvana u Srbiji. *Zaštita bilja*, Vol. 45 (3), br.209: 161-167, Beograd.
3. Јованчев П., 1997. Проучување на алтернариозите *Alternaria solani*-Sorauer и *Alternaria alternata* (Fries) Keissler) кај домотот и мерки за нивно сузбивање во Македонија. Докторска дисертација, Универзитет "Св."Кирил и Методиј" - Скопје.
4. Misaghi I.J., Grogan R.G., Duniway J.M., Kimble K.A., 1978. Influence of Environmental and Culture Media on Spore Morphology of, Pathogenicity and Cultural Characteristics of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 68: 29-34.
5. Marković S., 1979. Osnove fitopatoloških laboratoriskih metoda. Savezni komitet za poljoprivredu-Granična služba za zaštitu bilja i biljni karantitn, Beograd.
6. Пејчиновски Ф., 1996. Земјоделска фитопатологија (Општ дел). Универзитет "Св. Кирил и Методиј"- Скопје.
7. Rotem J., 1994. The genus *Alternaria*. APS PRESS. St. Paul, Minnesota.
8. Sarić M., Kastori R., Petrović M., Stanković Ž., Krstić B., Petrović N., 1986. Praktikum iz fiziologije biljaka. Naučna knjiga, Beograd.
9. Simmons / Chelkowski J. and Wisconti A., 1992. *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites. Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo.
10. Зибероски Ј., 1998. Практикум по микробиологија. Универзитет "Св."Кирил и Методиј", Земјоделски факултет - Скопје.

## THE EFFECT OF NUTRIENT MEDIA ON SPORULATION, CONIDIA SIZE AND DRY BIOMASS YIELD OF *ALTERNARIA ALTERNATA* IN TOBACCO

**B. Gveroska, P. Taskoski**

*Tobacco Institute- Prilep*

### SUMMARY

*A. alternata* was isolated from brown spots on infected tobacco leaves. Sporulation and conidia size were monitored on pure culture of the fungus grown in various nutrient media at 15 days interval. Investigations included the following media: potato dextrose agar, oat agar, Chapek agar, V-8 juice, peas, carrot and garlic.

In garlic agar and V-8 juice, low sporulation was recorded. In potato dextrose, oat and peas agar the sporulation was good, while in carrot it was very good. Abundant sporulation was noted only in Chapek agar.

The smallest conidia size was recorded in the garlic agar, and the largest in Chapek agar (32.46 x 11.85  $\mu$ m) and in potato dextrose agar (31.68 x 11.48  $\mu$ m).

Dry mass yield was the lowest in oat agar (30.00 mg), and the highest in Chapek agar (202.00 mg).

We consider that these investigations will be of special interest in improving the methods of studying of *A. alternata* in tobacco, and thereby in finding solution to the problems related to brown spot disease.

*Author`s address:*

Biljana Gveroska

Tobacco Institute - Prilep

Republic of Macedonia