

## ОЦІНКА ІНТЕНСИВНОСТІ УРАЖЕННЯ СОНЯШНИКА СЕПТОРІОЗОМ МЕТОДОМ ШТУЧНОГО ІНФІКУВАННЯ В УМОВАХ ФІТОТРОНУ

Х. М. Левицька<sup>1</sup>, В. О. Лях<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Інститут олійних культур Національної академії аграрних наук України

<sup>2</sup> Запорізький національний університет

У статті наведені результати досліджень оцінки інтенсивності ураження ліній соняшнику різного еколого-географічного походження збудником септоріозу методом штучного зараження в умовах фітотрону. Встановлено, що після інфікування сіяньців міцеліальною суспензією збудника в умовах вологої камери хвороба розвивалась досить швидко. Симптоми хвороби були наявні як на сім'ядольних, так і справжніх листках першої та другої пар. Перші симптоми ураження з'явилися на 10-й день, а спори *Septoria helianthi* виділялись на 15 день після інокуляції. Встановлено, що за штучного інфікування сіяньців септоріозом лінія HAR7 мала найнижчий ступінь ураження хворобою, лінія ЗЛ22А була більш сприйнятливою до ураження, а лінії ЗЛ58А та ЗЛ78А уражувались хворобою найбільше. Метод, який пропонується, забезпечує надійне інфікування зразків соняшника збудником *S. helianthi*, швидко оцінку інтенсивності ураження ліній соняшнику септоріозом, можливість застосування його для здійснення відбору рослин для подальшого використання їх у рік оцінки в селекційному процесі.

**Ключові слова:** соняшник, септоріоз, інокулюм, збудник, міцелій, фітотрон.

**Вступ.** Соняшник уражується численними грибними, бактеріальними та вірусними хворобами. Їх шкідливість залежить від ґрунтових та погоднокліматичних умов, технологій вирощування, насичення сівозміни соняшником, рівня селекційної роботи. Септоріоз поширений у країнах з теплим, вологим кліматом.

Збудник *Septoria helianthi* Ellis & Kellerm, відносять до класу *Dothideomycetes*, порядку *Capnodiales*, родини *Mycosphaerellaceae*, роду *Septoria*. (Quaedvlieg et al. 2013).

Хвороба на соняшнику була виявлена в Україні, Росії, Грузії, Югославії, Канаді, Німеччині, з різною інтенсивністю ураження (Lukomets et al 2011).

Розвиток септоріозу на рослинах соняшника досліджувався у польових умовах (Gindrat and Frei 1995; Hamid and Jalaluddin 2007) та в лабораторних умовах (Acimovic 1998). В умовах теплиць зі штучним зараженням сходів соняшника шляхом нанесення спорової суспензії, хвороба завдавала значної шкоди рослинам соняшника та швидко розвивалась далі на рослинах (Acimovic 1998).

Характерно, що збудник не втрачав патогенних властивостей при тривалому культивуванні на твердому поживному середовищі (Acimovic 1998; Babayants and Babayants 2014).

Хвороба розвивається спочатку на сім'ядольних листках соняшника. Далі вона починає розповсюджуватись на нижнє та верхнє листя у вигляді світлих або

жовтих плям, які далі стають темно-коричневими або темно-бурими, неправильної чи округлої форми. На верхівці листка в місцях плям формуються темні крапки – пікніди, які утворюють безбарвні прямі або трохи заокруглені пікноспори з 1–5 перетинками (Acimovic 1998).

Ураження рослин соняшнику септоріозом призводить до передчасного відмирання листя, порушення процесів дихання, фотосинтезу. Одночасно відбувається зниження продуктивності зеленої маси, якості та кількості насіння (Vipritskaya et al 2012).

Причиною розповсюдження даного захворювання є відсутність стійких форм соняшнику до хвороби. Для вирішення цієї проблеми важливою ланкою є поглиблене вивчення біологічних особливостей збудника *S. helianthi* та виявлення стійкості у рослин соняшнику до септоріозу.

Метою нашого дослідження було проаналізувати розвиток септоріозу за штучного інфікування сіяньців соняшника міцеліальною суспензією збудника в умовах фітотрону та визначити ступінь ураження цієї хворобою ліній різного еколого-географічного походження.

#### **Матеріал та методи досліджень**

Матеріалом для дослідження слугували самозапильні лінії соняшнику ЗЛ22А; ЗЛ58А; ЗЛ78А (запорізької селекції Інституту олійних культур НААН) та лінія HAR7 (США). Дані лінії є компонентами у багатьох експериментальних гібридів та мають відмінності за показником стійкості до септоріозу, несправжньої борошнистої роси, гнилей та вовчка в польових умовах.

Дослідження проводили в умовах фітотрону кафедри генетики та рослинних ресурсів Запорізького національного університету. Насіння обраних зразків соняшника висівали в ґрунт, у спеціально підготовлені горщики із дренажем та сумішшю чорнозема і піску (1:1) на глибину 3 см у два ряди по 10 насінин у кожному, з відстанню між насінням 0,5–1 см. Ріст та розвиток рослин проходив при фотоперіоді 16/8 годин (день/ніч) за температури 23–25 °С та відносній вологості 65 %. Полив здійснювався за необхідністю та в однаковій кількості для усіх зразків.

Інокуляцію рослин соняшнику проводили, дотримуючись загальноприйнятих методів у фітопатології (Dudka et al 1982, Leschuk et al 2016, Petrenkova et al 2012). Зараження проводили у фазі першої пари справжніх листків шляхом ручного розпилення 1мл водної суспензії міцелію *S. helianthi* на кожен сіянець у горщику (рис. 1). Далі заражені рослини розміщали в умовах вологої камери. Для зараження використовували інокулюм 30-денної міцеліальної культури гриба *S. helianthi*, який був отриманий при культивуванні збудника на твердому поживному середовищі. Для виділення збудника септоріозу уражені хворобою частини рослин, тобто уражене септоріозом листя соняшнику, збирали на стаціонарному штучному інфекційному фоні Інституту олійних культур у вегетаційному сезоні 2020 року в різні фази розвитку соняшнику.

Виділення збудника в чисту культуру та приготування інокулюму для зараження проводили за загально прийнятими у фітопатології та мікології методами, доповнюючи їх авторськими (Kiray et al. 1974; Naumova 1960). Для культивування збудника *S. helianthi* використовували картопляно-глюкозне агаризоване середовище з додаванням антибіотика. Мікологічні дослідження проводили в ламінарі за стерильних умов.



Рис. 1. Зараження сіянців соняшника в умовах фітотрону міцеліальною суспензією збудника *Septoria helianthi*

Ідентифікацію збудника септоріозу *S. helianthi* здійснювали за культурально-морфологічними особливостями міцелію та морфологічними особливостями пікноспор, спираючись на літературні джерела (Асімовіч 1998).

Ураження ліній визначали за відсотком рослин з певним ступенем ураженості.

Оцінку ступеня ураження рослин проводили шляхом візуального огляду усіх листків, використовуючи 5-ти бальну шкалу, модифіковану для наших досліджень, де:

0 – ураження відсутнє, всі листки рослини не уражені;

1 – незначне, ураження на сім'ядольних листках;

2 – слабке, відмічається ураження сім'ядольних листків та першої пари справжніх листків;

3 – середнє, ураження сім'ядольних листків та 1-2 пари справжніх листків;

4 – сильне, ураження усіх листків рослини (Petrenkova et al. 2012).

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакету прикладних програм Microsoft Excel 2007 (Volkova and Shipunov 2008).

Похибку відсотка визначали за формулою:

$$S_p = \sqrt{\frac{P \cdot (100 - P)}{n}}$$

де  $S_p$  – похибка відсотка;

$p$  – відсоток рослин з певним ступенем ураженості;

$n$  – загальна кількість рослин, що аналізувалися (Rokitsky 1973).

Обчислення розвитку хвороби проводили за формулою:

$$R = \frac{\sum (a \cdot b)}{N \cdot K} \cdot 100$$

де  $R$  – розвиток хвороби, %;

$\Sigma$  (a · b) – сума добутків кількості хворих рослин на відповідний бал ураження;

N – всього облікових рослин (здорових і хворих), шт.;

K – найвищий бал шкали (Leschuk et al. 2016).

#### **Результати досліджень та їх обговорення**

Через 10 днів після посіву на сіянцях з'явилась перша пара справжніх листків. Рослини були повністю здорові, тобто не мали жодних симптомів ураження септоріозом на усіх листках.

Температура та вологість повітря в умовах фітотрону були оптимальними для розвитку септоріозу. На 10–12 день після інокуляції на сім'ядольних листках з'явилися перші симптоми ураження у вигляді незначного в'янення та бурих плям. У подальшому плями переходили на верхні яруси, уражуючи справжні листки (рис. 2). Симптоми були наявними у всіх ліній, проте найбільше були уражені у цей період лінії ЗЛ78А та ЗЛ22А.



**Рис. 2. Ураження сім'ядольних та справжніх листків соняшнику (11, 14 день після інокуляції)**

З часом плями збільшувались, займаючи майже усю поверхню листкової пластинки, листки в'янули, продовжуючи висіти на стеблі (рис.3).



**Рис. 3. В'янення сім'ядольних листків та перехід інфекції на листки верхніх ярусів (21 день після інокуляції)**

На справжніх листках симптоми хвороби починали виявлятися на верхівці та з боків листка, захоплюючи всю листову пластинку. Проте хвороба не викликала некрозу уражених ділянок на листках на відміну від ураження соняшника в польових умовах (Levitska and Lyah 2019). Далі інфекція продовжувала уражувати листя вищих ярусів. На справжніх листках у місцях плям формувались темні крапки – пікніди. На 15 день після інокуляції на справжніх листках рослин соняшнику виділялись спори збудника септоріозу (рис. 4).



Рис. 4. Ураження септоріозом справжнього листка соняшника у вигляді плями та виділені з неї спори збудника септоріозу (14 день після інокуляції)

Визначення ступеня ураження сіяньців соняшнику проводили у фазі четвертої пари справжніх листків.

За результатами проведених досліджень, лінії соняшнику показали різний ступінь ураження та відповідно різний ступінь стійкості до септоріозу (табл. 1).

Таблиця 1

Ураження ліній соняшнику септоріозом в умовах фітотрону, %  
(2020 р.)

Генотип	Кількість рослин, шт.	Кількість уражених рослин, %	Ступінь ураження рослин, %					Розвиток хвороби, %
			0	1	2	3	4	
HAR7	17	70,5±11,0	29,4	0	58,8	11,8	0	38,2
ЗЛ 58А	16	100,0	0	0	56,2	43,8	0	60,9
ЗЛ 78А	10	100,0	0	0	60,0	40,0	0	60
ЗЛ 22А	20	75,0±9,6	25,0	0	70,0	0	5,0	40

З таблиці видно, що найменш ураженою була лінія HAR7. 70,5 % рослин цієї лінії уражувались хворобою. У 58,8 % рослин були уражені сім'ядольні та перша пара справжніх листків, а у 11,8 % була уражена друга пара справжніх листків. Зовсім неуражених рослин було 29,4 %. Розвиток хвороби на лінії HAR7 складає 38,2 %.

Лінія ЗЛ22А уражувалась на 75 %. Майже всі рослини мали ураження сім'ядолей та першої пари листків, що склало 70 %. Також у цієї лінії були рослини, що мали ураження на усіх листках, їх кількість склала 5 %. Неуражених хворобою рослин було 25 %. Слід відмітити, що лінія ЗЛ22А була близькою за ступенем ураження та розвитком хвороби до лінії HAR7 й показала відносно

сприйнятливості до септоріозу в умовах фітотрону. У лінії ЗЛ22А розвиток хвороби склав 40 %.

Лінії ЗЛ58А та ЗЛ78А уражувались септоріозом на 100 %. У лінії ЗЛ58А рослин з ураженими сім'ядолями та першою парою справжніх листків було 56,2 %, а рослин з симптомами даної хвороби на другій парі справжніх листків було 43,8 %. Рослин лінії ЗЛ78А, які мали ураження на сім'ядолях та першій парі справжніх листків, було 60 %, а рослин з симптомами септоріозу на другій парі – 40 %. У цілому ці дві лінії характеризувались однаковим ступенем ураження та їх можна вважати сприйнятливими до септоріозу. Відсоток розвитку хвороби у лінії ЗЛ58А склав 60,9 %, у лінії ЗЛ78А – 60 %.

Відмічається, що інкубаційний період хвороби може бути різним та залежати від умов навколишнього середовища та температури, отримані нами данні співпадають з результатами досліджень проведених М. АсимоVIC. За його даними розвиток септоріозу на рослинах соняшнику, за різних температур тривав від 7 до 14 днів (АсимоVIC 1998). У дослідях О. В. Бабаянц та Л. Т. Бабаянц, розвиток септоріозу на інших культурах, наприклад на пшениці за різних умов вирощування, може тривати від 6 до 26 днів і більше (Babayants and Babayants 2014).

### **Висновки**

Виявлено, що в умовах фітотрону при штучному інфікуванні ліній соняшнику водною суспензією з міцелієм збудника септоріозу, хвороба розвивалась досить швидко та з різною інтенсивністю ураження. Симптоми хвороби у вигляді в'янення та бурих плям були присутні як на сім'ядоліях, так і на справжніх листках. Далі інфекція продовжувала уражувати листя вищих ярусів. Слід відмітити, що у лабораторних умовах симптоми хвороби на соняшнику дещо відрізнялись від симптомів на уражених рослинах у польових умовах. На справжніх листках у місцях плям вже через два тижні після інокуляції виділялись спори збудника септоріозу. Цей етап розвитку збудника також є відмінним за вирощування соняшника у польових умовах.

Встановлено, що лінії запорізької селекції ЗЛ58А; ЗЛ78А; ЗЛ22А та НАR7 показали різний ступінь ураження септоріозом та відповідно ступінь стійкості за штучного зараження сходів в умовах фітотрону. Лінія НАR7 найменше уражувалась хворобою, тому є відносно сприйнятливою до септоріозу в умовах фітотрону, близькою до неї за ступенем ураження та відповідно за показником стійкості є лінія ЗЛ22А, а лінії ЗЛ58А та ЗЛ78А виявились сприйнятливими до хвороби, адже уражувались хворобою досить сильно.

Метод, який пропонується, забезпечує надійне інфікування рослин соняшника збудником *S. helianthi*, вірогідну та швидко оцінку інтенсивності ураження зразків соняшнику септоріозом та можливість використання його, незважаючи на сезонність, для здійснення відбору рослин для подальшого використання їх у рік оцінки в селекційному процесі.

### **References**

- АсимоVIC М (1998) Bolesti Suncokreta. Felton, Novi Sad.
- Babayants OV, Babayants LT (2014) Osnovy selektsii i metodologiya otsenok ustoychivosti pshenitsy k vzbuditel'yam bolezney (Fundamentals of breeding and methodology for assessing wheat resistance to pathogens). (In Russian). VMV, Odessa.

Dudka IA, Vasser SP, Ellanskaya IA, Koval EZ, Gorbik LT, Nikolskaya EA, i dr., (1982). *Metodyi eksperimentalnoy mikologii. Spravochnik. (Methods of experimental mycology.)* (In Russian). Naukova dumka, Kiev.

Gindrat D. et Frei P. (1997) La septoriose du tournesol décelée en Suisse romande. Station fédérale de recherches en production végétale de Changlins. CH-1260 Nyon. *Agric* 29(3): 109-110.

Hamid M, Jalaluddin M (2007) A new report of *Septoria Helianthi* leaf spot of sunflower from Sindh. *Pak.J.Bot* 39(2): 659-660.

Kiray Z, Klement Z, Shoymoshi F, Veresh Y (1974) *Metodyi fitopatologii. Kolos, Moskva. English edition: Kiraly Z., Klement Z, Solymosy F, Voros J (1970). Methods in plant pathology (With special reference to breeding for disease resistance). Academiai Kiado, Budapest.*

Leschuk NV, Bashkirova NV, Retman SV, Sergienko VG, Kalenich FS, Andruschenko AV (2016). *Metodika provedennya fitopatologichnih doslidzhen za shtuchnogo zarazhennya roslin. (Methods of phytopathological studies of artificial infection of plants).* (In Ukrainian). Kiev.

Levitska HM, Lyah VO (2019). *StlykIst Inly sonyashniku rIznogo pohodzhennya do septorIozu ta YiYi uspadkuvannya glbridami F1. Naukovo-tehnIchniy byuletен. (Resistance of sunflower lines of different origin to septoria and its inheritance by F1 hybrids).* (In Ukrainian). *IOK* 154(27): 6-12.

Lukomets VM, Piven VT, Tishkov NM (2011) *Bolezni podsolnechnika (Sunflower diseases).* (In Russian). VNIIMK, Krasnodar.

Naumova NA (1960). *Analiz semyan na gribnuyu i bakterialnuyu infektsiyu. (Seed analysis for fungal and bacterial infections).* (In Russian). Selhonzgiz, Leningrad.

Petrenkova VP, Borovska IYu, Kirichenko VV (2012) *StlykIst sonyashniku do nekrotichnih patogenIv. (Resistance of sunflower to necrotic pathogens).* (In Ukrainian). Magda LTD, HarkIv.

Quaedvlieg W, Verkley GJM., Shin H-D, Barreto RW, Alfenas AC, Swart WJ, Groenewald JZ, and Crous PW (2013) A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Studies in Mycology* 406(75):213-305.

Rokitsky PF (1973) *Biologicheskaya statistika (Biological statistics).* (In Russian). Vysheyshaya shkola, Minsk.

Vipritskaya AA, Puchnin AM, Kuznezhov AA (2012) *Vozbuditeli potentsial'no opasnykh bolezney podsolnechnika (Pathogens of potentially dangerous sunflower diseases).* (In Russian). *Vestnik TGU* 2:764-767.

Volkova PA, Shipunov AB (2008) *Statisticheskaya obrabotka dannykh v uchebno-issledovatel'skikh rabotakh (Statistical data processing in educational research).* (In Russian). Ecopress, Moscow.

## ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ПОРАЖЕНИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА СЕПТОРИОЗОМ МЕТОДОМ ИСКУССТВЕННОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ФИТОТРОНА

К. М. Левицкая<sup>1</sup>, В. А. Лях<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Институт масличных культур Национальной академии аграрных наук Украины*

<sup>2</sup> *Запорожский национальный университет*

В статье приведены результаты исследований оценки интенсивности поражения линий подсолнечника различного эколого-географического происхождения возбудителем септориоза методом искусственного заражения в условиях фитотрона. Установлено, что после инфицирования семян мицелиальной суспензией возбудителя в условиях влажной камеры болезнь развивалась достаточно быстро. Симптомы болезни имелись как на семядольных, так и настоящих листьях первой и второй пар. Первые симптомы поражения появились на 10-й день, а споры *Septoria helianthi* выделялись на 15 день после инокуляции. Установлено, что при искусственном инфицировании семян септориозом линия HAR7 имела самую низкую степень поражения болезнью, линия ЗЛ22А была более восприимчивой к поражению, а линии ЗЛ58А и ЗЛ78А более всех поражались болезнью. Предлагаемый метод, обеспечивает надежное инфицирование образцов подсолнечника возбудителем *S. helianthi*, быструю оценку интенсивности поражения линий подсолнечника септориозом, возможность применения его при осуществлении отбора растений для дальнейшего использования в год оценки в селекционном процессе.

**Ключевые слова:** подсолнечник, септориоз, инокулюм, возбудитель, мицелий, фитотрон.

## ASSESSMENT OF THE INTENSITY OF DAMAGE TO SUNFLOWER CAUSED BY ARTIFICIAL INFECTION WITH SEPTORIA IN PHYTOTRON CONDITIONS

К.М. Levitskaya<sup>1</sup>, V.A. Lyakh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Oilseed Crops of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine*

<sup>2</sup> *Zaporizhzhia National University*

The aim of our study was to analyze the development of *Septoria* leaf spot in sunflower seedlings artificially infected with the mycelium suspension of the pathogen in the phytotron and to determine the degree of damage caused by this disease in the lines of different origins. The materials for the experiment were self-pollinating sunflower lines ZL22A, ZL58A, ZL78A (all of Zaporizhzhya breeding the Institute of Oilseeds Crops of NAAS) and line HAR7 (originating from the USA).

The research was conducted in the phytotron facility at the Department of Genetics and Plant Resources of Zaporizhzhia National University. The seeds of selected sunflower samples were sown into the soil in the specially prepared pots containing drainage and a mixture of chernozem and sand in equal proportions to a depth of 3 cm in two rows of 10 seeds each, with a distance between seeds of 0.5-1 cm. The plants grew

and developed on a photoperiod of 16/8 hours (day / night) at a temperature of 23-25°C and a relative humidity of 65%. All samples were watered when needed and received equal amounts of water.

Sunflower plants were inoculated in accordance with generally accepted methods of phytopathology. Next, the infected plants were placed in a humid chamber.

The plants were infected with the inoculum of a 30-day old mycelium culture of the fungus *Septoria helianthi*, grown by cultivating the pathogen on a solid nutrient medium. The isolation of pathogen in pure culture as well as preparation of inoculum for infection were carried out using methods which were generally accepted in phytopathology and mycology, supplemented by author's own methodology.

The degree of damage to the plants was assessed by visual examination of all leaves, using a 5-point scale, modified for our studies. The affected lines were determined by the percentage of plants with a certain degree of damage.

The results of this research showed that sunflower lines sustained varying degrees of damage and, accordingly, varying degrees of resistance to *Septoria*.

The least affected was line HAR7, with 70% of the plants in this line having damaged leaves. The most damaged of those were cotyledons and the first pair of true leaves, whereas just 11.7% of plants had the second pair of true leaves damaged. Completely unaffected plants made up 29.5% of this line.

Line ZL22A was affected by 75%. Almost all plants in this line had damaged cotyledons and the first pair of leaves, with 70%. Besides, there were 5% of plants that had all their leaves affected. The number of unaffected plants was 25%. It should be noted that the ZL22A line was close in degree of damage to that of the HAR7 line and showed relative susceptibility to *Septoria* under phytotron conditions.

ZL58A and ZL78A lines were the most affected by *Septoria*, with 100%. In the ZL58A line, there were 56.2% of plants with damaged cotyledons and the first pair of true leaves, and 43.8% of plants whose second pair of true leaves showed the symptoms of the disease. The plants of the ZL78A line with lesions on the cotyledons and the first pair of true leaves made up 60%, whereas the number of plants with the symptoms of *Septoria* leaf spot on the second pair amounted to 40%. In general, these two lines were characterized by the same degree of damage and can be considered susceptible to *Septoria* leaf blight.

The disease progression on the HAR7 line is 38.2%, on the ZL22A line is 40%, on the ZL78A line is 60%, on the ZL58A line is 60,9%.

The findings show that sunflower plant lines that were artificially infected with an aqueous suspension of fungal mycelium containing *Septoria* leaf spot pathogen in the conditions of phytotron developed the disease rather rapidly and exhibited varying degrees of damage.

The proposed method provides a reliable infection of sunflower samples with the pathogen *S. helianthi*, a rapid assessment of the intensity of damage to sunflower lines by *septoria*.

**Keywords:** sunflower, *Septoria* leaf spot, inoculum, pathogen, mycelium, phytotron.