

**ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ТОКСИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
ВОЗБУДИТЕЛЯ АЛЬТЕРНАРИОЗА ТОМАТОВ, ЕГО ПОЛУЧЕНИЕ И
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТОКСИГЕННОСТИ
ИЗОЛЯТОВ И УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ К ПАТОГЕНУ**

Аркадий НИКОЛАЕВ, Светлана НИКОЛАЕВА, Виктория ШУБИНА, Леонид ВОЛОЩУК

Институт защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы

Sunt descrise beneficiile procesului de obținerea complexului toxic de *Alternaria* solubil în apă cu ajutorul mediului lichid în comparație cu cele ale mediului agarizat.

The benefits of process for obtaining of toxic *Alternaria* water-soluble complex in liquid media in comparison with using of agar medium are described.

Грибы рода *Alternaria*, сапрофиты и факультативные паразиты, широко распространены в природе и поражают широкий круг растений разных семейств. На злаковых культурах (пшеница, ячмень, рожь, овес, злаковые травы) они вызывают черный зародыш злаков (возбудитель *A. Tenuis Fr.*); на крестоцветных (капуста, рапс) поражают молодые и взрослые растения, семенники (возбудитель *A. brassicae Sacc.*); на зонтичных (морковь, сельдерей, петрушка) – стебли, корнеплоды (возбудитель *A. radicina M. D. et E.*). Грибы рода *Alternaria* поражают и многолетние культуры [1, 2].

Отмечая высокую частоту встречаемости гриба *Alternaria* (*A. alternata*, *namomun A. mali*) на листьях яблони, Гагкаева Т. и Левитин М. [1] первоначально полагали, что это сапрофит, поселяющийся на мертвой ткани и не причиняющий вреда растению. Однако более глубокие исследования показали, что альтернариоз яблони – новое опасное заболевание. В годы эпифитотии альтернариоз может вызывать опадение 50-60% листьев яблони. Заболеванию часто сопутствует высокая численность клещей в саду и поражение листьев паршой. Распространение альтернариоза в южной зоне садоводства России и в других регионах может привести не только к снижению продуктивности плодоносящих насаждений, но и к общей потере устойчивости яблони ко многим болезням в результате действия токсинов гриба. Известно, что токсины *A. alternata* (в частности АМ-токсины) приводят к разрушению клеточных стенок, утечке электролитов из цитоплазмы, уменьшению содержания хлорофилла и ослаблению фиксации CO₂. Токсин образуется при прорастании спор на поверхности чувствительных клеток листьев яблони и при проникновении гиф в клетки эпидермиса [1].

Особый вред альтернария причиняет пасленовым культурам, поражая томаты, картофель, перец, баклажаны, табак.

На томатах альтернария вызывает раннюю листовую пятнистость, потери урожая от которой в годы эпифитотий могут достигать 50-80% [3,4,5].

Как и во всех предыдущих случаях, существенную роль в патогенезе заболевания играют токсины гриба, с помощью которых патоген убивает клетки растения, а затем заселяет их, вызывая отмирание тканей.

Токсины запускают патологический процесс, при этом токсины одного гриба могут способствовать заражению растений слабым или непатогенным штаммом другого гриба. Заражению способствуют и механические повреждения, вызывающие омертвление тканей [6,7]. Подтверждением сказанному является и массовое развитие альтернариоза в яблоневых садах с высокой численностью клещей и поражением листьев паршой [1].

Для разработки защитных мероприятий в борьбе с альтернариозом, корректной оценки их эффективности, немаловажным условием является возможность выделять токсины, добавлять их в конидиальную (конидиально-мицелиальную) суспензию, чем обеспечивать гарантированное заражение растений.

Погодные условия 2009-2011 годов в Молдове благоприятствовали заражению томатов ранней сухой пятнистостью. Именно в эти годы нами было выделено подавляющее большинство изолятов альтернарии, использованных в работе.

Выделению водорастворимого токсического комплекса (ВТК) этих изолятов предшествовало изучение влияния состава питательных сред на линейный рост гриба, накопление биомассы, сравнение изолятов по их токсигенности, сравнительная оценка сортов с разной степенью устойчивости к альтернариозу по их реакции на токсин. Были испытаны 7 питательных сред, включая картофельно-глюкозную, картофельно-морковную, морковную, перечную, капустную, томатную (то есть отвары культур, поражаемых альтернарией), а также среда Чапека как универсальная синтетическая среда для грибов [8,9]. Самой благоприятной средой для роста гриба *Alternaria* и продуцирования токсических веществ была картофельно-глюкозная среда, что согласуется с данными литературы. По этим показателям среда Чапека уступала картофельно-глюкозной среде.

В полном соответствии с методикой Анненкова Б.Г. [10] нам удалось получить водорастворимый токсический комплекс (ВТК) нескольких изолятов *Alternaria*, выделенных из разных источников, проверить его действие на прорастание семян томатов разных по устойчивости к альтернариозу сортов, действие на листовые пластинки, побеги и молодые растения томата и перца. Однако в процессе исследований мы пришли к выводу, что можно, без ущерба для конечного результата, сократить некоторые операции по выделению токсических веществ, увеличить выход ВТК, уменьшить время его получения, удешевить весь процесс и минимизировать возможность загрязнения посторонней микрофлорой.

Цель исследований – усовершенствование методики получения водорастворимого токсического комплекса изолятов гриба *Alternaria*.

Материалы и методы исследований

В работе использованы изоляты гриба *Alternaria*, выделенные из альтернариозных пятен свежих листьев и гербарного материала томатов разных сортов, листьев картофеля, плодов томата, перцев и баклажанов. Образцы отбирали на опытных участках ИЗР и ЭЗ, сортоучастке Института генетики и физиологии растений АН Молдовы, в частных хозяйствах г. Кишинева и пригородов.

За основу методики выделения ВТК взят патент Анненкова Б.Г. [10], но культуру патогена выращивали не на агаризованной картофельно-глюкозной среде в чашках Петри, а на жидкой среде того же состава в колбочках Эрленмейера со 100 мл среды. Засев питательной среды проводился блоком патогена, выращенного на агаризованной картофельно-глюкозной среде. И чашки Петри, и колбочки были помещены в равные условия (термостат без подсветки, температура 28°C).

В течение 20 суток и в чашках Петри на агаризованной среде, и в колбочках на жидкой среде шло нарастание биомассы гриба, продукты метаболизма выделялись в питательную среду (в одном случае в агаризованную, в другом – в жидкую). Спустя 20 суток содержимое чашек Петри заливали 25 мл дистиллированной воды и оставляли еще на 10 суток для экстракции водорастворимых продуктов метаболизма гриба, а содержимое колбочек сразу фильтровали через бязь. Эту же операцию с жидкой фракцией в чашках Петри проводили после 10-суточного настаивания.

В дальнейшем и в одном, и в другом случаях 50 мл фильтрата заливали в выпарительную чашку, упаривали на водяной бане до получения сухого технического продукта. Затем сухой остаток тщательно смывали 5 мл воды, то есть в работе использовали десятикратно сконцентрированный токсический комплекс гриба.

Повторность опыта 3-5-кратная.

Результаты исследований и их обсуждение

Согласно методике Анненкова Б.Г., 20-дневную культуру альтернарии, выращенной на агаризованной среде, заливали 25 мл дистиллированной (дождевой, снеговой) воды и выдерживали в термостате еще в течение 10 суток. За это время в жидкую фракцию переходили метаболиты гриба, включая токсические вещества, ранее диффундировавшие в агар. Соблюдение температурного параметра и обязательная заливка водой соответствуют биологическим параметрам патогена. В природе заражение томатов альтернариозом приурочено ко времени появления утренней росы на растениях (конидии

патогена прорастают в капельной влаге). С моментом прорастания конидий связывают образование токсинов, с действием которых на растение начинается патологический процесс.

Более логичным, на наш взгляд, является культивирование патогена на жидкой среде, при этом продукты жизнедеятельности гриба переходят непосредственно в жидкую фракцию. Выигрывается время пребывания в термостате (10 суток) и сокращается количество операций.

Выход жидкой фракции с 1 единицы емкости увеличивается с 13,5 мл (на 1 чашку Петри) до 78,0 мл (на 1 колбочку Эрленмейера), то есть в 5,8 раза (средние величины по четырем изолятам и 5 повторностям). Соответственно увеличивается и выход сухой фракции. На этом этапе мы опять выигрываем на операции. При использовании агаризованной среды отдельно стерилизуются чашки Петри и отдельно (при другом режиме) агаризованная среда, после чего среда стерильно разливается в чашки Петри. В случае использования жидкой среды последняя непосредственно стерилизуется в колбочках.

Наблюдения за ростом разных изолятов альтернрии параллельно на 2-х средах показало, что характерные особенности роста изолятов как на агаризованных, так и на жидких средах сохраняются: например, наличие «звездочек» на подложках на картофельно-глюкозной среде, их размер, количество и характер расположения (рис.1,2,3).



Рис.1. «Звездочки» на подложке изолята G 348-28 (вид под микроскопом).

«Звездочки» в зависимости от изолята могли быть крупными или мелкими, их могло быть много или мало, они могли располагаться равномерно по всей поверхности подложки или островками, они могли совсем отсутствовать (рис.2).

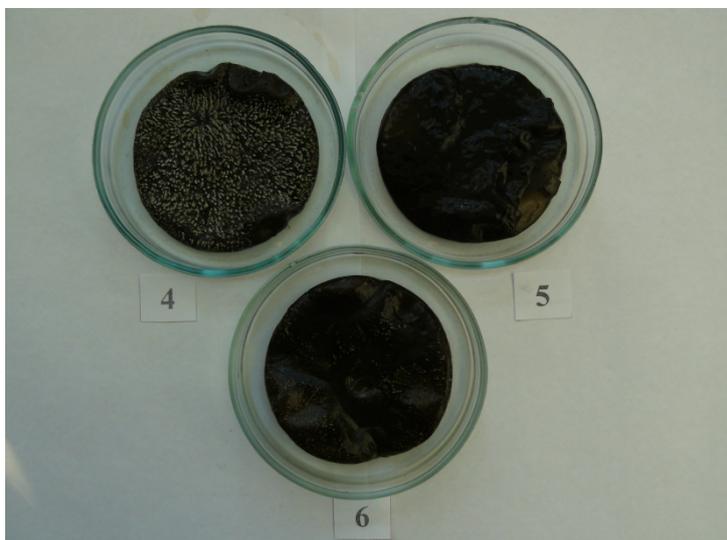


Рис.2. Вид подложки трех изолятов альтернрии, выращенных на жидкой среде.

«Звездочки» на подложке изолята G 348-28 (чашка 4) – крупные, их много, они расположены равномерно по всей поверхности, изолята ГЛТ-7 (чашка 6) – мелкие, расположены островками, на подложке изолята ГЛТ-3 (чашка 5) «звездочки» практически отсутствуют.

Наличие «звездочек» на подложке, их характерные особенности являются отличительным признаком изолятов альтернории. Он сохраняется и на агаризованной, и на жидкой картофельно-глюкозной среде. Связано ли это как-то с агрессивностью изолята, пока сказать не можем.



Рис.3. Внешний вид изолятов альтернории на жидкой картофельно-глюкозной среде. Слева – изолят G-348-28 (колба №4), справа – изолят ГЛТ-7 (колба №6).

В качестве продуцентов токсина в прототипе взяты 3 агрессивных музейных культуры альтернории из 3-х регионов: Беларуси, Приморья и Приамурья [10]. Нами взяты изоляты местной популяции, дающие зоны некроза на листовых пластинках томата.

Агрессивные изоляты (агрессивность объясняется токсигенностью), использованные Анненковым Б.Г., при выращивании на картофельно-глюкозной среде продуцировали с диффузией в поверхностный слой агаризованной среды фитотоксический продукт красно-бурого цвета (альтернариевую кислоту). В связи с этим процесс наработки токсина можно было контролировать. Эту же способность окрашивать среду в темно-красный цвет отмечали молдавские исследователи для самой агрессивной группы изолятов [5].

Использованные нами изоляты не окрашивали среду в темно-красный цвет. Тем не менее, на основе наших изолятов в полном соответствии с методикой Анненкова Б.Г. был получен ВТК нескольких изолятов и показано его высокое токсическое действие на проростки томатов. ВТК, полученный на жидкой среде, по своему токсическому действию не уступал препарату, полученному на агаризованной среде (таблица).

Действие токсинов проверено на проростках томата, листовых пластинках, молодых растениях томата и перца, побегах томата. Мы наблюдали разную реакцию на токсин сортов томата с разной степенью устойчивости к альтернариозу по развитию проростков из семян, замоченных в токсине, по скорости потери тургора побегами, помещенными в растворы токсина [8,9].

Таблица

Действие токсина альтернории, выращенной на агаризованной и жидкой средах, на проростки томатов

Вариант	% проросших семян	Длина стебелька		Длина корешка	
		(мм)	% к контролю	(мм)	% к контролю
Агаризованная среда	100	12,0±0,6	67,8	39,8±1,9	81,9
Жидкая среда	70,9	3,3±0,3	18,6	5,7±0,3	11,7
Контроль (вода)	100	17,7±0,9	—	48,6±2,1	—

Для получения одного литра жидкой фракции водорастворимого токсического комплекса с использованием агаризованной среды понадобилось бы 74 чашки Петри, 74 посевных блока, 74 операции посева. Предлагаемый нами способ получения ВТК каждую из этих цифр сокращает до 13.

Выводы

Предлагаемая нами модификация способа получения ВТК альтернариин не уступает прототипу по эффективности и обладает рядом преимуществ:

- с 30 до 20 суток сокращается время пребывания культур в термостате;
- увеличивается выход жидкой (и соответственно сухой) фракции ВТК с единицы посевной емкости;
- удешевляется процесс наработки ВТК за счет экономии агара;
- сокращается количество операций при стерилизации среды, при посеве, при культивировании (сокращается операция заливки чашек Петри водой);
- экономится посевной материал;
- уменьшается вероятность загрязнения культуры альтернариин посторонней микрофлорой при культивировании (узкие горла колбочек, закрытые ватно-марлевыми пробками, – и широкий периметр чашек Петри, уменьшение числа операций).

Литература:

1. Гагкаева Т.Ю., Левитин М.М. Альтернариоз - новое опасное заболевание яблони на юге России / *Агро XXI*, 1999, №10, с.12-13.
2. Ганибал Ф.Б., Бильдер И.В., Ули-Маттила Т. Виды рода *Alternaria* на яблоне // *Микология и фитопатология*, 2008, 42 (1), с.18-25.
3. Săvulescu A., Hulea A., Bucur E. Protecția plantelor în sprijinul zonării producției agricole în R.P.R. - București: Editura Academiei Republicii Populare Române, 1960. - 416 p.
4. Кулешов А.В. Макроспориоз томата и разработка мер борьбы с ним в условиях левобережной лесостепи УССР: Автореф. дисс... канд. с.-х. наук. - Киев, 1989. - 20 с.
5. Демидов Е.С., Садькина Е.И., Сайчук А.И. Методы селекции томата на устойчивость к альтернариозу. - Тирасполь, 2006. - 99 с.
6. Rotem J. Sand and dust storms as factors leading to *Alternaria* epidemics on potatoes and tomatoes // *Agric. Meteorol.*, 1965, 2, p.281-288.
7. Rotem Joseph. Fungal Diseases of Potato and Tomato in the Negev Desert // *Plant Diseases/April*, 1981, vol.65, N4, p.315-318.
8. Николаева С., Николаев А., Шубина В., Волощук Л. Влияние состава питательной среды на рост грибов рода *Alternaria* // *Studia Universitatis. Серия: Științe ale Naturii*, 2011, №1 (41), с.117-123.
9. Николаева С., Николаев А., Шубина В., Волощук Л. Некоторые методические подходы к выделению и изучению действия токсических веществ гриба *Alternaria* на проростки томатов // *Studia Universitatis. Серия: Științe ale Naturii*, 2012, №1 (51), с.72-79.
10. Анненков Б.Г. Способ получения токсина микромицета *Alternaria solani* / Патент Российской Федерации Номер 2066347, Классы патента C12N1/14, A01N63/04, C12N1/14, C12R1:645, Номер заявки: 5062634/13, Дата публикации 10.09.1996.

Prezentat la 01.10.2012