

ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ СЕМЯН ВИНОГРАДА НА ФИТОПАТОГЕНЫ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Аркадий НИКОЛАЕВ, Светлана НИКОЛАЕВА, Виктория ШУБИНА

Институт защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы

ACȚIUNEA EXTRACTELOR DIN SEMINȚE DE STRUGURI ASUPRA FITOPATOGENILOR ÎN CONDIȚII *IN VITRO*

Extracte din semințe de struguri prin diferite metode au fost testate privitor la activitatea lor fungicidică și fungistatică contra fitopatogenilor în condiții *in vitro*. A fost demonstrată activitatea fungistatică a extractelor în cazul introducerii lor în mediul de cultivare.

Cuvinte-cheie: *extracte, semințe de struguri, acțiune fungicidică, acțiune fungistatică.*

EFFECT OF EXTRACTS OF GRAPE SEEDS ON PHYTOPATHOGENS *IN VITRO*

Extracts of grape seeds by different procedures were tested on their fungicidal and fungistatical activity under *in vitro* condition. It was demonstrated their fungistatical activity when introduced into cultural medium.

Keywords: *extracts of grape seeds, antifungal and fungistatical effect.*

Молдова – республика виноградарства и виноделия. С одного гектара виноградников после переработки винограда на выжимки приходится примерно 3 тонны, из которых 0,7-1,2 тонны составляют семена. Биологически активные вещества, выделенные из семян винограда, находят применение в медицине, косметологии, кондитерской промышленности [3]. Вполне объясним интерес к экстрактам семян и со стороны представителей других специальностей. Так, по данным Настас Т. и др. [4], биологически активные вещества, экстрагированные из семян винограда, обладают хорошо выраженными инсектицидными, антифидантными и гербицидными свойствами.

В течение ряда лет (2006, 2011 и 2012 гг.) мы выясняли наличие фунгицидного эффекта экстрактов виноградных семян. Нам были предоставлены препараты Эноксил (экстракт этиловым спиртом), Халотанил (экстракт 15% метиловым спиртом), Энотанин (экстракт пропиленгликолем).

Методика исследований

Экстракты виноградных семян испытывали в исходном виде и в разведениях, в качестве контроля брали соответствующие растворители в таком же разведении.

В процессе исследований один из предложенных спиртовых экстрактов проверяли на фитотоксичность по отношению к проросткам и побегам томатов сорта Ранний 83. Препарат Халотанил в разведениях 1:100, 1:500 и 1:1000 (два последних разведения рекомендованы для испытания) проверяли на фитотоксичность по отношению к проросткам и побегам томатов сорта Ранний 83, остро реагирующим на токсин гриба Альтернария. Для каждого варианта, включая воду, брали по 50 семян томатов. Семена на одни сутки замачивали в соответствующих растворах, после чего проращивали во влажных камерах. Учитывали энергию прорастания семян и состояние проростков.

Побеги томата (по 5 штук на вариант) помещали в воду и в тестируемые растворы. В течение недели наблюдали за состоянием побегов.

На примере препарата Энотанин изучали влияние экстракта семян на прорастание конидий Альтернории.

Конидии выращивали на влажной фильтровальной бумаге по методике Allen et al. [1]. Для опытов использовали предметные стекла с лункой, помещенные в большую чашку Петри диаметром 16,5 см. В лунки предметных стекол заливали препарат (или растворитель) в соответствующих разведениях, а затем осторожно, легким прикосновением скальпеля, соскабливали конидии патогена. Все предметные стекла с растворами разной концентрации находились в одной чашке Петри, то есть в равных условиях проведения опыта (рис. 1).

Для наблюдения за прорастанием конидий в первые 5 часов эксперимента предметные стекла просматривали под микроскопом еже часно, а в период наиболее вероятного начала прорастания конидий (спустя 2 часа после начала эксперимента) – каждые 30 минут. Затем предметные стекла просматривали через 24 и 48 часов.

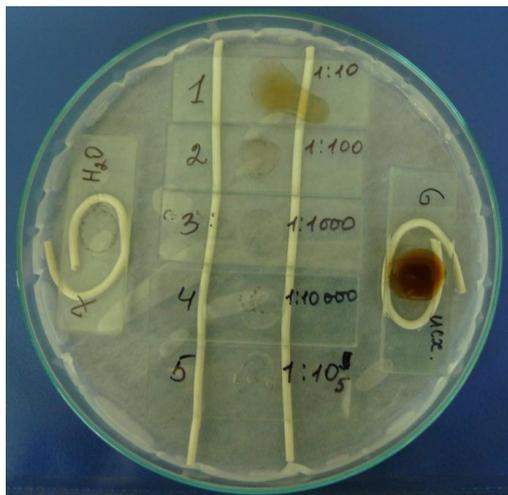


Рис.1. Общий вид чашки Петри, где прорашивали конидии гриба *Alternaria solani*.

В условиях влажной камеры в лунки с растворами разных концентраций были помещены для прорастания конидии патогена.

Основным методом тестирования для всех экстрактов был метод диффузии в агар, который обычно применяется для определения *in vitro* фунгицидной активности химических и биологических препаратов [2]. Тестирование проводили с использованием цилиндриков из нержавеющей стали и лунок. Цилиндрики (диаметр 8 мм) и лунки (диаметр 8 мм) располагали по трафарету на поверхности картофельно-глюкозного агара (20 мл на чашку). В лунки заливали по 0,2 мл, а в цилиндрики – по 0,5 мл растворов соответствующих разведений. Во избежание подтекания растворов из цилиндриков на поверхность среды, перед внесением тестируемых растворов в цилиндрики закапывали по 3 капли расплавленной агаризованной среды. В центр чашки помещали агаровый блок диаметром 8 мм с тест-культурой патогена. Чашки Петри инкубировали в термостате до тех пор, пока колонии патогена не разрастались по всей поверхности чашки. При наличии фунгицидного действия, вокруг цилиндриков или лунок должна образовываться зона отсутствия роста патогена.

В случае Эноксила применяли не только метод диффузии в агар, но и вносили препарат в расплавленную среду или растирали его стеклянным шпателем по всей поверхности среды, а в случае Энотанина погружали диски с патогеном на 20 минут в растворы соответствующих разведений. При таком способе тестирования должно наблюдаться или отсутствие роста патогена или его замедление.

Для этих опытов особенно тщательно подошли к отбору блоков с культурой патогена. В чашки Петри, в которых выращивали газон патогена для блоков, заливали строго определенное (20 мл) количество среды, а блоки вырезали на одинаковом расстоянии от центра чашки Петри. Характер роста гриба, инокулированного в центр чашки Петри, таков, что на равноудаленном от центра участке вырезали блоки патогена одного возраста, то есть максимально выравнивали условия проведения эксперимента. Это хорошо видно на рис.2.

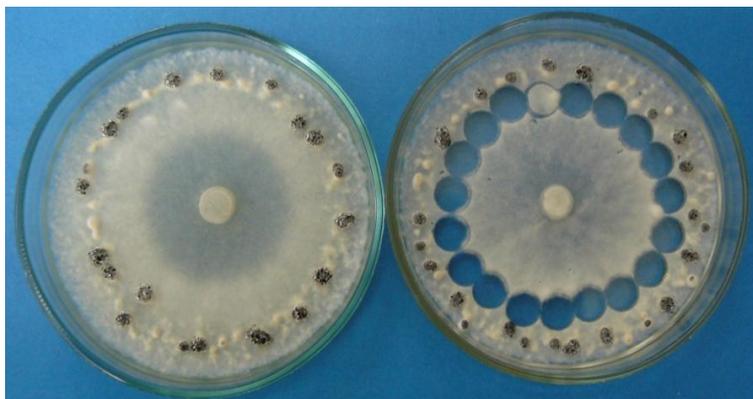


Рис.2. Вид чашки Петри с колонией *Sclerotinia sclerotiorum* до и после извлечения блоков.

В опытах использовали исходный раствор и разведения: 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000.

Большие разведения препарата были взяты с целью проследить возможный стимулирующий эффект низких концентраций препарата.

В качестве тест-объектов использовали следующие фитопатогены:

Sclerotinia sclerotiorum (из огурца) – возбудитель белой гнили;

Botrytis cinerea (из ягод винограда) – возбудитель серой гнили;

Rhizoctonia solani (из семян томата) – один из возбудителей корневых гнилей;

Alternaria solani (из листьев томата) – возбудитель альтернариоза;

Fusarium sp. (из корней земляники и корнеплода сахарной свеклы) – возбудитель фузариозной гнили.

Выбор указанных патогенов обусловлен тем, что они поражают широкий круг экономически значимых растений, выращиваемых в открытом и закрытом грунте. Кроме того, они причиняют серьезные потери сельхозпродукции во время хранения.

В разные годы исследований использовали не менее трех фитопатогенов, часто отдавая предпочтение *S. sclerotiorum* и *Rh. Solani* как быстрорастущим на питательных средах и дающим ровный газон на поверхности среды.

Повторность опытов 3-х – 5-кратная.

Результаты учетов обрабатывали статистически с использованием пакета программ Microsoft Office.

Результаты исследований

При фитотоксической оценке не обнаружено различий ни по энергии прорастания семян, ни по состоянию проростков между опытными и контрольными вариантами.

На побегах томатов в течение недели не выявлено никаких признаков токсикоза, более того, отмечено образование корней на побегах. То есть, Халотанил в разведениях 1:100, 1:500 и 1:1000 нефитотоксичен.

В опыте по изучению действия Энотанина на прорастание конидий Альтернариин получены следующие результаты, отраженные в таблице 1.

Таблица 1

Прорастание конидий Альтернариин в растворах Энотанина и растворителя

№ п/п	Варианты	Время экспозиции														
		1 час		2 часа		3 часа		4 часа		5 часов		24 часа		48 часов		
		Э	Р	Э	Р	Э	Р	Э	Р	Э	Р	Э	Р	Э	Р	
1	Исходный раствор	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1:10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^{*)}	-	- ^{*)}	
3	1:100	-	-	-	-	-	±	-	+	+	+	+	+	+	+	
4	1:1000	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	
5	1:10000	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	
6	1:100000	-	—	-	—	±	—	+	—	+	—	+	—	+	—	
7	Вода	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	

Условные обозначения: Э – Энотанин; Р – растворитель; - – конидии не проросли; + – массовое прорастание конидий, ростковая трубка превышает длину конидий; ± – единичные конидии наклонились, ростковые трубки не превышают длину конидий; — - вариант отсутствовал; -^{*)} – массовое прорастание конидий, но ростковая трубка не превышала ширины конидий.

В первые 2 часа эксперимента ни в одном из вариантов, включая контроль, проросших конидий не обнаружено, что вполне логично, так как для прорастания конидий в благоприятных температурных условиях требуется 2-3 часа. Спустя 3 часа в воде конидии не проросли, а в вариантах с большим разведением и растворителя, и Энотанина появились ростковые трубки. То есть проявился некоторый стимулирующий эффект по сравнению с контролем, причем в растворителе стимуляция отмечена в разведении 1:100, а в растворе Энотанина такого же разведения прорастание конидий не отмечено.

Однако стимулирующий эффект был непродолжительным. После 4-часовой выдержки конидии нормально проросли в воде и больших разведениях и Энотанина, и растворителя. В разведении 1:100 раствор Энотанина тормозил прорастание конидий, а в таком же разведении растворителя конидии проросли. После 5-часовой выдержки в разведениях 1:100 – 1: 100000 конидии проросли и в воде, и в растворах Энотанина, и в растворителе. После 48-часовой выдержки конидии не проросли в исходном растворе Энотанина и растворителе, а в разведении 1:10 не проросли в растворе Энотанина, а образовали небольшие ростковые трубки в 10-кратноразбавленном пропиленгликоле (90% проросших конидий, но их ростковые трубки не превышали ширину конидий или равнялись ей).

Таким образом, можно отметить, что в течение длительного времени (более 4 часов) Энотанин сдерживал прорастание конидий только в исходном препарате и при 10-кратном разведении.

Раствор Энотанина влиял на смачиваемость конидий, которая в воде была хуже, чем в растворе Энотанина. В каплях раствора Энотанина (всех разведений) конидии распределялись по всей поверхности раствора, а в воде они скапливались по периметру капли. Отмечено также, что цепочки конидий сохранялись во всех вариантах кроме исходного раствора. В исходном растворе не было обнаружено ни одной цепочки конидий: все конидии располагались отдельно друг от друга или кучками; в разведении 1:10 этого явления уже не отмечено (рис.3 и 4).

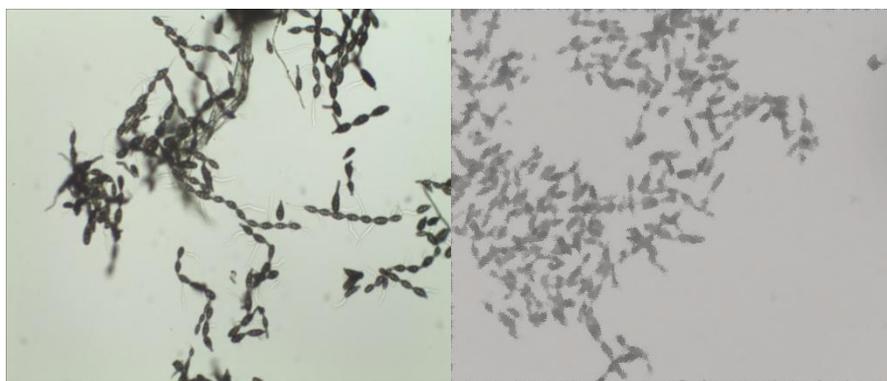


Рис.3. Внешний вид конидий в цепочках с ростковыми трубками в воде.

Рис.4. Конидии без цепочек в исходном растворе Энотанина.

Использование метода диффузии в агар не показало четкого фунгицидного или фунгистатического эффекта растворов Энотанина. На рис.5 представлен результат действия Энотанина на культуру *Fusarium sp.* (из земляники). Только в позициях 1 и 2 (в первой несколько больше) прослеживалось некоторое торможение роста патогена, но оно было очень кратковременным.

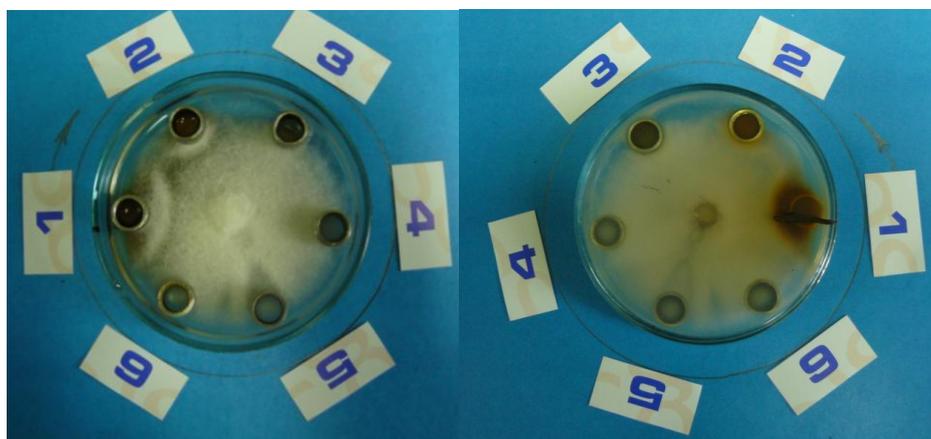


Рис.5. Действие растворов Энотанина на культуру *Fusarium sp.*
Слева – вид чашки сверху; справа – со дна чашки.

Условные обозначения: 1 – разведение 1:10; 2 – разведение 1:100; 3 – разведение 1:1000;
4 – разведение 1:10000; 5 – разведение 1:100000; 6 – вода.

На рис.6 показан результат действия растворов Энотанина на патоген *Sclerotinia sclerotiorum*. И в данном случае нет стерильной зоны вокруг лунок, то есть мы не отмечаем фунгицидного действия Энотанина на рост гриба.

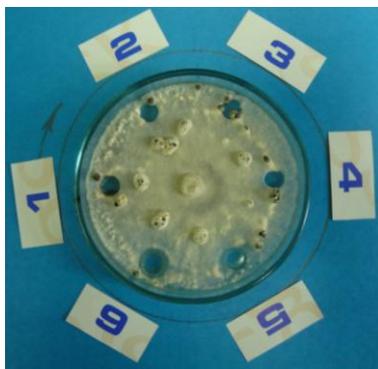


Рис.6. Действие растворов Энотанина на культуру *Sclerotinia sclerotiorum*.

Условные обозначения: 1 – разведение 1:10; 2 – разведение 1:100; 3 – разведение 1:1000;
4 – разведение 1:10000; 5 – разведение 1:100000; 6 – вода.

Логичным является отсутствие фунгицидного действия растворителя пропиленгликоля в разных разведениях (в лунках по 0,2 мл раствора), тест-культура – склеротиния.

Таким образом, метод диффузии в агар не показал выраженного фунгицидного действия Энотанина и в исходном виде, и в разведениях.

Для сравнения приведем результат испытания действия Энотанина и бактерий-антагонистов на гриб *Fusarium sp.* (рис.7). Просматривается наличие стерильных зон в позициях 2, 3, 5 и 6 (блоки бактерий-антагонистов с выраженным антифунгальным действием) и отсутствие их в позициях 1 и 4. Колония патогена приобрела вытянутую форму, максимально приближенную к месту внесения Энотанина.

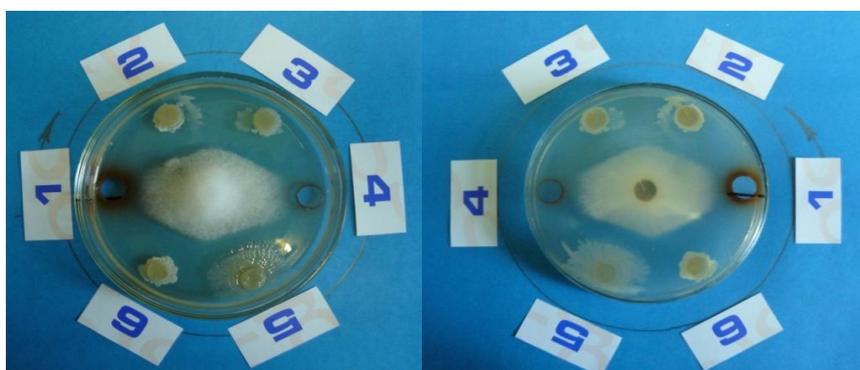


Рис.7. Сравнительное действие Энотанина и бактерий-антагонистов на *Fusarium sp.*
(Вид сверху чашки (слева) и с подложки колоний (справа)).

Условные обозначения: 1 – исходный раствор Энотанина; 4 – Энотанин в разведении 1 : 10;
2,3,5 и 6 – блоки разных культур бактерий-антагонистов.

При непосредственном контакте патогена с растворами Энотанина или растворителя (замачивание блоков с культурой склеротинии в течение 20 минут в разных концентрациях Энотанина) не выявило какого-либо действия на патоген (рис.8 а,б).

«Лысинка» непосредственно вокруг блока патогена характерна для роста патогена на агаризованной среде (рис.2).

Только в исходном растворе Энотанина (без разведения) в отношении *S. sclerotiorum* при использовании метода диффузии в агар нами был отмечен очень незначительный, но стойкий фунгистатический эффект, сохранявшийся около месяца. В разведении 1:1 этот эффект был едва заметен. В отношении *B. Cinerea* и *R. solani* не обнаружено ни фунгицидного, ни фунгистатического действия.

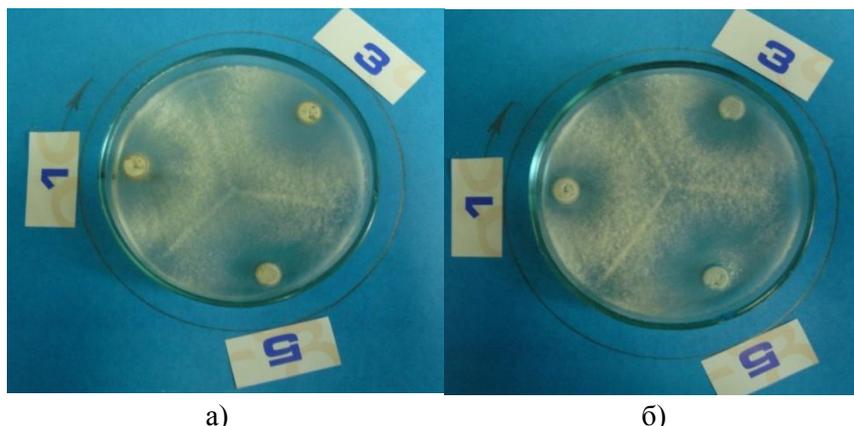


Рис.8 (а, б). Результат непосредственного контакта мицелия *Sclerotinia sclerotiorum* с растворами Энотанина.

Условные обозначения: 1 – разведение 1:10; 3 – 1:100; 5 – 1:1000;
а) растворитель, б) Энотанин.

В чашках Петри с добавлением Эноксила в среду отмечено сдерживающее влияние экстракта на формирование склероциев *S. sclerotiorum*. Так, в опытной чашке вдоль стенок только начинают образовываться белые уплотнения мицелия, а в контрольной (0,1 мл растворителя) уже сформировались черные склероции, то есть налицо фунгистатическое действие Эноксила.

В то же время видно, что этот сдерживающий эффект отмечается лишь при высоких концентрациях Эноксила. Он непродолжителен, нестабилен, фунгицидного действия нет. Сравнивая чашки Петри с выросшим на них газоном *R. Solani*, мы отмечали (фото не приводится), что в опытной чашке (0,1 мл Эноксила в среде) газон менее плотный, чем в контрольной (среда с 0,1 мл спирта).

При внесении экстракта в объем среды в большей степени, чем при внесении в лунки или цилиндрики, наблюдался фунгистатический эффект.

Из сравнения результатов линейного роста (таблица 2) реакции трех патогенов на количество Эноксила, введенного в питательную среду, видно, что из двух быстрорастущих патогенов (*S. sclerotiorum*, *R. solani*) *Rhizoctonia solani* в большей степени реагировал на содержание Эноксила в среде.

Таблица 2

Действие Эноксила на линейный рост *S. sclerotiorum*, *R. solani* и *A. solani*

Объем Эноксила (опыт) и растворителя (контроль-1) в среде, мл/чашку	Радиус трехсуточной колонии патогена (мм)					
	<i>S. sclerotiorum</i>		<i>R. solani</i>		<i>A. solani</i>	
	Опыт	Контроль-1	Опыт	Котроль-1	Опыт	Контроль-1
0,5	32,3±0,3	34,0±1,5	15,0±0,5	39,3±0,7	14,0±1,0	16,7±0,3
0,3	36,7±1,7	35,5±1,5	23,3±0,8	38,0±2,0	13,0±0	15,0±2,0
0,1	36,0±0,6	36,0±0	31,3±2,3	41,0±1,0	16,0±0,6	15,5±0,5
Контроль-2 (среда без добавок)	33,0±0		43,0±2,0		14,0±1,0	

Так, радиус колонии ризоктонии в опыте в 1,3-2,6 раза меньше, чем в контроле, тогда как в случае склеротинии показатели практически одинаковы. При 0,5 мл Эноксила в среде угнетение линейного роста ризоктонии в сравнении с контролем составило 2,6 раза (на 24 мм), при 0,3 мл – 1,6 раза (на 14,7 мм), при 0,1 мл – 1,3 раза (на 9,7 мм), то есть с уменьшением концентрации экстракта в среде его фунгистатическое действие снижалось.

Выводы

1. Препарат Халотанил в рекомендуемых разведениях 1:100 и 1:500 нефитотоксичен по отношению к проросткам и побегам томата сорта Ранний 83.
2. Исходный раствор Энотанина и растворитель в разведениях 1:10 сдерживали прорастание конидий *Альтернрии* более 2-х суток. При больших разведениях конидии прорастали после двухчасовой экспозиции.
3. Метод диффузии в агар при тестировании спиртовых экстрактов виноградных семян не обнаруживал образования зон отсутствия роста тест-культур. Для тестирования экстрактов более подходящим является способ введения экстрактов в питательную среду.
4. Результаты тестирования зависят от тест-культуры и объема экстракта в питательной среде. Исследуемые экстракты сдерживали рост патогенов по типу фунгистатического действия. Фунгицидный эффект ни по одному из экстрактов не обнаружен.

Библиография:

1. ALLEN, S.J., BROWN, J.F., KOCHMAN, J.K. Production of inoculum and field assessment of *Alternaria helianthi* on sunflower. In: *Plant disease*, 1983, v.67, p. 665-668.
2. ЕГОРОВ, Н.Е. *Основы учения об антибиотиках*. Москва: Высшая школа, 1969. 479 с.
3. ЗУЕВА, Т.А. *Разработка малоотходной технологии переработки семян винограда и получение на их основе лекарственных и косметических средств*: Автореф. канд. дисс. Пятигорск, 2004.
4. НАСТАС, Т., ЕЛИСОВЕЦКАЯ, Д., ГЛАДКАЯ, А., ОДОБЕСКУ, В., ХАРГЕЛ, П. Экстракт из семян *Vitisvinifera* в защите растений. В: *Биологическая защита растений – основа стабилизации экосистем*. Материалы докладов Международной научно-практической конференции, ВНИИБЗР, Краснодар, 2008, вып.5, с.363-365.

Prezentat la 07.10.2013