

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ ИЗОЛЯТОВ ГРИБОВ РОДОВ *ALTERNARIA*, *BIPOLARIS*, *ULOCLADIUM* НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Н.М. Арасланова,

кандидат сельскохозяйственных наук

М.В. Ивсбор,

кандидат сельскохозяйственных наук

С.Л. Саукова,

кандидат биологических наук

Т.С. Антонова,

доктор биологических наук

С.А. Рамазанова,

кандидат биологических наук

ГНУ ВНИИМК Россельхозакадемии

Россия, г. Краснодар, ул. Филатова, д. 17

тел.: (861)2758653, e-mail: araslanova-nina@mail.ru

Изучали токсигенность грибов рода *Alternaria*, *Bipolaris* spp. и *Ulocladium* sp. по влиянию культурального фильтрата их изолятов на прорастающие семена гибридов подсолнечника Кубанский 930 и Меркурий. Изоляты грибов получены из листьев, стеблей и семян подсолнечника, собранных в

Краснодарском и Ставропольском краях. Высокой токсичностью для проростков подсолнечника обладали изоляты *B. australiensis*, *Bipolaris* sp., один изолят *A. tenuissima*, а также представитель комплекса видов *A. infectoria*: количество проростков с ненормальным развитием или отсутствием корней варьировало от 58 до 100 %. Культуральные фильтраты *A. helianthi*, *A. helianthiinficiens*, *Ulocladium* sp. и большинства изолятов *A. tenuissima* на рост и развитие проростков обоих гибридов не повлияли.

The effect of culture filtrates of fungal isolates of species *Alternaria*, *Bipolaris*, *Ulocladium* on the seed germination and seedling growth of sunflower.

Araslanova N.M., Iwebor M.V., Saukova S.L., Antonova T.S., Ramazanova S.A..

The article presents the study of the toxigenicity of fungi of genus *Alternaria*, *Bipolaris* spp. and *Ulocladium* sp. according to the influence of culture filtrates of their isolates on the germinating seeds of sunflower hybrids Kubansky 930 and Mercury. The fungi isolates were obtained from the leaves, stems and seeds of sunflower of the Krasnodar and Stavropol regions. The high toxicity for sunflower seedlings had the isolates of *B. australiensis*, *Bipolaris* sp., one isolate of *A. tenuissima*, and the specimen of the species complex *A. infectoria*: the number of seedlings with the abnormal development or absence of roots ranged from 58 to 100 %. The culture filtrates of *A. helianthi*, *A. helianthiinficiens*, *Ulocladium* sp. and the most isolates of *A. tenuissima* did not affect the growth and development of seedlings of both hybrids.

Ключевые слова: подсолнечник, токсичность, *Alternaria*, вид, изолят, культуральный фильтрат, рост, длина, проростки, гипокотиль, корень

УДК 633.854.78:632.938

Введение. Альтернариоз подсолнечника – довольно частое явление. Возбудители – грибы рода *Alternaria* – поражают в основном листья, стебель, корзинку и семена, вследствие чего снижаются урожай и качество семян. Сведения о высокой вредности грибов рода *Alternaria* встречаются в отечественных и зарубежных публикациях. Например, листовая пятнистость подсолнечника в Греции, вызываемая *A. alternata*, снижала количество семян и их массу на 16–65 и 15–79 % соответственно [1]. В Аргентине потери

урожая семян от альтернариоза достигали 60–90 % [2]. В России заражённость семян подсолнечника грибами рода *Alternaria* в зависимости от погодных условий может достигать 100 % и приводить к загниванию центрального корня и недоразвитию корневой системы в целом, следствием чего при неблагоприятных условиях может быть даже гибель растений [3–5].

Таксономическая ревизия грибов этого рода показала, что подсолнечник поражают 4 специализированных патогенных вида *Alternaria* (из которых в России выявлено 2) и две группы полусапротрофных видов. Часто встречаются на семенах и листьях мелкоспоровые токсигенные виды, среди которых преобладает *A. tenuissima*. По несколько изолятов *A. arborescens* и *A. alternata* было выявлено в образцах семян из европейской части РФ. *A. alternata* был также обнаружен на подсолнечнике в ряде стран Европы, Азии и Южной Америки в качестве возбудителя болезни [6].

Молекулярные исследования тёмноокрашенных гифомицетов, к которым относятся роды *Alternaria*, *Bipolaris*, *Ulocladium*, показали некоторое несоответствие систематики данной группы грибов с точки зрения филогении. На филогенетическом древе виды *Alternaria* чередуются с видами *Bipolaris*, *Ulocladium* и других родов. Поэтому целесообразнее грибы близкие по показателям родства, считать альтернариоидными гифомицетами [6].

По данным исследований, проведённых в лаборатории иммунитета и электрофореза ВНИИМК, на юге России на подсолнечнике встречаются различающиеся по экологическим особенностям виды рода *Alternaria*. Из них специализированные крупноспоровые – *A. helianthi*, *A. helianthiinficiens* и *A. protenta*; мелкоспоровые неспециализированные – *A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. arborescens* и комплекс *A. infectoria*; родственные им –

Stemphylium sp. и *Ulocladium* sp. Кроме того, из семян подсолнечника впервые в России был выделен еще один темноокрашенный гифомицет – *Bipolaris australiensis* [7].

Фитотоксичные метаболиты патогенных грибов – один из объектов изучения многими исследователями. Определение степени токсичности культуральной жидкости гриба является одним из биологических методов изучения его патогенных свойств. Метаболиты используют в качестве селективирующих агентов для клеточной селекции устойчивых растений сельскохозяйственных культур к возбудителям грибных болезней [8]. Токсичность культурального фильтрата патогенных грибов для прорастающих семян подсолнечника может быть критерием оценки степени их агрессивности [9].

Виды *Alternaria* различаются по способности продуцировать токсины. Анализ фитотоксичности культуральной жидкости видов *Alternaria* при инокуляции листьев 10-дневных растений пшеницы и ячменя в контролируемых условиях показал, что среди мелкоспоровых видов *Alternaria* наиболее токсигенными являлись виды *A. tenuissima* и *A. alternata*. Около половины изолятов комплекса видов *A. infectoria* обладали умеренной токсигенностью, 6 % изолятов были высоко токсигенны, остальные – нетоксигенны. Выявлены высоко токсигенные изоляты среди видов *S. vesicarium* и *U. atrum*. Все исследованные изоляты нескольких видов, в том числе *A. alternata*, *A. tenuissima* и комплекса *A. infectoria*, оказались не патогенными для злаков [10].

Цель наших исследований – сравнить токсичность культуральных фильтратов у изолятов разных видов рода *Alternaria*, а также близкородственных ему *Bipolaris* и *Ulocladium*, выделенных из листьев, стебля и семян подсолнечника для определения их патогенных свойств.

Материалы и методы. Использовали общепринятые методики экспериментальной микологии. Моноконициальные изоляты культивировали в пластиковых чашках Петри на картофельно-морковном агаре (КМА) при 25 °С под лампами дневного света (12-часовой фотопериод). Идентификацию видов тёмноокрашенных гифомицетов, включая *Alternaria*, вели по определителю E.G. Simmons (2007) [11] и с помощью ключа, составленного Ф.Б. Ганнибалом (2011) [6], начиная с 3-х суток по 10-е (и позже), с помощью микроскопа анализировали габитус спороношения (наличие или отсутствие цепочек спор, их длину и тип ветвления), размер и форму конидий. Для получения культурального фильтрата блок с культурой изолята помещали на жидкую среду Чапека и выращивали 14 дней при постоянной температуре 25 °С. После чего фильтровали, освобождая от мицелия и конидий, и разливали по 20 мл в чашки Петри. Семена двух гибридов подсолнечника Кубанский 930 и Меркурий, предварительно промытые в течение часа под проточной водой, закладывали в культуральный фильтрат на 24 ч. Опыт проводили в трёх повторностях, по 100 семян в каждой. После воздействия культурального фильтрата семечки раскладывали на влажную фильтровальную бумагу по ГОСТ Р 523252005, свёртывали её в рулоны и выращивали 5 дней при температуре 25 °С. В качестве контроля использовали среду Чапека и воду. Учитывали количество сгнивших и проросших семян, измеряли длину проростка и центрального корня. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа.

В таблице 1 перечислены изоляты грибов альтернариоидных гифомицетов, их родовая и видовая принадлежность, место сбора, генотип и орган хозяина, из которого они были выделены.

Происхождение и видовая принадлежность изолятов родов *Alternaria*, *Bipolaris*, *Ulocladium*

Изолят	Род, вид	Происхождение				
		район сбора	год сбора	генотип хозяина	орган хозяина	
1	<i>A. helianthii-ficiens</i> E.G. Simmons, Walcz et R.G. Roberts	Краснодар, поля ВНИИМК	2011	Неизвестен	Лист	
2	<i>Alternariaster helianthi</i> (Hansford)			Неизвестен	Стебель	
3	Tubaki et Nishihara	Крыловский	2012	СПК	Семена	
4	<i>Bipolaris australiensis</i> (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama	ОСХ «Березанское»	2010	ЦМС Куб 93		
5	<i>Bipolaris</i> sp.	Краснодар, поля ВНИИМК	2011	Неизвестен		
6	<i>Ulocladium</i> sp.	теплица ВНИИМК	2012	Неизвестен		
7	<i>A. tenuissima</i>	Краснодар, поля ВНИИМК	2011	Неизвестен	Лист	
8	<i>A. tenuissima</i>	Ставропольский край	2012	Флагман	Семена	
9	<i>A. tenuissima</i>			ФГУП «Березанское»		ВК-653
10	<i>A. tenuissima</i>					ВД-541
11	<i>A. alternata</i> ¹					
12	<i>A. infectoria</i> ¹					

¹ – '*A. alternata*' и '*A. infectoria*' означают здесь и далее комплексы видов, включающие различные вариации

Результаты и обсуждение. Из литературных источников известно, что некоторые виды *Alternaria* (в частности, *A. alternata*, *A. arborescens* и *A. tenuissima*) являются продуцентами нескольких мико- и фитотоксинов в различных комбинациях. По мнению Андерсена (2001, 2002), состав их практически одинаков и зависит в большей степени от штамма, чем от вида гриба [12; 13]. Наиболее распространенные токсины у перечисленных видов относятся к трем химическим группам: дибензо-а-пироны, включающие альтернариол, монометилловый эфир альтернариола, альтенуен, тентоксин; тетрамины – тенуазоновая кислота; производные перилена – альтертоксин I, II и III [15; 16]. Для большинства видов '*A. infectoria*' характерен ряд метаболитов, являющихся структурными аналогами токсинов, продуцируемых видами родов

Stemphylium и *Ulocladium* [16]. Пока неизвестна роль биологической активности этих веществ в патогенезе.

Поскольку методы выделения и очистки токсинов, продуцируемых изолятами рода *Alternaria* и близкородственных ему *Bipolaris*, *Ulocladium*, очень сложны и трудоёмки, мы использовали культуральный фильтрат, состав которого включает все фитотоксические метаболиты.

Для сравнения токсигенности изолятов разных видов *Alternaria*, *Bipolaris* и *Ulocladium*, выделенных из листьев, стебля и семян подсолнечника, исследовали влияние культуральных фильтратов на прорастание семян двух гибридов подсолнечника.

Полного ингибирования прорастания семян гибридов подсолнечника после воздействия культуральных фильтратов изученных изолятов не наблюдалось. Количество непроросших семян обоих гибридов во всех вариантах было незначительным и не различалось с контролем – водой. Эти данные мы не приводим, поскольку допускаем, что такой результат может быть следствием влияния других патогенов. Метаболиты всех изолятов, кроме № 6, подавляли развитие корней в большей степени, чем гипокотилей. На рисунках 2, 3 показаны проростки, у которых наблюдалось либо полное отсутствие корней, либо отсутствие только центрального корня. Эти данные согласуются с результатами Федорович с соавторами [17].



Рисунок 1 – Нормально развитые проростки (контроль – вода)



а



б

Рисунок 2 – Ненормально развитые проростки подсолнечника после воздействия культурального фильтрата изолята № 4 – *Bipolaris australiensis* (а) и изолята № 7 – *A. tenuissima* (б)



а



б



в

Рисунок 3 – Полное отсутствие корней у проростков подсолнечника после воздействия культуральных фильтратов:

а – № 8 – *A. tenuissima*,

б – № 5 – *Bipolaris* sp.,

в – № 12 – '*A. infectoria*'

В таблице 2 представлены средние из трёх повторностей данные по количеству ненормально развитых проростков после воздействия на семена культурального фильтрата изолятов грибов альтернариоидных гифомицетов.

Таблица 2

Влияние воздействия культуральных фильтратов изолятов родов *Alternaria*, *Bipolaris*, *Ulocladium* на прорастание гибридов подсолнечника

№ изолята	Род, вид	Количество проростков с ненормальным* развитием, шт.	
		Кубанский 930	Меркурий
1	<i>A. helianthiinficiens</i> E.G. Simmons, Walcz et R.G. Roberts	20	14
2	<i>Alternariaster helianthi</i> (Hansford) Tubaki et Nishihara	38	22
3	<i>Alternariaster helianthi</i> (Hansford) Tubaki et Nishihara	26	30
4	<i>Bipolaris australiensis</i> (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama	96	100
5	<i>Bipolaris</i> sp.	46	52
6	<i>Ulocladium</i> sp.	4	10
7	<i>A. tenuissima</i>	96	98
8	<i>A. tenuissima</i>	36	48
9	<i>A. tenuissima</i>	20	16
10	<i>A. tenuissima</i>	30	34
11	<i>A. alternata</i> '	22	18
12	<i>A. infectoria</i> '	58	72
Контроль – среда Чапека		2	3
Контроль – вода		0	0
НСР ₀₅		13,4	12,8

Примечание: *к ненормально развитым отнесли проростки, у которых сгнил или отсутствовал центральный корень (рис. 2, 3)

Данные демонстрируют как межвидовые, так и внутривидовые различия по токсигенности изолятов. Наиболее токсигенными для проростков подсолнечника обоих гибридов были изоляты № 4 – *B. australiensis* и № 7 – *A. tenuissima*. Количество проростков с ненормально развитым корнем варьировало от 46 до 100 % у изолятов *B. australiensis* и от 16 до 98 % – у *A. tenuissima*, что существенно превышало контрольные варианты. Различия между гибридами были в пределах ошибки опыта.

Культуральные фильтраты представителей разных видов: изолят 4 – *B. aust-*

raliensis, 7 – *A. tenuissima*, 12 – комплекс видов '*A. infectoria*', были токсичными для прорастания семян подсолнечника. Различия по токсичности культуральных фильтратов наблюдались между четырьмя изолятами внутри вида *A. tenuissima*. Токсигенность изолята, также как и вида, не зависела от органа подсолнечника, из которого он был выделен. Так, изолят № 7, отличившийся высокой токсичностью культурального фильтрата, был выделен из поражённого участка листа, тогда как остальные изоляты вида *A. tenuissima* – из семян. Метаболиты изолята № 6, принадлежащего *Ulocladium* sp., не оказали существенного влияния на развитие корней, количество ненормально развитых проростков было на уровне контроля.

Таблица 3

Влияние воздействия культуральных фильтратов изолятов родов *Alternaria*, *Bipolaris*, *Ulocladium* на длину корня и гипокотилиа гибридов подсолнечника

№ изолята	Род, вид	Кубанский 930		Меркурий	
		Длина, см			
		корня	гипокотилиа	корня	гипокотилиа
1	<i>A. helianthiinficiens</i> E.G. Simmons, Walcz et R.G. Roberts	8,2	4,9	9,1	2,9
2	<i>Alternariaster helianthi</i> (Hansford) Tubaki et Nishihara	8,8	5,4	6,2	5,7
3	<i>Alternariaster helianthi</i> (Hansford) Tubaki et Nishihara	9,0	5,6	7,8	5,0
4	<i>Bipolaris australiensis</i> (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama	-	3,5	-	3,8
5	<i>Bipolaris</i> sp.	4,1	4,6	3,3	4,8
6	<i>Ulocladium</i> sp.	9,2	4,6	8,7	3,5
7	<i>A. tenuissima</i>	-	4,6	-	4,5
8	<i>A. tenuissima</i>	6,2	2,8	3,1	2,8
9	<i>A. tenuissima</i>	7,7	3,0	7,4	3,2
10	<i>A. tenuissima</i>	9,8	4,2	9,2	3,9
11	<i>A. alternata</i> '	10,0	4,1	10,3	3,4
12	<i>A. infectoria</i> '	3,7	2,0	4,0	2,3
Контроль – среда Чапека		10,2	4,4	4,6	4,0
Контроль – вода		9,6	4,2	10,1	3,7
НСР ₀₅		2,3	0,9	2,3	0,3

В таблице 3 приведены усреднённые данные по размерам корня и гипокотилиа после воздействия культуральными фильтратами исследуемых изолятов на

прорастающие семена. Угнетающее действие оказали изоляты № 4, 7, 5 и 12. Длина корня и гипокотыля в этих вариантах была существенно меньше контрольных (на 5 %-ном уровне значимости).

Культуральные фильтраты других изолятов грибов не повлияли на рост и развитие проростков обоих гибридов (табл. 3).

Таким образом, нашими исследованиями установлены как межвидовые различия по токсигенности изученных изолятов альтернарии, так и внутри вида. Культуральные фильтраты некоторых видов родов *Alternaria*, *Bipolaris*, *Ulocladium* в разной степени угнетали рост и развитие корней и гипокотыля у проростков гибридов подсолнечника. Особенно чувствительными к метаболитам были корни. Отмечены различия по степени токсичности культуральных фильтратов у изолятов внутри вида *A. tenuissima*. Выделены изоляты с высокой фитотоксичностью у видов *Bipolaris australiensis*, *Bipolaris* sp., *A. tenuissima*. Высокую токсичность проявил также изолят – представитель комплекса видов *A. infectoria*. Токсигенность изолятов грибов *Alternaria*, *Bipolaris*, *Ulocladium* не зависела от органов растения подсолнечника, из которых они были выделены.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края, грант № 13-04-96586.

Список литературы

1. *Lagopodi A.L., Thanassoulopoulos C.C.* Effect of a leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* on yield of sunflower in Greece // *Plant Dis.* – 1998. – Vol. 82 (1). – P. 41–44.
2. *Vrandecic K., Jurkovic D., Duvnjak T., Postic J.* Susceibility of sunflower breeding material to *Alternaria* sp. // *Proceedings 18th international Sunflower conference Mar Del Plata, Argentina Febr.* – 27-March 1, 2012. – 01 VC-34. – P. 338–341.
3. *Мурадасилова Н.В., Пивень В.Т.* Симптомы поражения альтернариозом центрального корня проростка подсолнечника // *Защита и карантин растений.* – 2006. – № 2. – С. 52–53.
4. *Шуляк И.И.* Патогенная микофлора семян подсолнечника в условиях Краснодарского края // *Защита и карантин растений.* – 2009. – № 2. – С. 23–25.
5. *Лукомец В.М., Пивень В.Т., Тишков Н.М.* Болезни подсолнечника // *Агрорус.* – 2011. – 210 с.
6. *Ганнибал Ф.Б.* Видовой состав, систематика и география возбудителей альтернариозов подсолнечника в России // *Вестник защиты растений.* – 2011. – № 1. – С. 13–19.
7. *Ивебор М.В., Антонова Т.С., Саукова С.Л.* К вопросу о возбудителях альтернариоза подсолнечника // *Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК.* – Краснодар, 2013. – Вып. 153–154. – С. 90–100.
8. *Берестецкий О.А.* Изучение фитотоксических свойств микроскопических грибов // *Методы экспериментальной микологии.* – Киев: Наукова думка, 1982. – С. 321–333.
9. *Арасланова Н.М., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С.* Внутривидовая дифференциация агрессивных изолятов *Phomopsis helianthi* по токсичности выделений гриба для проростков подсолнечника // *Межд. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей».* – Одесса, 2007. – С. 46.
10. *Ганнибал, Ф.Б.* Токсигенность и патогенность грибов рода *Alternaria* для злаков // *Лаборатория микологии и фитопатологии им. А.А. Ячевского ВИЗР. История и современность / Под ред. А.П. Дмитриева.* – СПб. 2007. – С. 82–93.
11. *Simmons E.G.* *Alternaria. An Identification Manual.* – Utrecht: CBS. – 2007. – 775 p.
12. *Andersen B., Kroger E., Roberts R.G.* Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes* // *Mycol. Res.* – 2001. – Vol. 105. – N 3. – P. 291–299.
13. *Andersen B., Kroger E., Roberts R.G.* Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-group // *Mycol. Res.* – 2002. – Vol. 106. – N 2. – P. 170–182.
14. *Andersen B., Svendsen A., Rasmussen L.A.* Associated field mycobiota on malt barley // *Can J. Bot.* – 1996. – Vol. 74. – N 6. – P. 854–858.
15. *Andersen B., Thrane U.* Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics // *Can. J. Microbiol.* – 1996. – Vol. 42. – P. 425–433.
16. *Coulombe R.A.* *Alternaria* toxins // *Mycotoxins and phytoalexins / Eds R.P. Sharma, D.K. Salunkhe. Boca Ration: CPC Press, 1991.* – P. 425–433.
17. *Федорович М.Н., Шашко Ю.К., Шашко М.Н., Поликсенова В.Д.* Токсичность культуральных фильтратов мелкоспоровых видов рода *Alternaria* Nees // *Вестник БГУ.* – 2006. – Сер. 2. – № 2. – С. 36–39.