**Введение**

Томаты принадлежат к важным овощным культурам, они поражаются многими заболеваниями, которые ведут к снижению урожая, и одним из наиболее опасных заболеваний является ранняя пятнистость (альтернариоз) томатов. Эта болезнь, вызываемая грибами Alternaria solani (Sorauer (1896)) и, Аlternaria alternata f. sp. lycopersici (Grogan, Kimble & Misaghi 1975), является одной из наиболее распространенных заболеваний томатов. Ранняя пятнистость может встречаться в различных почвенно-климатических условиях, но наиболее сильно проявляется в областях с обильной росой, дождями и высокой влажностью. У томатов заболевание вызывает увядание рассады, затем гниль шейки, повреждения листьев, стеблей и гниль плодов. Заражение растений может привести к полной потере урожая. Ранняя пятнистость увеличивает восприимчивость растений к другим инфекциям, путем уменьшения фотосинтетической поверхности листа, увеличения дисбаланса между питательным требованием плодов и поставкой питательных веществ листьями [2].

Поэтому на сегодняшний день борьба с альтернариозом томатов является актуальной.

Для контроля заболевания используют устойчивые сорта, а также обработку растений фунгицидами. В настоящее время используемые фунгициды утрачивают свою активность и вызывают экологические проблемы (загрязнение окружающей среды). Поэтому целесообразнее использовать наиболее современные классы фунгицидов, которые не токсичны и основаны на возможности индукции в растениях системной устойчивости.

На сегодня в научной литературе отсутствуют однозначные данные о возможности индукции системной устойчивости у растений томата к ранней пятнистости, в связи с чем данный вопрос имеет большое практическое и теоретическое значение.

Целью работы было отработка методов культивирования возбудителя ранней пятнистости и оценки устойчивости растений к заболеванию. На данном этапе были поставлены такие задачи:

- изучить научную литературу по данному вопросу;

- выделить возбудителя заболевания в чистую культуру;

- отработать методы оценки устойчивости растений томатов к ранней пятнистости.

гриб токсины инокуляция растение

**1. Обзор литературы**

**1.1 Биологические особенности возбудителей ранней пятнистости Alternaria solani и Alternaria alternata f. sp. lycopersici**

A. solani впервые описали в 1896 (Ellis & Martin) Sorauer [9].

Гриб принадлежит к отделу Ascomycota, подотделу Pezizomycotina, классу Dothideomycetes, подклассу Pleosporomycetidae, порядоку Pleosporales, семейству Pleosporaceae [Index]. А. solani принадлежит к многоспоровой группе в пределах рода Alternaria, которая характеризуется отдельными конидиями, иногда по 2 в цепочке. Конидиеносцы до 110 мкм длиной, 6-10 мкм толщиной. Конидии А. solani прямые, слегка изогнутые, обратно-булавовидные, удлиненно-овальные, клювоподобные, суживающиеся в длинный акрогенный отросток одинаковый по длине или, чаще, длиннее тела конидии. Отростков может быть 2-3. Окраска конидий светло-зеленоватая; старея конидии становятся темно-желтыми, бурыми, с 9-11 поперечными и 1-3 продольными перегородками. Тела конидий – 62-235 Ч 13,5-27 мк, по другим данным – 90-140 Ч 12-20 мк, 104-200 Ч 15-25 мк; размеры акрогенного выроста – 40,5-202 Ч 2,5-5 мк. Общая длина конидий – 120-130 мк, иногда до 150-300 мк [2].

А. solani явялется некротрофным патогенном. Она не имеет известной половой стадии или перезимовывающих спор [8].

Цикл развития простой, включающий в себя грибницу и бесполое конидиальное спороношение. Если спора находится в семени, гриб может инфицировать проросток сразу после того, как семя проросло. В других случаях споры переносятся ветром на растение, где начинается инфицирование [18].

При достаточной влажности и температуре (20-25 °С) конидия прорастает и формирует несколько ростовых трубок. Они впоследствии проникают в эпидермальную клетку хозяина непосредственно, используя апперессорию, или они проникают через раны. Проникновение может происходить, при температуре между 10 и 25 °С. Колонизация хозяина облегчена благодаря использованию ферментов, которые разрушают клеточную стенку хозяина и благодаря токсинам, которые убивают клетки хозяина и позволяют патогену получать питательные вещества из мертвых клеток. Повреждения становятся видимыми через 2-3 дня после инфицирования, продукция спор начинается через 3-5 дней [3].

Зимует гриб на послеуборочных остатках вегетативной массы в виде мицелия или конидий, а иногда и в сухих остатках пораженных плодов. Относительно короткий цикл болезни делает возможным полицикличность инфекции [3].

Жизненный цикл А. solani включает как почвенную и семенную стадии, так и стадию переноса по воздуху, поэтому патоген трудно контролировать посредством севооборота и очистки [3].

A. alternata f. sp. lycopersici впервые описали в 1975 г. Grogan, Kimble и Misaghi

Гриб относится к отделу Ascomycota, подотделу Pezizomycotina, классу Dothideomycetes, подклассу Pleosporomycetidae, порядоку Pleosporales, семейству Pleosporaceae [9]. Грибные колонии обычно от черных до серых. Конидиофоры одиночные или в маленьких группах. Они могут быть простыми или разветвленными, прямыми или извилистыми. Цвет от бледного до оливкового или золотисто-коричневого. Они гладкие и могут быть 50µm в длину и 3-6µm в ширину с одной или несколькими конидиальными «шрамами». Конидии длинные, разветвленные, могут быть яйцевидными или эллипсоидными. В случае эллипсоидных, они без носика, обычно они имеют короткий конический или цилиндрический носик. Конидии от бледных до золотисто-коричневых. Они гладкие или нет, с 1-8 поперечными и продольными или наклонными перегородками. Их полная длина 20-63(37)µm и 9-18(13)µm ширина, в самой широкой части. Носик может быть 2-5µm в ширину, и примерно одна треть длины конидии.

Жизненный цикл. Первоначально конидия приземляется на листья, ближайшие к земле и прорастает, формируя одну или более ростовые трубки [19].

Первая линия защиты, которую следует преодолеть грибу – это кутикула, которая состоит из кутина и восков. A. alternata f. sp. lycopersici секретирует эндоглюканазу, синтез которой вызван патоген-индуцированным возрастанием рН на растение хозяине. Эндоглюконазы и экзоглюконазы участвуют в патогенном процессе A .alternata f. sp. lycopersici [18].

Проникновение осуществляется через края листьев, раны, или непосредственно путем формирования апперессория. После проникновения гифа растет межклеточно, и в первую очередь наблюдается разрушение средней ламеллы. Сначала наступает коллапс эпидермальных клеток, затем губчатой паренхимы, и в конце палисадных клеток. Грибы обширно растут на мертвых тканях. Конидиофоры развиваются в концентрических кольцах или зонах через несколько дней после проникновения на обратной стороне листа.

Грибы зимуют на лигнифицированных растительных остатках [19].

**1.2 Патологический процесс Alternaria solani и Alternaria alternata f. sp. lycopersici у растений томатов**

**1.2.1 Симптомы заболеваний, вызванных грибами рода Alternaria**

Грибы Alternaria solani и Alternaria alternata f. sp. lycopersici – лиственные патогенны, которые вызывают относительно медленное разрушение тканей хозяина через уменьшение фотосинтетического материала. Род Alternaria обычно поражает воздушные части хозяина. Симптомы начинаются с маленьких, округлых, темных пятен. По мере развития болезни пятна могут увеличиваться до 1 см или более в диаметре и они обычно серые, серовато-коричневые, или ближе к черному цвету. Из-за колебаний внешних условий, патоген растет не равномерно, и пятна развиваются на целевых образцах в виде концентрических колец. В тех случаях, когда листья томатов достаточно велики, что на них наблюдается неограниченное развитие симптомов болезни, пятна, вызванные Alternaria рассматриваются как таковые, которые вызваны другими патогенами, которые вызывают такую же диагностику. Повреждения также часто покрыты тонким, черным, нечетким налетом, это спороношение грибов рода Alternaria на погибающих тканях хозяина [7].

Темные, вдавленные поражения обычно встречаются на корнях, клубнях, стеблях и плодах. Грибы могут спороносить в этих язвах, вызывая тонкий, черный, бархатный рост грибов и спор, чтобы покрыть пораженный участок [7].

Alternaria solani и Alternaria alternata f. sp. lycopersici также продуцируют токсины, которые диффундируют в ткани хозяина. Поэтому наблюдается желтый ареол, который погружается в здоровые ткани хозяина, которые окружают пораженный участок [7].

**1.2.2 Биосинтез токсинов грибами рода Alternaria**

Фитотоксины – низкомолекулярные компоненты, которые не требуются для нормального развития и воспроизводства. Основываясь на избирательности, фитотоксины могут быть разделены на 2 категории: неспецифические токсины и специфические. В целом, неспецифические токсины оказывают относительно умеренные фитотоксические эффекты, они охватывают широкий спектр разновидностей растений и рассматриваются как дополнительный фактор болезни, например механизм проникновения и ферментативные процессы. Хотя они обычно действуют как вирулентные факторы и усиливают тяжесть симптомов болезни, они не обязательно требуются для возникновения болезни т. к. они также токсичны для растений, не входящих в круг хозяев патогенна.

Для рода Alternaria многие неспецифические токсины были определены, но действие только нескольких из них было изучено в деталях [18].

Специфические токсины участвуют в развитии нескольких заболеваний. Они обычно оказывают серьезные эффекты на достаточно узкий круг хозяев, и являются обязательным фактором для развития заболевания. Токсины, синтезируемые этими патогенами разнообразны по химическому составу, от низкомолекулярных вторичных метаболитов до белков [18].

Хотя место действия токсинов грибов рода Alternaria разнообразно, в конце они все вызывают смерть клеток хозяина [18].

**1.2.3 Токсины Alternaria solani**

Неспецифические токсины

12 токсинов идентифицировано в культуральных фильтратах A. solani. Среди них альтернариевая кислота и соланопирон А, В и С, альтернариол (AOH) и альтернариол монометиловый эфир (alternariol monomethyl ether (AME)), макроспорин способны вызывать некротические повреждения растений томата [8].

Альтернариевая кислота неспецифический токсин, она вызывает хлороз и некроз листьев томата. Она содержится в покоящихся спорах и продуцируется прорастающими спорами гриба [3].

Было установлено, что альтернариевая кислота изменяет морфологические и физиологические характеристики плазматических мембран возле плазмодесм и таким образом вызывает изменение проницаемости, которое ведет к утечке электролитов. При благоприятных условиях споры прорастают в течение часов и могут образовывать более чем одну ростовую трубку на спору, т. к. споры состоят из нескольких клеток [8].

Альтернариевая кислота не токсична, если она нанесена отдельно на листья томатов, но усиливает инфекционный процесс и развитие некротических симптомов, когда она добавлена в суспензию спор A. solani [3].

Одиночное повреждение на несосудистой ткани листа относительно незначительно. Однако если присутствует одиночное повреждение на сосудистой ткани листа или стебля, где продуцируется альтернариевая кислота, она может быть транспортирована в другие части растения. Отмечено, что повреждения даже маленького сосуда приводит к более интенсивному образованию хлоротичных пятен в окружающих тканях, чем повреждения, которые находятся между сосудами [16].

Существует две поликетидные группы дибезо-б-пироны и антрокуноны. Первая группа включает альтернариол и его монометиловый эфир, альтертенуол, альтенуизол, альтенуен, альтенузин, и дигидроальтенузин [14].

И A. solani и A. alternata продуцируют альтернариол (AOH), альтернариол монометиловый эфир (alternariol monomethyl ether (AME)), макроспорин. AME цитотоксичен, канцерогенен. AME и AOH проявляют синергические эффекты. [13].

Авторы сообщают, что оптимальная продукция A. solani таких токсинов, как альтернариол (AOH), alternariol monomethyl ether (AME) наблюдается при температуре 25°С [13].

Специфические токсины

Также A. solani продуцирует специфические токсины в культуре, оба токсина 1 и 2 «в комбинации» вызывают типичные симптомы раннего увядания на листьях [14].

 Метаболиты могут синтезироваться в диапазоне от 5 до 30°С, однако при критических температурах, они синтезируются в малых количествах [10].

**1.2.4 Токсины Alternaria alternata f. sp. lycopersici**

Неспецифические токсины

К неспецифическим токсинам Alternaria alternata f. sp. lycopersici относятся альтернариевая кислота, альтернариол, макроспорин, тентоксин и тенуазоновая кислота [14].

Тенуазоновая кислота (TEA) вызывает некротические повреждения с или без образования желтого ореола на листьях. Она подавляет механизм синтеза белка.

Тентоксин (Tentoxin), который действует как фотофосфориляционный ингибитор через специфическое связывание с АТФ-синтазой хлоропласта, вызывая угнетение гидролиза и синтеза АТФ. Из-за того, что этот токсин затрагивает основные клеточные процессы, он является мощным микотоксином [18].

Специфические токсины

К специфическим токсинам, синтезируемым A. alternata f. sp. lycopersici относится AAL-токсины. Первый из них токсин А [TA] был открыт в 1981 году. AAL-токсины – это аминопентольные сложные эфиры, аналоги сфингозина, предшественника сфинганина, сфингониновые аналоги микотоксинов. Они относятся к семейству моноэстеров [18].

Наличие одной пары близких неэстерифицированных диолов в структуре каждого AAL-токсина подтверждает возможное включение эпоксидной гидролазы (EH) в синтез токсинов. Этот гипотетический механизм подтвержден тем фактом, что один из атомов кислорода в диоле присоединяется путем прямого включения атмосферного кислорода, а другой поступает от воды [12].

Гидролазы катализируют гидролиз эпоксидов или ареновых оксидов до их соответствующих диолов путем присоединения воды. Несколько представителей этого подсемейства ферментов представлено в разнообразии в млекопитающих, растениях, насекомых и микороорганизмах [12].

На основании сходства большинство гидролаз относятся к семейству б/ в гидролаз. Это семейство ферментов гидролизует свои субстраты в два этапа, которые включают формирование и гидролиз ковалентной алкил-ферментной промежуточной, которая сформирована при участии нуклеофильной аспарагиновой кислоты [12].

Этот фермент играет определенную роль в способности мицелия инфицировать растения. Активность гидролаз наблюдается одновременно с продукцией пигментов - вторичных метаболитов в стационарной фазе. Также, установили, что синтез AAL токсина происходит одновременно с повышением активности гидролаз [12].

В противоположность токсинам других разновидностей Alternaria alternata, ААL-токсины не вызывают быстрой потери электролитов чувствительных тканей. Подтверждено, что ААL-токсины действуют на аспартат карбамоил трансферазу (ACTаза), ключевой фермент в биосинтезе пиримидина. ACTаза локализована в хлоропластах. ААL-токсины ингибируют развитие клеток на всех уровнях, как у устойчивых, так и у восприимчивых сортов томата [22].

Более того, ААL-токсины ингибируют керамид синтазу в гепатоцитах крысы, и индуцируют апоптоз в клетках почек обезьян [12].

Мутантные формы A. alternata f. sp. lycopersici, не продуцирующие AAL-токсины утрачивают свою патогенность, тем самым подтверждая необходимость этих токсинов для развития инфекционного процесса. AAL-токсины – ингибиторы биосинтеза сфинголипида (керамида). Применение AAL-токсинов ведет к накоплению сфингоидных предшественников, истощению комплекса сфинголипидов и в конце концов к смерти клеток восприимчивых сортов томатов. AAL-токсины, вызывающие смерть клеток растений томатов по механизму действия сходны с генетически контролируемым клеточным суицидом или апоптозом, что подтверждает участие растения в обусловленной токсином смерти клеток [18].

Лестницы ДНК наблюдаются на протяжении смерти клеток в содержащих токсин протопластах и листьях томата. Интенсивность ДНК лестниц увеличивается под действием Са 2+ и угнетается под действием Zn 2+. Интенсивное разделение фрагментированной ДНК на отдельные фрагменты совпадало с появлением лестниц ДНК, что также наблюдается на протяжении смерти протопластов томата. Процесс апоптоза происходит одновременно с процессами развития в растении, и является функциональным процессом, в результате которого формируются симптоматические повреждения на растениях томата [20].

AAL токсины разделяют на 5 групп ТА, ТВ, ТС, TD, TE. ТА и ТВ – наиболее активные изоформы, состоящие из близко связанных компонентов. ТА и ТВ – аминопентолы, средний молекулярный вес 528 Da, они имеют одинаковую специфическую активность.

Токсин ТА индуцирует стререотипические признаки апоптоза, включающее формирование лестниц ДНК, уплотнение ядер ДНК и последующее появление апоптозных телец. Он не угнетает прогресс клеточного цикла [21].

Эта молекула представляет собой новый класс природных токсинов, которые могут быть использованы как модельные компоненты для дальнейшей характеристики молекулярных и бимолекулярных путей, ведущих к апоптозу.

Существует доказательство, что этот микотоксин ведет к разрушению сфинголипидного метаболизма. Важный участок ингибирования – это реакция, катализируемая сфингозин N-ацетилтрансферазой (керамид синтаза).

Cфинголипиды играют важную роль в росте и дифференцировке клеток. Они также могут влиять на пролиферативный потенциал клеток путем индукции или супрессии апоптоза. Полагаясь на факт, что AAL-токсины напоминают сфингоидные основания, сфинголипиды могут вызвать смерть клеток, путем индуцирования апоптоза и/или путем изменения клеточного цикла [21].

Токсичность AAL токсинов изучают на разных тканях томатов, включая листья на разных стадиях развития. Чувствительность наблюдается на всех уровнях, наиболее чувствительны молодые листья [11].

В растениях нечувствительность к AAL-токсинам и устойчивость к AAL-продуцирующей A. alternata f.sp. lycopersici определяется ко-доминирущим Alternaria stem cancer (Asc-1) геном, гомологом гена дрожжей. Хотя, точный способ действия Asc-1 не был определен, базируясь на изучении гомологов у дрожжей, считается, что Asc-1 уменьшает токсин-индуцированное блокирование сфинголипидного синтеза через «спасение» ER-to-Golgi транспорта GPI – заякоренных белков [18].

Аsc locus - ген с двумя аллелями, когда наблюдается полная доминантность – растения устойчивы к патогену, когда неполная доминантность – восприимчивы к токсину [4].

Гомозигота восприимчивых линий в 1000 раз более чувствительна к ААL-токсинам, чем устойчивые линии, в то время как их гибрид F1 имеет промежуточную чувствительность, являясь в 50 раз более чувствительным, чем гомозигота устойчивых образцов [22].

Эти данные подтверждают, если аsc locus контролирует обе функции. К тому же аsc locus удобен для физиологических исследований функционального генного контролирования взаимодействия патоген – хозяин, используя AAL-токсин как молекулярный маркер, если обе реакции контролируются одинаковым локусом. Совместимые или несовместимые взаимоотношения патоген – хозяин часто обусловлены различием только одного гена. Однако различия в физиологическом состоянии устойчивых и восприимчивых инфицированных растений-хозяев часто обусловлено поддельными биохимическими событиями, которые являются следствием аллельного различия между близко связанными, но не относящимися к болезни локусами [4].

**1.3 Системная приобретенная устойчивость**

Растения развивают большое количество индуцированных защитных механизмов против патогенов. Распознание патогена вызывает локализованную реакцию сопротивления, известную как сверхчувствительный ответ (HR), который характеризуется быстрой смертью клеток в месте инфекции. В 1960 Росс показал, что растения табака, зараженные вирусом табачной мозаики, впоследствии развивали возрастающую устойчивость к вторичным инфекциям в тканях. Такое распространение устойчивости в пределах тканей растений было названо системная приобретенная устойчивость (SAR) [6].

SAR может быть активирована в любом растении патогенном, который вызывает некроз или как часть HR. Такая устойчивость длительна, и иногда может сохраняться на протяжении всей жизни растения. Молекулярно SAR характеризуется возрастающей экспрессией большого числа связанных с патогенезом генов (PR-гены). PR-белки были впервые описаны в 1970 г. Ван Лунном, который обнаружил накопление различных новых белков после инфицирования табака вирусом TMV [6].

В 1979 г. Уайт обнаружил, что накопление PR белков и устойчивость к TMV можно индуцировать путем обработки растений табака салициловой кислотой (SA), аспирином (ацетил SA), или бензойной кислотой. Доказательства, что SA – это сигнал для индукции SAR поступили также из двух публикаций 1990г. Малами показал, что концентрация эндогенной SA возрастает в тканях растений после инфицирования табака вирусом TMV, и этот рост кореллирует с индукцией PR генов [6].

Необходимость SA в качестве эндогенного сигнала для SAR было показано Гаффнеем, он использовал бактериальный ген nahG, кодирующий салицилат гидроксилазу, которая удаляет SA путем превращения ее в катехоламин. Трансгенный табак, экспрессирующий ген nahG накапливал очень мало SA после атаки патогена и не экспрессировал PR белки. [5, 6]

Растения, которые не реагируют на SA были выделены в мутантные линии, также они несут мутации по одинаковым генам NPR1/NIM1 (NON-EXPRESSER OF PR GENES1/NONINDUCIBLE IMMUNITY1) [6].

**1.3.1 Природа системного сигнала**

***Салициловая кислота***

Салициловая кислота – фенольное соединение, важный молекулярный эффектор. Она регулирует ряд важных процессов: термогенез, защитные ответы на атаки патогенов, синтез этилена и созревание плодов. Также существуют данные, что SA участвует в регулировании ответов растений на абиотические стрессы, в частности УФ излучение и озон [15].

SA – системный сигнал для SAR. Исследования показали, что большинство накапливающейся SA (69%) было синтезировано и экспортировано из инокулированных листьев. В других исследованиях было показано, что SA была найдена и в инфицированных листьях и синтезирована de novo [6].

Последние данные подтверждают, что сигнализирование может происходить и за счет преобразования SA в летучее соединение метиловый салицилат, который может вызвать устойчивость не только в незараженных частях этого самого растения, но также и у соседних растений [6].

***Синтез SA***

SA может быть синтезирована в растениях путем превращения фенилаланина в транс-коричную кислоту, которая синтезирована ферментом фенилаланин аммиак-лиазой (phenylalanine ammonia-lyase или PAL). Фермент PAL является светоиндуцируемым. Поэтому в темноте накопление SA происходит медленно, а защитные реакции протекают с низкой интенсивностью. Недавно было показано, что SA может также синтезироваться из бензойной кислоты (ВА), которая может быть гидраксилированна в SA [1].

Также было показано, что как и у бактерий SA может синтезироваться из хоризмата через изохоризмат. Экспрессия бактериальных ферментов, катализирующих эти реакции изохоризмат синтаза 1 (ICS1) и изохоризмат пируват лиаза 1 (IPL1), в табаке и Arabidopsis привело к повышенному накоплению SA и устойчивости к патогену. Изохоризматный путь синтеза в растениях – главный источник синтеза SA.

SA можно обнаружить в двух формах в растении: (i) свободная SA, которая возможно имеет сигнальную функцию и (ii) главная запасающаяся форма Я-O-D-глюкосалициловая кислота (SAG) [5]. Этот гликозид ассоциирован с клеточной стенкой и расщепляется специфической в-гликозидазой. При действии стрессов нетравматического типа происходит высвобождение в-гликозидаз клеточной стенки. Затем происходит расщепление гликозида и высвобождению свободной SA. Таким образом, превращение SAG в свободную и активную SA может значительно повлиять на сигнальную передачу SA [1].

***Транспорт системного сигнала***

SA была обнаружена во флоэме нескольких видов растений, это позволило предположить, что именно это вещество является флоэмно-транслоцируемым сигналом. Эксперименты подтвердили, что сигнал SAR инициируется в инокулированных листьях, и транспортируется по проводящей системе (флоэма) к верхним листьям [1, 6].

***Активные формы кислорода (ROS)***

Существует несколько салицилат-связывающих белков. Главными мишенями для внеклеточной SA являются внеклеточные каталазы и пероксидазы. Присоединяясь к молекулам этих ферментов, SA изменяет их каталитическую активность и запускает окислительную вспышку – резкое усиление синтеза активных форм кислорода. Салициловая кислота является ключевой молекулой, запускающей в растительном организме этот процесс [1].

Во внеклеточном пространстве накапливается перекись водорода: HO2∙ + O2∙ ─ + Н+ ↔ Н2О2 + О2 либо 2O2∙ ─ + 2Н+ ↔ Н2О2 + О2, это приводит к накоплению других активных форм кислорода – супероксидного аниона (O2∙ ─), гидроксильного радикала, синглетного кислорода и др. Во внеклеточном пространстве растения происходит окислительная вспышка, она разрушительно воздействует на патогенные микроорганизмы.

Поскольку H2О2 не имеет неспаренного электрона, она может пересекать биологические мембраны. Протонирование O2∙ ─, которое происходит более легко при низком рН, дает гидропероксильный радикал HO2, он может пересекать биологические мембраны примерно так же эффективно, как и H2О2. HO2∙ может непосредственно атаковать жирные кислоты, и, как показано, превращает линоленовую, линолевую и арахидоновую кислоты в перекиси липидов.

Также перекись водорода является главным вторичным мессенжером сигнала индуцирования устойчивости. SA запускает экспрессию PR-генов благодаря ей. Перекись водорода способна индуцировать активность ряда важных ферментов, таких как NADH-дегидрогеназ (NADH-DH) хлоропластов, что также играет определенную роль в генерировании SAR.

Второй группой салицилат-связывающих белков являются пероксидазы - регуляторные ферменты. Кислые пероксидазы клеточных стенок способны связывать SA, фермент начинает генерировать перекись водорода с использованием NADPH.

Лигниназы сохраняют свою пероксидазную активность на прежнем уровне или даже повышают ее.

Активные формы кислорода крайне опасны для самого растительного организма, поэтому в растении существуют надёжные механизмы регуляции окислительной вспышки. Протекание окислительной вспышки допускается только во внеклеточном пространстве, а внутри клеток этот процесс подавляется компонентами антиоксидантной системы [1].

Альвазер и другие обнаружил, что H2O2 накапливается в маленьких группах клеток в неинокулированных листьях Arabidopsis после инфицирования его авирулентным штаммом P. syringae. Эти микровспышки наблюдаются на протяжении двух часов после начальной окислительной вспышки в инокулированных тканях, затем наблюдается формирование микроскопических HR повреждений. Используя каталазу чтобы удалить H2O2 или DPI чтобы ингибировать NADPH оксидазу, было показано, что обе окислительные вспышки необходимы для индуцирования SAR. Авторы предполагают, что микровспышки ROS могут акивировать защингые реакции на низком уровне во всем растении [6].

***Липидные сигнальные молекулы***

Новые работы подтверждают, что липидные молекулы могут быть мобильными сигналами для SAR. Мальдонадо показал, что мутанты dir1 (defective in induced resistance 1) развивают нормальную местную устойчивость к патогену, но не способны развивать SAR или экспрессировать PR белки в системных листьях. Таким образом, дикий тип dir1, который имеет сходство с липидным транспортом белков (LTPs), может участвовать в генерации или передаче мобильного сигнала.

Внеклеточное расположение LTPs подразумевает наличие мембранных рецепторов (PM), участвующих в передаче сигнала [6].

***Регуляторный белок NPR1***

Ключевой регулятор в развитии SAR является NPR1-белок. В норме NPR1 экспрессируеся в растении в малом количестве, но после проникновения патогена и обработки SA его уровень повышаетя в два – три раза. Он имеет две белок-белковые зоны взаимодействия, анкириновые повторности и BTB/POZ (Broad-Complex, Tramtrack, Bric-a-brac/Poxvirus, Zinc ﬁnger), а также предполагаемый сигнал ядерной локализации и области фосфорилирования [6].

Когда уровни SA низкие, NPR1 находится в своей олигомерной форме в цитоплазме, а в ответ на действие SA, регуляторный белок диссоциирует на мономеры, перемещается в ядро, и взаимодействует с факторами транскрипции TGA, тем самым, индуцируя экспрессию PR генов [6].

Для активации экспрессии гена PR-1 необходимы факторы TGA 2, 5 и 6. Для полной экспрессии данного гена необходим также фактор транскрипции WRKY70 [5].

Ядерная локализация NPR1 и активация TGA факторов возможно регулируются изменением окислительно-восстановительного потенциала клетки после обработки SA.

Когда белки были исследованы без восстановителя DTT, NPR1 обнаруживался только в обработанных SA образцах, тогда как при наличии DTT мономеры NPR1 были обнаружены в равных количествах с и без обработки SA [6].

Было установлено, что роль NPR1 в растениях не ограничивается SAR. NPR1 играет важную роль при ограничении роста патогенов. NPR1 также требуется для индуцирования другой защитной устойчивости (ISR), которая вызывается непатогенными, колонизирующими корни бактериями. NPR1 выступает посредником между пересекающимися сигнальными путями салициловой кислоты (SA), жасмоновой кислоты JA и этилена (C2H4), которые вызывают устойчивость к насекомым и некоторым некротрофным патогенам. NPR1 участвует в детоксикации SA и обратной регуляции ее биосинтеза. Кроме того NPR1 участвует в процессах, которые непосредственно не связаны с устойчивостью, например регуляция клеточного деления [6].

**2. Объекты и методы исследования**

Работа выполнялась на базе кафедры микологии и фитоиммунологии ХНУ им. В. Н. Каразина с 2008 по 2010 годы. Сбор материала проводился на территории Харьковской области в период с 2008 по 2009 годы.

Объектами исследования были изоляты гриба A. alternata f. sp. lycopersici, выделенные из пораженных плодов и листьев томатов. Также объектами исследования были проростки растений томатов.

**2.1 Выделение гриба в чистую культуру и подготовка растений к инокуляции**

Из пораженных образцов томатов были выделены чистые культуры гриба. Выделение чистой культуры проводилось с использованием стандартных микробиологических методов. Посев осуществлялся в чашках Петри на агаризованную питательную среду – картофельно-глюкозный агар. Также в колбы по 100 мл на жидкую питательную среду Чапека. Семена растений томатов Лагідний и КВС, помещали в стаканчики с универсальной почвой. Дальнейшее исследования проводились с 50 дневными растениями. Опыт осуществлялся в 3-х повторностях.

**2.2 Инокуляция растений**

А) Инокуляция стеблей

Растения инокулировали в возрасте 8 недель. Для инокуляции растений основной стебель горизонтально срезали стерильным лезвием. Одну высечку мицелия, диаметром 5 мм, аккуратно помещали мицелием вниз на срезанный стебель. Инокулированные растения инкубировали во влажной камере в течение 48 часов. Через два дня зараженные растения помещались в комнату с меньшей влажностью. Длину поражений (в мм) на каждом растении измеряли на 4 и 7 сутки после инокуляции.

Б) Инокуляция листьев

Листья 60 дневных растений томатов, помещались на фильтровальную бумагу в чашки Петри, предварительно смоченную дистиллированной водой, для достижения необходимой влажности. На листья аккуратно помещали капли с суспензией спор (концентрация ……). Инокулированные листья оставляли в чашках Петри на протяжении 48 часов, после чего отмечали появление хлоротических пятен вокруг капель.

В) Оценка поражений на токсичность

Проводились срезы 8 недельных растений томатов под струей воды, затем эти срезы помещались в колбы на 100мл с культуральными фильтратами

A. alternata f. sp. lycopersicy. Растения оставляли в колбах на протяжении 24 часов. После чего наблюдали степень увядания растений томатов.

**2.3 Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка данных проводилась с использованием дисперсионного анализа (р < 0,05). Вычисления проводились при помощи программы Statistica 6.0.

**3. Результаты собственных исследований**

В ходе проведения исследования нами было выделено в чистую культуру 3 изолята A. alternata f. sp. lycopersicy. Выделение изолятов проводилось из растений томатов.

**3.1 Оценка устойчивости растений и вирулентности изолятов гриба при инокуляции листьев**

В ходе наших исследований были испытаны различные методы заражения растений и проведена оценка их устойчивости к этому патогену.

При инокуляции стеблей томатов наблюдалось образование некротической зоны от светло-коричневого до черного цвета. (фото С1, С2, С3; КВС1, КВС2, КВС3)

По результатам дисперсионного анализа при инокуляции стеблей двух сортов томатов было установлено, что существует четкая разница между 3-мя изолятами гриба

A. alternata f. sp. lycopersici, между сортами, а также между сутками инокуляции (Табл. 1).

Изолят I более вирулентен, по отношению к изоляту II и III. При заражении стеблей томатов сорта КВС изолятом I некротическая зона на 4 сутки составила 5 мм, а на 7 сутки – 6,25 мм. При заражении сорта КВС изолятом II некротическая зона на 4 сутки составила – 3,5 мм, на 7 сутки – 5,25 мм. При заражении сорта КВС изолятом III некротическая зона на 4 сутки составила 3,5 мм, а на 7 сутки – 4 мм (Рис. 7.).

При заражении стеблей томатов сорта С изолятом I некротическая зона на 4 сутки составила – 5,75 мм, на 7 сутки – 6,5 мм. При заражении стеблей изолятом II, некротическая зона на 4 сутки составила – 5 мм, на 7 сутки – 6,25 мм. При заражении стеблей изолятом III, некротическая зона на 4 сутки составила – 4 мм, на 7 сутки – 5 мм (Рис. 8.).

Сорт С является более восприимчивым, по отношению к сорту КВС (Рис. 9.). Так, средний размер некроза при заражении 3-мя изолятами у сорта С на 4 сутки составил – 4,91 мм, а у сорта КВС – 4 мм. На 7 сутки средний размер некроза при заражении 3-мя изолятами у сорта С составил – 5,91 мм, у сорта КВС – 5,16 мм .

Таблица 1.

Результаты дисперсионного анализа при заражении стеблей томатов

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Эффект | SS | Степени свободы | MS | F | p |
| Сорт | 8,333 | 1 | 8,333 | 5,5556 | 0,023980 |
| Изолят | 24,500 | 2 | 12,250 | 8,1667 | 0,001190 |
| Сутки | 14,083 | 1 | 14,083 | 9,3889 | 0,004120 |
| Ошибка | 54,000 | 36 | 1,500 |  |  |

**3.2 Оценка устойчивости растений и вирулентности изолятов гриба при инокуляции листьев каплями с суспензией спор**

При инокуляции листьев томата сортов КВС и С наблюдалось образование хлоротических пятен на месте нанесения капель. При визуальной оценке мы выявили, что хлороз практически не образовался на листьях сорта КВС, более хорошо выражен на листьях сорта С.

Наибольшая площадь хлротических пятен наблюдалась под действием изолята I (фото)

**3.3 Оценка устойчивости растений и вирулентности изолятов гриба при оценке повреждений на токсичность**

Таблица 2.

Степень увядания растений томатов сортов КВС и С

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Сорт | КВС | С |
| Изолят I | 0 | 4 |
| Изолят II | 0 | 4 |
| Изолят III | 4 | 4 |
| Контроль | 0 | 0 |

**Выводы**

1. При проведении исследований в чистую культуру были выделены три изолята гриба A. alternata f. sp. lycopersici из пораженных растений томатов.

2. В результате отработки методов заражения на стеблях томатов была установлена четкая разница между изолятами гриба а также сортами. Более вирулентным оказался изолят I, более восприимчивый сорт – С.

3. При инокулировании листьев томатов наблюдалось появление хлоротических пятен. Больше хлоротических областей было на сорте С. Более вирулентным является изолят I.

4. При проверке действия токсинов на растения томатов установлена четкая разница между сортами. Более восприимчив сорт С.

### Список использованной литературы

1. Акулов А. Ю. Индуцированная неспецифическая устойчивость растений: история и современность / А. Акулов, Д. Леонтьев. – Х.: Харьковский Национальный университет им. В.Н.Каразина, - 37 с.

2. Демидов Е. С. Методы селекции томата на устойчивость к альтернариозу / Демидов Е. С., Садыкина Е. И., Сайчук А. И. – Приднестровский научно-исследовательский институт сельского хозяйства. – 2006 . – 100 с.

3. Chaerani R. Tomato early blight (Alternaria solani ): the pathogen, genetics, and breeding for resistance / Reni Chaerani, Roeland E. Voorrips // J Jen Plant Pathol. – 2006, 72:335–347

4. Clouse D. Interaction of the asc Locus in F8 Paired Lines of Tomato with A lternaria alternata f. sp. lycopersici and AAL-Toxin / D. Clouse, D.G. Gilchrist // Phytopathology. – 1987. – p. 80-82.

5. Custers J. H.H.V. Engineering disease resistance in plants: дис. Custers Jerфme H.H.V. – W., 2007. – 182 s.

6. Durrant W.E Systemic acquired resistance / W.E. Durrant, X. Dong // Phytopathology. – 2004. – N. 42. – p. 185 – 209.

7. Franklin L. Alternaria Deseases / Laemmlen Franklin // Agriculture and Natural Resources. – 2001.

8. Fritz M. Resistance induction in the pathosystem tomato – Alternaria solani: dissertation: 30.09.05 / Maendy Fritz. – G., 2005. – 124 s.

9. Fungal Databases Nomenclature and Species Banks [Electronic resource]

10. Magan N. Effect of Water Activity and Temperature on Mycotoxin Production by Alternaria alternata in Culture and on Wheat Grain / Naresh Magan, George R. Cayley, John Lacey // Applied and environmental microbiology. – 1984. - Vol. 47, No. 5. - p. 1113-1117.

11. Mesbah. L. A. Sensitivity among species of Solanaceae to AAL toxins produced by Alternaria alternata f.sp. lycopersici / L. A. Mesbah, G. M. van der Weerden, H. J. J. Nijkamp, J. Hille // Plant Pathology. – 2000. - Vol. 49. – p. 734-741.

12. Morisseau C. Multiple Epoxide Hydrolases in Alternaria alternata f. sp. Lycopersici and Their Relationship to Medium Composition andHost-Speciﬁc Toxin Production / Christophe Morisseau, Barney L. Ward, David G. Gilchrist, Bruce D. Hammock // Applied and environmental microbiology. – 1999. - Vol. 65, No. 6. - p. 2388–2395.

13. Motta S. A method for the determination of two alternaria toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products / Silvana da Motta, Lucia M. Valente Soares // Brazilian Journal of Microbiology. – 2000. – Vol. 31. – p. 315-320.

14. Nishimura S. Host-specific toxins and chemical structures from Alternaria species / Syoyo Nishimura, Keisuke Kohmoto // Ann. Rev. Phytopal. – 1983. – p.87-116

15. Norman C., Howell K. A. et al. Salicylic Acid Is an Uncoupler and Inhibitor of Mitochondrial Electron Transport // Plant Physiol. Australia, 2004, Vol. 134, pp. 492–501.

16. Pound G. S. The production of toxic material by alternaria solani and its relation to the early blight disease of tomato / Glenn S. Pound, Mark A. Stahmann // Phytopathology. – 1951. – Vol.41. – p. 1104-1114.

17. Seo H.S., Song J.T. et al. Jasmonic acid carboxyl metiltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2001, Vol. 98. No 8. – p. 4788-4793.

18. Thoma B. P. H. J. Alternaria spp.: from general saprophyte to speciﬁc parasite // Bart P. H. J. Thoma // Molecular Plant Pathology. – 2003. – Vol. 4. No. 4. – p. 225–236.

19. Vйlez H. Alternaria alternata mannitol metabolism in plant-pathogen interactions: dissertation / Heriberto Vйlez. – R., 2005. – 130 p.

20. Wang H. Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development / Hong Wang, Juan Li, Richard M. Bostock, David G. Gilchrist // The plant cell. – 1996. – Vol. 8. – p. 375-391.

21. Wang H. Fumonisins and Alternaria alternata lycopersici toxins: Sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells / Hong Wang, Clinton Jones, Janice Ciacci-Zanella, Todd Holt, David G. Gilchrist, Martin B. Dickman // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – Vol.93. No 8. – p. 3461-3465.

22. Witsenboer H. M.A. Effects of Alternaria Alternata f.sp. Lycopersici toxins at different levels of tomato plant cell development / Hanneke M.A. Witsenboer, Carla E. van Schaik, Raoul J. Bino, Huub J.M. Loffler, H. John J. Nijkamp, Jacques Hille // Plant Science. – 1988. – Vol. 56. – p. 253-260.