

УДК 634.711:632.482.31

ВЛИЯНИЕ ХИТИНАЗЫ И ХИТИНА НА ПУРПУРНУЮ ПЯТНИСТОСТЬ МАЛИНЫ

А.А. Беляев, Т.В. Шпатова, М.В. Штерншис,
Новосибирский государственный аграрный университет,
А.Б. Дужак, З.И. Панфилова, Институт цитологии и генетики СО РАН

Среди наиболее вредоносных для малины заболеваний в России и за рубежом отмечается пурпуровая пятнистость — *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. Особенно сильно грибом поражаются однолетние побеги, теряющие зимостойкость и продуктивность. На неустойчивых сортах в условиях Западной Сибири только одно это заболевание может вызвать недобор до 25% урожая.

В защите малины от пурпуровой пятнистости с применением биологических средств в более ранних исследованиях нами доказана эффективность препарата фитоп-флора С [Шпатова, 2004], а также выявлено фунгистатическое влияние на возбудителя болезни *in vitro* Фитоверма [Штерншис и др., 2005], которое затем подтвердилось в модельных и полевых экспериментах.

Наряду с другими агентами, в биологической защите растений известен ряд ферментов, пригодных для эффективного подавления развития различных вредных организмов. В частности, уже несколько десятилетий ведутся работы по изучению влияния хитиназ различного происхождения на вредных насекомых и фитопатогенные грибы. Хитиноподобные ферменты могут использоваться для подавления болезней растений. Например, хитиназы испытаны против склеротиниоза на злаках [Ordentlich et al., 1998] и *Botrytis cinerea* на различных растениях [Whiteman and Stewart, 1998]. Среди внутриклеточных биорегуляторов особое место занимают вещества, индуцирующие устойчивость растений к патогенам — салицилаты, жасмонаты, полиамины, перекись водорода, окись азота и др. В ряде работ показано, что возможно использование хитина и его производных в качестве индукторов устойчивости растений [Чирков, 2002; Павлюшин и др. 2004].

Цель работы, проведенной в 2002—2006 гг., — сравнительное тестирование двух препаратов хитина и двух препаратов хитиназы на наличие свойств, вызывающих у малины снижение пораженности пурпуровой пятнистостью. Использовали чистую культуру возбудителя пурпуровой пятнистости гриба *D. applanata* на модельных растениях в полевых условиях с искусственным инфекционным фоном и в полевом деляночном эксперименте. Объектами исследования служили малина сорта Киржач; культура фитопатогенного гриба *D. applanata*, выделенного из живых побегов малины; фермент хитиназа 1, выделенный из культуральной жидкости актиномицета *Streptomyces* sp.; фермент хитиназа 2, выделенный из культуральной жидкости мутантного штамма М-1 бактерии *Serratia marcescens*; препараты хитина двух типов — высокополимерного в виде суспензии микрочастиц (10—20 мкм) в воде и раствора низ-

комолекулярных хитоолигосахаридов ($n=1-3$), полученных в результате ферментативного гидролиза хитина.

Чистую культуру гриба *D. applanata* выращивали на питательной среде (рН=6,5) следующего состава (г/л): мальтоза (40), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2), дрожжевой экстракт (10), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3), KH_2PO_4 (6), агар (30).

В чистой культуре выявлено прямое влияние хитиназы 1 на рост колонии *D. applanata*: с увеличением концентрации препарата до 0,75 ЕА/мл диаметр колонии достоверно уменьшался в 2 раза. Хитиназа 2 влияния на патоген не оказывала.

Культуру гриба *D. applanata* для инокуляции живых побегов выращивали на питательной среде Чапека при температуре 24—26°C в термостате до формирования спорония (480 пикнид/см²). Искусственное заражение проводили 21.06, длина побегов составляла около 80 см. Каждый вариант включал 10 молодых побегов, при визуальном осмотре не имевших повреждений коры. Обработку побега препаратами проводили до нанесения инокулюма, т.к. наносимая на заражаемый участок стебля инфекционная нагрузка значительно превышала инфекционную нагрузку естественных условий. На побег в зоне 30—50 см от его основания накладывали агаровый блок культуры возбудителя диаметром 1 см со споронием, который обкладывали влажной ватой, а сверху обматывали полиэтиленовой пленкой и обвязывали ее снизу и сверху от места заражения. Побег отмечали биркой с указанием номера варианта и повторности.

Изоляторы снимали на 7-е сут. и проводили первый учет, измеряя длину и ширину инфекционных пятен. Аналогичный учет проводили на 30-е сут. Итоговый учет провели в конце вегетации. Измеряли размеры внешнего пятна поражения, оценивали его интенсивность по 4-балльной шкале, подсчитывали количество плодовых тел, площадь спорония, размеры некроза в сердцевине и древесине стебля.

В условиях искусственного заражения однолетних побегов хитиназа 1 уменьшила площадь внешнего некротического пятна в 6,8 раза, а хитиназа 2 — в 2,9 раза по сравнению с контролем (табл. 1).

В вариантах с хитиназами уменьшилось заражение внутренних слоев стебля по сравнению с контрольным вариантом. Хитиназа 1 сократила размер некроза древесины в 4,5 раза, а сердцевины — в 2,1 раза, а хитиназа 2 уменьшила показатели в 9 и 3,4 раза соответственно. Протяженность внутреннего некроза вдоль стебля в варианте с хитиназой 1 уменьшилась в 8,7 раза, а с хитиназой 2 — в 6,5 раза.

Таблица 1. Влияние хитиназ на пурпуровую пятнистость малины на искусственном инфекционном фоне

Вариант	Площадь внешнего пятна, см ²	Площадь некроза на поперечном сечении стебля, %		Протяженность некроза внутри стебля, см	Площадь зоны спорония, см ²	Количество псевдотец, на 1 см ²
		Ксилема	Серцевина			
Хитиназа 1	4,3	1,0	10,0	0,3	0	0
Хитиназа 2	10,1	0,5	6,0	0,4	0	0
Контроль (инокуляция грибом без обработки хитиназами)	29,2	4,5	20,5	2,6	1,1	12,8
Необработанные побеги	1,6	0	0	0	0,9	7,4

В контроле с искусственным заражением в среднем на 1 см² формировалось 12,8 псевдотециев. При использовании биопрепаратов формирование плодовых тел гриба (закладка псевдотециев) не наблюдалось.

Следовательно, под влиянием хитиназы 1 и хитиназы 2 проявился фунгистатический эффект, который нельзя объяснить только прямым действием препаратов на фитопатогена. По-видимому, входящие в состав препаратов хитинолитические ферменты оказывают иммунизирующее влияние на растение как элитаторы, вызывая активную ответную реакцию синтеза фитоалексинов.

Полевой эксперимент по испытанию хитиназы 1 проводили в 2003 г. в насаждениях малины (сорт Киржач). Делянка — 7,5 м², повторность — 4-кратная, расход рабочей жидкости — 800 л/га. Побеги обрабатывали однократно ранцевым опрыскивателем при появлении первых симптомов болезни (19.06). Итоговый учет провели 17.09.

В результате обработки удалось примерно в 3 раза уменьшить зараженность побегов и снизить развитие поражения (табл. 2). С учетом ранее проведенных полевых испытаний (1992—1993 гг.) хитиназа 1 снизила развитие болезни примерно в 2 раза. Поэтому можно констатировать влияние препарата на заболевание, приближающееся по эффективности к химическому фунгициду (Топаз).

Таблица 2. Влияние хитиназы 1 на пурпуровую пятнистость малины в условиях полевого опыта

Препарат	Распространение болезни, %	Развитие болезни, %	Биологическая эффективность, %
Контроль	75,4	27,9	—
Хитиназа 1 (0,5 ЕА/мл)	27,3	8,8	68,5
Топаз (0,1%)	22,9	7,3	73,4
НСР ₀₅	—	5,6	—


Исследование влияния препаратов хитина в модельном опыте 2005 г. в условиях искусственной инокуляции проводили по методике, аналогичной исследованию хитиназ.

Учет, проведенный в конце вегетации (через 80 сут. после заражения), показал, что в условиях искусственного

Таблица 3. Влияние хитиназы 2 и двух форм хитина на размеры внешнего и внутреннего некроза в побегах малины и спороношение гриба *D. applanata* при искусственном заражении

Вариант	Площадь внешнего пятна, см ²	Площадь некроза на поперечном срезе стебля, %		Количество плодовых тел на 1 см ²
		Древесина	Сердцевина	
Контроль (искусственный фон)	20,1	11,8	25,0	15,3
Суспензия хитина (3 мг/г)	4,9	2,0	10,0	0
Ферментативный гидролизат хитина (2,1 мг/г)	16,0	6,2	12,5	14,8
Хитиназа 2 (0,8 ЕА/мл)	10,3	0	0	0
Естественный фон (с провокацией)	7,1	0	0	0
Естественный фон	0,5	0	0	0
НСР ₀₅	9,2	8,2	—	—

заражения изучаемые препараты хитиназы и хитина подавляли развитие заболевания (табл. 3). Внешняя площадь пораженных участков достоверно сокращалась под влиянием хитиназы 2 в 2 раза, под влиянием суспензии хитина — в 4,1 раза. Обработка побегов хитиназой 2 исключила поражение внутренних тканей стеблей, а при нанесении обеих форм хитина проявилась тенденция к уменьшению размеров внутреннего некроза как в ксилеме (древесине), так и в сердцевине. Причем не только на поперечном срезе стебля, но и на продольном сечении протяженность некроза в сердцевине уменьшалась в 1,5—3 раза относительно контроля. Плодовые тела (незрелые псевдотеции) на опытных побегах осенью не выявлены в вариантах с хитиназой и суспензией хитина. В контрольном варианте и при нанесении гидролизата хитина возбудитель пурпуровой пятнистости смог сформировать соответственно 15,3 и 14,8 плодовых тел/см².

Таким образом, полученные результаты указывают на значительное снижение ряда параметров патологического процесса в растениях малины под влиянием хитиназы и суспензии хитина, что позволяет предполагать у них свойства, индуцирующие устойчивость растительных тканей к фитопатогенному грибу. В связи с экологичностью и относительной доступностью для массового производства, препараты хитиназ и хитина могут быть перспективными для защиты малины от грибных болезней. 

* С фотографиями к статье можно ознакомиться на сайте www.agroxxi.ru