

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ

на ступінь прояву цитопатології листя, зараженого фітофторозом томатів

У лабораторних умовах, за штучного зараження рослин томатів збудником фітофторозу *Phytophthora infestans*, досліджено зміну патогенезу листкової пластинки під впливом температури. Проведено аналіз анатомо-морфологічної будови листкової пластинки на фоні розвитку патологічного процесу та оцінку морфометричних параметрів досліджуваних зразків.

температура, ооміцет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, фітофтороз, томати, штучне зараження, морфометричні параметри

Впродовж понад півтора століття привертає увагу сільгоспвиробників і фітопатологів усього світу ураження рослин фітофторозом, що викликається ооміцетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. У минулому це пов'язано з величезними втратами врожаю, викликаними фітофторозними грибами на картоплі. Значних збитків завдають фітофтороз, або бура гниль на помідорах. Незважаючи на інтенсивне вивчення особливостей розвитку збудника хвороби, широке впровадження в практику стійких сортів, ефективних технологій і засобів захисту рослин, втрати урожаю томатів від цього захворювання за рахунок передчасного відмирання бадилля та ураження плодів під час вегетації і зберігання в середньому становлять 70–80%, а в разі епіфітотійного розвитку — 100% [3, 4].

На ступінь прояву захворювання, поряд з генотипом рослини-живителя і патогена, важливу роль відіграють екологічні фактори. Зокрема, температурний режим є одним із вирішальних чинників довкілля, який впливає на процеси росту і розвитку, біологічну активність збудників грибних захворювань [5]. Гіпо- і гіпертермія спричинюють дестабілізацію метаболічних процесів фітопатогенних грибів. Проте, останнім часом, агресивність *P. infestans* істотно зросла. Патоген став менш залежним від температури і вологості повітря.

А.М. КОВТУН,

науковий співробітник,
E-mail: Enddry@mail.ru

Інститут захисту рослин НААН,
м. Київ

Якщо для «старих» популяцій температурний інтервал становив 8–23°C, то ізоляти «нових» популяцій здатні інфікувати рослини при температурі 3–27°C. Для інфікування рослин ізолятами «нових» популяцій потрібно майже у два рази менший період наявності краплинно-рідинної вологи на листі (за однакової температури). У зв'язку з цим збільшилась кількість можливих генерацій патогена впродовж вегетаційного сезону.

Тому, вивчення особливостей патогенезу в системі томати — *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, під впливом абіотичних факторів навколишнього середовища, є надзвичайно актуальним для прогнозування і попередження розвитку захворювання.

Мета досліджень — вивчення еколого-біологічних особливостей листкової форми розвитку фітофторозу в патосистемі томати — *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary за умов підвищеного температурно-режиму.

Матеріали і методи. У експериментах використані 50-денні проростки рослин томатів сприйнятливо до фітофторозу сорту — Волове серце. Дослідні рослини вирощені в ґрунті за температури 20–22°C з 15–16-годинним світлоперіодом до фази розвитку 5–6 листків. Для фітопатологічних досліджень використовували тільки цілі, неушкоджені, зовні здорові рослини, які штучно інокулювали суспензією спор ооміцетів, приготовленою із культури *P. infestans*. Заражали рослини локальним нанесенням (1–2 краплі на кожен листок) по 5 мкл суспензії зооспор патогена. Концентрацію

спорів суспензії визначали підрахунком спор, що знаходились в окремому полі зору мікроскопа. Після нанесення інокулюму дослідні рослини інкубували в термостаті в умовах постійної темряви за різних терморезимів: 15, 20, 25, 30, 35°C (по 4–5 рослин у кожній групі) та спостерігали за особливостями прояву патологічного процесу впродовж 7-денного періоду.

Після закінчення експерименту макроскопічно досліджували параметри вегетативних органів дослідних рослин за загальноприйнятими лабораторно-польовими, польовими та лабораторними методами оцінки розвитку фітофторозу (Ильяшенко Д.А., 2010) [7]. Для мікроскопічного оцінювання стану та виявлення тонких деталей гістоструктури уражених листків томатів використовували відповідні загальноприйняті методики [10].

Морфометричне дослідження гістологічних препаратів здійснювали на мікроскопі Micromed XS-5520 (Китай) з використанням системи аналізу зображень Tour View 3.7 (for Digital Camera). Мікрофотографування об'єктів дослідження здійснювали за допомогою цифрової камери TourCam 3.0. (Китай), а одержані мікрофотографії обробляли у графічному редакторі Adobe Photoshop CS6.

Для кількісного аналізу змін в анатомічній структурі листкової пластинки використовували наступні морфометричні показники: товщину верхнього та нижнього епідермісу, товщину палисадного (стовпчастого) та губчастого мезофілу, загальну товщину листкової пластинки, площу провідного, або судинно-волоконистого пучка (об'єктів $\times 10$). Математично-статистичну обробку даних здійснювали методами описової та варіаційної статистики, використовуючи програму обробки даних SPSS Statistics 17.0 (for Windows). Одержані дані експериментальних рослин представлені у вигляді $X \pm SX$. Ре-

зультати обробляли статистично за U-критерієм Манна-Уїтні. Статистично значущими вважали дані за $P < 0,05$ [4].

Результати досліджень свідчать про гетерогенний розвиток порушень в листовій пластинці заражених фітофторозом рослин під впливом підвищених температур. Дослідні рослини відрізнялися між собою величиною та інтенсивністю ураження листків (табл. 1).

Усі зразки томатів, уражені збудником фітофторозу після 7-денної інкубації, характеризувалися інтенсивною жовтуватістю, а також наявністю на них розсіяних численних дрібних плям, що швидко збільшувалися в розмірах, впродовж двох-трьох днів зливалися і призводили до появи великих округлих розпливчастих некротизуючих бурих плям, розташованих переважно на вершині, по краях, а також часто вздовж центральної жилки з вузькою світло-зеленою облямівкою, яка різко відмежовувалась здоровою тканиною. Зісподу листків інколи спостерігався сірувато-білий спороутворюючий наліт збудника захворювання (рис. 1).

Встановлено, що температура повітря $+15^{\circ}\text{C}$ сприяла найбільш інтенсивному розвитку захворювання, за якої діаметр некротизуючих плям на 7-му добу становив понад 50% поверхні листя рослин. Із під-

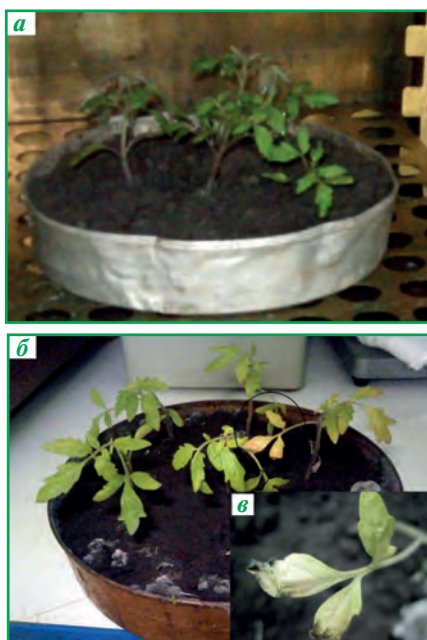


Рис. 1. Зовнішній вигляд дослідних рослин: а — інтактні (контрольні); б — інфіковані суспензією спор *P. infestans* (7 днів після інкубації); в — виокремлений фрагмент більш крупним планом

1. Динаміка інтенсивності ураження фітофторозом листків томатів після 7-денної інкубації в різних температурних режимах ($X \pm SX$)

Розвиток захворювання	Температура, $^{\circ}\text{C}$				
	15	20	25	30	35
Діаметр некротизуючих плям, мм	$8,04 \pm 1,36$	$5,78 \pm 0,88$	$3,01 \pm 0,32$	$2,21 \pm 0,36$	—
Інтенсивність ураження, %	Понад 50% поверхні листя	Понад 50% поверхні листя	25—50% поверхні листя	Поодинокі плями на листках	Плями фітофторозу відсутні

вищенням температури на 5°C показник інтенсивності ураження рослин був ще досить високим — понад 50% поверхні листя рослин. За температури $+25^{\circ}\text{C}$ на 7-му добу після штучного інфікування показник інтенсивності ураження відповідно становив 25—50% поверхні листя. При підвищенні температурного режиму до $+30^{\circ}\text{C}$ значно зменшується величина та інтенсивність ураження листків дослідних рослин — інтенсивність ураження проявляється у вигляді поодиноких плям на окремих листках. Температурні умови за $+35^{\circ}\text{C}$ є непридатними для розвитку захворювання, плями фітофторозу на рослинах були відсутні.

Найбільша величина та інтенсивність ураження листків дослідних рослин (при температурах $+15$ та $+20^{\circ}\text{C}$) сприяють також помірного (середнього) спороношенню *P. infestans*, що в цих температурних умовах становило 25—50% площі листка (табл. 2). Підвищення температурних умов до $+20^{\circ}\text{C}$ не уповільнює процеси розвитку гриба — інтенсивність спороношення спостерігається в тих же межах (25—50% площі листка). Слабке формування спороношення гриба (до 25% площі листка) відзначається при температурі $+25^{\circ}\text{C}$. За умов високих температур $+30$ та $+35^{\circ}\text{C}$ спороношення збудника не відбувалося.

Отже, оптимальною темпера-

2. Вплив температурних умов на інтенсивність спороношення *P. infestans* після 7-денної інкубації (за Д.А. Ільяшенком, 2010)

Температура інкубування, $^{\circ}\text{C}$	Інтенсивність спороношення (польовий метод оцінювання листків)	Інтенсивність спороношення (лабораторний метод оцінювання листків)
15	Середнє, або помірне	25—50% площі листка
20	Середнє, або помірне	25—50% площі листка
25	Слабке	Спороношення займає до 25% площі листка
30	Відсутнє	Поодинокі конідієносці
35	Відсутнє	Спороношення відсутнє

турою для розвитку захворювання є $+15$ — 20°C (верхня межа $+25^{\circ}\text{C}$). За температури $+15$ — 20°C інтенсивність спороношення збудника захворювання найвища. При підвищених термоумовах ($+30$ — 35°C) спороношення не спостерігається.

Результати порівняльних гістологічних досліджень вказують на розвиток певного чітко вираженого спектра патологічних змін, що проявляються в істотних порушеннях анатомо-морфологічної будови гістоструктури асиміляційного апарату томатів при розвитку фітофторозу.

У контрольних рослин вся поверхня листків покрита багаточисельними залозистими волосками, які розташовані як з верхньої, так і з нижньої сторони пластинки, де їх набагато більше. Нижня і верхня сторони листової пластинки покриті безбарвними клітинами епідермісу, серед яких розташовуються продири з хлоропластами, кількість яких на нижній стороні листка значно більша. Одразу за епідермою розташовується чітко диференційований мезофіл листка, останній представлений 2—4-ма шарами стовпчастих клітин, нижче — кількома шарами округлих клітин губчастого мезофілу, між якими добре видно великі міжклітинники (апопласт). Стовпчаста (палісадна) паренхіма складається із призматичних клітин, губчаста — із округлих. Кількість хлоропластів

в клітинах велика, що забезпечує високу інтенсивність фотосинтезу. На поперечному зрізі листової пластинки томату на рівні центральної жилки чітко виявлена деревина (ксилема) судинно-волоконистого пучка, луб'яна частина пучка (флоема), механічна тканина коленхіма, що розташована кількома шарами під і над головною жилкою листка, та механічна тканина склеренхіма, яка надає листку міцність, і має вигляд витягнутих клітин з товстими стінками.

Інша картина була виявлена в процесі гістологічного дослідження на тлі грибкового захворювання в листках груп рослин-живителів, інкубованих при температурах +15°C та +25°C, що є оптимальними для розвитку хвороби.

На 7-му добу з моменту інокуляції у всіх без винятку дослідних рослин виявлено досить видимі відмінності в недорозвиненні провідних (судинно-волокнистих) пучків центральної жилки листка, порівняно з інтактними рослинами. Також відзначався слабкіший розвиток механічної тканини (коленхіми). Під впливом інфекції спостерігалась деформація клітинних утворень гістоструктури листової пластинки. У місці проникнення гриба був некроз покривної тканини листової пластинки, мезофілу листка (особливо губчастого), аж до повного випадання некротизованої тканини із листка (рис. 2—6).

Найбільш важливими з точки зору підтримання нормального функціонального стану рослини і забезпечення їх фізіологічного гомеостазу вважаються такі основні параметри анатомо-гістоструктури листової пластинки: товщини верхнього та нижнього епідермісу, товщини

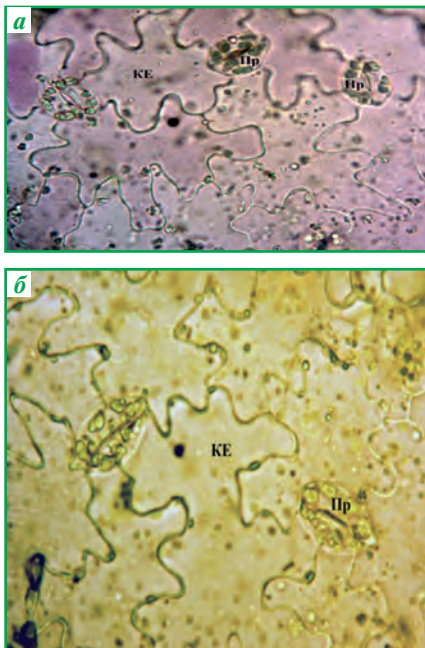


Рис. 2. Епідермальний комплекс нижньої сторони листової пластинки томатів сорту *Волове серце*: а — в нормі; б — при розвитку фітофторозу (7 днів після інфікування). Умовні позначення: *КЕ* — клітини епідерми, *Пр* — прости прорихи з хлоропластами. Примітка: непофарбований препарат. Ок. ×16, об. ×40

палісадного (стовпчастого) та губчастого мезофілу, товщини листової пластинки, площі провідного, або судинно-волокнистого пучка центральної жилки у хлоротичній зоні ураження, яка знаходиться на межі хворої і здорової тканини листка.

Наші дослідження показали, що в інфікованої дослідної групи рослин (II) після 7-денної інкубації при температурі +15°C порівняно із відповідними показниками контрольної групи достовірно зменшувались товщина верхнього та нижнього епідермісу, товщина палісадного та губчастого мезофілу листової пластинки, як і площа провідних пучків, також статистично достовірно зменшується в порівнянні з контрольними рослинами (табл. 3).

За температури +25°C товщина верхнього та нижнього епідермісу достовірно зменшувалась, порівняно із відповідними показниками інтактних рослин, проте достовірно збільшувалась у порівнянні із показником інфікованих рослин при тем-

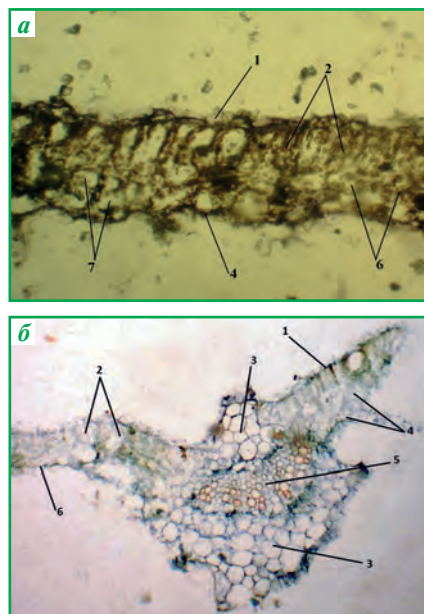


Рис. 3. Гістоструктура листової пластинки томату: а — в нормі; б — при розвитку фітофторозу (7 днів після інфікування). Умовні позначення: 1 — верхній епідерміс; 2 — стовпчастий (палісадний) мезофіл; 3 — хлоропласти в клітинах стовпчастої паренхіми, розташовані уздовж вертикальних стінок; 4 — нижній епідерміс; 5 — залозистий волосок (трихоми); 6 — губчастий мезофіл; 7 — міжклітинники. Примітка: а — непофарбований препарат; б — забарвлення конгорот-гематоксилін. Ок. ×16, об. ×10

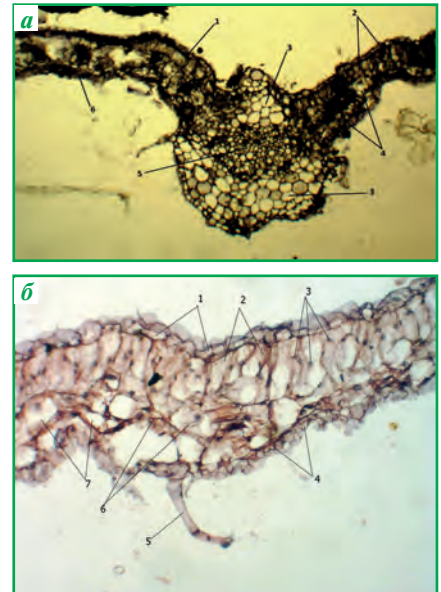


Рис. 4. Гістоструктура листової пластинки томату на рівні центральної жилки: а — в нормі; б — при розвитку фітофторозу (7 днів після інфікування). Умовні позначення: 1 — верхній епідерміс; 2 — стовпчастий мезофіл; 3 — механічна тканина коленхіма; 4 — губчастий мезофіл; 5 — провідний, або судинно-волокнистий пучок; 6 — нижній епідерміс. Примітка: а — непофарбований препарат; б — забарвлення сафранін-аніліновий синій. Ок. ×16, об. ×10

пературі +15°C. Щодо показників товщини палісадного та губчастого мезофілу листової пластинки, то за цими параметрами значних відмінностей у рослин групи (III) від контрольних та рослин групи (II) не виявлено, за винятком факту зменшення товщини губчастого мезофілу у дослідних рослин (III) щодо відповідного показника у інтактних рослин. За аналізу змін морфометричних параметрів було встановлено, що показник площі провідних пучків листової пластинки майже дорівнював відповідному показнику контрольної групи рослин та достовірно збільшувався відповідно до інфікованих рослин при +15°C. Загальна товщина листової пластинки зменшувалась, порівняно із відповідним показником інтактних рослин, проте достовірно збільшувалась в порівнянні з дослідною групою рослин (II).

ВИСНОВКИ

За умов розвитку фітофторозу у тканинах і органах уражених хворобою рослин томатів виникають анатомо-морфологічні зміни, які впли-

вають на загальний функціональний стан організму. У інфікованих рослин спостерігається порушення архітекτονіки листкової пластинки, деформація клітинних утворень гістоструктури листка. При цьому суттєво зменшується товщина як верхнього, так і нижнього епідермі-

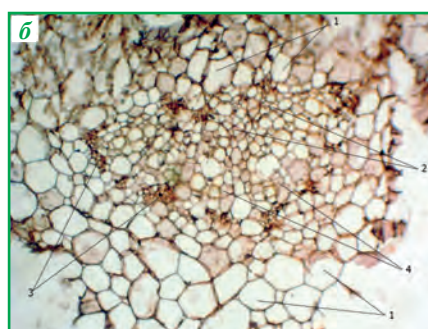
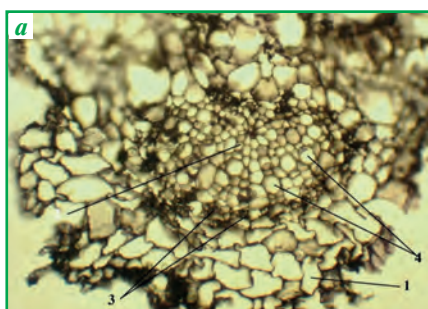


Рис. 5. Поперечний зріз центральної жилки листка томату:
а — в нормі; **б** — при розвитку фітофторозу (7 днів після інфікування).
 Умовні позначення: 1 — механічна тканина коленхіма; 2 — деревина (ксилема) судинно-волокнистого пучка; 3 — механічна тканина склеренхіма; 4 — луб'яна частина пучка (флоема). Примітка: **а** — непофарбований препарат; **б** — забарвлення конгорот-гематоксилін. Ок. $\times 16$, об. $\times 10$

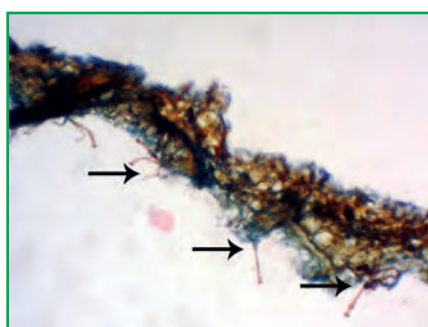


Рис. 6. Ендофітне (внутрішньотканинне) розташування паразита в листковій пластинці рослини-живителя. Стрілками позначено місця виходу збудника *P. infestans* через уражену тканину рослини-живителя. Примітка: забарвлення сафранін-аніліновий синій. Ок. $\times 16$, об. $\times 10$

3. Вплив температури на морфометричні показники анатомічної структури листкової пластинки томатів, інфікованих *P. infestans* ($X \pm SX$)

Цитоструктурні утворення		Група рослин		
		Контроль (I) (інтактні рослини)	Дослідна (II) (інфіковані при +15°C)	Дослідна (III) (інфіковані при +25°C)
Товщина епідермісу, мкм	верхнього	0,11 \pm 0,02	0,071 \pm 0,012*	0,095 \pm 0,015*#
	нижнього	0,166 \pm 0,015	0,069 \pm 0,011*	0,123 \pm 0,031*#
Товщина мезофілу, мкм	палісадного	0,305 \pm 0,038	0,287 \pm 0,019*	0,290 \pm 0,024
	губчастого	0,249 \pm 0,016	0,189 \pm 0,027*	0,197 \pm 0,022*
Загальна товщина листкової пластинки, мкм		0,864 \pm 0,041	0,75 \pm 0,045*	0,825 \pm 0,023*#
Площа провідного, або судинно-волокнистого пучка, МКм ²		0,959 \pm 0,190	0,861 \pm 0,116*	0,938 \pm 0,131#

Примітки: * — достовірна відмінність від даних контрольної групи рослин (при $p < 0,05$ U — критерія Манна-Уїтні); # — достовірна відмінність від даних дослідної групи (II) рослин (при $p < 0,05$ U — критерія Манна-Уїтні)

су, відбувається істотне зменшення товщини палісадного та губчастого мезофілу листкової пластинки, загальна товщина листкової пластинки дослідних рослин, в порівнянні з контрольними рослинами, також суттєво зменшується. Спостерігається часткове зменшення площі провідних пучків листкової пластинки.

ЛІТЕРАТУРА

- Ахатов А.К. Мир томата глазами фитопатолога / А.К. Ахатов. — М.: КМК, 2010. — 288 с.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. Ю.А. Данилова, под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова / С. Гланц. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
- Дьяков Ю.Т. Популяционная генетика *Phytophthora infestans* / Ю.Т. Дьяков, С.Н. Еланский. — М.: Национальная академия микологии, 2007. — 33 с.
- Еланский С.Н. Видовой состав и структура популяций возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля и томата: автореф. дис. на соискание уч. степени док. биол. наук : спец. 03.02.12. «Микология» / С.Н. Еланский. — М., 2012. — 46 с.
- Жданова Н.Н. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте / Н.Н. Жданова, А.И. Василевская. — К.: Наукова думка, 1982. — 168 с.
- Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Б.В. Анисимов, Г.Л. Белов, Ю.А. Варицев и др. — М.: Картофелевод, 2009. — 272 с.
- Методические указания по оценке картофеля на устойчивость к клубневым гнилям / Д.А. Ильяшенко, В.Г. Иванюк, В.И. Калач и др. — Самохваловичи: РУП НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству, 2010. — 52 с.
- Селиванов Е.В. Красители в биологии и медицине / Е.В. Селиванов. — Барнаул: Азбука, 2003. — 40 с.
- Скрипник Н.В. Вплив на патогени анатомо-морфологічних особливостей поверхні листків рослин / Н.В. Скрипник // Карантин і захист рослин. — 2013. — №3 (204). — С. 10—12.

- Справочник по ботанической микро-технике. Основы и методы / Р.П. Барыкина, Т.Д. Веселова, А.Г. Девятых и др. — М.: Издательство МГУ, 2004. — 312 с.
- Филиппов А.В. Фитофтороз картофеля / А.В. Филиппов // Защита и карантин растений. — 2012. — №5. — С. 27.

Ковтун А.Н.

Влияние температуры на степень проявления цитопатологии листьев при фитофторозе томатов

В лабораторных условиях, при искусственном заражении растений томатов возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans*, исследовано изменение патогенеза листовой пластинки под воздействием температуры. Проведены анализ анатомо-морфологического строения листовой пластинки на фоне развития патологического процесса и оценка морфометрических параметров исследуемых образцов температуры, оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, фитофтороз, томаты, искусственное заражение, морфометрические параметры

Kovtun A.M.

Temperature influence on degree of manifestation of leaves cellular pathology, infected by tomato gummosis

In vitro, in the conditions of an artificial infection of tomato plants with the causative agent of Phytophthora infestans, a change of lamina pathogenesis under the temperature influence has been investigated. The analysis of the anatomico-morphological structure of the lamina against the background of the pathological process development and an assessment of the morphometric parameters of the studied samples have been carried out.

temperature, oomycete, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, late blight disease, tomatoes, artificial infection, morphometric parameters

Рецензент:
 Нікішичева К.С.,
 кандидат біологічних наук
 Інститут захисту рослин НААН