

УДК 630\*161.4:631.527:632.4

## ВЛИЯНИЕ ГРИБА *SEPTORIA NODORUM* И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

ЛЕТИ ДЖОС, Е.А. КАЛАШНИКОВА

(Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии)

**Проведено исследование первого этапа клеточной селекции пшеницы на устойчивость ее к *Septoria nodorum*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в качестве селекционирующего объекта можно использовать как культуральные фильтраты, так и непосредственно грибок, выращенный на агаре. Установлены оптимальные концентрации грибка в жидкой и твердой средах.**

Значительным резервом повышения продуктивности зерновых культур является снижение потерь урожая от болезней, среди которых значительную опасность представляет септориоз. Возбудителями септориозов являются несовершенные грибы, относящиеся к группе Sphaeropsidales. На пшенице развивается 10 видов рода *Septoria*, из которых наиболее часто встречаются следующие: *S.graminis*, *S.tritici*, *S.nodorum*.

Заболевания пшеницы, возникающие вследствие поражения растений указанными грибами, встречаются повсюду, но наибольший вред септориозы приносят ее посевам в южных странах (в Индии, Румынии, Испании, Италии, южных районах Америки, Африки и т.д.). Значительное угнетение пшеницы септориозами

отмечено при развитии болезни на ослабленных растениях, пораженных, например, ржавчиной, насекомыми и др.

*S.nodorum* — наиболее распространенный и опасный возбудитель септориоза у пшеницы, ячменя, ржи, овса, поражающий все надземные органы растений, включая колос и зерно. Вредоносность септориоза высока. Видимые его симптомы: угнетенное состояние растений, низкорослость, преждевременное усыхание листьев, уменьшение длины и озерненности колоса, шуплость зерна. На стебле и его узлах развиваются септориозные пятна, что определяет полегание растений. Наиболее вредоносно поражение колосьев и зерен, поскольку ведет к потере урожая не только в год посева, но и на следую-

щий год, так как у зараженных семян снижаются энергия прорастания и полевая всхожесть. Болезнь поражает не только надземные органы растений, но и корневую систему [4].

Традиционные методы селекции позволяют создавать сорта пшеницы, обладающие устойчивостью к септориозу в той или иной степени, однако селекционный процесс, как известно, очень трудоемкий и весьма длительный.

Использование методов биотехнологии, в частности культуры изолированных клеток, тканей и органов растений, позволяет сократить сроки проведения селекции и повысить ее эффективность. Особого внимания заслуживает клеточная селекция, позволяющая в лабораторных условиях *in vitro* отбирать из многомиллионных каллусных клеточных популяций резистентные клетки, а затем из них получать целые растения. Работы в этом направлении ведутся с люцерной [2], картофелем [5], ячменем [6], томатами [7], свеклой [8], пшеницей [5] и другими культурами. Как правило, отбор устойчивых клеточных линий осуществляют на каллусной ткани, реже — на суспензионной культуре и изолированных протопластах.

Большинство исследователей в качестве селекционируемых объектов используют культуральные фильтраты возбудителей болезней, а также чистые токсины патогенов или их смеси с ферментами.

Работы по клеточной селекции пшеницы на устойчивость к болезням малочисленны и носят

пока понсковый характер, а данные по клеточной селекции пшеницы на устойчивость к *Septoria nodorum* в доступной нам литературе отсутствуют. В связи с этим наше исследование было посвящено первому этапу клеточной селекции пшеницы на устойчивость к септориозу, который заключается в определении токсичности культурального фильтрата (КФ) и выборе диапазона его концентраций.

### Методика

Объектом исследования служили семена, а также зрелые зародыши пшеницы сорта Саратовская 29. Растительный материал стерилизовали 30 мин в 0,1% растворе тимирозала, после чего экспланты трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Определенные токсичности КФ проводили на семенах и зрелых зародышах, которые культивировали на безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) в чашках Петри и конических колбах.

Чистая культура *S.nodorum* была предоставлена нам Институтом фитопатологии (г.Галицино). Гриб *S.nodorum* выращивали на твердой агаризованной или жидкой питательных средах, содержащих минеральные соли по прописи МС, сахарозу — 2%, глицин — 0,2 мг/л, инозит — 10 мг/л, тиамин—НС1 — 0,01 мг/л, пиридоксин — 0,05 мг/л, никотиновую кислоту — 0,05 мг/л. Культуральную жидкость получали, выращивая изоляты в колбах на 100 мл в 50 мл жидкой питательной среды на качалках при 100 об/мин.

В каждую колбу вносили кусочек агара 0,5 x 0,5 см, содержащий  $10^5$  конидий гриба. Токсичность КФ определяли на 7, 11 и 14-й день культивирования. Для этого содержимое колбы фильтровали через бумажный фильтр, а затем полученный раствор пропускали через бактериальный фильтр с порами 0,45 мкм (фирма «Millipore»). Изучаемые разведения КФ — 0, 25, 50, 75 и 100%.

Одновременно устанавливали токсичность гриба, культивируемого на агаре. В этом случае заражение проводили путем помещения 3, 4, 5 и 6 кусочков агара размером 0,3 x 0,3 см с грибом на заранее приготовленную безгормональную питательную среду МС, куда помещали затем изолированные зародыши.

В каждом опыте использовали 30 экзплантов, учитывали длину корневой системы и длину надземной части. Повторность опыта 2-кратная.

Токсичность КФ и гриба на агаре определяли по методике О.А. Берестецкого [1] и рассчитывали по следующей формуле:

$$T = 100\% - \left( \frac{\Sigma I_c}{\Sigma I_k} \cdot 100 \right),$$

где T — токсичность КФ или гриба на агаре;  $\Sigma I_c$  — сумма длин проростков пшеницы на КФ или на агаре;  $\Sigma I_k$  — сумма длин проростков на воде (контроль).

### Результаты

Получение устойчивых к тому или иному биотическому фактору растений — процесс длительный. Он включает несколько этапов: получение хорошо растущей

морфогенной каллусной ткани, собственно клеточную селекцию, регенерацию растений из стабильно устойчивых каллусных клеток, а также проверку полученных растений-регенерантов на устойчивость к селективирующему объекту. Как правило, последний добавляют в питательную среду в различных концентрациях и экспериментально определяют его оптимальную концентрацию, при которой с одновременным ростом одной части каллусной ткани наблюдается гибель другой.

Что же касается получения растений, устойчивых к болезням, то оно начинается с определения условий выращивания грибов, позволяющих получить наиболее токсичные их КФ, и диапазона концентраций КФ, оказывающих токсичное действие на прорастание семян, изолированных зародышей и в конечном итоге на культуру каллусных клеток.

Наши исследования показали, что КФ *S.nodorum* в различных разведениях оказывает в той или иной степени токсичное действие на прорастание семян (табл. 1). Однако следует отметить, что даже при разведении 100% токсичность КФ составила всего лишь 51,6%, а при разведениях 25 и 50% она была очень низкой: соответственно 1,6 и 9,7%. Последнее было обусловлено значительной стимуляцией роста зеленой массы (стебля) в этих вариантах по сравнению с контролем на протяжении всего времени наблюдений (5—7 дней). Объяснить указанное явление можно на основании уже существующих данных по *S.nodorum*. В частности, в культуральной жидкости *S.nodorum*

были обнаружены 4 токсина, 2 из которых — охратин и септорин — выделены и прошли испытания на семенах пшеницы, а 2 других до сих пор известны только в синтезированном виде: (---) 3RО метилмеллена и (—) 3R гидроксн-7-меллена 4 [3]. Экспериментально установлено, что охратин и септорин в пониженных

концентрациях (5 мг/л) оказывают стимулирующее действие на рост корней и побегов. Вероятно, выбранное нами разведение КФ содержало то минимальное количество токсинов, которое заметно усиливало прорастание семян и формирование более мощного побега по сравнению с контролем.

Таблица 1

Прорастание семян пшеницы

Вариант	Средняя длина побега, см			Средняя длина корней, см			Токсичность КФ на 5-й день, %
	день наблюдения						
	2-й	3-й	5-й	2-й	3-й	5-й	
Контроль	0,41	1,68	7,46	1,24	3,09	7,66	
<i>В % к контролю</i>							
КФ 25%	134,1	145,8	121,8	107,3	91,3	75,6	1,6
КФ 50%	117,1	126,8	125,6	100,8	70,9	55,9	9,75
КФ 75%	87,8	92,8	95,5	69,3	51,7	40,4	32,4
КФ 100%	80,5	69,0	76,4	53,2	31,1	21,1	51,6

Исходя из первых полученных данных мы попытались определить токсичность КФ на изолированных зародышах и установить,

существует ли закономерность в действии КФ на формирование проростков из семян и изолированных зародышей (табл. 2, рисунок).

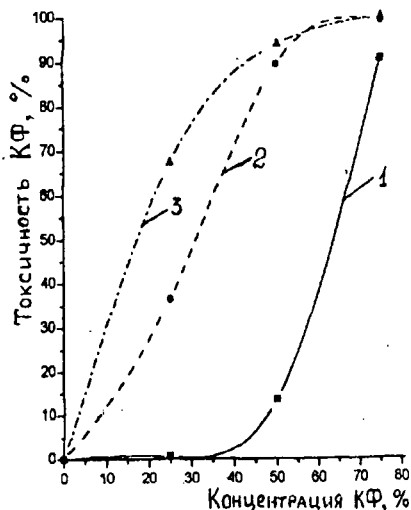
Таблица 2

Прорастание изолированных зародышей пшеницы

Вариант	Средняя длина побега, см			Средняя длина корней, см		
	время выращивания гриба в жидкой питательной среде, дни					
	7	11	14	7	11	14
Контроль	12,0	12,0	12,0	1,9	1,9	1,9
<i>В % к контролю</i>						
КФ 25%	120,8	52,5	30,8	242,1	121,0	73,7
КФ 50%	84,2	20,8	8,3	152,6	15,8	5,3
КФ 75%	8,3	0,8	0,8	10,5	0	0

Результаты наблюдений показали, что с увеличением разведения КФ в питательной среде возрастает его токсичность и при 75% разведении она достигает максимума — 90,5—100% (рис. 1).

Также следует отметить, что с увеличением времени выращивания *S.nodorum* в жидкой питательной среде, вероятно, увеличивается накопление токсинов в КФ. Так, достаточно высокая токсичность



Зависимость токсичности КФ от его разведения и времени выращивания гриба в жидкой питательной среде.

1, 2 и 3 — соответственно 7, 11 и 14-дневный КФ.

(67,3%) у 14-дневного КФ даже при разведении 25%. Наличие в питательной среде 11- и 14-дневного КФ в разведении 50% также было токсично для образования проростков из изолированных зародышей, в то время как 7-дневный КФ в той же концентрации был практически нетоксичен, а, наоборот, стимулировал формирование более длинной корневой системы (2,9 см по сравнению с 1,9 см в контроле).

Иная картина наблюдалась при использовании 7-дневного КФ в разведении 25%. В этом варианте на 20,8% увеличивался рост побегов и на 142,1% — рост корней по сравнению с контролем.

Полученные данные еще раз подтверждают тот факт, что токсины, входящие в состав КФ *S.nodorum*, в малых концентрациях

стимулируют рост не только надземной, но и подземной частей проростков пшеницы.

Таким образом, можно заключить, что при селекции пшеницы на устойчивость к *S.nodorum* целесообразно использовать 11- и 14-дневные КФ в разведении от 20 до 35%, обеспечивающие 50% токсичность.

Как правило, клеточную селекцию на устойчивость растений к болезням проводят с использованием КФ гриба. Однако исследователям не всегда удается получить стерильный фильтрат, так как конидии, имеющие большой размер, быстро забивают бактериальный фильтр и культуральный раствор не проходит через него. Поэтому в ряде случаев используют грибы, культивируемые на агаре. Для многих видов грибов характерен быстрый рост конидий на агаре, что позволяет наблюдать быстрое зарастание питательной среды грибом. Для *S.nodorum* это явление нехарактерно. В связи с этим нами были предприняты попытки определить возможность совместного культивирования гриба и изолированных зародышей на одной питательной среде.

Из табл. 3 видно, что с увеличением количества кусочков агара с грибом от 3 до 6 шт. в одной чашке Петри их токсичность возрастает от 63,6 до 80,1%. Причем, независимо от количества *S.nodorum* в одной чашке, резко снижается рост побегов и корней по сравнению с контролем (табл. 3).

Таким образом, наличие 3 кусочков агара с *S.nodorum* вполне достаточно для проведения работ по клеточной селекции пшеницы на устойчивость к данной болезни.

## Заключение

Разработан первый этап клеточной селекции пшеницы на ус-

тойчивость ее к *Septoria nodorum*. Показано, что с увеличением разведения и времени выращивания

Таблица 3

Проращивание изолированных зародышей пшеницы при воздействии на них *S.nodorum*, культивируемым на агаре

Вариант (количество кусочков агара с грибом, шт.)	Средняя длина побега, см/% к контролю	Средняя длина корней, см/% к контролю	Токсичность <i>S.nodorum</i> , %
Контроль	14,4	10,1	—
3	6,9/47,9	2,9/28,7	63,6
4	6,0/41,7	2,0/19,8	64,6
5	4,6/31,9	1,2/11,9	77,9
6	4,0/27,8	0,9/8,9	80,1

гриба *S.nodorum* в питательной среде уменьшается его токсичность, которая выражается в усилении способности семян и изолированных зародышей к проращиванию. Установлены оптимальные разведения КФ — 20—35% при 11- и 14-дневном культивировании. Наличие 3—6 кусочков агара, содержащих *S.nodorum* в одной чашке Петри, также токсично для семян и изолированных зародышей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Берестецкий О.А. Определение фитотоксической активности культур микроскопических грибов. — В кн.: Методы экспериментальной микологии. Киев, 1973, с. 165—175. — 2. Масленников С.Е., Посытанов Г.С., Мезенцев А.В. Разработка методических подходов для получения форм

люцерны, устойчивых к фузариозу, с использованием культуры каллусов и клеток. — Изв. ТСХА, вып. 3, 1994, с. 177—185. — 3. Никуленко Т.Ф. Токсины фитопатогенных грибов и их роль в развитии болезней растений. М.: Агропромиздат, 1987. — 4. Пыжикова Г.В., Санина А.А. Септориоз зерновых культур. — Защита раст., 1987, № 6, с. 15—16. — 5. Сидоров В.А. Биотехнология растений. — Клеточная селекция. Киев: Наукова думка, 1990. — 6. Hunold R. — Arch. Phytop. Pflanzenschutz. Berlin, 1989, Bd 25, № 3, S. 267—276. — 7. Kramer R., Schlegel H., Schiitze R. — Arch. Phytop. Pflanzenschutz. Berlin, 1989, Bd 25, № 3, S. 259—266. — 8. Vislur J. — Ann. de Gembloux, 1984, vol.90, № 1, p. 39—44.

Статья поступила 8 июля 1996 г.

## SUMMARY

The first stage of cellular selection of wheat for stability to *Septoria nodorum* has been developed. Higher concentration of cultural filtrate (CF) in nutrient media increases its toxicity which affects germination capacity of seed and isolated embryos. It has been found that optimum CF concentration is 20—35% with cultivation for 11 and 14 days. The presence of 3—6 pieces of agar containing fungus *Septoria nodorum* in a petri dish is also toxic for seed and isolated embryos.