

Висновки

Результати даних досліджень можна використовувати для побудови тест-системи *in vitro* для первинного скринінгу ізолятів грибів роду *Alternaria* на токсигенність та добору толерантних до альтернаріозу форм озимої м'якої пшеници. Було розроблено умови проведення роботи *in vitro* та відібрано для подальших досліджень найбільш токсигенні ізоляти.

Список літератури

1. Бабаянц О.В. Видовой состав и вредоносность микробиоты колосьев озимой пшеницы южной степи Украины // Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: Тез. докл. Междунар. научно-практической конференции СГІ–НЦНС, 11-14 вересня 2007 р. – Одеса: КП ОМД, 2007 р. – С. 42.
2. Ганнибал Ф.Б., Левитин М.М. Видовое и внутривидовое разнообразие токсигенных грибов рода *Alternaria* // Успехи медицинской микологии: Материалы IV Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М.: Национальная академия микологии, 2006. – Т. VII. – С. 7-8.
3. 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: ВИЗР, 2007. – С. 82-93.
4. Ганнибал Ф.Б. Виды рода *Alternaria* в семенах зерновых культур в России // Микология и фитопатология. – 2008. – Т. 42, Вып. 4. – С. 359-368.
5. Никифорова Е.А. Фитопатологическое состояние семян озимой мягкой пшеницы в зоне южной степи Украины // Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: Тез. докл. Междунар. научно-практической конференции СГІ–НЦНС, 11-14 вересня 2007 р. – Одеса: КП ОМД, 2007 р. – С. 17.
6. Ткачёва А.А., Поляков А.В., Бирюкова Н.К. Усовершенствованный метод оценки селекционного материала огурца на устойчивость к фузариозному увяданию // Проблемы научного обеспечения овощеводства юга России: Матер. Междунар. научно-практической конференции КНИИОКХ РАСХН, 4-7 сентября 2004 г. – Краснодар, 2004 г. – С. 70-75.
7. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ФИТОПАТОГЕНАМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВМЕСТНЫХ КУЛЬТУР

И.В. МАКСИМОВ, доктор биологических наук;

О.Б. СУРИНА, кандидат биологических наук;

Н.Б. ТРОШИНА, доктор биологических наук

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Введение

Сложность оценки устойчивости растений к патогенам в полевых условиях связана с их многообразием. В связи с этим в исследованиях фитоиммунологов используются способы культивирования конкретных патогенов на растениях, поражаемых органах и каллусной культуре. Причем сроки оценки устойчивости растений с начала опыта могут занимать длительный период, связанный как с онтогенезом растений, так и с периодом вегетации. Например, возбудители твердой и пыльной головни пшеницы развиваются в растениях бессимптомно вплоть до формирования у них генеративных органов, что

приводит к полному уничтожению потенциального урожая с инфицированных участков. Отсутствие симптомов болезней на растениях вызывает трудности не только в изучении физиологии взаимодействия растений с этими патогенами, но и в поиске новых средств защиты против них. Кроме возбудителей головни проблемными патогенами в современном растениеводстве на пшенице являются различные возбудители болезней, проявляющиеся в период вегетации растений. До сих пор наиболее эффективным, но, в то же время, экологически небезопасным методом защиты от патогенов, является обработка семян различными проправителями, а посевов – фунгицидами.

Для решения проблем селекции зерновых культур на устойчивость к патогенам уже давно используются каллусные культуры, растущие на фоне культурального фильтрата грибов [2, 7, 15]. Сведений о результатах совместного культивирования каллусов злаковых с грибными фитопатогенами в литературе очень мало. Одна из известных нам работ – исследование Kaur с соавторами [11], получившими совместную культуру каллуса пшеницы с возбудителем карнальской (индийской) головни.

Салициловая кислота (СК) и препараты хитоолигосахарида (ХОС) являются признанными индукторами устойчивости растений [4, 6, 12, 13, 17], с чем, в частности, связывают реализацию индуцированной системной приобретенной устойчивости [14, 16]. Можно полагать, что повышение устойчивости растений, предобработанных СК и ХОС, связано с индукцией в них накопления H_2O_2 [3, 8]. Воздействие этих соединений на устойчивость растений и каллусов пшеницы к ряду патогенов почти не исследовано.

Цель этой работы – анализ полученных нами в лаборатории данных по формированию совместных культур клеток и тканей пшеницы с наиболее вредоносными болезнями.

Объекты и методы исследования

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали незрелые зародыши пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Жница и пшеницы *T. timopheevii* Zhuk. (образец К-58666 из коллекции Всесоюзного НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, С-Петербург). Зародыши пшеницы изолировали через 12-15 сут после начала цветения растений из сформировавшихся зерновок. Изолированные зародыши высаживали на среду Мурасиге и Скуга (МС) и культивировали при 26°C в темноте. Через 30 сут образовавшиеся каллусы весом 200±10 мг пересаживали на свежую питательную среду МС без фитогормонов.

Для получения совместной культуры каллусов пшеницы и возбудителей головневых грибов каллусы спустя 3 сут после 2-го пассажа инфицировали телиоспорами грибов *T. caries* Tul. или *U. tritici* Jens. Инфекционная нагрузка на каждый из исследуемых каллусов составила по 80-100 телиоспор грибов. В случае *T. caries* для инициации прорастания спор, инфицированные каллусы культивировали при температуре 10-12°C в течение 3 сут, после чего каллусы культивировали при комнатной температуре. В случае *U. tritici* это не требовалось. Морфологическую оценку совместных культур каллусов с грибами проводили в течение 60 суток. Интенсивность развития гриба в каллусах оценивали по площади поверхности каллусов, покрытой мицелием гриба, по глубине проникновения гриба в каллус (% от диаметра каллуса) и по количеству образуемых спор.

Оценку развития септориоза проводили на отрезках листьев 7-суточных проростков мягкой пшеницы сорта Жница после инокуляции суспензией пикноспор *S. nodorum* (10^6 спор/мл).

С целью повышения устойчивости растений и каллусов пшеницы к возбудителям грибных болезней использовали препарат 0,1 мг/л ХОС (М.м. 7,5 кД, степень ацетилирования 65 %), 0,05 мМ СК.

Генерацию H_2O_2 в растениях и каллусах пшеницы оценивали по количеству клеток,

окрашенных 3,3-диаминонобензидином (ДАБ). Для этого растительный материал переносили в раствор ДАБ (1,5 мг/мл) с добавлением 2,5 мМ щавелевой кислоты по методикам, приведенным в работах [9, 10, 18].

Результаты и обсуждение

Споры *T. caries* и *U. tritici* прорастали исключительно на участках рыхлого каллуса (рис. 1 а, г). Мицелий грибов рос не только по поверхности каллусов, но и в межклеточных пространствах рыхло расположенных паренхимоподобных клеток (рис. 1 б, д), однако плотные участки каллусов и ризоиды патогенами не инфицировались. Развитие грибов на участках рыхлого каллуса с большими межклетниками и предопределило, вероятно, успех в создании совместных культур каллуса пшеницы с возбудителями головневых. Через 60 сут после инокуляции в каллусах образовывались споры грибов (рис. 1 в, е). Таким образом, в созданной нами совместной культуре каллуса пшеницы с возбудителями твердой и пыльной головни прослежен полный цикл развития грибов от прорастания спор до образования новых спор.

Нами была оценена устойчивость каллусов образца *T. timopheevii*, иммунного к возбудителю твердой головни, и каллусов мягкой восприимчивой пшеницы сорта Жница к грибу *T. caries*. Обнаружено различие в скорости роста гриба в каллусах этих образцов пшеницы. Так, в каллусах восприимчивого образца споры начинали прорастать через 5 сут после инокуляции, а в каллусах иммунного образца – через 12 суток. Более того, глубина проникновения гриба в каллусы иммунного образца в ходе инфицирования была заметно меньшей, чем в каллусы восприимчивого сорта (табл.).

Аналогичные результаты были получены и при анализе развития на каллусах воздушного мицелия *T. caries* (см. табл.). Медленное развитие гриба *T. caries* в каллусах *T. timopheevii* завершалось образованием небольшого количества спор в отличие от восприимчивого образца (рис. 2).

Нами установлено, что в каллусах не только восприимчивого, но и иммунного образцов пшеницы возбудитель твердой головни проходит полный цикл развития вплоть до образования спор. Это говорит об организменном уровне организации защиты растений пшеницы от головневых. Однако, в связи с тем, что скорость роста гриба *T. caries* в каллусах восприимчивой пшеницы в ходе совместного культивирования значительно превышала таковую в каллусах иммунной, данная модель может быть использована для сравнительной оценки устойчивости образцов этой культуры к головневым.

Важно подчеркнуть, что по количеству паренхимоподобных клеток, генерирующих H_2O_2 , инфицированные каллусы восприимчивого и иммунного образцов пшеницы различались. Так, если каллусы восприимчивого образца *T. aestivum* сорта Жница характеризовались относительно низким значением этого показателя (26% клеток), то у каллусов иммунного образца пшеницы *T. timopheevii* K-58666 он составил 38% клеток. Следовательно, полученные результаты обнаруживают некую аналогию в развитии ответных реакций у клеток паренхимы нативных растений и подобных им клеток каллусов пшеницы.

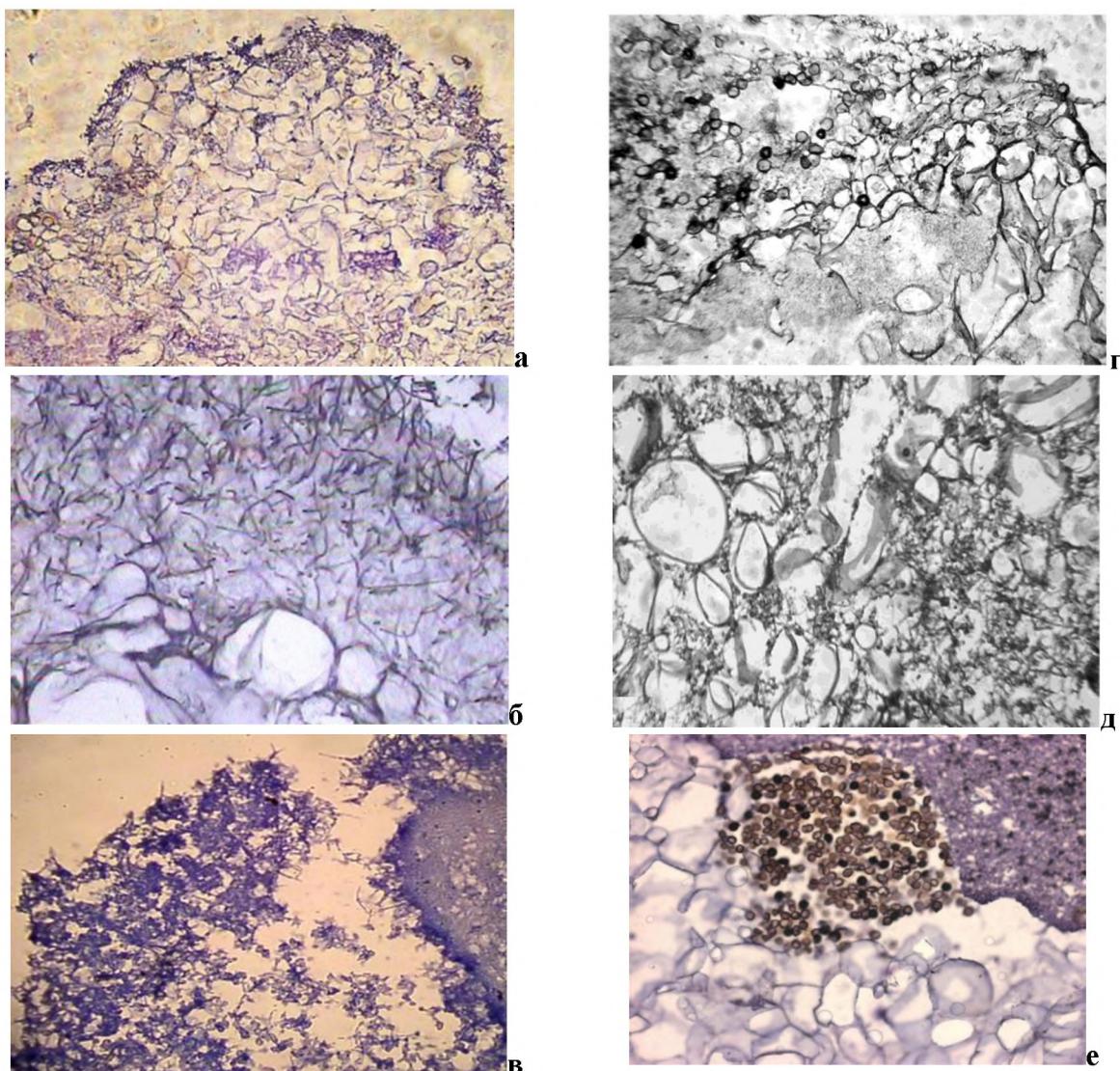


Рис. 1. Рост и развитие *U. tritici* (а-в) и *T. caries* (г-е) на каллусах *T. aestivum* сорта Жница: а, г – прорастание спор, 10 сут после инокуляции; б, д – распространение грибов по межклетникам паренхимоподобных клеток, 30 сут после инокуляции; в, е – образование новых спор грибов, 60 сут после инокуляции. Окрашивание метиленовым синим. Увеличение а – х 200; б-е – х 400

Таблица

Параметры роста и развития *T. caries* в каллусах пшеницы в разные сроки после инокуляции

Параметр роста гриба	Время после инокуляции, сут	Каллус <i>T. aestivum</i> сорт Жница	Каллус <i>T. timopheevii</i> к-58666
Размер инфицированных зон, % к диаметру каллуса	20	14.5±1.2	11.0±0.9
	40	29.3±2.0	18.4±1.2
	60	51.1±3.7	22.6±1.8
Толщина воздушного мицелия, % к диаметру каллуса	20	6.6±0.6	3.8±0.7
	40	10.2±1.0	8.7±0.5
	60	15.7±1.3	10.2±0.8

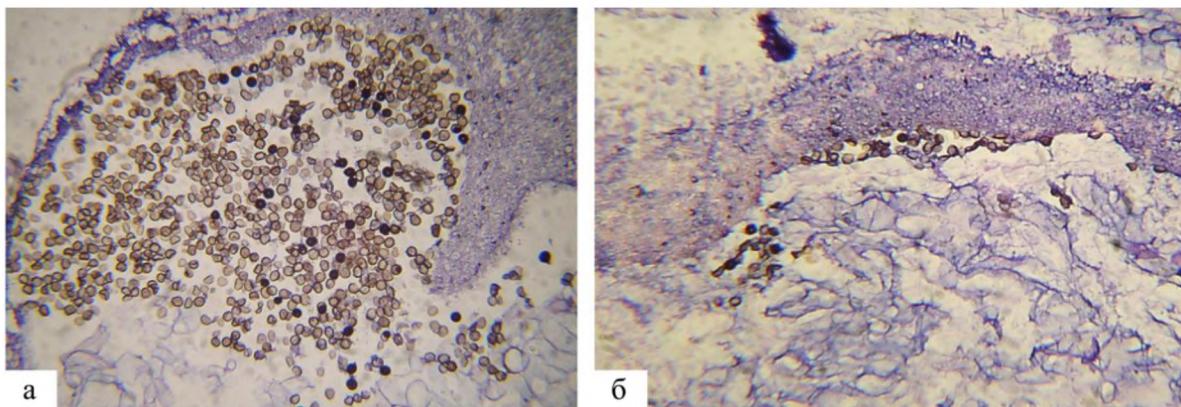


Рис. 2. Образование спор *T. caries* в каллусах *T. aestivum* сорта Жница (а) и образца *T. timopheevii* К-58666 (б). 60 суток опыта, увеличение х 400

Была проведена оценка влияния СК и ХОС на устойчивость каллусов и листьев пшеницы сорта Жница, инфицированных возбудителями головни и септориоза в связи с продукцией в них H_2O_2 .

Введение в среду для культивирования ХОС индуцировало в каллусах ризогенез (рис. 3 I-б), что подтверждает их способность усиливать корнеобразование [5]. Культивирование каллусов на среде, содержащей СК, приводило к уменьшению их диаметра за счет увеличения числа плотных участков (рис. 3 I-в, I-д) и уменьшения рыхлых (рис. 3 I-в, I-д). Инфицирование каллусов также инициировало ризогенез. Это может быть обусловлено выявленной ранее нами способностью головневых грибов к продукции ИУК-подобных соединений [2]. Мицелий грибов рос на каллусах довольно быстро, при этом введение в среду для культивирования каллусов каждого из изучаемых нами индукторов устойчивости приводило к замедлению роста мицелия в каллусах (рис. 3, II-б, II-в, II-д).

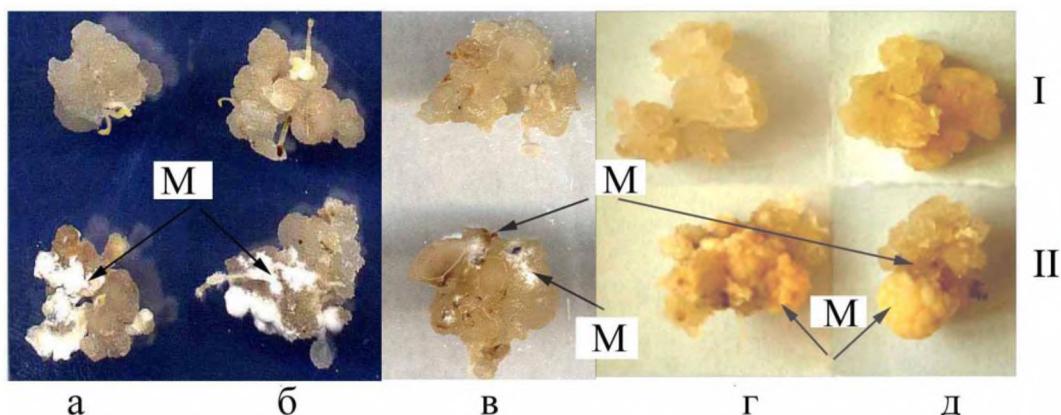


Рис. 3. Влияние хитоолигосахаридов и салициловой кислоты на устойчивость каллусов *T. aestivum* сорта Жница, инфицированных возбудителем твердой головни *T. caries* (а-в) и возбудителем пыльной головни *U. tritici* (г, д): I – контроль, II – инфицирование; а, г – среда МС, б – МС+ХОС; в, д – МС+СК (20 сут после инокуляции, М – мицелий грибов)

В инфицированных грибом *T. caries* паренхимоподобных клетках каллусов, расположенных рыхло, в отличие от таковых в контроле, регистрировали генерацию H_2O_2 (30% клеток). При инкубировании каллусов на среде МС в присутствии СК и ХОС и последующем инфицировании патогеном количество клеток, генерирующих H_2O_2 , увеличилось до 50%. Это коррелировало с подавлением роста мицелия гриба на каллусах. Таким образом, культивирование каллусов пшеницы в присутствии

индукторов устойчивости и последующее их инфицирование способствовало усилинию генерации H_2O_2 в паренхимоподобных клетках, подавлению роста мицелия головневых и инициированию появления не поражаемых патогенами плотных участков и ризоидов.

Анализ интенсивности генерации АФК клетками листьев пшеницы, инфицированными грибом *S. nodorum*, показал, что в контроле генерацию H_2O_2 обнаруживали только в зоне сосудистых пучков, а при инфицировании регистрировали и в зоне нанесения пикноспор гриба *S. nodorum* (рис. 4 А).

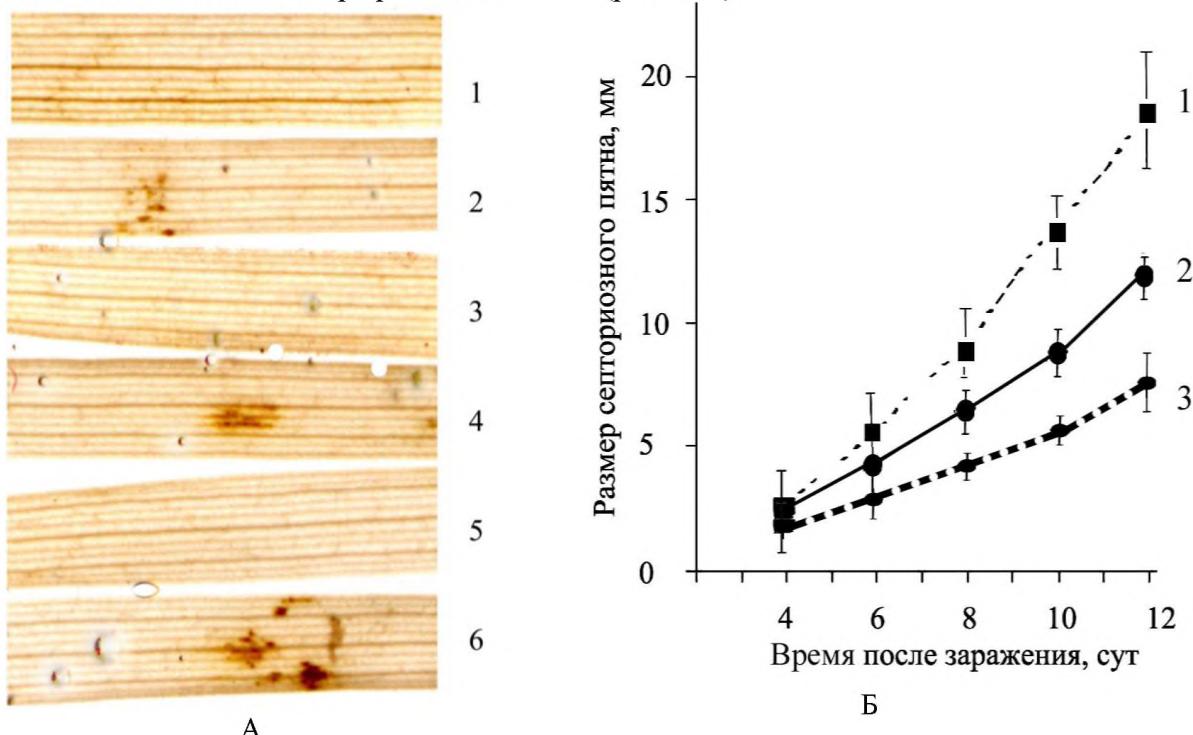


Рис. 4. Влияние салициловой кислоты и хитоолигосахаридов на интенсивность генерации H_2O_2 в листьях пшеницы *T. aestivum* сорта Жница, инфицированных *S. nodorum*: (А) 1 – контроль; 2 – *S. nodorum*; 3 – СК; 4 – СК+*S. nodorum*; 5 – ХОС; 6 – ХОС+*S. nodorum*. Окраска 3,3 – диаминобензидином DAB) и развитие симптомов септориоза (Б) 1 – *S. nodorum*, 2 – СК+*S. nodorum*, 3 – ХОС+*S. nodorum*

Предобработка индукторами устойчивости приводила к возрастанию количества клеток мезофилла, продуцирующих H_2O_2 . Это коррелировало с эффектом снижения в листьях степени развития симптомов септориоза (рис. 4 Б). Таким образом, продукция H_2O_2 в клетках растений пшеницы, обнаруживаемая в зоне роста возбудителей грибных болезней, является одним из факторов, защищающих растения от патогенов.

Выводы

Нами разработаны и усовершенствованы методы культивирования патогенных грибов, вызывающих септориоз и головню злаковых на каллусных культурах и отрезках листьев. Показана возможность длительного совместного культивирования каллусов пшеницы с возбудителями твердой (*T. caries*) и пыльной головни (*U. tritici*). Прослежен полный цикл развития грибов от прорастания спор до формирования новых как на листьях, так и на каллусах пшеницы. Обнаружено подавление под влиянием индукторов устойчивости гипертрофированного роста каллусов, вызванного биотрофами, а также получены данные об индукции активности генерации H_2O_2 в тканях растений и каллусах. Таким образом, совместные культуры клеток и тканей растений пшеницы с возбудителями грибных болезней следует рассматривать как удобную модель для скрининга защитных препаратов.

Список литературы

1. Карабаев М.К., Джардемалиев Ж.К. Культивируемые клетки пшеницы и кукурузы. Морфогенез и толерантность // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, № 6. – С. 807-814.
2. Влияние твердой головни на рост проростков и каллусов пшеницы / Максимов И.В., Трошина Н.Б., Хайруллин Р.М., Сурина О.Б., Ганиев Р.М. // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 5. – С. 767-772.
3. Влияние салициловой кислоты на активность пероксидазы в совместных культурах каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul. / Максимов И.В., Черепанова Е.А., Сурина О.Б., Сахабутдинова А.Р. // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 4. – С. 534-540.
4. Озерецковская О.Л., Роменская И.Г. Олигосахарины как регуляторные молекулы растений // Физиология растений. – 1996. – Т. 43, № 5. – С. 843-852.
5. Поликарпова Ф.Я., Паворва А.Ю., Борисова А.А. Влияние лактата хитозана на индукцию ризогенеза в стеблевых черенках садовых культур // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. – М.: ВНИРО, 2003. – С. 108-111.
6. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
7. Шаяхметов И.Ф., Асфандиярова Р.Р. Влияние фитотоксичных метаболитов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) SH. на рост каллусной ткани и регенерацию растений пшеницы // Физиология растений. – 1991. – Т. 38, № 2. – С. 399-405.
8. Alvarez M.E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance // Plant Mol. Biol. – 2000. – V. 44. – P. 429-442.
9. Caliskan M., Cuming A.C. Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalateoxidase gene expression during wheat embryo germination // Plant J. – 1998. – V. 15. – P. 165-171.
10. Ganesan V., Thomas G. Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress // Plant Sci. – 2001. – V. 160. – P. 1095-1106.
11. Coculture of wheat callus and cell suspension with *Neovossia indica* / Kaur S., Malhotra A., Aujla S.S., Gill K.S. // Ind. J. Exp. Biol. – 1990. – V. 28. – P. 193-194.
12. Kauss H., Jeblick W. Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. Comparison of ergosterol with other elicitors // Plant Physiol. – 1996. – V. 111. – P. 755-763.
13. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 829-837.
14. Kawano T., Furuichi T. Salicylic acid as a defense-related plant hormone: Roles of oxidative and calcium signaling paths in salicylic acid biology // Salicylic acid: A plant Hormone / Ed. Hayat S., Ahmad A. – Springer Netherlands, 2007. – P. 277-322.
15. Plazek A., Skrzypek E., Zur I. The change of heat emission and phenolic compound level in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca pratensis* Huds. calli treated with *Bipolaris sorokiniana* Sacc. ptytotoxins // J. Agronomy and Crop Science. – 2000. – V. 184. – P. 17-21.
16. Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G. Systemic acquired resistance // Plant Cell. – 1996. – V. 8. – P. 1809-1819.
17. Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V. Changes in hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity // Plant Sci. – 2003. – V. 164. – P. 317-322.
18. Vierheilig H., Schweiger P., Brundrett M. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots // Physiol. Plant. – 2005. – V. 125. – P. 393-404.