

УДК 632.4

## ХРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПТОРИОЗА ПШЕНИЦЫ (*S. TRITICI*, *S. NODORUM*)

© Ю.В. Зеленева, В.П. Судникова

**Ключевые слова:** пшеница; септориоз; популяция; фенотип; изолят; морфотип; культуральные признаки. Споры возбудителей *S. nodorum* и *S. tritici* сохраняют жизнеспособность при хранении изолятов на твердых питательных средах: в чистой культуре, под водой, под вазелиновым маслом; в виде сухого биоматериала на сыпучих субстратах, на гербарных образцах растений пшеницы. Сухой биоматериал возбудителей следует подвергать активизации.

### ВВЕДЕНИЕ

Происходящие в природе вспышки массового развития возбудителей болезней зерновых колосовых культур вызывают существенное колебание сбора урожая. Его ежегодные потери от болезней в России составляют от 8,5 до 20 млн т зерна [1]. Одним из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний пшеницы являются пятнистости, вызываемые несовершенными грибами рода *Septoria* spp. [2]. Опыт мировой науки и сельскохозяйственной практики убедительно доказал, что наиболее эффективным, экономически выгодным и экологически оправданным способом контроля развития болезней является возделывание устойчивых сортов.

Отмечая ежегодное поражение септориозом всех районированных и находящихся в сортоиспытании сортов пшеницы, необходимо проводить систематическое изучение устойчивости пшеницы к патогену. А это, в свою очередь, возможно лишь на искусственном инфекционном фоне. Использование провокационных фонов септориоза пшеницы ограничено в связи с отсутствием методов получения инокулюма патогена в достаточном количестве. Литературные данные о сохранении жизнеспособности септориальных грибов на различных субстратах малочисленны. Имеются лишь сведения о том, что в лабораторных условиях на пораженных листьях пшеницы пикноспоры возбудителя *Stagonospora nodorum* [Berk.] Castellani & E.G. Germano сохраняются не более 6 месяцев, *Septoria tritici* Rob. et. Desm. – до 2,5 лет [3–4].

Поэтому целью данной работы является изучение методов сохранения возбудителей септориоза без утраты их свойств.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили моноспорные изоляты септориоза (*S. tritici* и *S. nodorum*), выделенные с фрагментов пораженных листьев образцов районированных сортов яровой и озимой пшеницы на территории Центрально-Черноземного региона.

При проведении работ с септориальными грибами использовали метод культивирования их на искус-

ственных средах [5]. Культуру выращивали на картофельно-глюкозном (КГА), овсяном и овощном агаре. В исследование были включены высокоспорующие изоляты возбудителей септориоза пшеницы *S. tritici* и *S. nodorum*.

Устанавливали возможность хранения изолятов возбудителей на твердых питательных средах: в чистой культуре, под водой, под вазелиновым маслом; в виде сухого биоматериала и на природных субстратах (ячмень размолотый, пшено, солома, овсяная и перловая крупа), на гербарных образцах растений пшеницы, зараженных изолятами гриба. Гербарный материал упаковывали в фитопатологические пакеты и хранили при температуре +5 °С [6–7].

Сухой биоматериал получали путем отделения пикнид и конидий возбудителей септориоза, полученных на твердых питательных средах, их высушивания и хранения в холодильнике при температуре +5 °С. Биоматериал высушивали различными способами: при комнатной температуре; над серной кислотой, в сушильном шкафу при температуре +30 °С. Высушенный биоматериал хранили без измельчения в пробирках и полиэтиленовых пакетах или в измельченном виде (в ампулах). Через 3 месяца хранения определяли прорастаемость спор.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В результате исследований установлена возможность хранения возбудителей септориоза (*S. tritici* и *S. nodorum*) в чистой культуре на КГА в течение двух и более лет при пересеве культур 2 раза в год на свежую среду. Однако в процессе пересевов изменяются типичные морфологические признаки и теряются спорующие и патогенные свойства гриба.

Наблюдением за хранением изолятов возбудителей *S. nodorum* на твердых питательных средах установлено, что при хранении чистой культуры под вазелиновым маслом высокая прорастаемость спор (>70–80 %) сохраняется в течение года (табл. 1). При хранении под водой почти такая же прорастаемость спор у изолятов 32В оказалась на овощном и картофельно-глюкозном агаре, у изолята 38Б-13 – на овсяном агаре, у изолята 46В прорастаемость спор при этом очень низкая.

При хранении чистой культуры *S. nodorum* в пробирках на твердой питательной среде жизнеспособность спор в течение года снижается в 2–6 и более раз.

Прорастаемость спор *S. tritici* при хранении на твердых питательных средах изменяется в зависимости от изолятов и способа хранения (табл. 2). У изолята 07А наиболее высокие показатели наблюдались при хранении спор под вазелиновым маслом, у изолята 74В – при всех трех способах хранения.

Таким образом, чистую культуру *S. nodorum* на твердой питательной среде в течение года лучше хранить под вазелиновым маслом, а для некоторых изолятов и под водой. Для возбудителя *S. tritici* возможны различные способы хранения в зависимости от изолянта: под вазелиновым маслом, под водой и на твердой питательной среде.

При изучении различных сроков хранения сухого биоматериала *S. tritici* установлено, что с увеличением срока хранения (9–12 мес.) прорастаемость спор снижается в 1,5–2 раза (табл. 3). При этом хранить сухой биоматериал *S. tritici* можно без измельчения в ампулах. При более длительном сроке хранения (12 мес.) прорастаемость спор выше в ампулах. Условия выращивания культуры перед закладкой на хранение оказывают влияние на жизнеспособность спор. При 13-суточном режиме темноты прорастаемость спор наибольшая как при 9, так и 12 мес. хранения сухого биоматериала, при этом у изолята 74В у большинства вариантов более высокая прорастаемость по сравнению с изолятом 07А.

Сухой биоматериал *S. nodorum* в отличие от *S. tritici* сохраняет высокую прорастаемость спор в течение 6,

Таблица 1

Прорастаемость спор в зависимости от способа хранения биоматериала *S. nodorum* (12 месяцев хранения)

№ изолята	Прорастаемость спор, %			
	Вода	Среда	Вазелиновое масло	Средние по изолятам
Твердая питательная среда – овощной агар				
32В	78,7	10	77,3	64,7
46Б	19,2	8,8	84,3	37,7
38Б-13	83,3	12,8	73,3	46,4
				НСР <sub>05</sub> = 2,6
Твердая питательная среда – картофельно-глюкозный агар				
32В	78,5	58,0	85,8	–
46Б	22,8	28,5	84,2	–
38Б-13	24,3	12,0	72,7	–
Средние по способу хранения	47,5	21,7	79,6	НСР <sub>05</sub> = 2,6
Для частных средних НСР <sub>05</sub> = 6,69 $S_x = 2,7\%$				

Таблица 2

Прорастаемость спор в зависимости от способа хранения биоматериала *S. tritici*

№ изолята	Срок хранения, мес.	Прорастаемость спор, %		
		Вода	Среда, КГА	Вазелиновое масло
07А	9	52,5	49,2	60,2
74В	9	74,3	72,5	63,2
07А	12	39,2	52,2	61,5
74В	12	61,3	61,5	69,3
Для частных средних НСР <sub>05</sub> = 7,0 $S_x = 2,9\%$				

Таблица 3

Влияние приемов хранения сухого биоматериала *S. tritici* и способов выращивания культуры на прорастаемость спор

№ изолята	Прием хранения сухого биоматериала	Срок хранения, мес.					
		9			12		
07А	Неизмельченный в пробирках	38,2	43,7	69,7	25,3	38,7	26,0
	Неизмельченный в полиэтиленовых пакетах	35,0	54,0	57,0	20,2	22,8	35,3
	Измельченный в ампулах	23,7	37,3	54,3	26,0	29,3	43,2
НСР <sub>05</sub> = 5,51 $S_x = 1,7\%$							
74В	Неизмельченный в пробирках	45,3	53,3	–	29,3	43,2	24,0
	Неизмельченный в полиэтиленовых пакетах	48,8	47,3	57,8	31,7	30,8	28,7
	Измельченный в ампулах	32,7	51,5	52,7	41,8	44,7	55,7
НСР <sub>05</sub> = 6,25 $S_x = 2,9\%$							

Таблица 4

Влияние приемов хранения сухого биоматериала *S. nodorum* и способов выращивания культуры на прорастаемость спор

№ изолята	Прием хранения сухого биоматериала	Срок хранения, мес.								
		6			9			12		
38Б	Неизмельченный в пробирках	77,2	68,0	81,0	82,3	69,8	80,8	72,8	63,8	82,7
	Неизмельченный в полиэтиленовых пакетах	77,8	56,8	83,7	77,0	48,5	76,7	64,3	60,5	76,3
	Измельченный в ампулах	68,8	64,2	64,7	78,5	47,5	80,7	68,2	69,7	65,7
32В	Неизмельченный в пробирках	74,5	73,7	70,8	67,3	73,5	54,0	68,8	68,7	81,0
	Неизмельченный в полиэтиленовых пакетах	68,2	70,2	72,0	77,0	67,5	60,8	71,0	54,3	62,0
	Измельченный в ампулах	58,5	72,5	72,3	63,3	58,7	63,8	64,8	63,0	70,8
		НСП <sub>05</sub> = 6,51			НСП <sub>05</sub> = 8,74			НСП <sub>05</sub> = 5,8		
		S <sub>x</sub> = 1,7 %			S <sub>x</sub> = 2,5 %			S <sub>x</sub> = 1,6 %		

Таблица 5

Прорастаемость спор сухого биоматериала возбудителей септориоза при хранении без измельчения в пробирках в течение двух лет

№ изолята	Прорастаемость спор, %	№ изолята	Прорастаемость спор, %	№ изолята	Прорастаемость спор, %
<i>S. nodorum</i>			<i>S. tritici</i>		
38Б-13	89,0	01В	62,5	207А	33,2
74А	81,8	21Б	54,7	380В	32,2
98В	74,3	21Б	50,2	325А	33,8
38Б	69,5	21Б	26,0	381В	27,3
48В	64,8	81В	11,0	–	–
НСП <sub>05</sub> = 5,5 S <sub>x</sub> = 2,0 %			НСП <sub>05</sub> = 5,9 S <sub>x</sub> = 4,6 %		

Таблица 6

Прорастаемость спор возбудителей септориоза в зависимости от способа активации

Вариант опыта	Прорастаемость спор, %	
	<i>S. nodorum</i>	<i>S. tritici</i>
	Изоляты	
	Хранение 1 год	
	538Б	174В
Контроль без активации	45,0	44,2
Прогревание 30 мин., 50 °С, гидратация 24 ч	62,7	47,5
Прогревание 30 мин., 50 °С	54,8	52,8
Гидратация 24 ч	48,3	46,3
	НСП <sub>05</sub> = 2,19 S <sub>x</sub> = 1,0 %	НСП <sub>05</sub> = 77 S <sub>x</sub> = 2,9 %
	207А	
	Хранение 1,5 года	
Контроль без активации	–	15,2
Прогревание 30 мин., 30 °С	–	30,1
Гидратация 18 ч	–	45,1
Гидратация 24 ч	–	47,1
	–	НСП <sub>05</sub> = 6,6 S <sub>x</sub> = 3,4 %

9, 12 месяцев хранения при всех 3-х испытываемых приемах (табл. 4), наиболее высокие показатели были при хранении сухого биоматериала без измельчения в пробирках (от 63,8 до 82,7 %). При хранении без из-

мельчения в полиэтиленовых пакетах или в измельченном виде в ампулах жизнеспособность спор составила от 54,3 до 76,3 %. Споры возбудителя имели лучшие показатели прорастаемости при выращивании культуры 2 дня в темноте, затем 10 дней при ультрафиолетовом облучении.

Установлено также, что сухой биоматериал *S. nodorum* можно хранить без измельчения в пробирках в течение 2 лет, при этом сохраняется высокая прорастаемость спор (табл. 5). Жизнеспособность спор у трех изолятов из десяти составила от 74,3 до 89,0 %, у пяти изолятов – от 50,2 до 69,5 % и у двух изолятов – от 11,0 до 26,0 %. У возбудителя *S. tritici* прорастаемость спор за этот же срок хранения снизилась в 2–3 раза.

Таблица 7

Прорастаемость спор возбудителей септориоза при хранении на гербарном субстрате

Год закладки на хранение	Прорастаемость спор (%) в 2010 г.	
	<i>S. nodorum</i>	<i>S. tritici</i>
2002	66,3 ± 7,8	0
2003	71,0 ± 1,6	0
2004	87,8 ± 4,9	0
2005	92,3 ± 3,9	0
2006	92,5 ± 0,3	15,7 ± 0,3
2007	87,8 ± 2,7	38,8 ± 4,8
2008	91,3 ± 4,2	30,8 ± 4,6
2009	97,5 ± 0,6	80,1 ± 0,3

Таблица 8

Прорастаемость и патогенность спор возбудителей септориоза при хранении на культуральном субстрате

Вид патогена	Субстрат	Срок хранения, мес.	Прорастаемость спор, %	Патогенность, %
<i>S. nodorum</i>	Овсяная крупа	73	63,0	67,4
	Пшеничная крупа	73	64,8	33,8
	Ячмень размолотый	73	63,3	43,3
	Ячменная крупа	65	47,8	37,2
	Полова	69	90,8	53,7
	Пшено	68	61,3	42,7
	Перловая крупа	61	71,5	47,5
	НСР <sub>05</sub>		<b>5,2</b>	<b>14,2</b>
<i>S. tritici</i>	Отруби ржаные	36	29,3	28,3
	Пшено	38	28,5	29,8
	Овсяная крупа	37	41,5	34,0
	Полова	37	39,5	30,9
	НСР <sub>05</sub>		<b>3,7</b>	<b>4,3</b>

Следовательно, сухой биоматериал *S. nodorum* можно хранить при температуре 5 °С без измельчения (в пробирках и полиэтиленовых пакетах) или измельченным (в ампулах). Прорастание спор сухого биоматериала *S. nodorum* остается наибольшим при хранении без изменения в пробирках, *S. tritici* – в ампулах.

В процессе хранения в течение 1–2 лет прорастаемость спор сухого биоматериала *S. nodorum* большинства изолятов остается на высоком уровне (более 60–70 %). Данный показатель качества инфекционного материала возбудителя *S. tritici* с удлинением срока хранения до 6 и более месяцев снижается в 2–3 раза.

Результаты опытов по активизации сухого биоматериала *S. tritici* показали, что споры, прогреваемые до 50 °С и гидрированные в течение 24 ч, улучшили прорастаемость в 1,4 раза по сравнению с контролем (табл. 6). Гидратация спор в течение 18 и 24 ч также повысила прорастаемость спор в 1,1–3,1 раза.

Достоверные различия в повышении прорастаемости спор сухого биоматериала *S. nodorum* на 8,6 % (или в 1,2 раза) были выше в варианте, где споры прогревались 30 мин. при 50 °С.

Было установлено, что при длительном хранении зараженных септориозом листьев пшеницы выход пикноспор из пикнид происходит значительно медленнее, чем при использовании свежего инфекционного материала. При прорастании спор *S. nodorum* образуется обычно 1–2 ростка по концам споры, у *S. tritici* – от 3 до 12 боковых ростков. Необходимо отметить, что морфологических изменений спор не обнаружено (табл. 7).

Из результатов, приведенных в табл. 7, видно, что споры *S. nodorum* сохраняют жизнеспособность восемь лет. Так, в образцах, собранных в 2001 г., прорастаемость спор составила 60 %, из гербарного материала разных лет хранения была выделена чистая культура гриба.

Пикноспоры *S. tritici* заметно, в 2,5–3 раза, снижают жизнеспособность в течение 3–4 лет хранения и затем полностью ее теряют. В чистую культуру гриба удается выделить после 1–3 лет хранения.

В табл. 8 приведены данные по определению жизнеспособности спор обоих видов грибов после 3–6 лет хранения на сыпучем субстрате. Установлено, что пикноспоры *S. nodorum* после 3-летнего хранения на пше-

не, перловой, овсяной крупе имели высокую прорастаемость от 83 до 93,8 %. При этом перловая крупа была лучшим субстратом. При более длительном (61–73 мес.) хранении инфекционного материала на семи различных субстратах жизнеспособность спор снижается на 20–25 %, за исключением варианта, где споры были получены на половине (8 %).

Если перед закладкой опыта прорастаемость спор *S. tritici* на сыпучих субстратах составляла 98 %, то после хранения в течение трех лет их жизнеспособность снизилась в 2–3 раза. Особенно резко уменьшилось количество спор на пшенице (28,5 %) и ржаных отрубях (29,3 %).

При заражении восприимчивого к септориозу сорта Прохоровка спорами обоих видов грибов различных сроков хранения степень поражения растений составила от 28,3 до 67,4 % (табл. 8), что указывает на сохранение патогенности пикноспор после хранения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, споры возбудителей *S. nodorum* и *S. tritici* сохраняют жизнеспособность при хранении изолятов на твердых питательных средах: в чистой культуре, под водой, под вазелиновым маслом; в виде сухого биоматериала на сыпучих субстратах (ячмень размолотый, пшено, полова, овсяная и перловая крупа), на гербарных образцах растений пшеницы. Сухой биоматериал возбудителей следует подвергать активизации. Полученный биоматериал может быть использован при создании инфекционных питомников септориоза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Санин С.С. [и др.] Фитосанитарная экспертиза зерновых культур. (Болезни растений): Рекомендации / под ред. С.С. Санина. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2002. 138 с.
2. Назарова Л.Н., Корнева Л.Г., Жохова Т.П., Полякова Т.М., Санин С.С. Эпидемиологическая ситуация по септориозу на пшенице в 2001–2009 годах // Защита и карантин растений. 2010. № 10. С. 18–19.
3. Деревякин А.И. Септориоз озимой пшеницы и возможности борьбы с ним в Псковской области: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Тарту, 1970. 20 с.
4. Shipton W.A. et al. The common Septoria diseases of wheat // Bot. Ber. 1971. V. 37. P. 231–232.

5. Методы оценки устойчивости селекционного материала и сортов пшеницы к септориозу: метод. указания. М.: ВНИИФ, 1989. 42 с.
6. Методы экспериментальной микологии / под ред. В.И. Билай. К.: Наукова думка, 1982. 550 с.
7. *Кирай З., Клемент З., Шоймоши Ф., Вереш Й.* Методы фитопатологии. М.: Колос, 1974. 342 с.

Поступила в редакцию 17 февраля 2014 г.

Zeleneva Y.V, Sudnikova V.P. STORAGE OF MATERIAL INFECTIOUS AGENTS OF SEPTORIA WHEAT (*S. TRITICI*, *S. NODORUM*)

Spores and of pathogens *S. nodorum*, *S. tritici* remain viable during storage isolates solid media in pure culture, under water, mineral oil, in the form of dry bulk biomaterial on substrates on herbarium samples of wheat plants. Dry biomaterial pathogens expose activation.

*Key words:* wheat; Septoria; population; phenotype; isolate; morphotype; cultural features.

Зеленева Юлия Витальевна, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, г. Тамбов, Российская Федерация, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры биологии; Среднерусский филиал Тамбовского научно-исследовательского института сельского хозяйства Российской академии сельскохозяйственных наук, пос. Новая Жизнь, Тамбовский район, Тамбовская область, Российская Федерация, старший научный сотрудник, e-mail: zeleneva@mail.ru

Zeleneva Yuliya Vitalyevna, Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov, Russian Federation, Candidate of Agriculture, Senior Lecturer of Biology Department; Central Russian Branch of Tambov Scientific Research Institute of Agriculture RAAS, New Life, Tambov district, Tambov region, Russian Federation, Senior Research Worker, e-mail: zeleneva@mail.ru

Судникова Валентина Павловна, Среднерусский филиал Тамбовского научно-исследовательского института сельского хозяйства Российской академии сельскохозяйственных наук, п. Новая Жизнь, Тамбовский район, Тамбовская область, Российская Федерация, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунитета растений, e-mail: sudnikova@mail.ru

Sudnikova Valentina Pavlovna, Central Russian Branch of Tambov Scientific Research Institute of Agriculture RAAS, New Life, Tambov district, Tambov region, Russian Federation, Candidate of Agriculture, Senior Research Worker of Laboratory of Plant Immunity, e-mail: tmbnsnifs@mail.ru