ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ВРЕДНЫМ ОРГАНИЗМАМ

Методическое пособие

МОСКВА 2008

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РАСТЕНИЕВОДСТВА ИМЕНИ Н.И.ВАВИЛОВА

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ВРЕДНЫМ ОРГАНИЗМАМ

Методическое пособие

МОСКВА

2008

УДК 633.1:581.573.4

Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам. Методическое пособие.

Пособие обобщает литературные сведения и многолетний опыт работы, накопленный сотрудниками ГНЦ РФ ВИР, ВИЗР, СПГАУ и Таллиннского технологического университета. Описаны методы изучения устойчивости зерновых к насекомым и важнейшим болезням, вызываемым облигатными паразитами и гемибиотрофными патогенами. Представлены наиболее распространенные и доступные методы, которые позволили исследователям дифференцировать исходный материал по изучаемым признакам. Представлены теоретические и методические разработки, посвященные не только скринингу зерновых культур, но и изучению генетического контроля устойчивости растений к болезням и вредителям. Пособие может быть использовано в научно-исследовательских учреждениях, селекцентрах, на станциях защиты растений и в ВУЗах при изучении курсов «Частная генетика растений», «Иммунитет растений».

Авторский коллектив:

Е.Е. Радченко, В.И. Кривченко, О.В. Солодухина, Б.В. Ригин, Л.Г. Тырышкин, И.Г. Одинцова, И.Г. Лоскутов, Г.С. Коновалова, Т.В. Лебедева, А.П. Хохлова, М.М. Ковалева, М.А. Колесова, О.Ю. Антонова (ГНЦ РФ ВИР); А.Н. Фролов, Н.А. Вилкова, Л.И. Нефедова, Е.И. Гультяева, Т.Ю. Гагкаева (ВИЗР); А.Г. Семенова (СПГАУ); Х.О. Пеуша (ТТУ, Эстония)

Под редакцией

д-ра биол. наук Е.Е. Радченко

Рецензент

д-р биол. наук А.П. Дмитриев

© Россельхозакадемия, 2008

ВВЕДЕНИЕ

В ближайшие десятилетия основным направлением повышения продуктивности сельскохозяйственных растений будет создание принципиально новых экономичных технологий селекции на основе интенсивного использования генетических ресурсов растений и повышения способности растений противостоять влиянию экстремальных биотических и абиотических факторов, которые могут существенно снижать урожай сельскохозяйственных культур.

Особенность генетического контроля устойчивости растений к болезням и вредителям – взаимодействие двух сопряженно эволюционирующих систем. Приемлемость кормовых растений является одним из основных факторов, определяющих микроэволюционные процессы в популяциях вредных организмов. Возможность приспособления фитопатогенов и вредителей к устойчивым хозяевам обуславливает необходимость постоянного поиска новых эффективных генов и генетических систем резистентности. В настоящее время совершенно очевидно, что рациональная стратегия селекции сельскохозяйственных культур на устойчивость к болезням и вредителям должна предусматривать, прежде всего, расширение генетического разнообразия возделываемых сортов.

В литературе обсуждается несколько способов решения задачи восстановления генетического разнообразия сельскохозяйственных культур по устойчивости к вредным организмам: чередование во времени сортов с разными генами устойчивости; селекция мультилинейных сортов (смесей фенотипически сходных линий, различающихся по генам устойчивости); “мозаики” (возделывание сортов с разными генами устойчивости в ареале распространения вредителя); пирамидирование (объединение в одном сорте различных генов устойчивости). Реализация любой из этих стратегий селекции основана, прежде всего, на изучении наследования устойчивости и создании доноров с эффективными генами.

Начальный этап создания устойчивых сортов – выявление источников устойчивости. Несмотря на обширную литературу, посвященную скринингу сельскохо-

зяйственных культур по устойчивости к болезням и вредителям, актуальность поиска новых резистентных форм со временем все возрастает – прежде всего, вследствие утраты эффективности выделенных ранее источников.

Разработка и совершенствование методов изучения устойчивости, увеличение производительности и надежности экспериментов – важная часть исследований по скринингу мировой коллекции. Настоящее пособие обобщает многолетний опыт изучения устойчивости зерновых культур к вредным организмам, накопленный сотрудниками ГНЦ РФ ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, а также ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербургского аграрного университета и Таллиннского технологического университета. Достаточно подробно описаны методы оценки устойчивости зерновых к насекомым и важнейшим болезням, вызываемым облигатными и факультативными патогенами. Представлены наиболее распространенные и доступные методы, которые позволили исследователям дифференцировать исходный материал по изучаемым признакам. Очевидно, выбор того или иного метода для работы зависит от поставленной задачи и имеющегося в распоряжении инструментария.

Впервые в одном издании объединены основные теоретические и методические разработки, посвященные не только скринингу зерновых культур, но и изучению генетического контроля устойчивости растений к болезням и вредителям. Экспериментальные подходы, использующиеся при идентификации генов устойчивости зерновых культур, могут быть использованы и для исследования других систем взаимодействия вредный организм – растение-хозяин.

Пособие может быть использовано не только в научно-исследовательских учреждениях, селекцентрах, на станциях защиты растений, но и в ВУЗах при изучении курсов «Частная генетика растений», «Иммунитет растений». Коллектив авторов надеется, что издание, объединяющее под одной обложкой разрозненные ранее литературные сведения и снабженное обширным иллюстративным материалом, будет востребовано также в качестве справочника. Мы также будем благодарны за любые критические замечания, высказанные в адрес нашего издания.

1. ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ

1.1. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К БОЛЕЗНЯМ, ВЫЗЫВАЕМЫМ ОБЛИГАТНЫМИ ПАРАЗИТАМИ

Е.И. Гультяева, О.В. Солодухина

РЖАВЧИННЫЕ БОЛЕЗНИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Биологические особенности возбудителей ржавчинных заболеваний

Среди болезней зерновых культур ржавчинные заболевания до настоящего времени остаются наиболее вредоносными, несмотря на значительный прогресс в изучении природы устойчивости, изменчивости популяций патогенов, достижения практической селекции на устойчивость.

Возбудители ржавчинных болезней образуют на пораженных органах растений пустулы различной формы и величины. Степень развития болезни и вредоносность зависят от климатических условий, степени восприимчивости возделываемых сортов, источников и величины инфекционного начала.

В процессе развития гриба последовательно образуется 5 форм спороношения: **0** (спермогонии), **I** (эции), **II** (урединии), **III** (телии), **IV** (споридии или базидии с базидиоспорами). Питающие растения, на которых образуются все формы спороношения или только урединии и телии, называются основными, а несущие спермогонии и эции – промежуточными. Ржавчинные грибы могут развиваться по полному циклу и сокращенному, без промежуточного хозяина (0 и I стадий). Ряд из них паразитирует на одном виде растения (однохозяйные), другие часть жизненного цикла проводят на одном, а часть – на другом виде растения (разнохозяйные) (Ишкова и др., 2001).

Линейная (стеблевая) ржавчина. Возбудитель *Puccinia graminis* Pers.: Pers. subsp. *graminis.*

0–I стадии гриба развиваются на видах родов *Berberis, Mahonia*; II–III – на видах родов *Secale, Triticum, Avena, Hordeum* и других видах семейства *Poaceae*

(Ишкова и др., 2001).

Имеется несколько специализированных форм *P. graminis*:

- f. sp. *secale* (Erikss. et Henning) – поражает рожь и ячмень;

- f. sp. *avenae* (Erikss. et Henning) – поражает овес;

- f. sp. *tritici* (Erikss. et Henning) – поражает пшеницу и ячмень.

Заболевание проявляется на протяжении всего периода вегетации. Поражаются преимущественно стебли и влагалища листьев; при сильном развитии – основание листовых пластинок, листья (в первую очередь их нижняя поверхность), а также колос (чешуи и ости).

Урединии от ржаво-бурого до темно-бурого или коричневого цвета, разбросанные в беспорядке, разрывающие эпидермис, порошащие, длиной 0,3–1 мм, часто сливаются, образуя полосы. Урединиоспоры продолговатые, узкоэллипсоидальные 21–35 × 14–18 мкм; оболочка светло-бурая, толщиной до 2 мкм, бородавчатая. Телии более крупные, плотные, непорошащие, часто сливающиеся и образующие штрихи. Телиоспоры эллипсоидальные, продолговато-булавовидные, веретеновидные, 35–68 × 13–20 мкм, на вершине удлиненные, оболочка желто-бурая толщиной 1,5–2 мкм, на вершине утолщенная до 5–10 мкм.

Источниками инфекции являются промежуточные растения-хозяева, дикие злаки и пораженные растения зерновых колосовых культур.

Линейная ржавчина встречается повсеместно, но более вредоносна на Северном Кавказе, в отдельных областях ЦЧР, Нечерноземья, Сибири, Дальнего Востока (Ишкова и др., 2001).

Желтая ржавчина злаков. Возбудитель *Puccinia striiformis* Westend. (syn. *P. glumarum* Erikss. et Henning).

II–III стадии – на видах родов *Triticum*, *Secale*, *Hordeum*, *Aegilops* и других видах *Poacea.* Промежуточные растения-хозяева неизвестны, эцидиальная стадия не обнаружена (Ишкова и др., 2001).

Заболевание проявляется на листьях, влагалищах, а иногда на стеблях, остях, колосковых чешуях и даже на выступающих частях зерна. Характерная особен-

ность поражения – появление лимонно-желтых продольных полос урединий в виде пунктирных линий. Позже в местах поражений образуются темно-бурые или почти черные, не прорывающие эпидермис телиопустулы.

Урединии одиночные, овальные, длиной 0,3–1 мм, расположенные рядами или группами, иногда сливающиеся, ярко-желтые, светло-оранжевые или лимонно-желтые. Урединиоспоры шаровидные, широкоэллипсоидальные, 17–28 × 16–24 мкм; оболочка бесцветная, толщиной 1–2 мкм, мелкошиповатая. Телии располагаются главным образом на нижней стороне листьев или влагалищах, черные, прикрытые эпидермерисом. Телиоспоры продолговато-булавовидные, асимметричные, 30–57 × 15–24 мкм, на вершине усеченные, односторонне-удлиненные округлые; оболочка каштаново-бурая толщиной 1–1,5 мкм, на вершине утолщенная до 3–6 мкм, гладкая.

Источниками инфекции являются дикие злаки, падалица и пораженные посевы зерновых колосовых культур.

Желтая ржавчина распространена в зонах с умеренным климатом, где является весьма вредоносным заболеванием пшеницы и ячменя. На ржи желтая ржавчина встречается редко (Ишкова и др., 2001).

Бурая ржавчина пшеницы. Возбудитель *Puccinia triticina* Erikss. (syn.: *P. recondita* Roberge: Desm. f. sp. *tritici* (Erikss) C.O. Johnston).

0–I стадии – на видах рода *Thalictrum*, II–III – на видах родов *Triticum*, *Aegilops*, *Elytrigia*, *Poa*.

Болезнь проявляется на листьях, листовых влагалищах и, очень редко, на стеблях.

Урединии одиночные, продолговатые или округлые, длиной 0,5–1,5 мм, порошащие, ржаво-бурого цвета, чаще на верхней стороне листьев. Урединиоспоры шаровидные или эллипсоидальные, 17–29 × 17–23 мкм; оболочка желто-бурая толщиной 1–1,5 мкм, мелкошиповатая. (Рис.2). Телии располагаются главным образом на верхней стороне листьев, черного цвета, прикрытые эпидермисом, продолговатые, одиночные, часто сливающиеся длиной 0,5–1,5 мм. Телиоспоры бу-

лавовидные, продолговато-булавовидные, 32–49 × 14–21 мкм; оболочка светло-бурая толщиной 1–1,5 мкм, на вершине утолщенная до 3–4 мкм, гладкая.

Заболевание может развиваться по полному и сокращенному циклу (без 0 и I стадии). Основными источниками инфекции являются дикие злаки, падалица и пораженные посевы озимой пшеницы.

Бурая ржавчина распространена повсеместно в районах возделывания пшеницы. Наиболее вредоносна на Северном Кавказе, в Поволжье, ЦЧР, центральной зоне Нечерноземья, на Урале, в отдельных областях Западной и Восточной Сибири (Ишкова и др., 2001).

Бурая ржавчина ржи. Возбудитель *Puccinia dispersa* Erikss. et. Henning (syn. *P. recondita* Roberge: Desm. f. sp. *secalis*).

0–I стадии – на видах родов *Anchusa* и *Licopsis arvensis*, II–III – на видах рода *Secale*.

Внешняя картина проявления очень сходна с бурой ржавчиной пшеницы. Поражаются листья и листовые влагалища у всходов и взрослых растений.

Урединии одиночные, продолговатые, овальные или округлые, беспорядочно расположенные, 0,8–1,7 × 0,3–0,7 мм, ржаво-бурого или коричнево-красного цвета, чаще на верхней стороне листьев. Урединиоспоры шаровидные или эллипсоидальные 21–31 × 20–24 мкм; оболочка коричневая, толщиной 1–1,5 мкм, мелкошиповатая. Телии располагаются главным образом на нижней стороне листьев или на влагалищах, черные, прикрытые эпидермисом, продолговатые, одиночные, сливающиеся. Телиоспоры булавовидные, конусовидно вытянутые или округлые, оболочка коричневая, толщиной 1–1,5 мкм, на вершине утолщенная до 3–4 мкм, гладкая.

Основными источниками инфекции являются дикие злаки, падалица и пораженные посевы озимой ржи.

Заболевание распространено повсеместно в зонах возделывания ржи. Наиболее вредоносно в Северо-Западном, Волго-Вятском, Уральском регионах, в отдельных областях ЦЧР (Ишкова и др., 2001).

Карликовая ржавчина ячменя. Возбудитель *Puccinia hordei* G.H.Otth. (syn. *P. anomala* Rostr., *P. simplex* (Koern.) Erikss. Et Henning).

0–I стадии – на видах *Ornithogalum*, II–III – на видах рода *Hordeum*, редко на видах родов *Elytrigia, Bromus*.

Поражаются листья и влагалища.

Урединии обычно на верхней стороне листьев, реже на влагалищах, расположены в беспорядке, одиночные, округлые, 0,3–0,4 × 0,1–0,2 мкм, порошащие, светло-желтые или коричнево-бурые. Урединиоспоры шаровидные, широкоэллипсоидальные, 21–30 × 18–22 мкм; оболочка светло-бурая, толщиной 1,5–2 мкм, шиповатая. Телии преимущественно на нижней стороне листьев, на влагалищах, черные, прикрытые эпидермисом, точечные или продолговатые, длиной 0,1–0,5 мм, иногда сливающиеся. Телиоспоры двуклеточные и одноклеточные (мезоспоры), причем преобладают последние; 44–56 × 16–24 мкм, на вершине округлые или удлиненные; оболочка бурая, 1–2 мкм, на вершине утолщенная до 7 мкм, гладкая.

В местах отсутствия промежуточного хозяина и озимого ячменя наличие карликовой ржавчины объясняется заносом инфекции воздушным путем или сохранением гриба на самосеве ярового ячменя. Из числа диких злаков карликовая ржавчина встречается на видах пырея, костра, лисохвоста и др.

Заболевание распространено повсеместно в зонах возделывания ячменя. Наиболее вредоносно на Северном Кавказе, в Поволжье, Западной и Восточной Сибири, на Дальнем Востоке (Ишкова и др., 2001).

Корончатая ржавчина овса. Возбудитель *Puccinia coronata* Corda.

0–I стадии – на видах рода *Rhamnus*; II–III – на видах родов *Avena Elytrigia, Bromus* и других видах семейства *Poacea*.

Основная специализированная форма *P. coronata*:

- f. sp. a*venae* Erikss. поражает виды рода *Avena*, реже – *Secale, Hordeum*.

Поражаются листья и влагалища, реже стебли.

Урединии в основном на верхней стороне листьев и влагалищах, ярко- или

ржаво-оранжевые, вначале прикрытые эпидермисом, затем порошащие, одиночные или собранные в кучки, которые часто сливаются. Урединиоспоры шаровидные, эллипсоидальные 16–28 × 12–24 мкм; оболочка желтая толщиной до 2 мкм, редкошиповатая. Телии располагаются на нижней стороне листьев, блестящие, плотные, черные, прикрытые эпидермисом, одиночные или сливающиеся. Телиоспоры булавовидные 30–68 × 12–25 мкм, на вершине округлые, к основанию суженные, оболочка бурая толщиной 1–1,5 мкм, на вершине утолщенная до 3–5 мкм с выростами различной формы и размера.

Заболевание распространено повсеместно в зонах возделывания овса. Наиболее вредоносно в Северо-Западном, Центральном, Волго-Вятском и Уральском регионах, а также в Поволжье (Ишкова и др., 2001).

Изучение устойчивости зерновых культур

Устойчивость зерновых культур к ржавчинам может проявляться либо во всех фазах онтогенеза, начиная с фазы всходов (ювенильная устойчивость), либо только у взрослых растений (возрастная устойчивость). В связи с этим для объективной характеристики образцов зерновых культур в онтогенезе необходимо их изучение как в полевых условиях в фазе взрослых растений, так и в фазе проростков в лаборатории.

Изучение устойчивости в полевых условиях

Методы создания инфекционных фонов

Инфекционные питомники лучше организовывать по каждой болезни отдельно, соблюдая пространственную изоляцию между ними, чтобы избежать взаимовлияния фитопатогенов. Искусственно создаваемые инфекционные фоны по своей силе должны соответствовать естественным эпифитотиям, которые наблюдаются в конкретном районе и условиях.

Для оценки устойчивости к ржавчинам изучаемый материал высевают в 2–4 кратной повторности рядками длиной 0,8–1,5 м или на делянках, площадь кото-

рых – не менее 1 м^2. Расстояние между рядками может составлять 0,15–0,25 м. Норма высева семян – 50–130 зерен на 1 погонный м. Образцы сеют в ярусы, которые рекомендуется размещать перпендикулярно направлению преобладающих в период вегетации растений ветров. Вдоль каждого яруса, отступив от него 20 см, высевают 1 или 2 ряда накопителей инфекции. Сорта-накопители могут также высеваться через определенное количество рядков изучаемых образцов в ярусах (обычно через 10 рядков).

В качестве накопителей используют восприимчивые сорта, хорошо адаптированные к местным условиям, характеризующиеся развитой листостебельной массой и продолжительной вегетацией растений. «Силу» инфекционного фона можно регулировать площадью, занятой накопителем инфекции. Она также может зависеть от складывающихся погодных условий, величины инфекционных нагрузок при инокуляции, сроков и успешности заражения растений. Если накопители инфекции занимают 30% посевной площади, то при удовлетворительных погодных условиях инфекционный фон может быть высоким. Посевы должны обеспечивать получение равномерного инфекционного фона, быть удобными для выполнения инокуляции, оценок и отборов растений (Методы …, 1988).

Сроки инокуляции сортов-накопителей определяются наступлением оптимальных для прорастания урединиоспор и заражения температур и фазой развития растений. Так, для успешного заражения бурой, корончатой и карликовой ржавчинами температура должна быть не ниже 15°С, желтой – 10°С, стеблевой – 18°С (Неклеса, 1969; Жемчужина, 1974; Методы…, 1988; Анпилогова, Волкова, 2000; Дмитриев, 2000). Продолжительность периода увлажнения растений для прорастания урединиоспор должна быть не менее 16 ч для желтой, и не менее 6 ч для других видов ржавчин.

Обычно при создании искусственного инфекционного фона желтой ржавчины изучаемые образцы и сорта-накопители инфекции заражают в фазу трубкования, а бурой, стеблевой, карликовой и корончатой ржавчин – в период кущения–трубкования.

При инокуляции можно использовать опудривание смесью урединиоспор с тальком, опрыскивание водной или масляной суспензией урединиоспор, инжекторный метод, метод микрокамер или расстановку сосудов с ранее зараженными растениями среди изучаемых растений.

Чаще всего растения инокулируют смесью жизнеспособных урединиоспор с тальком или мукой вечером под возможную росу, либо после дождя, полива или после опрыскивания водой. При инокуляции взрослых растений соотношение урединиоспор и талька составляет 1:50, 1:100, молодых растений – 1:3, 1:5, 1:10.

При опрыскивании растений водной суспензией урединиоспор с добавлением ПАВ (Твин 80 и др.) для эффективного заражения необходимо 10 мг/м^2 жизнеспособных спор возбудителей бурой и карликовой ржавчин; 20 мг/м^2 – стеблевой, желтой и корончатой. Количество суспензии должно обеспечивать равномерное смачивание инокулируемых растений. Суспензию готовят из предварительно собранных урединиоспор, либо путем смыва урединиоспор с пораженных листьев или стеблей. Опрыскивание водной суспензией спор, хотя и производительно, но менее эффективно, так как теряется значительная часть урединиоспор в результате стекания инфекционных капель с поверхности растений.

Для успеха заражения в обоих случаях инокулированные растения зерновых желательно держать под полиэтиленовой пленкой или укрывным материалом при облачной погоде в течение суток. В солнечную жаркую погоду пленку следует снять при температуре воздуха выше 19–22ºС с целью предотвращения ожога листьев.

Инокулировать растения можно с помощью различных аппаратов, что зависит от объема работ и наличия технических возможностей. Для распыления сухой смеси спор с тальком или мукой можно пользоваться медицинскими порошковдувателями (резиновыми грушами) или стеклянной банкой, отверстие которой закрыто капроновой тканью в несколько слоев. В случае больших площадей, можно использовать ранцевые опылители. Инокуляцию суспензией можно осуществлять из пульверизатора или опрыскивателя.

Инжекторный метод заражения основан на использовании шприца. Наиболее благоприятно использование этого метода в фазу трубкования. Суспензию вводят сверху в воронку выходящего из трубки листа. На одной делянке достаточно заразить 5–10 растений (или 10–20 стеблей на погонный метр накопителя инфекции), доза – 0,25 мл суспензии на растение. При заражении ржи инокулируют 2–3 стебля каждого растения. Суспензию готовят из расчета 20 мг всхожих, хороших по качеству урединиоспор на 100 мл воды. Достоинство данного метода – возможность инокуляции растений в любую погоду в дневные часы без последующего укрытия растений полиэтиленовой пленкой, а также относительно небольшой расход спорового материала; недостаток – его трудоемкость.

В полевых питомниках для создания инфекционного фона можно выставлять вегетационные сосуды или ящики с растениями, предварительно выращенными и зараженными в теплице. Число микроочагов инфекции должно быть таким, чтобы обеспечить достаточную первичную нагрузку урединиоспор и их равномерное рассеивание.

Для изучения устойчивости взрослых растений, особенно в целях экономии спорового материала, иногда инокулируют отдельных листья с помощью микрокамер. Для этого квадратик фильтровальной бумаги, предварительно смоченный в суспензии спор, помещают на верхнюю часть листа, а затем сверху закрывают (обертывают лист) полиэтиленом и укрепляют его с помощью скрепок. На одном растении (или листе) можно разместить несколько фильтровальных бумажек, смоченных, например, суспензиями разных рас. На следующий день после инокуляции камеру с фильтровальной бумагой снимают.

С целью создания оптимального инфекционного фона допускается использование одновременно нескольких способов инокуляции.

При селекции зерновых колосовых культур на неспецифическую (горизонтальную) устойчивость биоматериал должен быть представлен максимальным разнообразием патотипов по агрессивности. При селекции на расоспецифическую (вертикальную) устойчивость патотипы гриба, включаемые в популяции, должны

быть подобраны так, чтобы они способствовали отбору растений с заданным геном устойчивости. При комплектовании популяции в неё следует включать патотипы, вирулентные к источникам устойчивости (если таковые имеются).

Оценка устойчивости зерновых к возбудителям ржавчинных болезней

Устойчивость зерновых колосовых культур в полевых условиях определяют по трем показателям: тип реакции, интенсивность поражения, потери урожая.

Ржавчину учитывают в фазах кущения (на озимых – осенью и весной), колошения, налива и молочной спелости зерна. После обнаружения симптомов заболевания проводят учет интенсивности первичного поражения сортов и типа реакции. Последующие учеты ведут через каждые 7–10 дней. В полевых инфекционных питомниках желательно проведение нескольких учетов (3–5), однако основным является учет максимального проявления болезни. В зависимости от вида ржавчины, оно наблюдается до пожелтения и усыхания растений в период от молочной до восковой спелости зерна.

Пораженность растений определяют глазомерно, одновременным осмотром всей делянки или осмотром ее в нескольких местах. Возможны статистические учеты с определением средней интенсивности или балла поражения. На малых делянках количество учетных растений – не менее 25, а на делянках основных и предварительных сортоиспытаний – 75–150 (Методы …, 1988). Возможны случаи неоднородности поражения растений в пределах оцениваемого сорта, что обусловлено гетерогенностью образца либо механическим засорением.

Если естественный инфекционный фон очень слабый и максимальная интенсивность поражения бурой ржавчиной составляет 20–30%, стеблевой – 10–20%, желтой – 10–20%, то на таком фоне можно выбраковать наиболее поражаемые сорта, все же остальные подлежат повторной оценке. Весьма важна оценка в эпифитотийные годы.

При работе с бурой, корончатой и карликовой ржавчинами определяют гла-

зомерно пораженность флагового и предфлаговых листьев; стеблевой – двух верхних междоузлий, влагалищ флагового и предфлагового листьев и колоса; желтой – трех верхних листьев.

Интенсивность развития ржавчины характеризуется плотностью расположения пустул на пораженном органе (лист, стебель и т.д.). Степень поражения бурой, стеблевой, карликовой и корончатой ржавчинами определяют по шкале Петерсона с соавторами (1948) (рис. 1.1.1.). Пораженность желтой ржавчиной можно определять по шкале Кобба (Peterson et al., 1948).

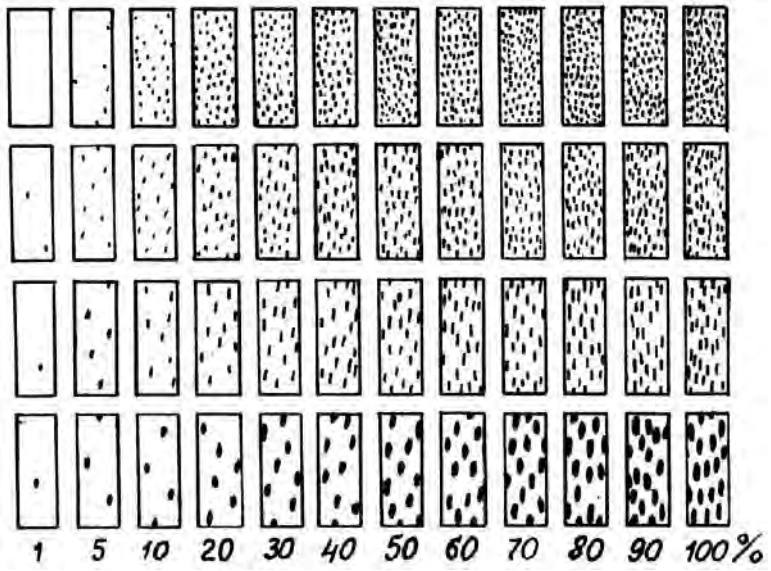


Рис. 1.1.1. Шкала Петерсона и соавторов (1948) для определения интенсивности поражения видами ржавчины.

При первых учетах, когда развитие болезни невелико, а также при слабом проявлении ржавчины, учет можно проводить методом подсчета урединиопустул. Для бурой ржавчины, корончатой и карликовой ржавчин степень поражения, равная 1%, соответствует следующему числу пустул на один зеленый лист: на всходах – 1; в период кущения – 3 и в период налива зерна – 5 пустулам. Для стеблевой ржавчины пшеницы и ржи 1% поражения в фазе кущения соответствует 5 пустулам на растение, выхода в трубку – 9, колошения – 15. Для желтой ржавчины 1% поражения в фазе кущения соответствует строчке ржавчины длиной 0,5 см, выхода в трубку – 1 см, колошения – 2 см (Санин и др., 2002).

Для оценки типа реакции можно использовать как отдельные для каждой бо-

лезни шкалы: Стэкмана и Левина (1922) – для стеблевой ржавчины, Мейнса и Джексона (1926) – для бурой, Гаснера и Штрайба (1934) – желтой, Стэкмана и соавторов (1923) – корончатой, Левина и Черевика (1952) – для карликовой ржавчины, так и унифицированную шкалу (табл. 1.1.1.) (Методы …, 1988).

Таблица 1.1.1. Унифицированная шкала учета типов реакции растений зерновых колосовых культур при поражении ржавчинными заболеваниями

Тип реакции	Характер проявления болезни	Степень устойчивости, восприимчивости
0	Признаки болезни отсутствуют	Иммунный
R	Отдельные хлоротические и некротические пятна без урединиопустул, иногда с отмиранием всего листа (желтая ржавчина)	Высоко устойчивый
R	Единичные очень мелкие урединиопустулы в хорошо выраженных хлоротических и некротических пятнах	Устойчивый
MR	Небольшое количество мелких и средних урединиопустул в более или менее выраженных хлоротических и некротических пятнах	Умеренно устойчивый
LM	Пустулы различного размера, большинство из которых в более или менее выраженных хлоротических и некротических пятнах	Гетерогенный или промежуточный с превалированием устойчивого типа реакции
M	Пустулы различного размера в более или менее выраженных хлоротических и некротических пятнах и без них	Гетерогенный или промежуточный
HM	Пустулы различного размера, большинство из которых без хлороза и некроза	Гетерогенный или промежуточный с превалированием восприимчивого типа реакции
MS	Средние и единичные несмывающиеся крупные урединиопустулы, иногда в хлоротических или хлоротически-некротических (желтая ржавчина) пятнах	Умеренно восприимчивый
S	Пустулы крупные, иногда сливающиеся без некроза, но возможен хлороз (желтая ржавчина)	Восприимчивый
	Крупные сливающиеся урединиопустулы образующие сплошное покрытие	Высоко восприимчивый

Уровень полевой устойчивости растений ржи можно оценивать по степени поражения второго от колоса (предфлагового) листа, используя 9-бальную шкалу Миданера и Шперлинг (1995) (табл. 1.1.2.).

Таблица 1.1.2. Шкала учета поражения ржи бурой ржавчиной

Балл	Характер поражения листа	Степень поражения листа, %
1	Признаки болезни отсутствуют	0–0,5
2	1–3 пустулы на листе	0,6–2,0
3	4–8 пустул на листе	2,1–4,5
4	9–15 пустул на листе	4,6–8,0
5	Пустулы занимают ≈ 10 % площади листа	8,1–15
6	Пустулы занимают ≈ 20 % площади листа	15,1–28
7	Пустулы занимают ≈ 30 % площади листа	29–42
8	Пустулы занимают ≈ 50 % площади листа	43–65
9	Пустулы занимают > 65 % площади листа	> 65

Популяции ржи представляют собой смесь схожих, но неодинаковых генотипов, поэтому для иммунологической характеристики образца необходимо оценивать каждое растение. Иммунологическую структуру изучаемых популяций определяют по **степени распространения болезни (P, %),** а иммунологическую характеристику – по **степени развития болезни (R, %)** (Чумаков и др., 1974; Гешеле, 1978). Величины P и R рассчитывали по формулам:

$P = \frac{n}{N} 100\%$; $R = \frac{\sum (a \times b)}{N \times k} 100\%$, где

P – распространение болезни;
R – развитие болезни;
n – количество восприимчивых растений в популяции (с баллом 3 и 4);
N – количество учетных растений;
a – количество больных растений;
b – соответствующий балл поражения;
k – высшее значение балла по шкале.

Дифференциацию образцов ржи по распространению болезни (P, %) проводят на основе следующих критериев:

1 – устойчивый образец (количество восприимчивых растений в популяции до 10%);

2 – слабо восприимчивый (от 10 до 40%);

3 – средне восприимчивый (от 40 до 65%);

4 – сильно восприимчивый (от 65 до 100%).

Для сравнения образцов между собой по степени развития болезни (R, %) придерживаются следующих градаций:

1 – интенсивность поражения до 10% – популяция устойчивая;

2 – от 10 до 25 % – слабо восприимчивая;

3 – от 25 до 40 % – средне восприимчивая;

4 – от 40 до 100 % – сильно восприимчивая.

В качестве показателя, характеризующего неспецифческую устойчивость сорта, используют критерий скорости нарастания развития болезни, выражаемый площадью под кривой развития болезни (ПКРБ) (Wilcoxson et al., 1974). При этом материал оценивают на фоне искусственного заражения синтетической популяцией гриба, состоящей и рас, наиболее полно отражающих вирулентность и агрессивность местной популяции патогена. Контролем служат ранее изученные сорта с низким и высоким уровнем неспецифической устойчивости. За вегетационный период проводят 3–4 учета, определяют тип реакции в баллах и степень поражения в процентах, а затем рассчитывают ПКРБ в условных единицах по формуле:

$S = 0{,}5 \times (x_1 + x_2) (t_2 – t_1) + \ldots 0{,}5 \times (x_{n-1} + x_n) (t_n – t_{n-1})$, где

S – площадь под кривой развития болезни;
x_1 – интенсивность развития болезни на момент первого учета, %;
x_2 – интенсивность развития болезни на момент второго учета, %;
x_n – интенсивность развития болезни на момент последнего учета, %;
$(t_2 – t_1)$ – количество дней между вторым и первым учетом;
$(t_n – t_{n-1})$ – количество дней между последним и предпоследним учетами;
n – количество учетов.

Для достоверной оценки отобранные в поле образцы с низким показателем ПКРБ необходимо оценить в лабораторных условиях, поскольку при низкой инфекционной нагрузке некоторые образцы со специфической устойчивостью могут попасть в эту группу. Для этого сорта оценивают к каждому патотипу, входящему в состав используемой синтетической популяции (Макаров и др, 2003).

ВНИИ фитопатологии разработана методика определения неспецифической устойчивости в лабораторных условиях (Макаров и др., 2003). Основным критерием является доля проявившихся пустул от количества нанесенных на единицу площади листа спор, тип реакции и латентный период. Используя эти показатели в период выхода в трубку, когда они наиболее информативны, можно вычислить индекс устойчивости в камеральных условиях (φ):

φ = ДПП ×ТР / ЛП, где

ДПП – доля проявившихся пустул, %;

ТР – тип реакции, баллы;

ЛП – латентный период, дни.

По данным Макарова и соавторов (1998), этот комплексный показатель тесно коррелирует с результатами полевой оценки устойчивости.

Одним из существенных качеств сортов является их выносливость (толерантность) к заболеванию. Толерантность – это меньшие потери урожая сорта при равной или большей пораженности в сравнении с другими сортами. Ее определяют в специальном опыте, сравнивая урожайность одного и того же сорта на фоне искусственного заражения и без него (контроль) при прочих равных условиях.

Показателем, характеризующим степень толерантности, является коэффициент толерантности, который вычисляют по формуле:

$Т = У_ф/У_к$, где

$У_ф$ – урожайность на инфекционном фоне;
$У_к$ – урожайность в контроле.

Можно сопоставлять сорта по массе 1000 семян. Однако высокая корреляция между массой 1000 семян и урожайностью наблюдается не всегда (Методы …, 1988).

Лабораторные методы изучения устойчивости

Фитопатологические оценки и отборы устойчивых к болезням генотипов проводятся в теплицах, климатических камерах, помещениях со светоустановка-

ми, что позволяет дополнительно изучить устойчивость селекционного материала к популяции и отдельным биотипам гриба. Эти оценки дополняют полевые, особенно при определении типов устойчивости, а также способствуют ускорению селекционного процесса. Объекты искусственного климата дают возможность создавать оптимальные для развития растений и болезней температуру, освещенность, влажность воздуха и почвы.

Для исследования устойчивости растений к стеблевой и бурой ржавчинам пшеницы и ржи, стеблевой и корончатой ржавчинам овса, карликовой ржавчине ячменя оптимальна температура 18–23ºС, желтой ржавчине – 14–20ºС. Продолжительность светового дня в среднем должна быть около 16 ч (для *P. striiformis* не более, для других грибов отрицательное влияние увеличения светового дня не замечено). Освещение, необходимое для развития большинства возбудителей ржавчины, составляет 5–7 тыс. лк, а для желтой – 30–40 тыс. лк. (Ибрагимов, Шестиперова, 1973; Методические рекомендации…, 1976). Относительная влажность воздуха должна быть в пределах 60–70 %.

Изучаемые образцы выращивают на стеллажах с почвой, в ящиках, вазонах, и т. п. Для оценки устойчивости пшеницы, ячменя, овса вполне достаточно 10–25 растений, для ржи – 50–100 растений.

Заражение молодых растений (фаза 1–2 листа) проводят разными способами: опыливанием смесью урединиоспор с тальком или мукой, опрыскиванием водной суспензией (с добавлением твина–80) и др. После инокуляции растения помещают во влажную камеру и убирают ее через 18–24 ч. Для создания влажных камер используют проволочные каркасы, на которые натянут полиэтилен, либо стеклянные или пластиковые цилиндры.

Искусственное освещение отключают перед инокуляцией и вновь включают после снятия влажной камеры. Устойчивость растений оценивают по типу реакции в баллах через 7–14 дней после инокуляции с использованием различных шкал (табл. 1.1.3. – 1.1.8.).

Таблица 1.1.3. Шкала Стэкмена и Левина (1922) для учета типов реакций растений зерновых культур на заражение возбудителем стеблевой ржавчины

Тип реакции, балл	Характеристика типа реакции	Характеристика сорта
0	Отсутствие видимых симптомов	Иммунный
0;	Мелкие пятна отмершей ткани (пустул не образуется)	Относительно иммунный
1	Пустулы ржавчины исключительно мелкие и окаймлены участками отмершей ткани	Устойчивый
2	Пустулы от мелких до средней величины, расположены в зеленых островках ткани, окаймлены участками хлоротичной или отмершей ткани	Умеренно устойчивый
3	Пустулы рассеянные, средней величины; участков отмершей ткани не наблюдается	Умеренно восприимчивый
4	Пустулы крупные, зачастую сливающиеся вместе; участков отмершей ткани нет	Восприимчивый
X	Пустулы на одном и том же листе разных типов, присутствуют хлорозы и некрозы	Гетерогенный (промежуточный)

Примечание. В случае, если тип реакции несколько выше или ниже указанных баллов, то можно ввести знаки + или -.

Таблица 1.1.4. Шкала Мейнса и Джексона (1926) для учета типов реакции растений пшеницы и ржи на заражение возбудителем бурой ржавчины

Тип реакции, балл	Характеристика типа реакции	Характеристика сорта
0	Отсутствие видимых симптомов	Иммунный
0;	Гиперчувствительные пятна – мелкие пятна отмершей ткани (пустул не образуется)	Высокоустойчивый или относительно иммунный
1	Мелкие пустулы с некрозом	Устойчивый или высоко устойчивый
2	Мелкие, средние пустулы, окруженные некрозом или хлорозом	Умеренно устойчивый
3	Среднего размера пустулы без хлороза	Умеренно восприимчивый
4	Крупные пустулы без хлороза	Восприимчивый или сильновосприимчивый
X	Пустулы на одном и том же листе разных типов, присутствуют хлорозы и некрозы	Гетерогенный (промежуточный)

Таблица 1.1.5. Шкала Гаснера и Штрайба (1934) для учета типов реакций растений на заражение возбудителем желтой ржавчины

Тип реакции, балл	Характеристика типа реакции	Характеристика сорта
0	Отсутствие видимых симптомов	Иммунный
0;	Некротические пятна, иногда с отмиранием всего листа. Пустулы отсутствуют	Высокоустойчивый
1	Немногочисленные очень мелкие отдельные пустулы, чаще всего окруженные некротическими пятнами	Устойчивый
2	Образование пустул слабое, пустулы большей частью мелкие, расположены на некротических пятнах различной величины	Умеренноустойчивый
3	Пустулы от средних до крупных, расположены на хлоротическинекротических пятнах	Умеренновосприимчивый
4	Крупные пустулы равномерно покрывающие лист. Наблюдается слабый хлороз	Восприимчивый

Таблица 1.1.6. Шкала Стэкмана и соавторов (1923) для учета типов реакций овса на заражение возбудителем корончатой ржавчины

Тип реакции, балл	Характеристика типа реакции	Характеристика сорта
0	Отсутствие видимых симптомов	Устойчивый
0;	Мелкие некротические пятна, пустулы отсутствуют	Высокоустойчивый
1	Мелкие пустулы, окруженные участком отмершей ткани (некрозами)	Устойчивый
2	Мелкие пустулы с некрозами или хлорозами	Умеренноустойчивый
3	Средние и крупные пустулы с хлорозами	Умеренновосприимчивый
4	Крупные пустулы с хлорозом или без хлороза	Восприимчивый
X	Пустулы на одном и том же листе разных размеров, присутствуют хлорозы и некрозы	Гетерогенный (промежуточный)

Таблица 1.1.7. Шкала Левина и Черевика (1952) для учета типов реакций ячменя на заражение возбудителем карликовой ржавчины

Тип реакции, балл	Характеристика типа реакции	Характеристика сорта
0	Отсутствие видимых симптомов	Иммунный
0;	Отсутствие пустул и слабые некротические пятна	Высокоустойчивый
1	Мелкие слабовидимые пустулы, окруженные участком отмершей ткани (некрозами)	Устойчивый
2	Множество мелких пустул с небольшими некрозами или без некрозов (часто окружают зеленые островки ткани)	Умеренноустойчивый
3	Пустулы среднего размера, рассеянные, окруженные легким хлорозом, некрозов не наблюдается	Умеренновосприимчивый
4	Пустулы преобладают очень крупные; некрозы отсутствуют, но небольшие хлорозы могут присутствовать	Восприимчивый
X	Пустулы на одном и том же листе разных размеров, присутствуют хлорозы и некрозы	Гетерогенный (промежуточный)

Таблица 1.1.8. Шкала Фраунстейна и Рейчела (1978) для определения типов реакций растений ржи на заражение возбудителем бурой ржавчины

Тип реакции, балл	Характеристика типа реакции
1	Отсутствие признаков заражения
2	Мелкие некротические пятна без пустул
3	Мелкие пустулы, окруженные большими некрозами
4	Порошащие пустулы, окруженные некрозами
5	Порошащие пустулы, окруженные небольшими хлорозами
6	Большие порошащие пустулы без хлорозов

При изучении устойчивости растений к отдельным видам ржавчины (например, бурая ржавчина пшеницы и ржи, карликовая ржавчина ячменя, корончатая ржавчина овса) допустимо использование отрезков листьев, помещенных в раствор бензимидазола, который поддерживает их метаболизм

(Михайлова, Квитко, 1970). Для этого отрезки листьев оцениваемых образцов 7–10-дневного возраста длиной 3–5 см раскладывают в кюветы рядами либо на слой ваты, смоченный 0,004%-ным раствором бензимидазола, либо на стекло, обернутое фильтровальной бумагой, концы которой опущены в раствор бензимидазола, налитый на дно кюветы. Листья разных сортов укладывают в непосредственной близости друг к другу. Концы отрезков укрывают ватными валиками, также смоченными раствором бензимидазола. Заражение проводят опрыскиванием водной суспензией урединиоспор с помощью пульверизатора. После инокуляции кювету плотно закрывают стеклом или полиэтиленовой пленкой, в течение 10–15 ч выдерживают на рассеянном свету, способствующим лучшему прорастанию спор, а затем ставят под лампы дневного света на светоустановку. Тип реакции учитывают через 7–10 дней после инокуляции.

Методики определения устойчивости образцов зерновых культур, описанные выше, в основном служат для характеристики расоспецифической устойчивости. Однако в ряде случаев возникает необходимость изучить уровень неспецифической устойчивости. Для этого определяют продолжительность инкубационного (латентного) периода, число пустул на единицу поверхности листа, размер урединиопустул и урожай спор. Эти показатели отражают главным образом механизмы устойчивости, действующие после установления паразитического контакта (Дмитриев и др., 1979; Дмитриев А.П., 1990).

Латентный период – промежуток времени от инокуляции растения до проявления на нем первых симптомов заболевания. Длительность его оценивают либо по времени появления первых пустул, либо учитывают динамику их появления на 8, 10, 12, 14 день после заражения (Одинцова, 1977).

Для достоверной оценки числа пустул на единицу поверхности листа необходимо заботится о равномерности заражения. Используют сегменты листьев изучаемых сортов произвольных размеров либо "газон", приготовленный в чашке Петри из отрезков листьев проростков или взрослых растений. На каждый газон распыляют суспензию урединиоспор в водном растворе детергента Твин-80 в

одном и том же объеме (оптимально – 0,5 мл) при концентрации 3000 спор/мл. Чашки оставляют на рассеянном свету или в темноте в течение 16–18 ч, затем на дно осторожно приливают примерно по 20 мл 0,004%-ного водного раствора бензимидазола, после чего чашки выставляют на светоустановку. У взрослых растений для приготовления газонов могут быть использованы молодые, только что появившиеся листья. Через 7–8 дней после инокуляции подсчитывают число пустул на сегментах листьев (Одинцова, Михайлова, 1981; Михайлова, 2006).

Для измерения урожая спор учитывают массу спор со 100 пустул либо массу спор с единицы поверхности листа. В последнем случае интегрируется число пустул на единицу поверхности и масса спор с одной пустулы.

Количество спор в пустуле можно определить взвешиванием созревших, осыпавшихся спор или подсчетом числа спор в суспензии, полученной смывом спор водным раствором детергента, с помощью камеры Горяева. Инокулированные листья интактных проростков или взрослых растений через 12 и 19 дней на время спороношения помещают в пробирки, фиксированные на подставках. В эти пробирки периодически, осторожно стряхивают урединиоспоры с листа, взвешивают и рассчитывают продуктивность спор на лист и соответственно на одну пустулу (Михайлова, 2006). Для смыва спор используют 0,0001%-ный раствор Твин-80. Осторожно отрезают сегменты листьев с подсчитанным количеством пустул, помещают отрезки в пробирку с определенным количеством раствора Твина и энергично встряхивают. Зная объем суспензии, количество спор на 1 мл суспензии и количество помещенных в пробирку пустул, легко определить урожай спор на пустулу.

Для определения размеров урединиопустул используют микроскоп с микрометром (увеличение 100×). Листья предварительно выдерживают в кипящем растворе лактофенол : этанол (2:1) в течение трех минут. Затем измеряют длину и ширину 15 произвольно выбранных на листе пустул. Размер пустулы (РП) определяют с помощью формулы:

$РП = 1/4\pi \times Д \times Ш$, где

Д – длина пустулы, Ш – ширина пустулы.

Необходимо учесть, что в случае избыточной концентрации спор при инокуляции растений развивается большое количество мелких уредопустул. Оптимальная концентрация спор в инокуляционной суспензии – 3 тыс. спор/мл. (Михайлова, 2006).

Сбор, размножение и хранение инфекционного материала

Для создания инфекционного фона инокулюм можно собрать непосредственно с зараженных растений в поле с помощью пылесоса с циклоном, либо стряхиванием спор с пораженных листьев в пробирки. Инфекционный материал также может быть представлен пораженными листьями (стеблями) зерновых культур. Листья с пустулами ржавчины рекомендуется подсушить в тени, а затем поместить в эксикатор. Инокулюм ржавчины на пораженных листьях хранят в эксикаторах до 2 месяцев при комнатной температуре и до 4 месяцев – в холодильнике при температуре +4–5°С.

Размножение урединиоспор в лабораторных условиях включает следующие этапы: выращивание растений, инокуляция и сбор инокулюма. Используют высоко восприимчивые к возбудителю болезни сорта. Растения в фазе всходов (первый лист) слегка опрыскивают водой из пульверизатора и инокулируют урединиоспорами. Инфекционный материал наносят на растения с помощью распылителя (при использовании смеси урединиоспор с тальком или мукой), пульверизатора (заражение водной суспензией спор), либо путем стряхивания спор с зараженных растений. После инокуляции растения помещают во влажную камеру на 18–24 ч. При заражении возбудителем желтой ржавчины влажная камера должна быть не менее 36 ч (Ибрагимов, Щекочихина, 1973). Для создания влажных камер можно использовать полиэтилен, стеклянные стаканы и стекла от фонарей «летучая мышь», прикрытые сверху чашками Петри.

Освещение отключают перед инокуляцией и вновь включают после снятия пленки. В период заражения и последующего развития бурой и карликовой ржав-

чин поддерживают температуру на уровне 18–23°С, стеблевой ржавчины – 20–22°С, корончатой – 18–23°С. Для желтой ржавчины температура воздуха в период заражения (время влажной камеры) должна быть на уровне 10–12°С, в период инкубации – 14–20°С (Методы…, 1988).

Урединиоспоры считаются готовыми для сбора, когда пустулы хорошо «пылят». При оптимальных условиях развития растений инфекция проявляется на 6–8 день после инокуляции. При отклонении от нормы инкубационный период удлиняется до 12–14 и более дней, что особенно характерно для желтой ржавчины. При вазонной культуре сбор проводят путем стряхивания спор в пробирку или с помощью специальных аппаратов (циклонов), подключенных к пылесосу или насосу. Если вазон накрыть сухим стеклянным сосудом, урединиоспоры можно стряхивать энергичным постукиванием палочкой по стеклу.

Л.А. Михайловой и К.В. Квитко (1970) предложены методы лабораторного культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы, основанные на использовании раствора бензимидазола (40 ppm). В сравнении с оранжерейными, эти методики позволяют с относительно малыми затратами довольно быстро размножать инфекционный материал. Семена универсально восприимчивых сортов зерновых культур помещают в кюветы на смоченную водой вату и через 7–10 дней срезают первый лист растений. Для размножения инокулюма на дно чашки Петри на два предметных стекла укладывают отрезки листьев длиной 2–3 см и прижимают концы ватой, смоченной раствором бензимидазола. Инокуляцию проводят путем опрыскивания с помощью пульверизатора суспензией спор в 0,0001%-ном растворе Твина-80. Можно также прикладывать собранные в поле листья с пустулами ржавчины к отрезкам или стряхивать споры с кисточки. После инокуляции чашки Петри помещают на сутки на рассеянный свет и затем – на светоустановку (освещенность 2500–3000 лк, температура не выше 22–24°С). На 7–8 день после инокуляции споры стряхивают в небольшие пробирки.

Для клонирования популяций при проявлении пустул, осторожно придерживая отрезки листьев пинцетом, вырезают сегменты с одной и достаточно

далеко отстоящей от других пустулой. Каждым из сегментов посредством смазывания инокулируют одну из групп отрезков листьев в чашке. Отрезки листьев в чашках раскладывают группами по 3–5 штук, по 3 группы с каждой стороны чашки. Перед инокуляцией отрезки в чашках опрыскивают водой. Образовавшиеся через 7–8 дней споры с каждой группы листьев размножают или стряхивают стерильным пинцетом в отдельную, сухую и свободную от спор ржавчины пробирку. Для работы удобны короткие пробирки длиной 4–5 см (например, пробирки Флоринского) (Михайлова и др., 2003).

Перед закладкой на длительное хранение урединиоспоры подсушивают в вакуумных установках или над водоотнимающими веществами в эксикаторе (Методы…,1988).

При высушивании в вакуумном шкафу споры рассыпают на противни слоем от 3 до 5 мм. Полки с противнями нагревают до температуры не более 40°С. Высушивание производится при разрежении 2–1,3 КПа (15–10 мм рт.ст.). В начале процесса, при интенсивной отдаче влаги, температура урединиоспор понижается. В данном случае при сушке спор стеблевой ржавчины температура не должна опускаться ниже 0°С. Для этого временно прекращают вакуумирование. Сушку заканчивают при достижении температуры 16–18°С. Продолжительность сушки варьирует в зависимости от влажности спор и типа вакуумных насосов и составляет от 0,5 до 2 ч в вакуумных шкафах, от 3 до 6 ч – на коллекторе, от 3 до 5 суток – в эксикаторе. При сушке в эксикаторах в качестве водоотнимающих веществ используют предварительно обезвоженный селикагель или хлористый кальций. Данный метод не пригоден для сушки урединиоспор возбудителя желтой ржавчины (Методы…,1988).

При отсутствии технических возможностей подсушенные споры засыпают в ампулы и запаивают либо помещают в склянки с притертой пробкой и заливают пробки парафином. Споры хранят в холодильнике при +4–5 °С.

Перед применением данных спор их необходимо вывести из состояния анабиоза. Для этого существует несколько методов обработки.

1). Споры рассыпают тонким слоем в чашки Петри или на часовые стекла и прогревают в термостате, сушильном шкафу: урединиоспоры бурой и стеблевой ржавчины при температуре 45°С в течение 30 мин, урединиоспоры желтой ржавчины – при температуре 40°С в течение 5 мин, урединиоспоры карликовой ржавчины – при температуре 50°С в течение 30 мин (Щелко,1974; Методы…, 1988).

2). Постепенное оводнение урединиоспор. Для этого споры пересыпают из ампул в пробирки, рассыпая их тонким слоем по стенкам, и держат в эксикаторе в условиях высокой относительной влажности (100%) над водой. Через 24 ч материал готов к использованию (Метод. рекомендации…, 1976).

3). Запаянную ампулу опускают в теплую воду (50°С) на 5 мин, затем ампулу вскрывают и помещают в эксикатор с водой на 15–16 ч при комнатной температуре (Ибрагимов, Щекочихина, 1973).

Для определения всхожести урединиоспор используют 2 метода: «росяной» и на 1–2% агаре (Методы…, 1988). Проращивание урединиоспор возбудителей бурой, желтой и стеблевой ржавчин проводят на агаре. Споры стеблевой и карликовой ржавчин проращивают «росяным» методом.

Агар разливают в чашки Петри (2 чашки на образец) слоем 2–3 мм. При проращивании урединиоспор желтой ржавчины, до разлива агара по чашкам, в него добавляют сок из листьев пшеницы (примерно 0,5 мл на 100 мл агара). Сок получают путем растирания в фарфоровой ступке 5–7 молодых листочков пшеницы. На поверхность застывшего агара наносят споры из расчета 1500–1700 шт/см. Распыл производят в «башне осаждения» или под стеклянным колпаком при давлении около 3 атмосфер, либо путем стряхивания с заспоренной кисточки. Затем чашки Петри закрывают и переносят на сутки в термостат с температурой 18–20ºС при проращивании урединиоспор бурой и стеблевой ржавчины, и 6–12°С – при проращивании желтой ржавчины (Методы…, 1988)

При «росяном» методе проращивания урединиоспор стеблевой и карликовой ржавчин споры распыляют на сухие предметные стекла (4–6 стекол на образец) и заспоренной стороной кладут на стеклянные палочки в чашки Петри, на дно кото-

рых налито небольшое количество воды. Вместо воды допустимо на крышку и дно чашки Петри положить влажную фильтровальную бумагу. Чашки закрывают крышкой, на 5–10 минут ставят в холодильник при температуре 5°С для получения на предметных стеклах росы, необходимой для прорастания спор. Из холодильника чашки переносят в термостат на 24 ч (температура 18–20°С). Через сутки на каждом из предметных стекол под микроскопом считают 100 спор и отмечают количество проросших. Среднее количество проросших спор, выраженное в процентах к общему их числу, показывает жизнеспособность спорового образца (Щелко, 1974; Методы…, 1988).

Литература

Анпилогова Л.К., Волкова Г.В. Методы создания искусственных инфекционных фонов и оценки сортообразцов пшеницы на устойчивость к вредоносным болезням (фузариозу колоса, ржавчинам, мучнистой росе). Краснодар, 2000. 28 с.

Гешеле Э. Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений. – М.: Колос, 1978. 206 с.

Дмитриев А.П. Лабораторные методы оценки неспецифической устойчивости зерновых культур к болезням. С.-х. биология. 1990. № 3. С. 178-182.

Дмитриев А.П. Ржавчина овса. СПб.: ВИЗР, 2000. 112 с.

Дмитриев А.П., Шитова И.П., Берлянд-Кожевников В.М. Эффективность клонирования как показатель неспецифической устойчивости пшеницы к бурой ржавчине. Селекция и семеноводство. 1979. № 4. С. 5-6.

Жемчужина А.И. Определение суммы тепла и нижнего термического порога развития *Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* Fraser et Led // Микология и фитопатология. 1974. Т. 8. вып. 4. С. 348–349.

Ибрагимов Г.Р, Щекочихина Р.И. Методические указания по определению вредоносности бурой и желтой ржавчины пшеницы. Л., 1973. 22 с.

Ишкова Т.И., Берестецкая Л.И., Гасич Е.Л., Власов Д.Ю. Учебно-методическое пособие по диагностике основных грибных болезней хлебных злаков. – СПб.: ВИЗР, 2001. 76 с.

Макаров А.А., Коваленко Е.Д., Соломатин Д.А., Маторина Н.М. Методы полевой и лабораторной оценки неспецифической устойчивости растений к болезням // Типы устойчивости растений к болезням (Материалы научного семинара). СПб, 2003. С. 17-24.

Макаров А.А., Соломатин Д.А., Стрижекозин Ю.А. Лабораторный метод выявления частичной (расонеспецифической) устойчивости пшеницы к бурой ржавчине / Сб. методических рекомендаций по защите растений. СПб., 1998. С. 148-152.

Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к основным болезням в странах-членах СЭВ. – Прага, 1988. 322 с.

Методические рекомендации по изучению расового состава возбудителей ржавчины хлебных злаков. – Москва: ВНИИФ, 1976. 144 с.

Михайлова Л.А. Генетика взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пше-

ницы, СПб: ВИЗР, 2006. 80 с.

Михайлова Л.А., Квитко К.В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f.sp. *tritici* // Микология и фитопатология. 1970. Т. 4. вып. 3. С. 269-273.

Михайлова Л.А., Гультяева Е.И., Мироненко Н.В. Методы исследования генетического разнообразия популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob.ex Desm. f.sp. *tritici*. СПб: ВИЗР, 2003. 24 с.

Неклеса Н.П. Сроки инокуляции хлебных злаков ржавчиной при создании искусственного инфекционного фона // Труды V Всесоюзного совещания по иммунитету растений. Киев, 1969. С. 99-104.

Неклеса Н.П. Применение влажной камеры при создании искусственного инфекционного фона ржавчины хлебных злаков в полевых условиях // Труды V Всесоюз. совещ. по иммунитету растений. Киев, 1969. С. 104-110.

Одинцова И.Г. Методы оценки общей и специфической устойчивости // Генетические основы устойчивости растений к болезням. Л.: Колос, 1977. С.129-139.

Одинцова И.Г., Михайлова Л.А. Лабораторный метод определения неспецифической устойчивости пшеницы к бурой ржавчине // Сельскохозяйственная биология, 1981. Т. 16. № 1. С. 137-142.

Санин С.С., Черкашин В.И., Назарова Л.Н. и др. Фитосанитарная экспертиза зерновых культур. Рекомендации. Москва. ФГНУ «Росинформагротех». 2002. 140 с.

Чумаков А.Е., Минкович И.И., Власов Ю.И., Гаврилова Е.А. Основные методы фитопатологических исследований. М.: Колос, 1974. 190 с.

Щелко Л.Г. Методические указания по изучению устойчивости ячменя к карликовой ржавчине. Л.: ВИР, 1974. 28 с.

Frauenstein F., Reichel A. Zum Erkenner von slow-rusting Formen bei Braunrost (Puccinia recjndita Rob. Ex Desm.). // 2. Symp. Schaderreger in der industriemaβigen Getreideproduktion der Martin-Luther- Universitat., Halle. Wiss. Beitrage. 1978. Bd.14. S. 11. S. 403-411.

Gassner G., Straib U.W. Weitere Untersuchungen über die Spezialisierungsverhältnisse des Gelbrostes *Puccinia glumarum* (Schm.) Erikss. u. Henn. // Arb. biol. Reichsanstalt. 1934. V. 21. P. 121–145.

Levine M.N., Cherewick W.J. Studies on dwarf leaf rust of barley. 1952. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. 1056. 17 p.

Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss // Phytopathology. 1926. V. 16. P. 89-120.

Miedaner T., Sperling U. Effect of leaf rust on yield components of winter rye hybrids and assessment of quantitative resistance // J. Phytopathology. 1995. V. 143. P. 725-730.

Peterson R. F., Cambell A. B.,Hannah A. E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Can. J. Res. 1948. V.26. P. 496-500.

Stakman E.C., Levine M.N. The determination of biologic forms of *Puccinia graminis* on *Triticum* spp. Minn. Agr. Exp. Stat. Tech. Bull. 1922.

Stakman E.C., Levin M.N., Bailey D.L. Biologic forms of *Puccinia graminis* on varieties of *Avena* spp. // J. Agric. Res. 1923. V. 24. № 10. P. 1013-1018.

Wilcoxson R.D., Atif A.H., Skovmand B. Slow rusting of wheat varieties in the field correlated with stem rust severity on detached leaves in the greenhouse // Plant Dis. Rep. 1974. V. 58. № 12. P. 1085-1087.

В.И. Кривченко, А.П. Хохлова

ГОЛОВНЕВЫЕ БОЛЕЗНИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

БИОЛОГИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГОЛОВНЕВЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Для головневых грибов (Ustilaginales) свойственен биологический цикл, основанный на чередовании ядерных фаз: диплоидной, гаплоидной и дикариотической. В диплоидном состоянии всегда находятся зрелые покоящиеся хламидоспоры возбудителя. Ядра у них очень мелкие – 1,3–3 мкм, плохо просматриваются в микроскоп. Диплофаза длится до тех пор, пока хламидоспоры находятся в покоящемся состоянии, и заканчивается в момент набухания спор.

Гаплоидная фаза наступает в период прорастания хламидоспор. При этом образуется промицелий, т.е. специфическая гифа, в которой происходят редукционное деление ядра и образование споридий. Редукция числа хромосом наблюдается при первом или втором делении ядра. В результате образуются споридии, несущие по одному гаплоидному ядру. Гаплофаза очень короткая. Споридии сливаются между собой или погибают, если условия для их сапрофейного роста неблагоприятны.

Дикариофаза наступает после слияния споридий и образования двуядерного (дикариофитного) мицелия. Это паразитическая фаза гриба. Она начинается слиянием споридий и кончается созданием хламидоспор.

Половое воспроизведение головневых грибов характеризуется регулярным чередованием кариогамии и мейоза в жизненном цикле.

Биология возбудителей твердой головни пшеницы

При изучении устойчивости пшеницы к твердой головне успех экспериментальных исследований зависит от четких знаний видовой принадлежности патогена, его биологических особенностей, специализации и патогенности.

У видов семейства Tilleticeae диплоидные хламидоспоры при прорастании формируют промицелий без перегородок. Иногда образуется 2–3 промицелия, но всегда остается только один, остальные лизируются. Ядро хламидоспоры подвер-

гается мейотическому делению, как в самой споре, так и в промицелии. Затем следует одно или несколько последовательных делений. В результате, как правило, образуется 8–16 дочерних ядер, хотя число их может варьировать от 4 до 16 и более. На конце промицелия образуются нитевидные первичные споридии с одним гаплоидным ядром. Иногда первичная споридия может иметь два ядра. Первичные споридии соединяются попарно непосредственно на промицелии. Между соединившимися споридиями образуется каналец и через него ядро и цитоплазма одной споры переходят в другую. Двуядерные Н-образные споридии прорастают в инфекционные грифы или образуют вторичные споридии. Последние меньше по размерам, серповидные, обычно содержат 2 ядра. Они могут образовывать дикариотический мицелий или новые споридии.

Дикариотический мицелий интенсивно развивается в тканях растений, концентрируясь, в основном, в зоне конуса нарастания и зачаточного колоса. К моменту колошения или созревания зерна мицелий продуцирует двуядерные молодые хламидоспоры. При созревании спор ядра сливаются, дикариофаза завершается и снова возникает диплофаза в виде покоящихся хламидоспор гриба.

Между видами возбудителей твердой и карликовой головни может происходить гибридизация (Sibernagel, 1964). При этом факторы, управляющие вирулентностью и другими признаками, наследуются независимо. В посевах зерновых нередко обнаруживается несколько рас грибов разной вирулентности, что существенно повышает вероятность контакта между ними. Поэтому гибридизация является мощным фактором изменчивости всех признаков возбудителя, включая вирулентность, и играет немаловажную роль в процессах расообразования грибов и в потери сортами устойчивости. В селекции необходимо учитывать этот факт.

Твердая головня пшеницы представлена двумя видами возбудителей: *Tilletia caries* (DC.) Tul. Syn. – *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. и *Tilletia levis* Kuehn. Syn. – *Tilletia foetida* (Wallr.) Liro. Биологический цикл этих грибов одинаков. Симптомы проявления заболеваний идентичны. Сорусы в плодовых телах имеют резкий селедочный запах, который вызывает триметиламин, содержащийся в хламидоспо-

рах. Споровая масса заполняет содержимое зерна, часто немного превышая его объем; покрыта плодовой оболочкой, которая легко растрескивается и обнажает черно-оливково-коричневую споровую массу. Признаки болезни заметны только после цветения пшеницы. Пораженные колосья темно-зеленого цвета и остаются такими дольше здоровых, хотя внешне незначительно от них отличаются. К моменту созревания пшеницы колосья приобретают рыхлый "взъерошенный" вид. У большинства видов пшеницы патоген вызывает укорочение колоса.

Растения могут быть поражены головней целиком или частично. Не все колосья бывают инфицированы в равной мере. На одном растении могут развиваться здоровые, полностью или частично пораженные колосья. Инфицированный стебель, как правило, прямостоячий, оболочка семени матовал, содержимое зерна превращается в темно-коричневую, почти черную массу.

У *T. caries* хламидоспоры обычно сферические, субсферические, иногда овальные, темно-оливковые, 14–18 микрон в диаметре, с сетчатым узором, варьирующим от незначительных мелких петель и полигональной сети до четких ячеистых образований на оболочке спор (рис. 1.1.2.).

У *T. levis* хламидоспоры гладкие, без ячеистых структур, сферические или овальные, иногда вытянутые в длину, темно-оливково-коричневые, 14–22 мкм в диаметре (рис. 1.1.2.).

а б в

Рис. 1.1.2. Морфология хламидоспор возбудителей головневых болезней:
а – *T. caries*; б – *T. levis*; в – *T. controversa*.

Инфекция твердой головни передается с семенами. Во время обмолота пшеницы головневые комочки разрушаются и хламидоспоры возбудителя заспоряют семена. Заражение растений происходит только в фазе проростков до появления

первого листа. Проникая в проросток, мицелий возбудителя концентрируется у конуса нарастания, а в период колошения интенсивно развивается. К моменту молочно-восковой спелости семян образуются хламидоспоры гриба. Хламидоспоры возбудителей твердой головни лучше развиваются при достаточном обеспечении влагой, хотя ее избыток снижает интенсивность прорастания. Гриб требует хорошей аэрации, существенно не реагирует на интенсивность света.

Споры твердой головни при обмолоте пшеницы оседают на оболочках зерновок и прорастают в почве после посева семян. Инфекционные грифы образуют апрессории, с помощью которых проникают в колеоптиле. Внедрение и распространение паразита идет межклеточно. Примерно через 50 дней мицелий достигает точки роста и проникает в нее.

Характер инокуляции, эффект заражении, а следовательно, и оценка исходного материала во многом зависят от факторов внешней среды. Температура почвы ниже 4–5°С и выше 16°С резко уменьшает процент зараженных проростков. На развитие инфекционного процесса влияет влажность почвы в период инокуляции и некоторые сопутствующие факторы. Существенную роль в инфицировании проростков пшеницы играет тип почвы. Лучшие условия для инокуляции создаются в легких окультуренных почвах. Тяжелые суглинистые, кислые болотистые почвы отрицательно влияют на развитие патогена.

Роль инфекционной нагрузки возбудителей твердой головни в патогенезе общеизвестна. С уменьшением числа хламидоспор снижается и поражаемость растений. Существует прямая связь между количеством спор на семени и процентом поражений посевов. Максимальная восприимчивость была получена при дозе 5 г спор на 1 кг семян. Единичные споры на зерне не могут вызвать четкого инфекционного процесса у растений.

Для прорастания и, соответственно, инокуляции, возбудителю требуется определенный период покоя для перехода спор из дикариотического состояния в диплоидное. Инфекция может сохраняться без потери жизнеспособности более 20

лет. Различная продолжительность жизни хламидоспор наблюдается не только у видов, но и у рас возбудителей.

По патогенности, механизму воздействия на растение и специализации оба вида также почти идентичны. В равной мере они поражают как озимую, так и яровую пшеницу. Существенные различия между ними отмечаются лишь по характеру распространения. Для северных и центральных районов более специфичен вид *T. caries*, для южных и юго-восточных – *T . levis*. В лесостепной зоне, как правило, регистрируются оба возбудителя.

При перевозке семян в разные районы, возможен занос *T. caries* и *T. levis* в несвойственные для них зоны. Однако длительная локализация очагов *T. caries* в южных, а *T. levis* – в северных областях не зарегистрирована. Поэтому одним из основных правил работы с патогенами является определение видовой принадлежности возбудителя.

Карликовая головня пшеницы. Возбудитель – *Tilletia controversa* Kuehn. Syn. *Tilletia brevifaciens* Fiech.

Симптомы поражения возбудителем несколько схожи с симптомами поражения *T. caries* и *T. levis*. Однако в отличие от твердой головни, растения заражаются *T. controversa* не только в стадии проростков, но и в фазе 1–2 листьев и в период кущения. В то же время, как и у твердой головни, течение болезни в первый период протекает скрыто. Первые симптомы можно заметить в фазу кущения и начала выхода растений в трубку. В это время у больных растений заметно светлее окраска листьев и интенсивнее кущение. Листья торчат щеточкой, а сами растения после колошения отличаются от здоровых – их стебли в 2–4 раза короче здоровых (при поражении растений видами твердой головни больные растения ниже здоровых всего лишь на несколько сантиметров). Благодаря этому карликовая головня и получила свое название. Другим характерным признаком карликовой головни является уплотненный вид пораженного колоса, с редуцированными и часто закрученными остями. Под влиянием гриба колоски разрастаются, и в них увеличивается число завязей. В таких случаях колос как бы ветвится. Характер-

ным признаком для *T. controversa* является также своеобразная форма и размер головневых мешочков. Они значительно меньше, чем у видов твердой головни, имеют округлую форму. На их вершине, как правило, сохраняется рыльце в виде двух нитевидных придатков. Хламидоспоры возбудителя похожи на таковые у *T. caries* и *T. levis*, но более светлые. Размеры их колеблются в пределах 16–25 мкм. Оболочки имеют хорошо выраженную сетчатую структуру; широкие, до 5 мкм, ячейки и высокие ребра сетки – 1,5–3 мкм (см. рис. 1.1.2.). Для спор характерно наличие слизистого слоя толщиной 1,5–4 мкм. Наряду с сетчатыми (ячеистыми) окрашенными спорами у возбудителя всегда встречаются (до 8%) гиалиновые (бесцветные), преимущественно гладкие хламидоспоры. Этот признак может считаться диагностическим для данного вида. Инфекция карликовой головни передается семенами, хламидоспоры переносятся также ветром, водой и растительными остатками. Главным резерватом инфекции является почва, в которой споры сохраняются до 9 лет. Оптимальная температура для их прорастания 3–5°С, максимальная – 15°С. Обязательное условие – свет, стимулирующий прорастание хламидоспор и образование споридий. Гиалиновые (бесцветные) споры могут развиваться в темноте. Патогенными свойствами обладают не только споридии, но и мицелий карликовой головни, который ведет в почве сапрофитный образ жизни довольно продолжительное время. Особенности биологии возбудителя в известной мере определяют характер его распространения, так как гриб поражает, главным образом, пшеницу озимого образа жизни, виды пырея, озимый ячмень, озимую рожь, эгилопсы и некоторые другие озимые злаки. На яровых зерновых культурах *T. controversa* не зарегистрирована. В России карликовая головня обнаружена преимущественно на Северном Кавказе.

Биология возбудителя пыльной головни пшеницы

Возбудитель пыльной головни пшеницы – *Ustilago tritici* (Pers.) Jens. Заболевание хорошо изучено. У больного растения колос разрушается полностью или частично. В некоторых случаях снороношение гриба наблюдается даже на листьях и стеблях. В момент выхода пораженного колоса из влагалищного листа сору-

сы одеты в тонкую оболочку, которая сразу же разрушается, обнажая споровую массу оливково-черного цвета.

Патоген имеет четкое чередование фаз в жизненном цикле. Отмечаются гаплоидная, дикариотическая и диплоидная стадии гриба. Однако, в отличие от других видов головни, диплоидные хламидоспоры не образуют споридий, а только гифы. Слияние последних дает начало патогенному дикариотическому мицелию, который инокулирует завязь цветка. У пыльной головни пшеницы дикариофаза начинается со слияния ветвящихся гаплоидных клеток (Popp, 1955).

Растения заражаются этим видом головни в период цветения. Хламидоспоры гриба, попадая на рыльце завязи цветка, прорастают в промицелий и гаплоидные гифы. Последние, сливаясь, образуют патогенный мицелий, который внедряется в стенки завязи и развивающийся зародыш. Инфицированные пыльной головней растения пшеницы мало отличаются от здоровых, хотя несколько отстают в росте. К моменту восковой спелости семян мицелий окончательно локализуется в различных его органах: щитке, зародышевой почке, колеоптиле, корешках, эпибласте, семенной оболочке и переходит в покоящееся состояние. Жизнеспособным мицелий гриба может оставаться несколько лет.

При прорастании зерна грибница тоже трогается в рост. Вместе с конусом нарастания она растет и распространяется вверх по стеблю. В этот период мицелий тонкий, многоклеточный, от 2-х до 6-ти мкм толщиной, разветвленный. Развивается в тканях межклеточно. Хламидоспоры образуются непосредственно из мицелия по типу септирования последнего. В зрелом состоянии они шаровидной или эллипсоидальной формы, иногда удлиненные или угловатые, 5–9 мкм в диаметре, светло-коричневые.

После выхода из влагалищного листа хламидоспоры разносятся ветром. Попадая в цветок, споры начинают развиваться, переходя из дикариотического состояния в диплоидное, прорастают и инокулируют завязь цветка. У восприимчивых сортов направление роста основной массы гиф в зерновке ориентировано в сторону зародышевой почки и колеоптиле. Мицелий, оставшийся в корешках и

семенной оболочке, оказывает патогенное действие на растение, но со временем прекращает свою жизнедеятельность. Долгое время существовали разные мнения о путях проникновения мицелия гриба в развивающуюся зерновку. В наших опытах подтвердилось мнение авторов о проникновении гиф возбудителя не только через пыльцевой канал, но и через стенки завязи (Кривченко, 1984). Основная масса спор и проникновение гиф наблюдались у основания ветвей завязи. Точное время инокуляции пшеницы и наиболее восприимчивые фазы развития растений имеют большое значение при изучении устойчивости. Пшеница восприимчива к заболеванию всего несколько дней. Оптимальным сроком для инокуляции является не весь период от начала колошения до молочной спелости, а более короткий отрезок времени, всего 4–5 дней от начала цветения. Практически это время определяют по состоянию и цвету пыльников. Слабое их пожелтение свидетельствует о наступлении периода максимальной чувствительности растения. Примерно через 3 дня после оплодотворения завязь быстро теряет восприимчивость. Характер цветения пшеницы (открытый или закрытый) лишь в известной мере влияет на восприимчивость сорта к возбудителю. Споры у головни, как уже отмечалось выше, очень мелкие. Они сравнительно легко проникают между цветочными чешуями и попадают на завязь. Следует все же отметить, что закрытый тип цветения в определенных условиях уменьшает инфекционную нагрузку возбудителя на завязь и, соответственно, ведет к более низким процентам поражения растений. Однако для целей изучения головнеустойчивости, определяемой, главным образом, генетическими, а не механическими факторами, эти признаки должны приниматься во внимание с известными оговорками.

Развитие возбудителя и инфекционный процесс существенно зависят от окружающих условий. Решающее значение в патологическом процессе имеют температура и влажность воздуха. Высокая относительная влажность способствует массовому прорастанию хламидоспор. При температуре 18–24°С и относительной влажности воздуха, близкой к 100%, создаются наиболее благоприятные условия для развития гриба. Интенсивное заражение пшеницы может происхо-

дить и при более низких температурах воздуха – 13–14°С. При такой температуре и высокой влажности удлиняется период цветения (время наибольшей чувствительности растения). Хламидоспоры имеют более длительный период контакта с растением-хозяином, что и обуславливает сильное его заражение. Минимальная температура для развития гриба 5°С, максимальная – 26–30°С. В естественных условиях минимальный порог влажности для эффективного заражения завязи равен 75–80%. Этапы работы с возбудителем, организация опытов, методы учета и классификации исходного материала приведены в разделе по твердой головне пшеницы.

Биология возбудителя пыльной головни ячменя

Пыльная головня ячменя вызывается грибом *Ustilago nuda* (Jens) Kell. et Swing. Симптомы поражения растений, жизненный цикл гриба и морфология спор одинаковы с *U. tritici*. Эти виды различаются только по характеру образования патогенных дикариотических гиф.

Диплоидные хламидоспоры, попадая на завязь цветка, образуют гифальные и промицеальные клетки, которые копулируют. Каждая конъюгирующая пара образует двуядерные мицелиальные ветви, которые затем делятся на 3 клетки, одну дикариотическую (патогенную) и две монокариотические. В сочетании с ярко выраженной родовой специализацией к питающим растениям эти типы полового процесса (*tritici*-тип и *nuda*-тип) обуславливают четкую видовую таксономию возбудителей.

В момент выхода пораженного колоса из влагалищного листа сорусы одеты в плотную и прочную оболочку, через некоторое время оболочка разрушается и пылящая масса спор разносится потоками воздуха в окружающее пространство. Хламидоспоры *U. nuda* в зрелом состоянии шаровидной или эллипсоидальной формы, иногда удлиненные или угловатые, 5–9 мкм в диаметре, светло-коричневые.

Оптимальная для прорастания хламидоспор температура 20–23°С, минимальная – 15°С, максимальная – 26–30°С. Наиболее благоприятна для развития инфекции на завязи высокая влажность воздуха.

Биология возбудителя черной, или ложной, пыльной головни ячменя

Возбудитель – *Ustilago nigra* Tapke. Характер разрушения колосьев, внешние признаки сорусов, распыление хламидоспор почти такие же, как у пыльной головни, только споровая масса несколько темнее. Вызывая схожие с *U. nuda* симптомы заболевания, черная пыльная головня по характеру прорастания хламидоспор ближе к другому виду – *U. hordei*, так как ее промицелий образует споридии и заражение растений происходит в фазу начала роста растения.

Биология гриба *U. nigra* обычна для возбудителей головневых. После непродолжительного периода покоя ядра хламидоспор конъюгируют, переходя в диплоидное состояние. Затем споры прорастают в промицелий, на котором развиваются гаплоидные споридии. После периода почкования гаплоидные споридии сливаются и образуют дикариотический патогенный мицелий, который инфицирует растения в фазе проростков. Развитие грибницы в тканях растения происходит межклеточно. К моменту колошения гифы разрушают колос, образуя массу хламидоспор. Они очень мелкие (6–8 мкм в диаметре), округлой или слегка овальной формы, светло-коричневые, шиповатые. Попадая на чешуи здоровых колосьев или под них, хламидоспоры не прорастают, а сохраняются до весны. При набухании семян они прорастают и образуют споридии. При слиянии последних, возникают инфекционные гифы, которые инокулируют проростки.

Оптимальная температура для прорастания спор 18–20°С, минимальная – 5°С, максимальная – 30–35°С. Теплая влажная почва способствует заражению проростков.

Черная пыльная головня полностью разрушает колосья. Кроме того, она сильно угнетает растения, снижая массу 1000 зерен, продуктивную кустистость, число зерен в колосе и технологические качества.

Хламидоспоры *U. nigra* сохраняют жизнеспособность непродолжительное время, в лабораторных условиях – не более 8–10 месяцев; при температуре 0–5°С не теряют всхожести один год. В почве хламидоспоры, напротив, погибают быстро.

Биология возбудителя каменной головни ячменя

Каменная головня ячменя вызывается возбудителем *Ustilago hordei* (Pers.) Kell. et Swing. Хламидоспоры головни оливковые или светло-коричневые, совершенно гладкие, шаровидные, реже – угловатые или продолговатые, 6–11 мкм в диаметре. Оптимальная температура для их прорастания – 20°С, минимальная – 5°С, максимальная – 35°С. Хламидоспоры возбудителя прорастают, образуя промицелий и споридии. Споридии интенсивно почкуются и формируют инфекционные гифы, которые внедряются в колеоптиле. Массовому прорастанию спор и образованию споридий способствуют физиологически активные вещества, выделяемые семенами в период роста.

Заражение ячменя происходит в почве в фазе проростков от спор, находящихся в зерне ячменя, где они сохраняются в углублениях, трещинах, семенной оболочке или между пленками. Инфекционные гифы гриба инокулируют колеоптиле, развиваются межклеточно. К концу трубкования растений они концентрируются в конусе нарастания и зачаточном колосе. Гриб разрушает эмбрионы и на гифах терминально образует хламидоспоры. Сначала они бесцветные, затем (к моменту выхода головневого соруса из влагалищного листа) приобретают цвет и окончательную форму. Зерновки ячменя с оболочкой и чешуями полностью превращаются в твердые комочки из склеенных вместе хламидоспор, покрытых свинцово-серой оболочкой. Ости не разрушаются. Колоски внешне сохраняют форму.

Так же как и другие виды головни, каменная головня сильно угнетает растение, снижает абсолютную массу семян и накопление сухого вещества вегетативной массы, повышается восприимчивость растений к карликовой ржавчине и мучнистой росе. У больных растений увеличивается число подгонных стеблей.

В отличие от *U. nuda* и *U. nigra*, хламидоспоры *U. hordei* длительное время (до 25 лет) остаются жизнеспособными при хранении в гербарных коллекциях. Без определенного периода покоя они даже не прорастают. Особенно долговечны споры, находящиеся внутри комочков. В них они не теряют всхожести даже после химической обработки заспоренного зерна. Однако в почве жизнеспособность спор незначительна, поэтому роль почвенной инфекции, по-видимому, невелика.

Биология возбудителя пыльной головни овса

Пыльная головня овса вызывается возбудителем *Ustilago avenae* (Pers.) Jens. Хламидоспоры пыльной головни шаровидные, эллипсоидальные или слегка продолговатые, неправильной формы 5,9–11 × 4,5–5,9 мкм, светло-коричневые, мелкощетинистые или почти гладкие (рис. 1.1.3.). Оптимальная температура прорастания спор 20–25°С, минимальная – 0–5°С, максимальная – 30–35°С. Хламидоспоры прорастают трехклеточным промицелием, образуя большое число споридий. Они сливаются попарно и образуют дикариотические патогенные гифы, которые локализуются под кроющими чешуями семени.

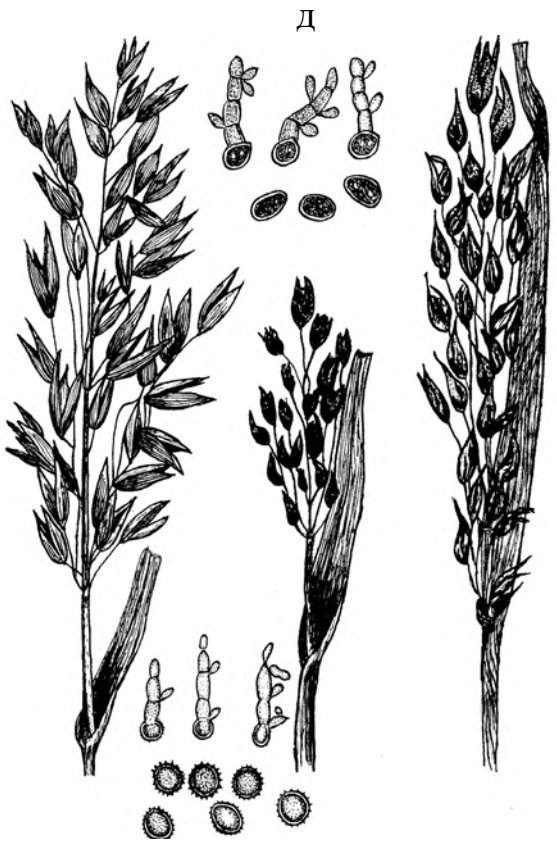


Рис. 1.1.3. Симптомы поражения *U. avenae* и *U. kolleri* и характер прорастания хламидоспор:

а – здоровая метелка овса;
б – пораженная *U. avenae* метелка;
в – пораженная *U. kolleri* метелка;
г – прорастание хламидоспор *U. avenae*;
д – прорастание хламидоспор *U. kolleri*.

Заражение овса происходит летом во время и после цветения. Хламидоспоры локализуются внутри цветка или оседают между чешуями. Споры могут остаться в покоящемся состоянии до прорастания семени или образовывать патогенный мицелий в период формирования зерна в метелке. Прорастанию хламидоспор благоприятствует влажная и теплая погода в период созревания семян.

Поражаются метелки растений (рис. 1.1.3.). Зерно и чешуи превращаются в черно-оливковую пыль. Как правило, разрушается вся метелка, а при задержке развития патогена – только часть ее. Споридии, находясь на поверхности семян овса или по соседству с ними в почве, прорастают в гифы, которые проникают в ростки овса во время их прорастания.

При набухании семени дикариотический покоящийся мицелий проникает в колеоптиле и разрастается межклеточно в тканях вблизи конуса нарастания. В это время он заметно угнетает растения, которые отстают в росте, накапливают меньше сухого вещества и продуцируют более легковесное зерно.

Отмечаются две формы проявления пыльной головни овса: мягкая – с распыляющимися и твердая – с нераспыляющимися хламидоспорами. Последняя форма по типу поражения очень похожа на твердую (покрытую) головню овса (*U. kolleri*). Этот факт усложняет диагностику видов *U. avense* и *U. kolleri*.

Замечено, что *U. avenae* не переходит с *Avena sativa* на виды *A. fatua* и *A. strigosa*, а последний имеет свою специализированную форму патогена. Расовая дифференциация этого гриба проявляется четко.

Биология возбудителя твердой головни овса

Твердая или покрытая головня овса вызывается *Ustilago kolleri* Wille (синоним *Ustilago levis* (Kell. et Swing). Заболевание распространено локально и районы значительной вредоносности не так велики, как у пыльной головни овса.

Отдельные хламидоспоры возбудителя шаровидные, округлые или элипсоидальные, светло-коричневые, гладкие, 5–10 мкм в диаметре. При прорастании хламидоспоры образуют четырехклеточный промицелий (см. рис. 1.1.3.), на котором вырастают эллипсоидальные или яйцевидные споридии.

Заражение овса происходит во время прорастания семян от спор, находящихся на поверхности семян. Не исключено заражение семян растений в период цветения, если хламидоспоры возбудителя попадают под пленку зерновки. Патоген образует промицелий уже при температуре 10°С, оптимальной – 15–20°С. Инфекционные гифы гриба проникают в растение большей частью у основания ростка. У зараженных растений разрушаются все цветки в метелке, причем повреждаются завязи и цветковые чешуи, а колосковые сохраняются, прикрывая скопления спор. Однако эти признаки не всегда бывают четко выражены. При созревании споры не рассыпаются, так как склеены между собой слизистым веществом и только при полной спелости овса твердые образования распадаются на кусочки.

Так же как пыльная, твердая головня овса сильно угнетает растения, снижает абсолютную массу семян и накопление сухого вещества вегетативной массы.

Как и у *U. avenae*, для возбудителя твердой головни характерна специализация форм в пределах рода *Avena*, а также расовая дифференциация.

Сравнение *U. avenae* и *U. kolleri* показывает, что симптомы проявления и биология возбудителей пыльной и твердой головни овса очень сходны. *U. kolleri* визуально трудно отличить от *U. avenae*, так как у последнего вида сорус имеет и пылящую, и твердую формы. У них может быть один и тот же тип проявления болезни и способ инокуляции растений (цветковый или проростковый). Шиповатость или отсутствие щетинок на оболочках хламидоспор, трех-четырехклеточные фрагмобазидии (промицелий) – это сильно варьирующие признаки. Расы этих видов легко скрещиваются между собой, образуя много промежуточных форм. Возбудители мало различаются при культивировании на питательных средах.

Биология возбудителя пузырчатой головни кукурузы

Возбудитель пузырчатой головни кукурузы – *Ustilaqo zeae* (Beckm.) Ung., syn. – *U. maydis* (DC.) Cda. Симптомы заболеваний растений кукурузы пузырчатой головней весьма характерны. На вегетативных (листья, пазушные почки стеблей) и на репродуктивных (початки, мужские соцветия) органах формируются патологические новообразования (галлы), достигающие подчас внушительных размеров –

до 30 см и более в диаметре. Наиболее значительные по размерам галлы образуются на початках, а также в пазушных почках стеблей. Меньшие по размерам, но весьма разнообразные по очертаниям, галлы образуются на листьях и мужских соцветиях. Корневая система грибом не поражается, но пазушные почки "воздушных" корней могут находиться ниже уровня земли, создавая впечатление инфицирования корневой системы.

Галлы представляют собой разросшиеся ткани растения. В патологических новообразованиях формируются споры гриба и завершается цикл его развития. Количество спор *U. zeae*, образующихся в галлах, огромно. Обычно в 1 см галловой ткани дифференцируется 370 млн. спор, что при заражении кукурузы на 10% дает до 125 млрд спор на 1 га. Телиоспоры гриба шаровидные или коротко эллипсоидальные, темно-коричневые, 8–15 × 7–10 мкм, с короткими тупыми шипами (рис. 1.1.4.).

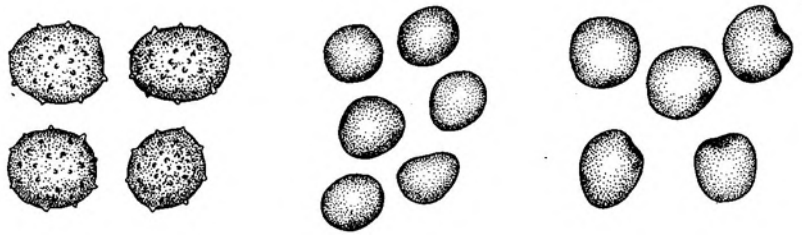


Рис. 1.1.4. Морфология телиоспор (по Каратыгину, 1981):
а – *U. zeae*; б – *Sph. sorghi*; в – *Sph. cruenta*.

Растения кукурузы восприимчивы к инфекции от момента образования первого листа до начала дифференциации пыльцы в пыльниках, то есть в тот период, когда имеются доступные для инфицирования меристематические ткани. Возбудитель внедряется в организм растения-хозяина через формирующиеся генеративные органы, почки, а также через молодые листья. Гриб не способен инфицировать проросток через неповрежденный колеоптиль, поэтому в естественных условиях поражение пузырчатой головней всходов кукурузы отмечается крайне редко. Инфекция часто осуществляется в стадии "листовой розетки", когда растение достигает 30–100 см в высоту. При заражении початков споры проникают между не-

плотно прижатыми листовыми обертками в начале процесса опыления. Наиболее восприимчива для заражения кукуруза за 10–14 дней до выметывания, когда меристематические ткани конусов нарастания наиболее открыты и доступны для инфицирования телиоспорами. Таким образом, место и способ заражения растения-хозяина у *U. zeae* весьма отличны от других видов головневых грибов. Заражение в естественных условиях обычно осуществляется сразу несколькими прорастающими телиоспорами, расположенными на поверхности слабо дифференцированных тканей. При этом одна часть телиоспор прорастает с образованием дикариотического мицелия, другая – с образованием споридий. Мицелий проникает в формирующийся орган, изменяя обычный ход его дифференциации и стимулируя патологическое разрастание тканей. От начального момента образования галлов до созревания в них спор проходит обычно 7–15 дней. Споры, созревшие в тканях, способны прорастать и вызывать инфекцию.

Возбудитель пузырчатой головни относится к теплолюбивым видам. Температура прорастания и созревания телиоспор 0–35□C, оптимальная – 20–30□C. Споры могут сохраняться в почве 1–3 года, в зависимости от экологических факторов. В условиях средней полосы России телиоспоры сохраняются в почве более 11 месяцев, но основная их часть гибнет через 5–6 месяцев. Споры в галлах могут сохранить жизнеспособность до 2 лет и больше.

Биология возбудителя пыльной головни сорго и кукурузы

Пыльная головня сорго и кукурузы вызывается возбудителем *Sorosporium reilianum* McAlp. f. *sorghi ceschele*. Syn – *Sphacelotheca reilianum* Clinton, *Sorosporium holci-sorghi* (Riv.) Moesz. Родина гриба – тропическая Африка.

У пораженного растения отмечаются общее снижение роста до 55% (Halisky, 1965), гибель генеративных органов, снижение всхожести семян. Пыльная головня сорго становится наиболее заметна в фазу выметывания. Вместо метелки из влагалища верхнего листа появляются крупные продолговатые вздутия, покрытые серовато-белой оболочкой. После созревания спор оболочка лопается, и споры разносятся ветром. Патоген уничтожает все соцветия, и после освобождения спор

на месте метелки остаются кучки тяжевидных волокон – остатки проводящей ткани.

Кроме генеративных органов, болезнь может проявляться на листьях и стеблях. При листовой форме заболевания на листьях вдоль средней жилки образуются неправильной формы мешковидные вздутия, покрытые серовато-белой оболочкой, заполненные споровой массой. Гриб может поражать и нижнюю часть соцветия, а также стебель. При этом в верхней части метелки или на стебле заметны черные различных размеров и формы образования, твердые на ощупь. Соцветия при этом не разрушаются, но цветение не происходит из-за нарушения притока питательных веществ в метелку. В то же время, на этом же растении из боковых побегов могут образоваться новые метелки меньших размеров с метельчатой формой проявления головни.

Источник заражения сорго головней – споры, попавшие в почву или на поверхность семян, цветковая инфекция у данного вида не происходит.

Споры *S. reilianum* собраны в округлые или продолговатые комочки от 70 до 150 мкм в диаметре. Комочки легко распадаются в воде. Единичные споры шаровидной, эллипсовидной формы, темно-коричневые со слабощетинистой оболочкой, размером 6,3–14,4 мкм в диаметре. Хламидоспоры довольно хорошо выдерживают в почве неблагоприятные зимние условия, а весной прорастают.

Сорго восприимчиво к инфекции уже на ранних стадиях развития. Гриб проникает через колеоптиле, причем растение сохраняет восприимчивость спустя 16–24 дня после прорастания зерновых (Kruger, 1962). Дикариотический мицелий проникает в колеоптиле без образования споридий (Wilson, Frederiksen, 1970). Мицелий двигается по слабо дифференцированной эпидерме в район апикальной меристемы проростка и по мере роста и удлинения междоузлий поднимается вместе с точкой роста побега. Закладка скоплений спорогенного мицелия (будущих сорусов) начинается в период перехода апикальной меристемы от вегетативного к репродуктивному состоянию. Чем меньше мицелия содержится в районе апикальной меристемы на более поздних стадиях дифференциации соцветия, тем менее

деформировано оно в результате развития сорусов (Каратыгин, 1981).

Заражение метелки пыльной головней происходит на IV этапе органогенеза. Если к этому моменту мицелий гриба не достигнет основной метелки, то она не будет поражена. Однако вследствие того, что грибница *S. reilianum* способна сохранять жизнеспособность на протяжении почти всей вегетации сорго, то боковые побеги с метелками оказываются пораженными.

Для *S. reilianum* характерен тетраполярный гетероталлизм с двумя аллеями в обоих половых локусах. Генетическая система “по полу” у этого вида еще более сложна. Так, у него выявлены признаки существования нескольких различных (около 10) “половых групп”.

При скрещивании *S. reilianum* и *S. phacelotheca cruenta* (мелкопузырчатая головня сорго) формируются хламидоспоры (телиоспоры), прорастающие крупным промицелием с крупными споридиями, возможно вследствие гетерозиса.

При скрещивании *S. reilianum* и *Sphacelotheca sorghi* (покрытая головня сорго) в первом поколении формируется “гетерозисный” промицелий со споридиями. Тип сорусов *S. reilianum* (пыльной головни) доминирует над компактными сорусами промицелий со споридиями. Тип сорусов *S. reilianum* (пыльной головни) доминирует над компактными сорусами *Sph. sorghi* (Rodriguez, Frederiksen, 1968).

Способность *S. reilianum* гибридизировать со *Sph. sorghi* свидетельствует о филогенетической близости этих видов, хотя их и относят к разным родам.

Биология возбудителя покрытой головни сорго

Покрытая головня сорго вызывается грибом *Sphacelotheca sorghi* Clint. Синоним – *Sporosporium sorghi* Ehrend.

Покрытая головня сорго, в отличие от *S. reilianum*, проявляется только на генеративных органах растения. Болезнь становиться заметной в фазе выметывания. Вместо зерна в завязи образуются продолговатые, цилиндрические или конусообразные вздутия 2–3 мм длиной, покрытые светло-серой или бурой оболочкой, которая представляет собой разрастающийся в завязи бесцветный мицелий гриба. Вся внутренняя часть зараженной завязи заполнена пылевидной оливково-

коричневого цвета споровой массой. После созревания спор покрывающая вздутия оболочка разрывается. Споры разносятся ветром, попадают в почву и на здоровые семена сорго. На месте завязей остаются короткие столбики-колонки – остатки разрушенных тканей.

Хламидоспоры покрытой головни сорго имеют шаровидную или овальную форму, оливкового цвета, с гладкой или покрытой бородавками оболочкой (рис. 1.1.4.). Размер спор 3,6–7,2 мкм в диаметре (до 8,5 мкм).

При посеве заспоренного головней зерна споры прорастают одновременно с семенами. Проникновение мицелия в зародышевый мешок осуществляется обычно в районе мезокотиля. В это время проростки сорго имеют длину 1,5–4 мм, а первичные корешки – 0,5–1,5 мм (Melchers, 1956). Таким образом, заражение растений происходит приблизительно на 5-й день после начала прорастания семян сорго и за 3–4 дня до появления всходов. Проникнув в первичные корни, мицелий гриба начинает ветвление и вскоре образуют споридии.

Для *Sph. sorghi* отмечены признаки мультиполярного гетероталлизма. *Sph. sorghi* легко скрещивается с *S. reilianum* и *Sph. cruenta*. При этом межвидовые линии *Sph. sorghi* и *Sph. cruenta* более агрессивны, чем инбредные линии обоих видов. В то же время при скрещивании некоторых линий в пределах вида *Sph. sorghi* образуются хламидоспоры, промицелий которых при их прорастании подвергается лизису. Подобная тенденция к лизису управляется генетическими факторами, которые в естественных условиях ограничивают внутривидовые скрещивания.

К *Sph. sorghi* близок сравнительно недавно выявленный вид *Ustilago bolgarica*, паразитирующий на сорго. Болезнь проявляется в поражении завязей, которые удлиняются и приобретают вид “рожков”, выступающих из цветочных чешуек. “Роговидные” образования покрыты серой мицелярной пленкой (оболочкой).

Биология возбудителя мелкопузырчатой головни сорго

Мелкопузырчатую головню вызывает гриб *Sphacelotheca cruenta* Potter. Синоним – *Sporisorium cruentum* (Kuehn) Vanky.

В России *Sph. cruenta* менее распространена, чем *Sph. sorghi* и *S. reilianum*.

Возбудитель поражает большинство культурных и диких видов сорго.

Мелкопузырчатая головня задерживает рост зараженных растений, что часто приводит к усиленному ветвлению. В отличие от возбудителя покрытой головни сорго, гриб поражает не только завязи, но и цветоножки, чешуи, тычинки, ветви метелки. Мелкопузырчатая головня, как и пыльная, может поражать листья и стебли растений. На листьях она появляется в виде волнисто-сморщенных удлиненных вздутий с более или менее гладкой поверхностью.

Так как мицелий гриба проникает во флоральные меристемы на ранних стадиях их дифференциации, то происходит общая деформация генеративных органов, а не отдельных завязей. На пораженных органах образуются красноватые или светло-коричневые мешковидные вздутия удлиненной неправильной формы. Сверху они покрыты оболочкой, которая разрывается и споры разносятся ветром, заражая почву и семена. На месте вздутия остается длинный темный заостренный стержень (Viennot-Bourgin, 1978).

Хламидоспоры мелкопузырчатой головни шаровидные или эллипсовидные (рис. 1.1.4.) 7–11 мкм в диаметре. Оболочки спор коричневого цвета, гладкие или с небольшим утолщением. Хламидоспоры прорастают вскоре после посева заспоренных семян, образуя четырехклеточные базидии с веретенообразными, легко почкующимися базидиоспорами.

Гриб обладает биполярным гетероталлизмом. *Sph. cruenta* легко скрещивается со *Sph. sorghi* и *S. reilianum*. При скрещивании *Sph. cruenta* и *S. reilianum* в первом поколении было получено 3 типа сорусов. Два из них имели сходство с сорусами родительских типов, а третий напоминал сорус крупнопузырчатой головни (Vakeeduddin, 1942).

Биология возбудителя крупнопузырчатой покрытой головни сорго

Крупнопузырчатая головня сорго (возбудитель – *Sorosporium ehrenbergii* Kuchn.) в бывшем СССР впервые отмечена в Средней Азии (Запрометов, 1925).

Заболевание вызывает существенное снижение урожая сорго. Болезнь проявляется на отдельных завязях метелки. Вместо семян образуются пузыревидные

цилиндрические головневые мешочки до 2–3 см длиной и 0,5–0,6 см шириной. Они слегка изогнутой вытянутой эллипсовидной формы, покрыты вначале белой, затем желтовато-серой пленкой, заполненные черной массой хламидоспор. Мешочки не сливаются друг с другом, разбросаны по всей метелке, но в основном сосредоточены в верхней ее части, а у образцов с изогнутой метелкой – в нижней части. Болезнь может проявляться на тычинках цветка сорго. При этом образуются 3 длинных тонких мешочка, равных количеству тычинок цветка сорго. Головневые мешочки покрыты оболочкой. При их разрыве на месте мешочков остается 8–10 пучков тонких темно-бурых нитей (остатки проводящих сосудов), между которыми плотно прикреплены головневые споры.

Споровая масса черная, шероховатая и твердая на ощупь. Отдельные споры шаровидные, эллиптические или слегка угловатые, 9–14 мкм в диаметре, с желтой или темно-коричневой оболочкой. Верхняя поверхность спор бородавчатая.

Заражение растений осуществляется во время цветения сорго. Телиоспоры и споридии заносятся ветром на зерновки, находящиеся в начальных стадиях формирования, прорастают и мицелий внедряется в зерновку, где зимует в покоящемся состоянии. На следующий год из прорастающих зерновок мицелий гриба инфицирует проросток, образуя многоклеточные базидии с боковыми и верхушечными базидиоспорами, или появляется гифа с воздушными конидиями, которые возникают на вершине цепочками или гроздями. Таким образом, инфекция в данном случае промежуточная между цветковой и проростковой, напоминает *U. hordei*. Помимо этого, частично имеет место непосредственное заражение растений в стадии проростков от хламидоспор, находящихся в почве (Hafiz, 1958).

ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОПЫТОВ, МЕТОДЫ УЧЕТА, КЛАССИФИКАЦИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА

Сбор, подготовка и хранение инокулюма

Инфекционным материалом для оценки устойчивости к головне должны служить популяции с районированных сортов, поскольку сорта растения-хозяина

существенно влияют на популяцию возбудителя, оказывая селективное действие. При массовой оценке исходного коллекционного и селекционного материала определяют устойчивость к смеси популяций. Наиболее ценный материал (устойчивые, слабо восприимчивые формы) необходимо оценивать к каждой популяции отдельно. Если изучен расовый состав возбудители, необходимо проводить оценку устойчивости к наиболее агрессивным для данной зоны расам головни.

U. avenae и *U. kolleri* собирают с зерновых культур, идентичных оцениваемым. У овса, при отсутствии инокулюма на видах *A. strigosa* и *A. fatua,* можно использовать популяции возбудителя с сортов *A. sativa*.

Сроки сбора инокулюма разных видов головни должны быть строго определенными, в соответствии с особенностями развития патогена. Хламидоспоры *U. hordei*, *T. levis*, *T. caries*, *U. kolleri* собирают в период восковой или полной спелости растения-хозяина, споры *U. tritici*, *U. nuda*, *U. nigra*, *U. avenae* лучше собирать в начале выхода колосьев или метелок из влагалища листа в фазу колошения. На сорго и кукурузе сбор инокулюма следует проводить в конце вегетационного периода (август–сентябрь). Это обеспечивает получение зрелых жизнеспособных спор почти без загрязнения.

В течение 2–3 суток весь собранный материал должен быть просушен в теплом сухом месте. После этого пораженные колосья или метелки связывают в снопики и держат в сухом, прохладном, хорошо проветриваемом месте. Хламидоспоры большинства видов головни могут храниться в комнатных условиях в гербарных образцах без существенной потери всхожести в течение длительного времени: *U. avenae* – до 10 лет, *U. kolleri* – до 13 лет, *U. hordei* – до 7 лет, *T. caries* – до 18 лет, *T. levis* – до 25 лет.

Хламидоспоры *U. tritici*, *U. nigra* и *U. nuda* лучше хранить в холодильнике при температуре 0+3°С, жизнеспособность их в этих условиях сохраняется до 6–8 мес. Для длительной консервации этих возбудителей (до 5 лет) можно использовать частичный вакуум (в стеклянных ампулах при разрежении 1,2 ×10 атм).

У пыльной головни сорго основным источником инфекции является почва.

Споры гриба сохраняются в почве, не теряя жизнеспособности несколько лет. В опытах с пыльной головней рекомендуется собранные осенью споры тщательно перемешать с почвой. Приготовленную смесь помещают в контейнер, который закапывают на опытном участке с тем, чтобы условия перезимовки возбудителя были максимально приближены к естественным. Весной зараженную почву извлекают из контейнера и путем добавления определенной навески земли готовят разные инфекционные нагрузки.

Сбор инокулюма пузырчатой головни кукурузы проводят заблаговременно – собирают хорошо сформированные вздутия без признаков плесневения. Такие вздутия в зимнее время следует хранить в неотапливаемом помещении. Весной вздутия измельчают, споры очищают просеиванием от механических примесей и хранят в течение периода заражения в холодильнике или подвале.

Подготовка инокулюма

Для инокуляции хламидоспоры *U. tritici*, *U. nuda*, *U. nigra*, *U. avenae* необходимо стряхнуть с колосьев или метелок, просеять через сито с отверстиями 0,05 мм и подготовить из них навески. Колосья, зараженные видами твердой головни, следует предварительно растереть в ступке. В работе с инокулюмом очень важно не допустить смешивания популяций спор. Это возможность наиболее вероятна в момент обрушивания головневых сорусов, когда облачко спор поднимается в воздух и находится там некоторое время. Подобную работу лучше всего проводить в хорошо защищенных местах в тихую безветренную погоду.

После длительного хранения необходимо обязательно проверить жизнеспособность хламидоспор. Популяция патогена, имеющая более 50% проросших спор, может быть использована для инокуляции семян и растений в тех дозировках, которые описаны и методической части. Образцы возбудителя, которые сохранились хуже (25–50% проросших спор), требуют соответствующего увеличения навески хламидоспор. Образцы с более низкой жизнеспособностью следует выбраковывать или использовать для реинокуляции на восприимчивых сортах.

Для проращивания хламидоспор используют специальные питательные сре-

ды. В обычной водопроводной воде хламидоспоры головни прорастают слабо. Можно проращивать в капле воды, нанесенной на предметное стекло, предварительно смазанное картофельно-глюкозной средой. Каплю питательной среды со спорами помещают во влажную камеру на 40 ч. Просмотр препаратов и определение процента жизнеспособных спор осуществляют с помощью микроскопа.

Широко используют различные питательные среды – такие, как среда Чапека, Артари, Сарториса, Пихлера и другие.

Среда Артари: NH_4NO_3 – 0,25 г; KH_2PO_4 – 0,1 г; $MgSO_4$ – 0,025 г; $FeCl_3$ – следы; вода –100 мл.

Хорошо прорастают хламидоспоры а 6%-ном пивном сусле. Свежее заводское сусло (100%) разводят дистиллированной водой и используют для проращивания хламидоспор *U. tritici*, *U. nuda*, *U. nigra*, *U. hordei*, *U. avenae*, *U. kolleri***,** возбудителей головни сорго. Хламидоспоры уже через 12–16 ч полностью прорастают, продуцируя огромное число споридий.

Для проращивания хламидоспор возбудителей *T. caries* и *T. levis* чаще используют среду Сарториса следующего состава: мальц-экстракта – 3,0 г; декстрина – 2,0 г; $Ca(NO_3)_2$ – 0,4 г; KNO_3 – 0,2 г; KH_2PO_4 – 0,2 г; $MgSO_4$ – 0,01 г; пептона – 0,1 г; воды – 100 мл.

Хорошо прорастают хламидоспоры *T. caries* и *T. levis* на среде Пихлера. Ее составляют из следующих компонентов: дистиллированная вода, 0,1%-ный раствор нитрата кальция и 1% раствор конского навоза (PH = 7,6), который готовится путем настаивания, а потом кипячения в 1 л воды 100 г свежего конского навоза.

Проращивание хламидоспор возбудителей следует проводить не в темноте, а при рассеянном свете, при температуре 25–28□С.

Целесообразно проращивать споры головневых грибов во влажных камерах. Для увлажнения используют воду. Для патогенов сорго можно использовать настой из корешков или стеблей, или их смеси с добавлением почвенной вытяжки. Настой делают, помещая 200 г растительного образца (зеленые растения в стадии 3-х листов, корни, стебли) на 12 ч в 1 л стерильной водопроводной воды.

Почвенную вытяжку готовят путем 2-х часового взбалтывания 200 г почвы с 1 л дистиллированной стерилизованной воды. Почву берут с участка, на котором в течение 4-х лет выращивали сорго. При проращивании патогенов кукурузы можно использовать капли смыва с семян. Семена и воду берут в соотношении 1:1 и выдерживают в термостате в течение суток.

Организация опытов по изучению устойчивости

Выбор и подготовка участка. Организация исследований начинается с выбора участка, который проводится с учетом возможной пространственной изоляции головневых посевов от общих селекционных и, особенно, семеноводческих.

Самым лучшим вариантом является организация инфекционного питомника. Для ограниченных исследований пригодны временные инфекционные питомники, создаваемые невдалеке от селекционных полей, однако нужно соблюдать строжайшую пространственную и экранную изоляцию от семеноводческих посевов. Лучше всего закладывать опыты в высокорослых массивах кукурузы, подсолнечника и других культур. Удаление инфекционного питомника на 300–500 м от производственных посевов предохраняет их от сильного заражения.

Необходимо, чтобы участок был ровным, хорошо обработанным, расстояния между рядами, которые определяют площадь питания растений, должны быть одинаковыми. При работе с кукурузой и сорго весь опытный участок необходимо обсеять стандартным, не зараженным головней сортом. Дорожки между опытными делянками 2 м, ширина междурядий 70 см. Размер делянок 7–10 м в зависимости от цели опыта.

Посев инфицированных семян в оптимальные сроки или спустя 3–5 дня благоприятно сказывается на проявлении болезни. Посев определенной схемы опыта необходимо начинать и заканчивать в один день. Закладка всех опытов по головнеустойчивости не должна превышать 3-х дней.

Уход за посевами во время вегетации ничем не должен отличаться от агротехники обычных посевов. При организации опытов следует воздержаться от од-

постороннего внесения каких-либо удобрений. Еще более жесткие требования должны предъявляться к внесению в почву пестицидов и обработке семян фунгицидами, которые способны значительно изменить обмен веществ у растений или в сторону повышения устойчивости к одним паразитам или усиления восприимчивости к другим. Поэтому любая обработка растений и почвы ядохимикатами может исказить естественную реакцию устойчивости испытываемых образцов.

Сроки и кратность проведения исследований по устойчивости исходного материала к головневым заболеваниям определяются характером и целью опытов, наличием семян и эффективностью методов инокуляции.

При оценке в конкурсном сортоиспытании необходимо использовать трехкратную повторность в опытах. При определении устойчивости коллекционных и селекционных образцов существенную роль играет принцип выявления максимального поражения сорта. По этому показателю определяется потенциальная устойчивость сорта. Устойчивость, контролируемая генетическими факторами, должна проявляться стабильно даже на самом сильном инфекционном фоне. Значительное варьирование поражения в разные годы изучения свидетельствуют о влиянии различных факторов на инфекционный процесс.

Таким образом, та или иная степень поражения сортов пшеницы, ячменя, овса, сорго в разные годы, обусловленная влиянием климатических и других факторов, требует особого подхода к анализу полученных данных. Использование средних процентов поражения для характеристики степени устойчивости приводит к заниженным данным, не соответствующим испытанной реакции сортов. Следовательно, средние показатели снижают учетную степень поражения и приводят к увеличению числа так называемых слабо поражаемых сортов, что неверно с позиций классификации типов резистентности. Только максимальное поражение образца за ряд лет показывает объективную реакцию устойчивости.

Такой подход определяет и кратность (повторность) экспериментов. Она зависит от степени выраженности инфекционного фона, на котором получены те или иные результаты. Если эффективность метода низка, то опыты со многими

повторностями не вскроют устойчивости образца. Большие различные свидетельствуют о низком качестве искусственного заражения или отрицательном влиянии температуры почвы и воздуха на развитие инфекции. Опыт следует повторить. Эти особенности ориентируют на однократный посев хорошо инокулированных семян, а окончательную характеристику каждому сорту следует добавить по максимальному поражению, полученному за 2–3 года изучения.

В экспериментах следует ориентироваться на методы инокуляции, которые обеспечивают поражение восприимчивых сортов на 80–100%. Инокулированные семена высевают на одной делянке количеством не менее 100–150 зерен.

При сильном изреживании посевов или повреждении их вредителями независимо от числа посеянных семян опыты следует браковать. При этом следует обращать внимание на характер выпадов, так как гибель всходов иногда случается из-за сильного поражения зародышей семян: происходит самоочищение посевов от головни. Такого рода данные следует учитывать, так как они обеспечивают получение дополнительной информации о степени устойчивости сортов.

Исходя из этого, эксперимент по оценке исходного материала необходимо проводить следующим образом. Инокулированные семена высевают в поле. О качестве искусственного заражения судят по поражению восприимчивого контроля. Если исследуемый образец сильно поражается головней (более 40–50% при хорошем стеблестое и высокой восприимчивости контроля), то оценку заканчивают, так как эти результаты свидетельствуют о восприимчивости сорта. При отсутствии инфекции или небольшом поражении изучаемых образцов, опыты обязательно повторяют, чтобы исключить возможную ошибку. Средневосприимчивые сорта повторно испытывают в том случае, если они перспективны по другим хозяйственным признакам и представляют интерес для селекции.

В качестве контроля высеивают восприимчивый сорт. Поражаемость этого сорта должна быть не ниже 60%. Очередность размещения контроля определяется в каждом конкретном случае: через 10 или 20 испытываемых сортов. Слабое поражение в опытах восприимчивого сорта можно объяснить некачественной ино-

куляцией семян или неблагоприятными условиями для развития патогена на том или ином участке поля.

Учет поражения

Для унификации данных по устойчивости к головневым заболеваниям и условного размещения образцов в определенные классы устойчивости используют соответствующие шкалы учета поражения. Ниже приведены шкалы для оценки образцов пшеницы, ячменя и овса.

Виды твердой головни пшеницы (*T. caries*, *T. levis*, *T. controversa*):

0 – высокая устойчивость, поражение отсутствует;

1 – практическая устойчивость, поражение не превышает 10%;

2 – слабая восприимчивость, поражение не превышает 25%;

3 – средняя восприимчивость, поражение не более 50%;

4 – сильная восприимчивость, поражение более 50%.

Виды головни пшеницы, ячменя и овса (*U. tritici*, *U. nuda*, *U. avenae*, *U. kolleri*, *U. nigra*):

0 – высокая устойчивость, поражение отсутствует;

1 – практическая устойчивость, поражение не превышает 5%;

2 – слабая восприимчивость, поражение не превышает 25%;

3 – средняя восприимчивость, поражение не превышает 50%;

4 – сильная восприимчивость, поражение более 50%.

Каменная головня ячменя (*U. hordei*):

0 – высокая устойчивость, поражение отсутствует;

1 – практическая устойчивость, поражение не превышает 5%;

2 – слабая восприимчивость, поражение не превышает 20%;

3 – средняя восприимчивость, поражение не превышает 40%;

4 – сильная восприимчивость, поражение более 40%.

В случае, если поражение изучаемых образцов составило 3 или 4 балла (при поражении восприимчивого стандарта на 4 балла), оценку устойчивости этих об-

разцов заканчивают. Образцы, поражение которых не превышало 1 балла, необходимо испытывать не менее двух лет.

При учете поражения зерновых культур головневыми заболеваниями используют два способа, один из которых основан на подсчете количества здоровых и больных колосьев (метелок), другой – на анализе здоровых и больных растений.

Для характеристики устойчивости образцов более удобен метод учета по стеблям – он регистрирует действительную реакцию растений на внедрение паразита (особенно у слабо восприимчивых сортов).

Метод учета по растениям более пригоден при изучении устойчивости гибридов всех поколений, то есть в тех случаях, когда особенно тщательно должен быть осуществлен учет наибольшего поражения каждого растения с целью отбора устойчивых семей и линий. Этот же метод учета необходим при изучении наследования признака устойчивости у сортов.

При оценке устойчивости сорго к головне используют 2 метода учета поражения. Один из них основан на анализе здоровых и больных метелок. Во втором случае к больным относят даже те растения, у которых поражена часть метелки, даже несколько цветков, или поражение обнаружено на другом участке растения (стебель, лист, ось соцветия при поражении пыльной головней). Анализ данных свидетельствует о том, что при одних и тех же методах инокуляции, но разных способах учета конечные результаты могут существенно различаться. У многих восприимчивых сортов разница в поражении невелика, 10–17%. Более заметные отклонения наблюдаются в группах средне- и слабовосприимчивых сортов. Оно могут достигать соответственно 30, 40 и даже 70%.

Варьирование степени поражения сортов при разных методах учета объясняется тем, что у средне- и слабовосприимчивых образцов не все стебли растения бывают поражены. Частичное поражение растений этих сортов, по-видимому, – своего рода реакция устойчивости. Вследствие этой особенности учет по стеблям более точно улавливают и реакцию устойчивости растения, особенно у слабовосприимчивых образцов.

Для учета пораженности кукурузы пузырчатой головней существует несколько методов. При оценке устойчивости целесообразно учитывать количество пораженных растений, разграничивая пораженность их различных органов, что даст представление об органотропной устойчивости. Используют шкалу:

0 – высокая устойчивость, поражение до 2%;

1 – устойчивость, поражение от 2,1 до 10%;

2 – средняя устойчивость, поражение от 10,1 до 15%;

3 – восприимчивость, поражение от 16 до 30%;

4 – сильная восприимчивость, поражение более 30%.

При заражении початков пораженность значительно выше, чем в предыдущем случае, поэтому предлагается шкала устойчивости с иной градацией:

0 – высокая устойчивость, поражение до 5%;

1 – устойчивость, поражение 25%;

2 – средняя устойчивость, поражение от 26 до 50%;

3 – восприимчивость, поражение от 51 до 75%;

4 – сильная восприимчивость, поражение более 75%.

У сорго учет поражения образцов головневыми болезнями необходимо проводить в августе-сентябре (фаза молочно-восковой спелости).

Для покрытой головни сорго рекомендуется шкала:

0 – высокая устойчивость, поражение отсутствует;

1 – практическая устойчивость, поражение не превышает 10%;

2 – слабая восприимчивость, поражение не превышает 25%;

3 – средняя восприимчивость, поражение не превышает 50%;

4 – сильная восприимчивость, поражение более 50%.

При изучении устойчивости к пыльной головне сорго используют следующую шкалу:

0 – высокая устойчивость, поражение отсутствует;

1 – практическая устойчивость, поражение не превышает 5%;

2 – слабая восприимчивость, поражение не превышает 20%;

3 – средняя восприимчивость, поражение не превышает 40%;

5 – сильная восприимчивость, поражение более 40%.

Как указывалось выше, средне и сильновосприимчивые образцы изучают один год. Образцы, показавшие себя высокоустойчивыми, практически устойчивыми и слабовосприимчивыми, следует изучать в течение 2–3 лет.

Методы инокуляции пшеницы возбудителями твердой головни

Твердая головня пшеницы. Наиболее эффективна инокуляция с помощью простого метода А.И. Борггард-Анпилогова (Борггард, 1961), при котором проводят заспорение семян за несколько дней до посева. Обычно берут 100 семян каждого сорта, всыпают их в широкую пробирку, колбу или бумажный пакет, где и производят инокуляцию. Подготовка инокулюма заключается в обмолоте головневых зерен, растирании их в ступке, просеивании на мелких решетах для отделения от примесей. Навеску хламидоспор (1:100) высыпают в сосуд с семенами. В течение 2–3 мин семена тщательно встряхивают, затем высыпают в посевной пакет. Посев проводят в наиболее благоприятное для развития заболевания время. При изучении устойчивости озимой пшеницы лучшими являются поздние сроки сева, а при оценке яровой пшеницы инокулированные семена необходимо сеять несколько раньше оптимальных сроков. Глубина заделки семян играет большое значение при оценке устойчивости пшеницы. Посевной материал необходимо высевать на глубину 8–10 см. Обычно используют 100 заспоренных семян, которые лучше сеять в 2 ряда длиной 1 м, с расстоянием между рядами 15 см. Для контроля качества инокуляции и условий проявления заболевания используют восприимчивый контроль, заспоренные семена которого высевают через каждые 20 образцов изучаемой коллекции. Поражение контроля свыше 50% свидетельствует о благоприятных условиях для инокуляции и о достоверности данных оценки. В качестве восприимчивых можно использовать озимые сорта пшеницы Гибрид 128 (к-5283) и Мироновская 808 (к-43920) и яровой сорт Ленинградка (к-47882).

Карликовая головня пшеницы. Все методы инокуляции пшеницы карликовой головней основаны на насыщении почвы и семян большим числом хламидоспор.

Один из способов состоит в том, что почву насыщают возбудителем путем полива рядков пшеницы суспензией хламидоспор карликовой головни из расчета 1 г головни на 5 погонных метров пшеницы. В США принята иная методика. Головневые колосья с небольшим количеством земли обрабатывают на специальных машинах. Полученную массу перемешивают с почвой и оставляют в открытых ящиках на полтора–два месяца. Спустя 15 дней после оптимального срока проводят посев пшеницы в бороздки, которые засыпают искусственно заспоренной почвой из расчета 5 кг массы на 1,5 м рядка. После этого почву слегка утрамбовывают. Мелкая заделка семян способствует лучшему заражению растений. Как и в случае оценки пшеницы к твердой головне, необходимо использовать восприимчивый контроль (Гибрид 128), который размещают через 20 испытываемых сортов.

Методы инокуляции пшеницы возбудителем пыльной головни

Заспорение цветков с помощью кисточки очень эффективно, но чрезвычайно трудоемко, так как необходимо проводить заспорение каждого цветка в отдельности. В настоящее время применяется очень редко. Близки к этому способу заражения растений и методы вдувания хламидоспор в цветки пшеницы с помощью различных приспособлений (рис. 1.1.5.).

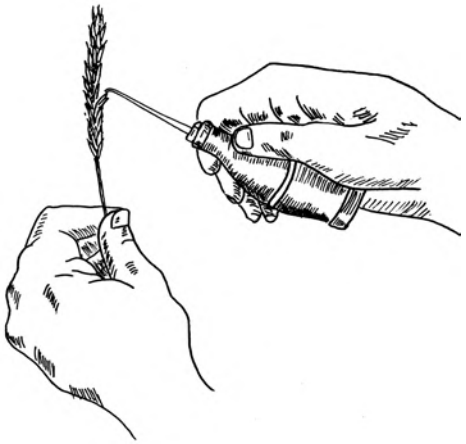


Рис. 1.1.5. Инокуляция цветков пшеницы хламидоспорами возбудителя пыльной головни методом заспорения

Инокуляция с подрезанием чешуй (Гешеле, 1978). В период колошения подрезают колосковые и цветочные чешуи, открывая тем самым свободный доступ

хламидоспорам к завязи. Подготовленные таким образом колосья натирают пораженным головней колосом (рис. 1.1.6.). Хламидоспоры падают на завязь цветка и инокулируют ее. Метод эффективен, при тщательной работе обеспечивает высокие проценты поражения восприимчивых сортов. К некоторым недостаткам можно отнести очень сильное распыление спор и сравнительно невысокую производительность. Метод может быть использован для дифференциации рас возбудителей только при условии строжайшей изоляции, но хорошо оправдывает себя при опенке устойчивости образцов.

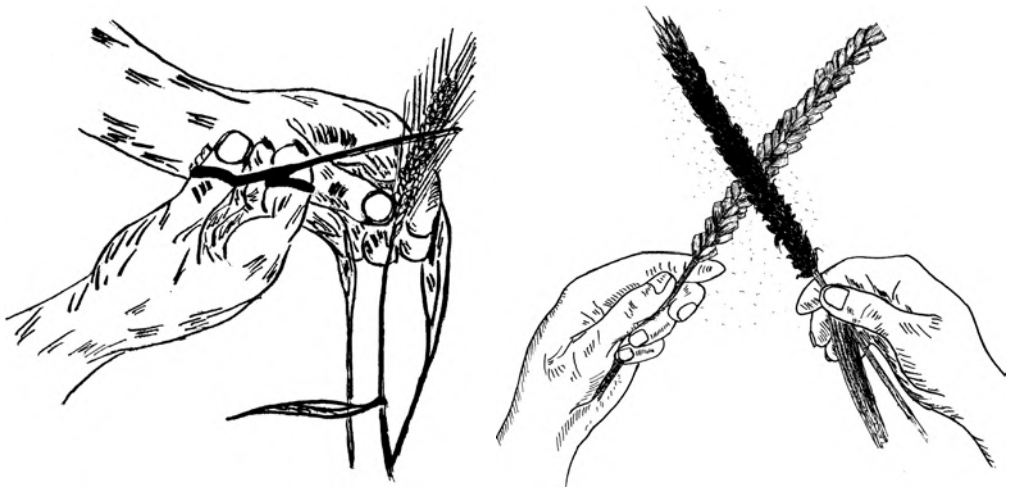


Рис. 1.1.6. Метод искусственного заражения пшеницы по Гешеле:

слева – подготовка колосьев к инокуляции;
справа – инокуляция цветков хламидоспорами.

Заражение пшеницы пыльной головней в период цветения при помощи шприца. В период цветения пшеницы суспензию хламидоспор вносят в каждый цветок с помощью медицинского шприца, соединенного с резиновой грушей. Концентрация спор – 1 г на 1 л воды. Метод эффективный, дает высокий процент поражения восприимчивых сортов, при инокуляции не повреждается завязь в цветке. Недостаток метода – низкая производительность. Метод может быть использован для оценки гибридного материала.

Инокуляция пшеницы пыльной головней в период гибридизации. Вакуумный метод не совсем пригоден для инокуляции цветков пшеницы и ячменя после их

опыления в период гибридизации, так как суспензия смывает и уменьшает количество завязываемых гибридных зерен. Поэтому заспорение гибридов осуществляют через 24 ч после принудительного опыления способом, похожим на твел-метод – прокручивают головневый колос вокруг испытуемого колоса, не снимая изолятор, затем опрыскивают водой из пульверизатора внутри и снаружи изолятора. Метод эффективен и при тщательной работе обеспечивает высокое поражения восприимчивых гибридов.

Метод проростковой инокуляции ячменя и пшеницы пыльной головней – способ Каванага (Kavanag, 1964). Семена ячменя или пшеницы проращивают до тех пор, пока колеоптиле достигает длины 1–2 см. Верхушки колеоптиле срезают на 1–2 мм. Подготовленные таким образом проростки помещают в суспензию, которая состоит из воды, хламидоспор и смачивающего вещества Твин-20 или Твин-80 (0,02%). Концентрация спор – от 1–2 г на 1 л воды. Погруженные в суспензию проростки выдерживают 1 мин в вакууме при давлении 25 мм рт.ст. (в приборе Комовского). Время отсчитывают с момента установления этого давления. Проростки высаживают в грунт, и после колошения производят учет пораженных растений. При заражении проростков в период посадки оптимальна среднесуточная температура воздуха 15–17°С, сохраняющаяся в течение 9–12 дней.

Для того чтобы избежать подрезания колеоптиле, семена выращивают при интенсивном освещении, которое способствует растрескиванию колеоптиле. Полученные таким путем проростки инокулируют головней.

Преимущество этого метода перед методом цветковой инокуляции заключается в том, что можно инокулировать большее число проростков при одинаковых условиях без опасения смешивания рас. Для инокуляции большого числа проростков требуется небольшое количество инокулюма.

Недостаток метода – трудоемкость процесса подрезания колеоптиле. Кроме того, степень поражения сортов при инокуляции методом Каванага сравнительно низка, что не дает гарантии точной оценки устойчивости.

Вакуумный метод инокуляции пшеницы признан наиболее эффективным.

Принцип использования разрежения воздуха в цилиндре для подъема суспензии спор и инокуляции цветков впервые предложен Муром в 1936 г. Им же сконструирован и первый аппарат (Moore, 1961). Метод имеет преимуществ в сравнении с ранее описанными: высокую производительность, надежность инокуляции, отсутствие распыления спор. Многие авторы модифицировали аппарат Мура, но неизменным оставался принцип использования разрежения воздуха.

В 1960 г. предложена модель вакуумного аппарата, которая в течение многих лет тщательно апробировалась (Кривченко, 1960). Аппарат прост, имеет малые габариты, удобен в работе. В поле прибор обслуживают два человека (рис. 1.1.7.)

Рис. 1.1.7. Заражение растений возбудителем пыльной головни с помощью вакуумного аппарата.

Прибор состоит из стеклянного цилиндра с двумя патрубками: один для откачивания воздуха, другой – для его впуска. В нижней части он расширен для ввода герметизирующего устройства. Цилиндр соединен с насосом резиновой трубкой, сжатие которой рассчитано на остаточное давление 100–120 мм рт.ст. Она служит своего рода манометром для определения степени разрежения в цилиндре. Для этой же цели можно использовать не всю трубку целиком, а ее не-

большой отрезок, соединенный с цилиндром и шлангом любого размера, диаметра и упругости. Наиболее ответственной деталью аппарата является герметизирующее устройство для стеблей злаков – вакуумная зажимная пробка. Ее изготовляют из резиновых пробок: просверливают сквозное отверстие, вырезают среднюю часть и вклеивают мелкопористую резину с разрезом в середине. По бокам закрепляют упоры. Сквозное отверстие соединяют трубкой с сосудом, содержащим суспензию спор возбудителя (рис. 1.1.8.).

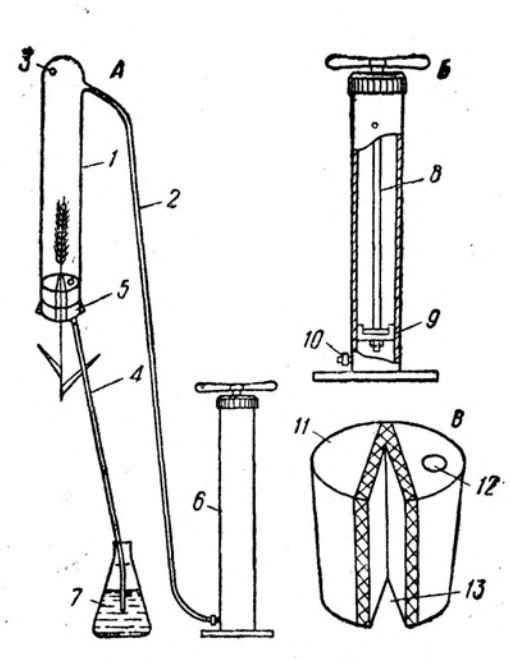


Рис. 1.1.8. Схема аппарата для инокуляции пшеницы и ячменя возбудителями пыльной головни: А – общий вид прибора: 1 – стеклянный цилиндр, 2 – трубка для откачивания воздуха, 3 – отверстие для впуска воздуха в цилиндр, 4 – шланг для подъема и спуска суспензии спор, 5 – вакуумная зажимная пробка, 6 – насос, 7 – сосуд для суспензии спор; Б – насос: 8 – шток, 9 – манжет, 10 – клапан; В – герметизирующее устройство (вакуумная зажимная пробка): 11 – одна из половинок пробки с мелкопористым слоем резины, 12 – отверстие, 13 – разрез в мелкопористом слое.

Восприимчивость пшеницы к пыльной головне в разные периоды цветения неодинакова. Встречаются сорта, которые более восприимчивы до цветения или в период оплодотворения завязей. Через 3–5 дней после цветения восприимчивость к заражению у всех сортов резко ослабевает.

В связи с этими особенностями, лучшим сроком для заражения является период, когда в колосе зацветает одновременно несколько цветков. Такие колосья

легко обнаруживаются по единичным пыльникам, выходящим из одного-двух (не более) колосков. Колосья содержат цветки, находящиеся на разных фазах развития: еще с зеленоватыми пыльниками, цветущие и только что отцветшие. Заражение в этот период дает возможность провести инокуляцию колосьев в два срока: в начале цветения (пыльники еще не созрели) и во время цветения (массовое оплодотворение завязей).

Непосредственно перед инокуляцией готовят водную взвесь спор пыльной головни – суспензию из расчета 0,5 г спор на 1 л воды. В сосуд наливают чистую воду и всыпают приготовленную навеску спор. Содержимое сосуда энергично встряхивают для равномерного распределения спор в воде. Образование стойкой суспензии может обеспечить гомогенизатор. Суспензию используют в течение одного дня, так как примерно через 12 ч споры гриба начинают прорастать. Подбирают несколько рядом стоящих колосьев, обрезают у них недоразвитые верхние колоски. В разрез вакуумной пробки помещают стебли подобранных колосьев и плотно надевают цилиндр на пробку. Закрывают пальцем стеклянную трубку и с помощью насоса создают в цилиндре разрежение. Под действием вакуума суспензия поднимается из сосуда и заполняет цилиндр. Как только колосья пшеницы погрузятся в жидкость, пальцами другой руки зажимают шланг для прекращения подачи суспензии в цилиндр. Откачивание продолжают до тех пор, пока в цилиндре не образуется давление, равное 100–120 мм рт.ст. (это определяют по сжатию трубки). Затем впускают воздух в цилиндр и разжимают шланг для выпуска жидкости. Процесс заражения 5–10 колосьев длится около минуты. Следует отметить, что размещать в пробке стебли необходимо очень аккуратно, для того чтобы мелкопористая резина плотно их облегала, а цилиндр на пробку одевать плотно. Сильное бурление жидкости в цилиндре при работе насоса свидетельствует о плохой герметизации, а, следовательно, и о неудовлетворительном качестве инокуляции. Зараженные колосья отмечают этикетками, цветными нитками и т.д. Для оценки устойчивости пшеницы и ячмень к пыльной головне достаточно инокулировать 7–10 колосьев испытываемого сорта.

После созревания зараженные колосья пшеницы убирают и обмолачивают обычными способами.

Так как степень заражения может сильно варьировать в зависимости от качества работы, температуры, влажности воздуха и других причин, для достоверной оценки материала необходимо использовать в работе восприимчивый контроль. С этой целью ежедневно в период инокуляции следует заражать один раз утром, другой раз – вечером восприимчивый сорт. Дату инокуляции и время суток отмечают на этикетках. Сильное поражение контроля (50% и более) говорит об успешном заражении, слабое свидетельствует о неудовлетворительной инокуляции.

Для каждой зоны можно подбирать восприимчивый сорт индивидуально. Универсально восприимчивыми являются Осетинская 3, Юбилейная Осетии – озимая мягкая пшеница; Reward (ВИР, к-8097), Диамант, Скала – яровая мягкая пшеница; Харьковская 46, Леукурум 33 – яровая твердая пшеница.

В отделе иммунитета ВИР на основе вакуумного аппарата Кривченко разработано и запатентовано устройство для инокуляции растений зерновых культур возбудителями болезней (рис. 1.1.9.).

Рис. 1.1.9. Заражение колосьев с помощью прибора для инокуляции

Устройство состоит из трех функциональных элементов: прибор для заражения растений, специальный ручной насос, переносной штатив. Обслуживается это устройство одним, а не двумя сотрудниками; имеет низкую массу (30–50 г); характеризуется высокой производительностью (100 растений в час); обеспечивает наблюдение за процессом заражения (использование пластиков); при низком расходе суспензии (около 1-го литра на 1000 растений) повышается качество инокуляции (проникновение спор возбудителя заболевания глубже в завязь цветка).

Принцип работы устройства основан на перепадах давления воздуха в камере с заражаемым растением. При отрицательном перепаде происходит засасывание суспензии с возбудителем заболевания в камеру. Специальный насос, в отличие от использующихся при вакуумной инокуляции, работает по принципу медицинского шприца, то есть как на всасывание, так и на нагнетание воздуха в камеру с заражаемым растением, что вдвое повышает эффективность заражения растения.

Лабораторный метод идентификации мицелия пыльной головни в зародышах зерновых культур

Анализ зараженности мицелием пыльной головни семян пшеницы позволяет заблаговременно выяснить степень устойчивости гибридных комбинаций или используемых в скрещиваниях родительских пар. Лабораторный метод обеспечивает более точный мониторинг зараженности посевов, нежели другие прямые и косвенные методы, позволяет прогнозировать развитие болезни в районном и зональном масштабе.

Принцип метода основан на отделении зародышей семян от эндосперма кипячением зерен в растворе щелочи, выявлении грибницы возбудителя и определении характера ее локализации в тканях зародыша.

Для проведения анализов необходимо иметь NaOH (каустическую соду), уксусную или молочную кислоту, краситель анилиновый синий для хлопчатобумажных тканей (бытовой), микроскоп или бинокуляр, скальпель, предметные стекла, набор лабораторных решет, стеклянные колбы.

Отделение зародышей от эндосперма. Для анализа пшеницы отбирается

средняя проба – 1000 естественно зараженных зерен или 100–120 искусственно инокулированных семян. Их кипятят в 3%-ном растворе щелочи до полного отделения зародышей от эндосперма, наступающего примерно через 50–60 мин.

После кипячения содержимое колбы фракционируют через набор лабораторных сит с диаметром отверстий 5, 3, 1 мм, с последующей промывкой решет проточной водой. Зародыши пшеницы с током воды проходят через крупные отверстия сит и оседают на решете с диаметром ячеек 1 мм. Более крупные по размеру части эндосперма, оставшиеся на верхних решетах, удаляют.

Отделенные зародыши переносят в небольшую колбу, где кипятят 40 мин в 15%-ном растворе щелочи. Для 1000 зародышей чаще используют колбу объемом 250 $см^3$, для 100 зародышей – 100 $см^3$. Количество раствора щелочи, соответственно, 200 и 50 $см^3$.

Существует другой способ отделения зародышей. Семена погружают в 10%-ный раствор NaOH на 24 ч (на 100 зерен используют 100 мл раствора, на 1000 зерен – 700 мл). В течение суток почти все зародыши отделяются от эндосперма. Их повторно кипятят в том же растворе щелочи 10 мин.

После кипячения щелочь процеживают через мелкоячеистое сито, осевшие зародыши слегка промывают в струе проточной воды и переносят в любой сосуд с горячей водой (50–60°С), где промывают 5–10 мин. Эта операция необходима для тщательной отмывки зародышей от следов щелочи в тканях. Очень часто качество анализа зависит именно от этой операции, поэтому ее следует проводить как можно более тщательно. Отделение и обработку зародышей на этом заканчивают. Практически после указанных операций остается 600–900 или 80–100 зародышей. Потери при обработках не должны превышать 200 – в первом и 20 зародышей – во втором случае.

В случае необходимости, подготовленные зародыши можно сохранять в 45%-ной уксусной кислоте до 3–4 дней. Дольше эмбрионы хранить не рекомендуется, так как мицелий гриба в зародыше окрашивается значительно хуже.

Окрашивание зародышей производят 0,1–0,2%-ным раствором анилинового

синего красителя в 45%-ной уксусной кислоте. Уксусная кислота имеет резкий запах. Ее можно заменить 45–50%-ной молочной кислотой. Качество окрашивания зародышей в этом случае не хуже, чем в уксусной кислоте. В связи с тем, что выпускаемый в продажу краситель бывает разного качества и чистоты, в некоторых случаях процентное содержание его в кислоте уменьшают или увеличивают. Концентрацию красителя лучше всего определить экспериментально на партии семян, зараженных пыльной головней. Химически чистый анилиновый синий можно использовать при окрашивании зародышей. Для этого в раствор необходимо добавить немного (3–5%) поваренной соли. Однако интенсивность прокрашивания гиф возбудителя при этом невысокая. Техника окрашивания состоит в следующем: отмытые зародыши помещают в стеклянный бюкс или колбу, куда наливают небольшое количество раствора анилинового красителя и доводят до кипения. Когда зародыши приобретут хорошо выраженную синюю окраску, кипячение следует прекратить. Обычно оно продолжается не более 10–20 сек. В некоторых случаях (при хорошем качестве красителя) достаточно лишь довести краситель до кипения. Сразу же после кипячения зародыши переносят в стеклянный бюкс с 45%-ной уксусной (лучше молочной) кислотой, и снова кипятят в течение 20–30 сек. Эта операция необходима для удаления из зародышей избытка краски. На этом процесс окрашивания заканчивают. Он длится 2–4 мин. Сразу же после окрашивания зародыши следует анализировать и лишь в крайних случаях можно оставлять окрашенные зародыши в кислоте на 1–2 дня, так как в процессе хранения грибница обесцвечивается.

Просмотр зародышей в микроскопе. На предметное стекло в каплю остуженной 45%-ной уксусной или молочной кислоты, в которой проводилось последнее кипячение, помещают зародыши. Размещать их в капле кислоты лучше всего небольшим скальпелем, один за другим, сверху вниз.

На одно предметное стекла можно поместить 7–10 капель, примерно по 10 зародышей в каждой (по 100 и более на одном предметном стекле). Покровным стеклом накрывать зародыши не следует. Препараты просматривают в микроско-

пе при малом увеличении. Его регулируют так, чтобы в поле зрения микроскопа был полностью виден только один зародыш. Для того чтобы эмбрионы не высыхали, необходимо на стекло периодически добавлять кислоту.

При анализе лучше использовать искусственное освещение. На желтом или слабо-голубом фоне тканей зародыша отчетливо видна темно-синяя грибница возбудителя. Особое внимание при настройке микроскопа следует обратить на положение конденсора прибора. Он должен быть в самом верхнем положении, а диафрагма полностью открыта. Смещение конденсора вниз резко ухудшает качество изображения. Если зародыши плохо просматриваются из-за излишка красителя, их следует повторно прокипятить в чистой 45%-ной уксусной кислоте.

Зародыши необходимо просматривать с лицевой стороны, то есть со стороны зародышевой почки, корешков и колеоптилей (рис. 1.1.10. а–г). Зародыши, оказавшиеся уложенными тыльной стороной вверх (то есть стороной щитка), необходимо осторожно перевернуть скальпелем на лицевую сторону. Эту операцию следует делать лишь в том случае, если в щитке обнаружена грибница возбудителя: отсутствие мицелия гриба в щитке свидетельствует о том, что остальные ткани также свободны от поражения. Грибница головни при малом увеличении микроскопа представляет собой комочки спутанных нитей (в щитке) или вытянутые, сильно извитые гифы (в зародышевой почке и корешках).

Особое внимание уделяют поражению зародышевой почки и щитка: чем больше их заражено, тем выше процент поражения растений в поле. Следует четко различать границы зародышевой почки и эпибласта. Последний представляет собой образование в виде небольшого наплыва чуть ниже зародышевой почки.

Раскладка зародышей на предметные стекла и просмотр их в микроскоп – трудоемкий процесс. Значительно быстрее можно провести заключительную часть анализа с использованием бинокуляра и чашки Петри. С этой целью на обратной стороне чашки восковым карандашом наносят 8–11 параллельных линий. Подготовленные к просмотру окрашенные зародыши слегка взбалтывают в колбе и в два-три приема выливают в подготовленную чашку Петри. Легким потряхива-

нием распределяют зародыши равномерно по всей поверхности. Пинцетом удаляют случайно попавшие в пробу чешуйки и пленки. Пипеткой отсасывают избыток кислоты. Чашку устанавливают на столике бинокуляра. Подбирают увеличение с таким расчетом, чтобы в поле зрения была видна расчерченная полоса. Встречающиеся пораженные зародыши переносят к одному из краев чашки для последующего детального анализа или сразу определяют характер и интенсивность локализации гиф. Подсчитывают отдельные здоровые и пораженные эмбрионы. У последних дифференцируют характер поражения частей зародыша.

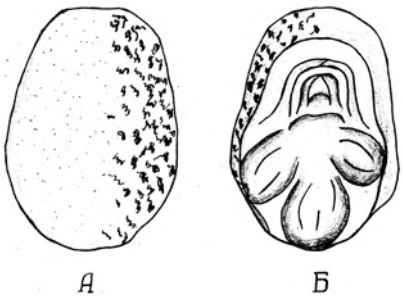


Рис. 1.1.10. а. Структура зародыша пшеницы, не пораженного головней:
А – вид со стороны щитка;
Б – вид со стороны зародышевой почки:
1 – щиток; 2 – колеоптиле;
3 – зародышевая почка;
4 – эпибласт; 5 – корешки.

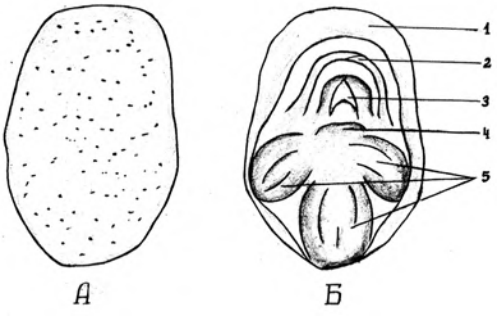


Рис. 1.1.10. б. Зародыш пшеницы, пораженный головней в слабой степени:
А – поражена часть щитка;
Б – поражена часть щитка, все остальные органы свободны от мицелия

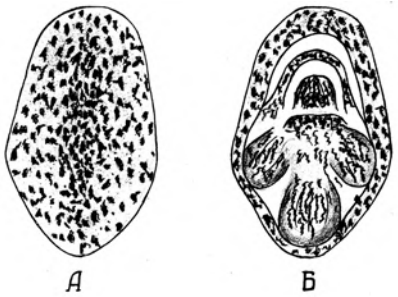


Рис. 1.1.10. в. Зародыш сильно заражен головней:
А – поражен весь щиток;
Б – поражены корешки и эпибласт; колеоптиле и зародышевая почка свободны от мицелия.

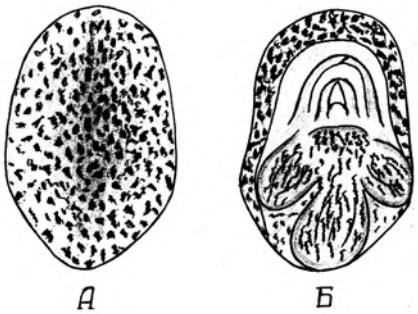


Рис. 1.1.10. г. Весь зародыш пшеницы заражен головней:
А – поражен весь щиток;
Б – поражены все органы зародыша.

Использование в анализе чашек Петри и бинокуляра значительно ускоряет весь процесс лабораторного метода. Если по ранее рекомендованной методике с использованием микроскопа требуется 3,5 ч для раскладки 1000 зародышей, то при использовании чашки Петри эта операция занимает 5–10 мин. Значительно быстрее осуществляется и просмотр зародышей с помощью бинокуляра.

Поражение партии семян определяют по числу инфицированных зародышевых почек и щитков. Слабее поражение только щитка зародыша мицелием возбудителя типично для очень устойчивых к пыльной головне сортов. Как правило, грибница локализована в одном из краев щитка и ее очень мало. Такой тип поражения могут давать и восприимчивые сорта при заражении их не специализированными расами гриба или в случаях, когда инфекционная нагрузка возбудителя при инокуляции завязи очень низкая. В полевых условиях такие семена, как правило, продуцируют свободные от головни колосья (см. рис. 1.1.10. а, б). Часто у некоторых сортов наблюдается сильное поражение щитка, корешков, колеоптиле при полном отсутствии грибницы в зародышевой почке (см. рис. 1.1.10. в). В полевых условиях такие образцы во многих случаях бывают свободны от пыльной головни. Тем не менее, характер поражения обязательно учитывается, так как не исключена возможность проявления заболевания и при таком типе локализации мицелия. Сильное поражение эмбрионов пыльной головней сопровождается интенсивным проникновением гиф в щиток, зародышевую почку и другие части зародыша (см. рис. 1.1.10 г). У восприимчивых сортов пшеницы это наиболее распространенная реакция на инокуляцию возбудителем.

Возможное максимальное поражение посевов головней определяют по количеству семян, у которых поражены не только щитки, но и зародышевые почки.

Расчеты возможного проявления болезни в поле на основании лабораторных анализов несложны. Ниже приводится несколько примеров.

1. Всего анализировано 800 зародышей. Из них пораженных оказалось 23. У всех выделенных эмбрионов поражен щиток и только у 10 зародышей – зародышевая почка. Расчет ведется обычным определением процента поражения:

800 – 100%, 23 – х $x = \frac{23 \cdot 100}{800} = 2{,}8\%$ – поражение по щитку

800 – 100%, 10 – х $x = \frac{10 \cdot 100}{800} = 1{,}2\%$ – по зародышевой почке

Анализ полученных данных: поражение щитков и зародышей было интенсивным (см. рис. 1.1.10. в), грибница в тканях зародышевой почки просматривалась четко. В щитке много мицелия гриба. Следовательно, можно ожидать увеличение поражения растений в поле за счет проникновения грибницы из щитка в конус нарастания, примерно до 3%, но вероятно, что оно будет в пределах 1–2%.

2. Всего анализировано 900 зародышей. Из них инфицированных оказалось 45, с поражением зародышевой почки – 12. Следовательно, поражение по щитку будет составлять 5% , по зародышевой почке – 1,3%.

Анализ полученных данных: поражение щитка у трети зародышей было слабым (см. рис. 1.1.10. а, рис. 1.1.10. б). Большая часть зародышей поражена интенсивно. Следовательно, можно ожидать максимального поражения растений в поле – 5%, но наиболее вероятно, что оно будет в пределах 1,5–2%.

3. Всего анализировано 850 зародышей. Из них пораженных – 63. У всех выделенных эмбрионов поражен щиток, корешки, колеоптиле или эпибласт. Зародышевые почки у всех зародышей не имеют мицелия.

Таким образом, процент поражения партии семян по щитку 7,4, по зародышевой почке – 0.

Анализ полученных данных: примерно около половины всех зародышей поражено по типу устойчивого сорта (см. рис. 1.1.10. а). Следовательно, максимально возможное поражение растений в поле должно составлять 3–4%, наиболее вероятно – 0–1,5%, так как далеко не все инфицированные щитки способны вызывать заболевание.

Более точно предсказать поражение растений в поле трудно, так как развитие грибницы в зерне зависит от многих факторов, особенно климатических. При благоприятных для развития возбудителя погодных условиях поражение будет приближаться к максимальному, при менее благоприятных условиях – к минималь-

ному. Так как точно прогнозировать погодные условия за год вперед нельзя, то и определение точного процента поражения головней трудно осуществимо.

Кроме того, следует отметить, что процент поражения растений во взрослом состоянии зависит также от интенсивности кущения пшеницы, которое не одинаково при различных условиях агротехники, погодных условий и восприимчивости сорта. Очень часто семена с сильно пораженной зародышевой почкой не дают всходов или образуют ослабленные проростки, которые со временем могут погибнуть. Это может привести к резкому снижению процента поражения – самоочищению сорта. В таких случаях данные анализа могут быть выше реального поражения растений в посеве. Подобные ситуации неизбежны и их следует учитывать в повседневной работе. Однако в большинстве случаев прогноз развития заболевания бывает сравнительно точным.

Указанный метод определения зараженности семян пшеницы следует использовать для оценки исходного материала, проверки посевных качеств семян суперэлиты и первых репродукций. Целесообразно анализировать и партии семян, предназначенные для термической обработки.

Методы инокуляции ячменя пыльной головней

Этапы работы с возбудителями головневых болезней ячменя, а также организация проведения опытов, методы учета и классификация исходного материала приводятся в соответствующем разделе, касающемся пыльной головни пшеницы.

Жизненные циклы грибов *Ustilago nuda* и *U. tritici* одинаковы, но четко сочетают родовую специализацию к питающим растениям. Вследствие этого, все разработанные методы массовой оценки коллекционного и гибридного материала пшеницы по устойчивости к пыльной головне пригодны и могут быть применены для оценки устойчивости ячменя,

Методы инокуляции подробно изложены в разделе, посвященном работе с возбудителем пыльной головни пшеницы. Однако следует отметить ряд особенностей при подборе растений ячменя для инокуляции в период цветения.

Наибольшее заражение этой культуры достигается в случае, если для иноку-

ляции используют колосья только в фазе начала цветения (в цветках можно видеть еще зеленые или слегка желтеющие пыльники). У некоторых сортов ячменя начало цветения наступает в период, когда колос полностью или частично находится внутри влагалища, у других – после выхода из влагалища. Поэтому время начала цветения колосьев при инокуляции возбудителем пыльной головни следует определять для каждого сорта в отдельности путем просмотра нескольких цветков.

Чтобы оценить устойчивость ячменя к пыльной головне, достаточно инокулировать 8–10 колосьев многорядного ячменя или 6–12 колосьев двурядного ячменя.

Методы инокуляции ячменя каменной головней

Существует несколько методов инокуляции ячменя возбудителем каменной головни. Наиболее распространено заспорение семян перед посевом хламидоспорами возбудителя (по аналогии с твердой головней пшеницы).

Данный способ малоэффективен, так как обеспечивает лишь слабое заражение даже восприимчивых сортов. Удаление оболочки семян несколько увеличивает зараженнность образцов (до 30–40%), однако и этого недостаточно для объективной оценки коллекции.

Метод Tapke (1935) более эффективен. Семена энергично встряхивают в споровой суспензии (1 г спор на 1 л воды) в течение 30 сек и помещают в герметично закрывающуюся коробку, на дно которой положена влажная фильтровальная бумага. Подготовленные таким образом семена выдерживают в термостате 24 ч при температуре 20°С. После просушки семена можно высевать.

Этот метод модифицирован С. Димитровым. Он предложил использовать более концентрированную суспензию спор возбудителя (2 г спор на 1 л воды) и встряхивать семена в течение минуты. Семена оставляют в суспензии в закрытых колбочках 15 мин, затем суспензию сливают, процеживают через фильтровальную бумагу. Оставшиеся на бумаге семена помещают в термостат на 20 ч при температуре 20°С, сушат и высевают (Димитров, 1968).

Известны и другие методы инокуляции семян ячменя возбудителем каменной головни, в том числе и метод инокуляции с применением частичного вакуума, а

также метод инокуляции Поппа и Черевика, основанный на частичном травмировании семян в суспензии хламидоспор (Popp, Cherevick, 1953). Все эти методы не обеспечивают достаточно высокого процента поражения восприимчивых сортов.

Наиболее производителен, надежен и обеспечивает получение высокую степень поражения ячменя каменной головней (до 80%) метод ВИР, основанный на травмировании семян в воде. Для этого следует иметь некоторые приборы и реактивы – размельчитель тканей РТ-1, набор зерновых лабораторных сит, колбы, пивное сусло, декстрин, агар-агар.

Изучаемые образцы ячменя помещают в бумажные пакеты, по 150 зерен в каждом. Готовят жидкую питательную среду, необходимую для быстрого и массового прорастания хламидоспор. Она содержит 6%-ный раствор технического (заводского) пивного сусла, 0,2% агар-агара и 1% декстрина. В стакан прибора РТ-1 наливают около 800 мл питательной среды и засыпают 0,64 г порошка хламидоспор возбудителя (из расчета 2 г спор на 1 л раствора). Включают прибор (4000 об/мин) на 30 сек для получения стойкой суспензии. В ней проводят инокуляцию семян ячменя. Для этого снова включают размельчитель тканей на 4000 об/мин, быстро высыпают из пакета приготовленные семена, закрывают стакан крышкой и начинают отсчет времени. По истечении 15 сек выключают аппарат и на зерновых ситах отделяют семена от жидкости. Ту же суспензию можно использовать для последующих 6–10 инокуляций. Обработанные семена высыпают обратно в бумажный пакет и оставляют в открытом виде (при комнатной температуре) для просушки. Открытые пакеты устанавливают вертикально в ящики или зерновые коробки и помещают в прохладное (5–12°С) и относительно влажнее место (70–90% относительная влажность воздуха). Для этих целей можно использовать подвальные помещения и современные холодильные установки. Срок хранения семян при таких условиях равен 25–35 дням.

Инокулированные семена высевают, когда температура почвы достигает 12–15°С. Каждый образец сеют в два рядка длиной 1 м, с междурядьями 15 см и глубиной заделки 7–8 см. Через каждый 20 изучаемых образцов размещают воспри-

имчивый контроль, инокулированный таким же образом и тем же возбудителем. В качестве контроля используют наиболее восприимчивые сорта, такие как Hannchen (к-4104), Vantage (к-18504). В случае, когда контроль поражается на 40% и более, данные оценки образцов можно использовать для характеристики степени устойчивости. В случае слабого поражения восприимчивого контрольного сорта оценку следует повторить.

Методы инокуляции ячменя черной (ложной) пыльной головней

Для искусственного заражения семян ячменя ложной пыльной головней рекомендуется несколько методов.

Инокуляция по Tapke (1937) состоит в том, что семена ячменя помещают в небольшие конические колбы, заливают суспензией спор возбудителя (2 г спор на 1 л воды), интенсивно встряхивают в течение 30 сек, после чего оставляют в этой же суспензии еще на 15 мин. Семена переносят в бумажные пакеты и 24 ч содержат в условиях влажной камеры при температуре 18–20°С. Далее следуют подсушка семян в течение 2–3 дней и их посев.

Метод Тодоровой являемся модификацией метода Tapke. Семена встряхивают в суспензии проросших (в течение 24 ч) хламидоспор гриба и выдерживают во влажной камере в течение суток при температуре 20–23°С (Тодорова, 1955).

Метод Понировского (1963) состоит в том, что семена инокулируют в колбе Бунзена в условиях частичного разрежения воздуха. Суспензию готовят из расчета 1 г спор возбудителя на 1 л воды. Колбу с суспензией спор и семенами закрывают пробкой и откачивают из нее воздух до тех пор, пока всплывшие в начале откачивания воздуха семена не осядут снова на дно колбы. Затем в колбу впускают воздух, сливают суспензию, а семена подсушивают. Максимальное заражение восприимчивых сортов при инокуляции таким методом составляет 35%.

Описанный ранее метод ВИР, который предложен для инокуляции ячменя возбудителем каменной головней, пригоден и при работе с черной головней.

Минимальное количество инокулированных семян для оценки сорта – 100. Их высевают в два рядка длиной 1 м с междурядьем 15 см. Через 20 образцов, как

обычно, размещают восприимчивый контроль, инокулированный тем же инокулюмом. Посев проводят в сроки, оптимальные для развития возбудителя (температура почвы около 15°С на глубине заделки семян, равной 6–8 см).

Методы инокуляции овса возбудителями головневых заболеваний

Начальные этапы работы с возбудителями головни овса, а также организация проведения опытов, методы учета и классификация исходного материала описаны в разделе «Твердая головня пшеницы».

Для массовой оценки материала, а также для дифференциации возбудителей головневых заболеваний можно применять простые и высокопроизводительные методы инокуляции. В естественных условиях заражение овса пыльной и твердой головней происходит в очень рано, когда мицелий проникает через эпидермис колеоптиле в проросток. В инфекционном процессе участвуют только те споры и мицелий, которые локализованы между пленками и зерновкой. Вследствие этого при искусственном заражении необходимо добиться получения покоящегося мицелия в условиях, наиболее близких к естественным, то есть локализовать его между зерновкой и кроющей чешуйкой.

Прямое заспорение семян эффективно лишь в случае, если предварительно с зерновок овса удалены чешуи. Именно эта сложность долгое время сдерживала подбор массового и эффективного метода искусственного заражения семян овса.

Метод опудривания семян. Семена опудриваются хламидоспорами головни в соотношении 1 г спор на 100 г семян перед посевом. Метод имеет низкую эффективность, поскольку не достигаются условия, необходимые для успешного заражения – хламидоспоры не попадают между пленкой и зерновкой семени.

Метод Г. Рида (Reed, 1924). При инокуляции сухие споры наносят на семена, с которых предварительно удалены пленки с помощью препаровальной иглы. Инфекционная нагрузка – 1 г хламидоспор на 100 г семян. После инокуляции семена необходимо высеять в ящики на глубину 2,5–3 см и в течение четырех дней после посева выдерживать при температуре 18–22°С в условиях обильного увлажнения. После появления первых двух–трех листьев проростки пересаживают в грунт. Ме-

тод очень эффективен. Поражение восприимчивого сорта достигает 100%. Вместе с тем, метод мало производителен и трудоемок.

Метод Д. Харринга основан на принудительном введении хламидоспор под пленки зерна. Инокуляция производится в колбе Бунзена или вакуумном эксикаторе, наполненном суспензией спор. Для приготовления питательной среды на 100 мл дистиллированной воды необходимо 0,1 г глюкозы, по 0,2 г $(NH_4)_2S0_4$, K_2SO_4, KH_2PO_4 и по 0,1 г $MgS0_4$, NaCl, $CaCl_2$. Раствор должен иметь температуру 18–25°С. Для инокуляции 150 г зерна требуется около 600 мл раствора. Для приготовления суспензии спор на 100 мл раствора добавляют 0,1 г спор. Для заражения в колбу Бунзена или в вакуумный эксикатор наливают суспензию спор, всыпают семена и с помощью вакуумного насоса откачивают воздух (остаточное давление 100–110 мм рт. ст.). В течение 20 мин все зерно всплывает на поверхность. При резком впускании воздуха суспензия спор попадает под пленки, инокулируя семена, которые опускаются на дно. Для образования покоящегося мицелия из спор, находящихся под пленками, зерно помещают на 20 ч во влажную камеру (температура 22–25°С при 100%-ной относительной влажности воздуха). Затем семена необходимо просушить в течение двух суток при комнатной температуре.

Заражение проводят непосредственно перед посевом. Максимальное поражение, которое достигается этим методом – 45%.

Вакуумный метод подробно описан ранее. Производительность инокуляции очень высокая, однако эффективность метода сравнительно невелика. Восприимчивые сорта поражаются до 23–25%.

Метод ВИР заражения овса возбудителями пыльной и твердой головни – самый эффективный (восприимчивые сорта поражаются до 80–100%). Метод описан в разделе, посвященном инокуляции ячменя возбудителем каменной головни.

После инокуляции и хранения при комнатной температуре семена целесообразно высевать в оптимальные для овса сроки, заделывая их на глубину 8–10 см. Через каждые 20 образцов следует высевать инокулированный восприимчивый контроль Льговский 1026 или другие восприимчивые к головне сорта овса.

Методы инокуляции кукурузы и сорго возбудителями головневых болезней

Инокуляция кукурузы возбудителем пузырчатой головни

Для определения устойчивости к пузырчатой головне предложен сравнительно простой способ создания инфекционного фона. Растения опрыскивают 0,005%-ной суспензией спор в наиболее уязвимые фазы: первый раз – до цветения, в период, соответствующий наиболее восприимчивой фазе для данного гибрида или сорта, а второй раз, для заражения початков и пазушных почек, – в фазе полного выхода нитей. Следует стремиться, чтобы при первом опрыскивании жидкость попадала в раструб листьев, а при втором – на початок.

Для выявления физиологической устойчивости к пузырчатой головне лучшие результаты дает заражение початков на 7-й день с начала появления нитей. Заражение проводят при помощи шприца, вводя под обертку початка 2–3 мл водной суспензии спор 0,2%-ной концентрации. При более раннем заражении все гибриды и сорта поражаются очень сильно и различия между ними нивелируются, а при более позднем они поражаются слабо, что также не дает возможности достоверно определять степень устойчивости к болезни. Оценку устойчивости следует проводить в двух повторностях, в каждой из них заражают по 25 початков. Для заражения початков необходимо иметь споры с высокой степенью прорастания.

Инокуляция сорго возбудителем покрытой головни

Для инокуляции семян сорго спорами покрытой головни можно использовать простой метод, предложенный А. И. Борггардтом (1961). Навеску семян и спор птогена в соотношении 100:5 помещают в плотно закрывающийся стеклянный сосуд и интенсивно встряхивают в течение нескольких минут. После этого необходимо подождать некоторое время, чтобы осело облачко спор, и пересыпать семена в посевной пакет. Инокуляцию семян проводят за 5–7 дней до посева.

Инокуляция сорго возбудителем пыльной головни

Инфекционный фон для заражения пыльной головней сорго создают путем

заспоривания почвы. Для этого необходимо приготовить смесь почвы и спор гриба из расчета на 100 г почвы – 5 г спор. Для тщательного перемешивания почвы со спорами используют объемную колбу с притертой пробкой. На один погонный метр расходуется 50 г смеси, 15 г – на одну лунку. Метод очень трудоемкий. Он требует приготовления заранее посевных лунок для семян и зараженной почвы. При этом невозможно регулировать равномерную глубину заделки семян, частично теряется влага, выдувается из лунок заспоренная почва. Трудоемкость опыта снижает возможность проведения большого объема исследований.

В отличие от покрытой головни, возбудители пыльной головни заражают растения не только в довсходовый период, но и через некоторое время после всходов. Для заражения сорго возбудителем пыльной головни можно использовать метод инъекций. Суспензию спор с помощью медицинского шприца вводят в область колеоптиле 3-х недельным проростков сорго. Существует также капельный метод заражения, при котором суспензию спор с помощью пипетки вводят в верхушку раскрывающейся обвертки листьев молодых растений в стадии 2–5 листьев. Недостатки методов – трудоемкость и низкая (25% по сравнению с заспорением почвы – 40%) степень заражения растений.

Споры пыльной головни очень слабо пристают к семенам. Мы использовали в качестве прилипателя 5%-ный раствор крахмала. Семена сорго смачивали в этом растворе, обкатывали в спорах и давали просохнуть. После подсыхания инокулированные семена ссыпали в посевной пакет. Достоинство этого метода в его простоте, а, следовательно, возможности проведения большого объема исследований. Недостатком метода оказалось снижение на 10% степени поражения растений по сравнению с методом заспоривания почвы.

Очевидно, самый эффективный метод создания инфекционного фона пыльной головни сорго – способ заражения почвы. Эффективность этого метода будет выше, если исследования проводить на постоянном участке без применения севооборотов. Таким образом, из года в год растет уровень заспорения почвы, так как жизнеспособность спор пыльной головни сохраняется в почве в течение 4-х лет.

Литература

Борггард А.И. Избранные труды по фитопатологии. М., 1961. С. 207-215

Гешеле Э.Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений. М., 1978. 206 с.

Запрометов Н.Г. Болезни культурных растений в Средней Азии. Ташкент, 1925. 165с.

Каратыгин И.В. Головневые грибы: Онтогонез и филогенез. Л., 1981. 202с.

Кривченко В.И. Прибор для заражения пшеницы и ячменя пыльной головней // Селекция и семеноводство. 1960. № 3. С. 66-67.

Кривченко В. И. Устойчивость зерновых колосовых к возбудителям головневых болезней. М.: Колос, 1984. 304 с.

Понировский В.Н. Методические указания по распознанию возбудителей пыльной головни ячменя *Ustilago nigra* Tapke и *Ustilago nuda* Kell. et. Sw. M., 1963.

Димитров С. Физиологични раси при покритата главня по ечемика – *Ustilago hordei* (Pers.) Jagerh в България. Растен науки, 1968.

Hafiz A. Some studies on long smut of *Sorghum* // Pakistan J. Sci. Res., 1958. V.10. P. 83-87.

Halisky P.M. Physiologic specialization and genetics of the smut fungi, III. // Bot. Rev. 1965. V. 31. № 1. P. 114-150.

Kavanag T. Factors influencing seedling infection of barley by ustilago nuda (Jens.) Rostr. // Ann. Appl. Biol., 1964, v. 54, № 2. P. 225-230

Krüger W. *Sphacelotheca reiliana* on maize. I. Infecton and control studies // South Afr. J. Agr. Sci., 1962. V. 5. № 1. P. 43-56.

Melchers L.E. Sorghum kernel smut infection in relation to seed germination // Trans. Acad. Kansas Sci., 1956. V. 59. № 1–4. P. 320-366.

Moore M.B. Method of inoculating wheat and barley with loose smut // Phytopathology. 1961. V. 26. № 4. P. 397-400.

Popp W. A comparative study of spore germination of *Ustilago tritici* and *U. nuda* // Phytopathology. 1955. V. 45. № 11. P. 585-590.

Popp W., Cherewick W.J. An improved method of inoculating seeds of oats and barley with smut // Phytopathology. 1953. V. 43. № 12. P. 697-699.

Reed G.M. Physiologic races of oat smuts // Amer. J. Bot. 1924. V. 11. № 7. P.483-492.

Rodriguez E., Frederiksen R.A. Genetic studies in a cross between *Sphacelotheca reiliana* and *S. sorghi* // Phytopathology, 1968. V. 58. № 6. P. 730.

Silbernagel M.J. Compatibility between *Tilletia caries* and *T. controversa* // Phytopathology. 1964. V. 54. № 9. P. 1117-1120.

Tapke V.F. An effective and easily applied method of inoculating seed Barley with covered smut // Phytopathology. 1935. V. 25. № 11. P. 1038-1039.

Tapke V.F. A method of inoculating seed barley with black loose smut for use in studies of physiologic races // Phytopathology. 1937. V. 27. № 1. P. 115-116.

Тодорова В. Черна праховита главня *(Ustilago nigra* Tapke) по ечемика. Сборник научни трудове институти при Министерството на земеделието. Т.1. София, 1955.

Vaheeduddin S. The pathogenicity and genetics of some sorghum smuts // Techn. Bull. Minn. Agr. Exp. Sta., 1942. V. 154. № 1. P. 3-46.

Viennot-Bonrgin Y. Origine et nature de la mycocecidie provoqée par le *Sphacelotheca cruenta* // Rev. Mycol. 1978. V. 42. № 3. P. 253-261.

Wilson J.M., Frideriksen R.A. Histopathology of resistance in the *Sorghum bicolor* – *Sphacelotheca reiliana* interaction // Phytopathology. 1970. V. 60. № 9. P. 1365-1367.

В. И. Кривченко, Т. В. Лебедева, Х. О. Пеуша

МУЧНИСТАЯ РОСА ЗЛАКОВ

Мучнистая роса является одной из наиболее распространенных и вредоносных болезней зерновых культур. У пораженных растений изменяется ассимиляционная поверхность листьев, снижается их фотосинтетическая активность, существенно изменяется ход физиологических процессов: возрастает потеря воды (результат усиления транспирации растений и испарения у гриба), резко возрастает дыхание, в связи с чем количество углеводов для перемещения в корни, точки роста и зерновки существенно уменьшается. Вследствие этих причин у пшеницы и ячменя замедляется интенсивность роста стеблей и ослабевает способность к кущению, снижается абсолютных вес семян, уменьшается озерненность колосьев,

Биологические особенности возбудителя мучнистой росы

Возбудитель мучнистой росы злаковых растений относится к классу аскомицетов (Ascomycetes), семейству мучнисторосяных (Erysiphaceae), роду *Erysiphe* Hedroig. Род включает ряд морфологически однотипных форм, различающихся по специализации к растениям-хозяевам.

Факт узкой специализации гриба *Erysiphe graminis* DC. установил Шренк в 1902 г. Споры мучнистой росы с пшеницы не заражали овес, рожь и другие злаки. В том же году Маршал выделил 7 биологических форм мучнистой росы (Marshal, 1902). Последующие исследования подтвердили узкую специализацию биологических форм вида *E. graminis*. Приведем некоторые данные по широте специализации, симптомологии и вредоносности различных форм *E. graminis*.

f. *tritici* Marchal Возбудитель развивается на видах родов *Triticum* L. и *Aegilops* L., а также *Agropyrum intermedium* (Host) P.B. Не исключена возможность заражения растений костра (*Bromus* L.) и овсяницы (*Festuca* L.). Поражает листья, стебель, колос. Сумчатая и конидиальная стадии на пшенице обильные, на *A. intermedium* – скудные. Вредоносность очень высокая. Распространена повсеместно.

f. *hordei* Marchal. Возбудитель поражает растения видов рода *Hordeum* L. Узкоспециализированная форма. Поражает листья, стебель, колос. Сумчатая и конидиальная стадии обильные. Вредоносность очень высокая. Распространен повсеместно.

f. *secalis* Marchal Возбудитель поражает растения видов рода *Secale* L. Узкоспециализированная форма. Спороношение обильное. Вредоносность очень высокая. Распространена повсеместно.

f. *avenae* Marchal Возбудитель развивается на видах рода *Avena* L. Узкоспециализированная форма. Конидиальная стадия обильная, сумчатая – скудная. Вредоносность высокая. Распространена повсеместно.

f. *agropyri* Jacs. Возбудитель поражает различные виды пырея. Сумчатое и конидиальное спороношение обильное. Вредоносность высокая. Распространена повсеместно.

f. *agrostidis* Jacs. Возбудитель развивается на растениях полевицы (*Agrostidis* L.). В цикле развития гриба конидиальная и сумчатая стадии. Заболевание широкого распространения не имеет. Вредоносность не высокая. Круг питающих растений (кроме полевицы) не выяснен.

f. *alopecuri* Jacs. Возбудитель развивается на растениях лисохвоста (*Alopecurum* L.). В цикле развития гриба конидиальная и сумчатая стадии. Заболевание отмечается редко. Вредоносность невысокая. Широта специализации неизвестна.

f. *bromi* Jacs. Возбудитель поражает растения костра (*Bromus* L.). Не исключена возможность идентичности формы с f. *tritici*, хотя считается возбудителем с узкой специализацией. Заболевание отмечается на видах костра только в конидиальной стадии. Вредоносность высокая.

f. *dactyiidis* Jacs. Возбудитель специализирован к еже (*Dactylis* L.). Заболевание встречается повсеместно на дикорастущей и культивируемой еже. В цикле развития гриба конидиальная и сумчатая стадии. Вредоносность высокая.

f. *elymi* Jacs. Возбудитель сильно поражает культивируемый волоснец сибирский. Данные о патогенности формы к другим злаковым культурам отсутствуют. В цикле развития гриба конидиальная и сумчатая стадии. Вредоносность высокая.

f. *festucae* Jacs. Возбудитель широко распространен на всех видах овсяниц. Гриб образует только конидальную стадию. Не исключена возможность идентичности с f. *tritici.* Вредоносность высокая.

f. *lolii* Roum. Возбудитель развивается на райграсе пастбищном (*Lolium* L.) только в конидиальной стадии. Считается, что возбудитель узкоспециализирован к культуре. Вредоносность высокая.

f. *phlei* Jacs. Возбудитель специализирован к культивируемым и дикорастущим видам тимофеевки (*Phleum* L.). Развивается преимущественно в конидиальной стадии. Вредоносность высокая.

f. *poae* Marchal. Возбудитель поражает все виды мятликов (*Poa* L.). Развивается преимущественно в конидиальной стадии. Кроме них поражает растения бескильницы (*Poccinellia distans* (R.) Parl.). Вредоносность высокая.

f. *anthoxanthi* Jacs. Возбудитель поражает душистый колосок (*Anthoxanthum odoratum* L.). Развивается преимущественно в конидиальной стадии. Клейстотеции образуются редко. Болезнь встречается очагами.

f. *deschampsia* Jacs. Возбудитель развивается на луговике (*Deschampsis caespitosa* (L.) P.B. и *D. flexuosa* (L.) Trin.) повсеместно, но только в конидиальной стадии. Широта специализации неизвестна.

f. *cynosuri* Jacs. Считается, что форма специализирована к гребеннику обыкновенному (*Cynosurus crustatus* L.). Развивается в конидиальной стадии. Вредоносна на лугах. Встречается в лесу.

f. *milii* Jacs. Возбудитель поражает бор раскидистый (*Milium affusum* L.). Образует только конидиальную стадию. Вредоносность часто высокая.

f. *triseti* Jacs. Возбудитель специализирован к трещиннику желтоватому (*Trisetum flaveescens* (L.) P.B.). Развивается преимущественно в конидиальной стадии. Вредоносность слабая.

По морфологическим признакам перечисленные формы *E. graminis* практически не различаются между собой. Главным критерием их разделения в самостоятельные таксоны является узкая специализация к родам растений-хозяев.

Биология мучнисто-росяных грибов изучена хорошо и описана в трудах А. А. Ячевского (1917), Н. И. Вавилова (1919), W. Cherewick (1944), М. В. Горленко (1950), J. Moseman (1966), П. Н. Головина (1960) и многих других исследователей.

Формы *E. graminis* являются облигатными паразитами. Их грибница хорошо развита и представляет собой многоклеточный мицелий.

Заболевание проявляется на обеих сторонах листьев (больше на верхней стороне), листовых влагалищах, стеблях, а в годы сильного развития болезни даже на колосковых чешуях. В начальный период развития болезни мицелий имеет вид паутинистого налета. Позже наблюдается образование белых паутинистых колоний грибницы, которая со временем уплотняется до более или менее войлочных, различной величины выпуклых подушечек, часто сливающихся, темнеющих до сероватого, грязно-серого или коричневатого цвета. На грибнице образуются конидии цилиндрической или бочкообразной формы, в цепочках, сидящие на вздутиях у основания конидиеносцев, 16–27 × 7–14 мкм.

Через 3–6 недель после появления конидиального спороношения образуются плодовые тела – клейстотеции 111–279 мкм в диаметре. Они темного цвета, шаровидные, погруженные в войлочные сплетения мицелия. Вокруг плодовых тел образуются короткие гифообразные придатки. В полости клейстотециев содержится от 9 до 30 сумок цилиндрической или эллипсоидальной формы на короткой ножке, 70–100 × 15–40 мкм. В каждой сумке содержится 4–8 элипсоидальных спор 20–23 × 10–13 мкм.

Согласно исследованиям И. Н. Александрова (1973), гриб *E. graminis* может развиваться по одному или нескольким из четырех типов: моноциклическому, дициклическому, полициклическому и ациклическому. Ведущими факторами, обусловливающими различия в цикле развития гриба, являются биологические особенности питающих растений. При моноциклическом типе развитие патогена в

конидиальной стадии длится одну вегетацию. В сумчатую стадию гриб переходит рано, однако созревание аскоспор происходит лишь после перезимовки клейстотециев. Такой тип развития отмечен у форм *tritici*, *hordei*, *avenae*, специализирующихся на пшенице, ячмене и овсе – однолетних яровых культурах.

Дициклический тип свойствен формам, питающимся на однолетних озимых злаках, костре ржаном, ржи и пшенице. Возбудитель зимует в виде мицелия на живом растении. Рано весной конидиальная стадия возобновляется. В конце лета происходит созревание аскоспор и их выбрасывание.

На многолетних злаках специализируются формы *agropyri*, *dactilidis*, *poae*, *festucae*, которые развиваются по полициклическому типу. Функция гриба в конидиальной стадии в этом случае продолжается в течение нескольких вегетационных периодов, то есть. всей вегетационной фазы злаков. Сумчатая стадия обязательна, но кратковременна и в перезимовке патогена и возобновлении инфекции весной существенной роли не играет.

Ациклический тип развития отмечен у форм *phlei*, *cynosuri*, *agrostidis*, *anthoxanthi*, *deschampsiae*, *milii*, *lolii*, питающихся на тимофеевке луговой, гребневике обыновенном, полевице белой, колоске душистом, луговике дернистом, боре развесистом, райграсе пастбищном. Развитие гриба происходит только в конидиальной стадии. Сумчатая стадия отсутствует.

Способность паразита к различным формам зимовки, обеспечивающая ему наилучшую форму выживания во времени и в пространстве, обусловлена высоким полиморфизмом гриба в отношении его приспособленности к экстремальным факторам: конидии могут прорастать в широком диапазоне температур от 0 до 30°С при колебаниях относительной влажности воздуха от 10 до 100%.

Температурный фактор имеет первостепенное значение для жизнедеятельности гриба. Интенсивное прорастание конидий и развитие гриба происходит при температурах, близких к оптимальным для растения-хозяина. Наиболее благоприятной для возбудителя является 15–18°С, максимальная – 28–30°С. Установлена корреляция между температурой и образованием спороносящих подушечек гриба.

При низких положительных температурах подушечки образуются на 10–15 день, при более высоких (18–22°С) – через 3–5 дней.

Существенная роль в развитии возбудителя принадлежит влажности воздуха. Возбудитель мучнистой росы может развиваться при относительной влажности 75 %, однако лучшими условиями являются 96–99%. В интервале 50–70% относительной влажности процент прорастания конидий снижается. Свет стимулирует прорастание конидий. Инфекционный процесс протекает следующим образом: конидии гриба, попадая на листья растений, прорастают ростковыми трубками, которые распространяются на поверхности листа, образуя многочисленные апрессории. Последние полностью растворяют восковой слой листа, облегчая проникновение в клетки листа гаусторий, которые вырастают из апрессория в виде инфекционного колышка с тупым концом. Последний, по-видимому, выделяет фермент, растворяющий стенку эпидермиса, и оказывает механическое давление на него. В результате возникает инфекционная пора и гриб проникает в цитоплазму клеток растения. В конидиальной стадии гриб в течение одного периода вегетации может образовывать до 20 поколений. Конидии интенсивно прорастают в течение первых двух часов. Внедрение ростка споры происходит через 10 ч, а через 16 ч образуются гаустории. Число вторичных инфекционных гиф на поверхности растений равно числу гаусторий, образовавшихся в клетках. Через гаустории возбудитель болезни получает все необходимые ему питательные вещества. У восприимчивых к патогену сортов гаустории и инвазионные клетки растения внешне функционируют нормально. При наличии даже небольших признаков устойчивости происходит отклонения от «нормы» в реакции взаимоотношения, что сопровождается появлением в местах контакта листа и патогена хлорозных и некрозных пятен различной величины и формы. Эти показатели, наряду с интенсивностью развития мицелия и споруляцией, служат критерием для установления степени устойчивости сортов к возбудителю заболевания.

В различных эколого-географических зонах страны в процессе эволюции гриб выработал различные механизмы сохранения жизнеспособности в критиче-

ский для него период, хотя долгое время считалось, что основной зимующей формой является клейстотеций. Этот вывод основывался на работах Salmon (1903), показавшего, что аскоспоры способны прорастать лишь после перезимовки их в клейстотециях. Клейстотеции зимуют с недозрелыми аскоспорами, созревание и выбрасывание которых начинается весной. В это время и появляются первые растения, пораженные мучнистой росой.

В 1912 г. А. А. Ячевский установил другой способ развития и сохранения инфекции мучнистой росы. Он неоднократно наблюдал сильное поражение растений на озимых всходах пшеницы, что дало основание предположить возможность передачи инфекции зимующей грибницей.

Вероятно, в разных эколого-географических зонах эволюция патогена шла разными путями. При отсутствии озимых культур и сравнительно коротком периоде вегетации растений возрастала роль клейстотециев; в зонах преобладания озимых – конидий и мицелия. В некоторых экологических зонах возможны пути сохранения инфекции и конидиями, и клейстотециями. Такая биологическая пластичность гриба дает возможность сохранения мощных долговременных очагов инфекции практически во всех зонах, что и обуславливает его высокую вредоносность на огромной территории.

Дифференциация популяций *E. graminis*

Эффективная борьба со многими болезнями (особенно с теми, инокулюм которых разносится воздушным потоком), может быть практически решена только при анализе природных популяций возбудителей в региональном аспекте и научно обоснованного использования эффективных генов устойчивости на большой территории. Для решения этой задачи необходим генофонд источников иммунитета с известной генетикой и данные о расовом составе патогена в динамике. Именно эти обстоятельства обусловливают интерес исследователей к проблеме расовой дифференциации мучнистой росы.

Физиологические расы – это внутривидовые таксоны возбудителей, различающиеся между собой по вирулентности на сортах соответствующих растений-хозяев. Они образуются в результате сложных процессов: гибридизации, мутации, гетерокариозиса, парасексуального процесса и характеризуются наличием главных генов вирулентности или их комбинаций, обнаруживаемых по реакции сортов-дифференциаторов с различными генами устойчивости. Поэтому в основу расовой дифференциации положен принцип регистрации реакции тестирующих сортов или специальных линий на инокуляцию их клонами патогенов. Для этой цели используют наборы специальных дифференцирующих сортов, содержащих различные по эффективности идентифицированные или еще не установленные гены устойчивости.

Дифференциация рас возбудителей мучнистой росы предусматривает определенные правила выбора и использования в экспериментах инфекционного материала. Споровый инокулюм собирают с районированных, а также с перспективных сортов конкурсного сортоиспытания. Этим преследуют цель – выявить превалирующие в популяции расы. Для обнаружения потенциально опасных рас сбор инокулюма проводят со слабовосприимчивых и практически устойчивых сортов.

Перед инокуляцией сортов-дифференциаторов исследуемая популяция гриба должна быть клонирована на моноизоляты, то есть потомства одной пустулы, конидии или аскоспоры. Объясняется это тем, что естественные популяции возбудителя состоят из множества различных по вирулентности клонов и рас. Только методом клонирования изолятов можно точно расчленить популяцию на составляющие ее расы. Число анализируемых моноизолятов популяии должно быть не меньше 20–30. Чем больше их число, тем точнее и полнее осуществляется дифференциация возбудителя. Используются три вида моноизолятов: пустульные, конидиальные и аскоспоровые.

Монопустульные изоляты. На проростки растений, выросших в условиях изоляции, стряхивают споры с пораженных растений. Распыление конидий регулируют таким образом, чтобы на листья осело очень небольшое их число, для че-

го споры стряхивают не над опытными растениями в боксе, а в стороне. При таком процессе лишь единичные конидии попадают на проростки. Горшочки с инокулированными злаками помещают в условия влажной камеры на 24 ч. Через несколько дней появившиеся пустулы размножают. С этой целью участок листа с отдельной пустулой отрезают и помещают в чашку Петри. Нижний срез листа прикрывают кусочком ваты, смоченной 0,004 %-ным раствором бензимидазола. Под отрезок подкладывают предметное стекло. Чашку Петри помещают под источник света и на четвертые сутки осматривают. Если на нем образовалось несколько пустул, опыт бракуют. В дальнейшую работу поступают отрезки листьев, у которых созревает только одна пустула.

Моноспоровые изоляты. Споры исследуемой популяции слегка стряхивают на чистое сухое предметное стекло, помещают его на предметный столик микроскопа или бинокуляра и устанавливают малое увеличение. Тонкую препаровальную иглу, предварительно смоченную водой, вводят в поле зрения микроскопа, подносят к одной из отдельно лежащих конидий и улавливают ее легким прикосновением кончика иглы, наносят на лист конидию и изолируют растение. Спору следует наносить ближе к основанию листа. На одно растение наносят только одну конидию. Эту операцию проводят до тех пор, пока не будет выделено необходимое число спор. После каждого пассажа иглу обжигают на пламени спиртовки. В течение двух недель растения ежедневно просматривают и по мере появления пустул листья изолируют в чашках Петри. При отсутствии бензимидазола дозревание пустул проводят на растениях в изоляторах.

Выделять моноспоровые изоляты можно и с помощью микроманипулятора. Для этого споры наносят на предметное стекло, покрытое тонким слоем агар-агара. Отдельные споры улавливают с помощью иглы манипулятора.

Моноаскоспоровые изоляты. растения выращивают в горшках до появления второго листа и изолируют стеклом от фонаря «летучая мышь». Сверху изолятор закрывают крышкой от чашки Петри, дно которой выслано увлажненной фильтровальной бумагой. К фильтровальной бумаге прикрепляют кусочек листа рас-

тения с плодовыми телами. Ежедневно фильтровальную бумагу увлажняют. В условиях высокой влажности происходит освобождение аскоспор из сумок и заражение растений. На 17–20 день, при наличии жизнеспособных аскоспор, можно ожидать появления мицелиального налета и подушечек гриба на листьях опытных растений.

Методы наблюдений за перезимовкой гриба и длительностью сохранения конидиальной стадии

Для определения способов перезимовки гриба необходимо установить роль клейстотециев в цикле развития возбудителя мучнистой росы. Технически это определяется сравнительно простым методом. Ежедневно, со дня обнаружения в поле клейстотециев, их анализируют в лаборатории. На предметном стекле легким надавливанием препаровальной иглой на покровное стекло раздавливают плодовое тело и определяют наличие сумок и аскоспор. В незрелых плодовых телах обнаруживается однородная масса без ее дифференциации на сумки. Зрелые клейстотеции при надавливании трескаются и из них выходят сумки со спорами. По числу сформировавшихся плодовых тел определяют период массового созревания, который в разных зонах может быть различным.

В зонах предполагаемой перезимовки гриба клейстотециями пробы для анализа целесообразно отбирать с растительных остатков. Для этой цели после уборки растений оставляют небольшие площадки с пожнивными остатками. На посевах многолетних злаковых трав взятие проб проводят с вегетирующих растений. Начиная с поздней осени и до весны через определенные промежутки времени, проводят микроскопический анализ клейстотециев. Наличие пустых плодовых тел свидетельствует, что плодовые тела в перезимовке гриба заметной роли не играли. В случае преобладания заполненных клейстотециев следует провести определение жизнеспособности сумкоспор. С листьев растений отбирают пробы, переносят в лабораторию и размораживают. Препаровальной иглой или скальпелем переносят подушечки гриба на предметное стекло. Конидии и мицелий распределяют на стекле тонким слоем и помещают в чашку Петри, выстланную увлажнен-

ной фильтровальной бумагой. Просмотр и подсчет проросших конидий проводят через 4–6 ч. Параллельно рекомендуется перезимовавшими конидиями заражать проростки восприимчивых растений. По числу проросших спор и проявлению болезни на инокулированных растениях определяют жизнеспособность конидий.

Жизнеспособность и хранение инфекционного материала

В естественных условиях конидиальная стадия гриба, являющаяся основным источником массовой инфекции, сохраняется в жизнеспособном состоянии сравнительно недолго (от нескольких часов до 2–3 суток). Значительно более продолжительный период выживания возбудителя в клейстотециях. Аскоспоры гриба способны длительный период находиться в плодовых телах, не теряя способности образовывать патогенный мицелий. Поэтому для продолжительной консервации образцов возбудителя сохранение различных гербарных проб с клейстотециями не представляет значительных трудностей. Для этого растительные остатки с плодовыми телами помещают в пергаментные пакеты и хранят при температуре 2–6°С. Образцы в подобных условиях можно хранить до года и более. Важно, чтобы плодовые тела были полностью сформированы.

Зимовка гриба мицелием на живых растениях предопределяет возможность иного способа хранения инокулюма. При помещении больных растений в холодильные камеры с температурой 1–2°С и низкой освещенностью инфекция сохраняет жизнеспособность в течение более 3 месяцев. Этот способ особенно приемлем при хранении рас и клонов возбудителя, для которых многократные пассажи нежелательны.

Популяции в жизнеспособном состоянии можно сохранить путем постоянного перезаражения растений в условиях, исключающих возможность загрязнения инокулюма. Для этого выращенные в изоляции растения злаков инокулируют спорами гриба, закрывают стеклом от фонаря «летучая мышь» и обильно поливают почву в горшочке. Сверху стекло должно быть задрапировано бязью. В первые 24 ч верхнюю часть изолятора закрывают крышкой от чашки Петри для создания

благоприятных условий влажности. После 24-часовой экспозиции вазон с опытными растениями переносят в теплицу или на светоустановку. Непосредственно перед инокуляцией в горшочек подсевают семена того же сорта. По мере созревания на больных растениях конидии опадают на всходы новых растений, заражая их. Таким способом обеспечивают сохранение и размножение патогена в течение двух и более месяцев. Подсев семян в горшочек и удаление старых растений производят в строго изолированных условиях.

При пересылке инокулюма почтой следует учитывать малый срок жизнеспособности гриба, его особенность быстро терять способность к прорастанию. Поэтому скорость пересылки спорового материала и его возобновление в стационарных условиях во многом определяет успех эксперимента. Надежным способом пересылки и перевозки инфекционного материала можно считать следующий. Сорванные листочки с явными признаками поражения помещают в пробирки, а места срезов листьев прижимают ватой, смоченной 0,004%-ным раствором бензимидазола. Пробирку этикетируют с указанием места сбора и названия сорта, помещают в коробку и отправляют адресату.

Полевые методы оценки устойчивости

Известно, что растения злаков наиболее восприимчивы к мучнистой росе в период кущения-колошения. Однако при обычных сроках посева во время кущения запас инфекции в поле невелик и растения почти не поражены. Гриб локализуется на отдельных листьях, спороношение может быть не обильным. Лишь к колошению-цветению инфекция образуется в массе и ее развитие идет интенсивно. Эта биологическая особенность положена в основу создания провокационных фонов, на которых во много раз усиливается споровая нагрузка возбудителей в нужный период. С этой целью в питомниках оценки размещают "сорта-провокаторы" (накопители инфекции), высеваемые на две недели позже исследуемой коллекции (Ригина, 1972). Указанные сорта подбирают из числа наиболее восприимчивых. Высеянные в поздние сроки, они в фазе кущения попадают в

благоприятные условия и сильно заражаются при наличии естественной инфекции, обильно спороносят и служат мощными очагами инфекции для окружающих опытных растений.

Провокационные питомники закладывают следующим образом. Сорта (гибриды) сеют в оптимальные сроки в рядки длиной 1–1,5 м. Через определенные промежутки (5–6 м) оставляют метровые участки. На них через две недели высевают "сорта-провокаторы".

Для создания более жесткого инфекционного фона рекомендуют проводить искусственное заражение сортов-накопителей инфекции, для чего в теплице предварительно размножают инокулюм (расы или популяции). Пораженные листья с обильным спороношением разбрасывают на провоцирующие сорта в вечернее время. При отсутствии размноженных в теплице пораженных растений можно использовать другой способ. На посевах озимых культур, где развитие болезни идет быстрее, собирают листья с обильной споруляцией патогена и раскладывают на сорте-накопителе.

При организации провокационных фонов следует предусмотреть возможность контроля плотности инфекционной нагрузки. Это достигается высевом вместе с изучаемой коллекцией восприимчивых стандартов через 20 коллекционных или гибридных образцов. Подобными стандартами могут служить и сорта-накопители инфекции. Сильное и равномерное их поражение (балл 4) по всей площади питомника свидетельствует о хорошей инфекционной нагрузке возбудителя, слабое или неравномерное их поражение на площади опытного поля – о неудачной закладке питомника и о необходимости повторной оценки образцов.

Размер делянок в питомнике и число опытных растений может быть различным, в зависимости от целей и задач исследователя. Опыт показывает, что для оценки коллекционного образца достаточно высеять 100–120 зерен в 1–2 рядка.

Первую оценку устойчивости проводят в фазе кущения, если заболевание достаточно сильно проявляется уже на ранних этапах развития болезни. Второй учет проводится в фазе колошения, когда начинается массовое развитие болезни. Сле-

дующий учет совпадает с фазой молочной спелости зерна. Для сравнения сортов по динамике развития болезни, что является одним из показателей степени устойчивости сорта, необходимо провести не менее трех учетов.

Оценка устойчивости растений к мучнистой росе в поле основана на учете интенсивности проявления заболевания; при этом особенно важно принимать во внимание распространение гриба по листовым ярусам растений: мучнистая роса распространяется по растению снизу вверх, и листья верхних ярусов устойчивых сортов обычно не поражены. Существенным является также возникновение защитных реакций в ответ на внедрение гриба (некротические пятна). Однако в полевых условиях не всегда возможно отличить их от некрозов, вызванных иными причинами (пятна неинфекционного характера, поражение другими патогенами).

Для оценки устойчивости пшеницы, ячменя и ржи в поле используется следующая шкала, составленная на основе шкал Н. И. Вавилова (1913) и современных, используемых в странах Европы (Смилякович, 1966 и др.).

0 – отсутствие поражения;

1 – очень слабое поражение (единичные мелкие подушечки на листьях и междоузлиях нижнего яруса; подушечки могут быть и более многочисленные, но очень мелкие, в виде слабого налета);

2 – слабое поражение (умеренное количество подушечек на листьях и междоузлиях нижнего яруса);

3 – среднее поражение (подушечки в массе развиваются, главным образом, на нижних листьях и междоузлиях, доходя до верхних ярусов отдельными рассеянными пятнами);

4 – сильное поражение (подушечки в изобилии развиваются на всех листьях и междоузлиях, в том числе и на верхних; поражение может захватить и колос).

На практике возникает потребность введения промежуточных баллов – часто между 0 и 1. В этих случаях можно использовать градации – балл 01, который обозначает исключительно слабое поражение; 1–2 – мелкие подушечки на листьях или междоузлиях нижнего яруса.

Лабораторные методы оценки устойчивости.

Наиболее точный иммунологический анализ коллекционного и гибридного материала осуществляют в теплицах, вегетационных домиках и в лаборатории, где исследования ведут на всходах злаков. Сорта испытываемых культур высевают в горшки (для изучения небольшого числа образцов) или ящики (при массовых анализах). Количество растений одного образца должно быть не менее 10. Там же высевают семена восприимчивых стандартов. Искусственно заражать проростки следует в начале появления у них второго листа.

Заражение осуществляют стряхиванием конидий с больных листьев. Использование суспензий или смеси конидий с тальком также эффективно. Для заспорения 250–300 проростков в ящике используют больные растения из одного горшочка. При этом необходимо стремиться к равномерному стряхиванию конидий над всей площадью посева.

Устойчивость оценивают по шкале качественной реакции. Показатели устойчивости сортов – интенсивность и характер спороношения, качественные реакции тканей растений в ответ на внедрение патогена (некрозы и хлорозы). Оценку проводят по первому листу проростков на 7–10 сутки после инокуляции.

Устойчивость пшеницы и ячменя к патогену в фазе проростков оценивают по шкале, представляющей собой модификацию шкалы Майнса и Дитца (1930):

0 – иммунный или высокоустойчивый, нет видимого мицелия;

1 – высокоустойчивый, слабое развитие мицелия;

2 – умеренно устойчивый, умеренное развитие мицелия, слабая споруляция;

3 – умеренно восприимчивый, умеренное развитие мицелия и умеренная споруляция;

4 – высоко восприимчивый, обильное развитие мицелия и обильная споруляция.

В дополнение к балловой оценке для учета величины и интенсивности хлорозов и некрозов вводятся следующие буквенные обозначения (по Гонеккеру, 1937): C – сильные хлорозы, c – ограниченные хлорозы, N – большие некрозы, n – огра-

ниченные некрозы, nn – многочисленные точечные локальные некрозы. Каждое растение оценивают индивидуально, а затеи выставляют общую оценку поражения данного образца. Для этого ставят преобладающий балл (или баллы) поражения, а в скобках указывают отклонения, наблюдаемые у отдельных растений: например, 3 (0, 1, 2) или 1, 2 (4).

Более удобным и производительным является лабораторый метод с использованием светоустановок и реактива бензимидазола. Одно из важнейших свойств этого вещества – сохранять жизнеспособность изолированных листьев в течение 2–3-х недель без изменения иммунологических свойств растений.

Растения испытываемых сортов выращивают в горшках и кюветах на светоустановках. В начале развития второго листа обрезают сформировавшиеся первые листья и раскладывают в чашки Петри. Места срезов прикрывают смоченной в растворе бензимидазола ватой. Под листья подкладывают чистые предметные стекла. В одной чашке можно разместить 3 сорта по 5 листочков. Концентрация рабочего раствора бензимидазола 0,004%, то есть 40 мг препарата на 1 л воды.

Производительность метода значительно возрастает при использовании кювет. Отрезки листьев испытываемых сортов (по 6–8 отрезков) укладывают на дно кюветы, выстланной ватой, обильно смоченной рабочим раствором бензимидазола. В каждом опыте рекомендуется использовать одну и ту же часть листа. Инокуляцию отрезков листьев выполняют методом стряхивания спор. Чашки Петри закрывают крышкой, а кюветы – стеклом и на 24 ч помещают в темное место, после чего переносят на стеллажи светоустановок.

Учет реакции устойчивости проводят на 8–9 день после инокуляции. Добавлять раствор бензимидазола в чашки или кюветы рекомендуется один раз в 3–4 дня после инокуляции до появления подушечек гриба.

Исследованиями многих авторов установлено, что оптимальными условиями для определения устойчивости растений является 18–21°С и относительная влажность воздухе в диапазоне 75–99% при 14–16-часовом дне. Реакция устойчивости растений существенно меняется при высоких температурах. Поэтому превышение

критического показателя (23–24°С) может исказить результаты. При температурах выше 25°С эксперименты проводить не рекомендуется. Минимально допустимой является температура 15–16°С (примерно такие же показатели следует соблюдать при работах в теплицах и вегетационных домиках). Освещение также существенно влияет на инкубационный период возбудителя и, соответственно, точность опытов (оптимальной освещенностью является 4500 лк).

При изучении количественных и качественных показателей защитных реакций растений используют методы инокуляции, которые давали бы возможность стандартизации условий заражения, определения концентрации инокулюма, равномерность распределения спор на поверхности листа и воспроизводимость результатов. Опытные растения выращивают в сосудах под колпаками из целлофана в условиях фитотрона. Для оценки каждого образца необходимо не менее 45 растений. 10-дневные проростки разрезают на сегменты 2–2,5 см и укладывают в чашки Петри на раствор агара (6 г/л) с бензимидазолом (35 мг/л). Каждое растения разрезают на 4 сегмента и укладывают на строго определенное для него место для того, чтобы отрезки каждого растения попали под разные изоляты. Подготовленные чашки с тестируемыми образцами и контролями восприимчивого сорта ставят под большой колпак из плексигласа (башни осаждения). Сверху на колпаке имеются отверстия, куда помещают листья, зараженные тест-изолятом. Для сдувания спор мучнистой росы используют воздушный насос. Поток воздуха сдувает споры с листьев и они через отверстия в кубе попадают на чашки с опытными образцами. При заражении под куб одновременно с опытными чашками ставят предметное стекло, потом достают стекло и проверяют плотность инфекционной нагрузки. Плотность инфекционной нагрузки считается достаточной, если в поле зрения микроскопа при 10-кратном увеличении насчитывается не менее 20 конидий. Все работы по оценке устойчивости проводят в ламинар-боксе: разлив агар-агара в чашки Петри, резку растений и, конечно, инокуляцию. При работе для стерилизации инструментов, поверхностей столов и приборов и рук используется 70%-ный этанол.

После заражения чашки Петри помещают в контролируемые условия. На десятый день после заражения оценивают ответные реакции растений по 9-бальной шкале. Такой метод оценки использовали J. Torp et al. (1978) при анализе устойчивости более 130 сортов ячменя в фазе проростков к изолятам мучнисторосяного гриба (табл. 1.1.9.). При необходимости учитывают дополнительные характеристики: n – маленькие некротические пятна, N – большие некротические пятна, c – небольшие хлорозы, C – большие хлорозы.

Таблица 1.1.9. Характеристика проявления возбудителя мучнистой росы на проростках злаков

Инфекционные типы	Рост мицелия	Споруляция	Развитие хлорозов/ некрозов
0	нет	нет	-
0–1	нет	нет	+
1	слабый	нет	+
1–2	слабый	слабая	+
2	средний	слабая	+
2–3	средний	средняя	+
3	сильный	средняя	+
3–4	сильный	сильняя	+
4	сильная	сильная	-

В отличие от лабораторных опытов, в полевых экспериментах существуют многочисленные факторы, трудно поддающиеся стандартизации и учету (климатические и почвенные условия, наличие – отсутствие эпифитотии, выравненность растений по фазам развития и т.д.). В связи с этим, существуют разные подходы к оценке реакции растений на заражение грибом.

Уровень инфекции определяют как процент поверхности листьев, покрытых мучнистой росой (Masterbroek et al., 1988). Взрослые растения оценивают еженедельно, от колошения до созревания путем подсчета числа пустул мучнистой росы на верхних 5-ти листьях главного стебля у 10 случайно выбранных растений на делянке (Kølster et al., 1989).

E. E. Saari, J.M. Prescott (1975) для оценки интенсивности развития заболевания у злаков предложили следующую шкалу:

0 – растение без симптомов поражения;

0E – растение без симптомов поражения, вероятно, вследствие ухода от патогенна;

1 – очень устойчивое растение: несколько отдельных пустул и только на самых нижних листьях;

2 – умеренно устойчивое: незначительное поражение нижней 1/3 растения, самые нижние листья поражены умеренно;

3 – умеренно инфицированное: умеренное до сильного поражение нижнего яруса и незначительное поражение листьев среднего яруса;

4 – промежуточное: сильное поражение нижних листьев, умеренное поражение верхнего яруса, верхние листья свободны от инфекции;

5 – промежуточное: сильное поражение нижней трети растения, умеренное на серединных листьях и рассеянные пустулы гриба выше середины растения;

6 – умеренно восприимчивое: крупные пустулы гриба на нижних и серединных листьях с распространением болезни на листья ниже флагового листа или со следами поражения флагового листа;

7 – восприимчивое: сильное поражение нижних и серединных листьев, сильная инфекция на верхней трети растения, поражен флаговый лист;

8 – очень восприимчивое: сильное поражение всего растения, включая колос.

N – невозможность учета из-за некроза, других болезней или факторов.

Растения, пораженность которых не превышает 3-х баллов – устойчивые, 4 – умеренно устойчивые, 5–6 – умеренно восприимчивые, 7–10 – восприимчивые.

Предложена также 9-бальная шкала оценки устойчивости взрослых растений к мучнистой росе, в которой оценки 9–6 баллов характеризуют устойчивость растений, а 1–4 – восприимчивость (Методы…, 1988).

Большинство авторов при описании устойчивости злаков к мучнистой росе используют шкалу, предложенную Н.И. Вавиловым (1913), или модификации шкалы Майнса и Дитца (1930), по которой растения с баллами 0 и 1 относят к классу устойчивых, 2 – умеренно устойчивых, 3 и 4 – восприимчивых.

Литература

Александров И.Н. Различия в цикле развития *Erysiphe graminis* DC. //Микология и фитопатология. 1973. Т. 7. Вып. 3. С. 167-171.

Вавилов Н.И. Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям. М.: Наука. 1986. 520 с.

Головин П.Н. Мучнисторосяные грибы, паразитирующие на культурных и полезных диких растениях. М.-Л.: Изд-во АН СССР.1960.

Горленко М.И. Болезни пшеницы. М.: Сельхозгиз. 1951. С. 182-196.

Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. Координационный центр СЭВ. Прага. 1988. 321 с.

Ригина С.И. Методические указания по оценке устойчивости пшеницы и ячменя к мучнистой росе. Л.: ВИР. 1972.

Ячевский А.А. О значении селекции в деле борьбы с грибными заболеваниями культурных растений // Труды Бюро по микологии и фитопатологии Ученого комитета. 1911. Т. 8. Вып. 30.

Cherewick W.I. Studies on the biology of *Erysiphe graminis* DC. // Canad. J. Res. 1944. V. 22. № 1. P. 52-86.

Honecker L. Die Bestimmung der physiologischen Rassen des Gerstenmehltaues (*Erysiphe graminis* f. *hordei* Marchal.) // Phytopathol. Z. 1937. B. 10. № 1.

Kølster P., Munk L., Stølen O. Disease severity and yield in barley multilines with resistance to powdery mildew // Crop. Sci.1989. V. 29. №. 6. P. 1459-1463.

Mains E.B., Dietz S.M. Physiologic of barley mildew *Erysiphe graminis hordei* Marchal // Phytopathology. 1930. V. 20. P. 229-239.

Marchal M. Deela specialization du parasitism chez I *Erysiphe graminis* // Compt. rend. I Acad, de Sci. 1902. V. 135. P. 210-212.

Mastebrock H.D., van den Bos J., Balkema-Bomstra A.G. Infection by powdery mildew, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, in small hill-plots of spring barley varieties at different levels of allo-infection // Cereal Res. Comm. 1988. V. 16. № 3/4. P. 223-229.

Moseman J.G. Genetics of powdery mildews // Ann. Rev. Phytopathol. 1966. V. 4. P. 269-290.

Saari E.E., Prescott J.M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease.// Plant disease reporter. 1975. V. 59. № 5. P. 377-380.

Salmon E.S. On *Erysiphe graminis* DC. and its adaptive parasitism within the genus *Bromus* // Am. Mycology. 1904. V. 8. P. 255-267.

Torp J., Jensen H. P, Helms J.J. Powdery mildew resistance genes in 106 northwest European spring barley varieties // Kgl.. Vet.-og Landbohøjsk. Ärsskr. 1978. P. 75-102.

Zeller F.J., Lutz J., Stephan U. Chromosome location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L.) 1. *Mlk* and other alleles at the *Pm3* locus // Euphytica. 1993. V. 68. P. 223-229.

1.2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К БОЛЕЗНЯМ, ВЫЗЫВАЕМЫМ ГЕМИБИОТРОФНЫМИ ГРИБАМИ

Г.С. Коновалова, Л.Г. Тырышкин

1.2.1. МЕТОДЫ РАБОТЫ С ЧИСТЫМИ КУЛЬТУРАМИ ГРИБОВ

Оценка пораженности сельскохозяйственных растений болезнями на естественных инфекционных фонах абсолютно необходима, но в большинстве случаев является только предварительным этапом идентификации ценных для селекции образцов. Это связано с тем, что:

- многие болезни проявляются в форме эпифитотий только в отдельные годы;
- в конкретном районе естественные популяции могут представлять лишь небольшую часть генотипической изменчивости фитопатогена;
- небольшая площадь посева изучаемого образца предотвращает возможность автоинфекции наиболее приспособленными к нему изолятов патогена.

В связи с этим очень важна оценка устойчивости на искусственных инфекционных фонах в лабораторных и полевых экспериментах, для чего необходимо выделить изоляты грибов и размножить их в количествах, достаточных для инокуляции большого числа образцов.

Основными этапами этой работы являются сбор зараженного материала в полевых условиях, выделение отдельных изолятов в чистую культуру, в случае необходимости клонирование изолятов, наработка инфекционного материала. Работы такого рода проводятся в асептических (стерильных) условиях. Для этого необходимо оборудование для стерилизации питательных сред и пересева культур.

Стерилизацию большинства твердых питательных сред для роста грибов проводят в автоклавах; типичный режим автоклавирования – 0.8 атм, 30 минут. Для стерильного пересева культур используют ламинар-бокс (рис. 1.2.1.1.). До начала эксперимента рабочую поверхность ламинара протирают спиртом, прово-

дят прожиг УВ-лучами в течение 30–60 мин (практически все современные модели оборудованы встроенными бактерицидными лампами).

Рис. 1.2.1.1. Ламинар-бокс для стерильной работы с культурами грибов

Для работы с чистыми культурами требуется микробиологическое оборудование: микроскоп, чашки Петри, пробирки, пипетки, шпатели, микробиологическая игла, счетная камера Горяева, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага. Для приготовления сред используют дистиллированную воду.

Посуду стерилизуют в термошкафах при температуре 150 – 200°С в течение 3–4 ч. Возможно также автоклавирование посуды в режиме 2 атм в течение 1ч.

Базовые питательные среды для роста фитопатогенных грибов

Ниже приведен состав наиболее часто используемых питательных сред для выделения и наработки инокулюма фитопатогенных грибов.

Картофельно-глюкозный агар (КГА)

Картофель (отвар) …….……200 г
Глюкоза……..20 г
Агар…….20 г
Дистиллированная вода…….. до 1000 мл

Картофель измельчают и кипятят в воде в течение 40 мин, после чего отвар сливают через марлю. Среду автоклавируют в течение 20 мин при 1 атм.

Среда Чапека

K_2HPO_4.....1,0 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$.....0,5 г
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$.....0,01 г
KCl……..0,5 г
$NaNO_3$..……...3,0 г
Сахароза……30 г
Агар……15,0 г
Дистиллированная вода……..1000 мл

Стерилизуют при давлении 0,5 атм в течение 20 мин. В качестве источника углерода вместо сахарозы можно добавить глюкозу.

Модифицированная среда Чапека (ЧЛМ)

KH_2PO_4.....0,5 г
$MgSO_4$.....0,5 г
KCl……..0,5 г
Мочевина……..1,2 г
Лактоза……...20 г
Агар……20 г
Дистиллированная вода……..1000 мл

Минимальная синтетическая среда (М)

KH_2O_4.....2 г
$MgSO_4$.....1 г
$(NH_4)_2\ SO_4$……1 г
Глюкоза……20 г
Агар……20 г
Дистиллированная вода……..1000 мл

Полная синтетическая среда (П)

KH_2O_4..... .....2 г
$MgSO_4$..... .....1 г
$(NH_4)_2\ SO_4$…… …….1 г
Глюкоза…… ….20 г
Дрожжевой экстрат…… ….. 1 г
Пептон……10 г
Агар……20 г
Дистиллированная вода……..1000 мл

Для каждого вида, а иногда и изолята потогена необходим подбор экспериментальным путем наиболее подходящей питательной среды для получения большего количества высокоагрессивного инокулюма.

При приготовлении сред твердые компоненты (за исключением агара) взвешивают и вносят в дистиллированную воду, мерно разливают в колбы, добавляют агар, закрывают ватными пробками или металлической фольгой и стерилизуют в автоклаве. Остуженную до 40–70°С стерильную среду разливают в чашки Петри (20–40 мл) в ламинаре. Возможно хранение сред в колбах в холодильнике либо в стерильном лабораторном шкафу. При необходимости среду расплавляют, помещая в кипящую воду, остужают и разливают. Перед разливом среды горлышко колбы прожигают в пламени горелки. Чтобы избежать загрязнения, чашки лучше использовать сразу или на следующий день. Для получения скошенного агара расплавленную среду разливают по 5–7 мл в стерильные пробирки, которые закрывают ватными пробками и дают остыть в наклонном состоянии.

Сбор, выделение изолятов фитопатогенных грибов и размножение инфекционного материала

Для выделения изолятов грибов в поле собирают пораженные органы растений – хозяев (листья, корни, колосья, стебли), части растений высушивают и хранят в бумажных пакетах в холодильнике. Сборы проводят в сухую погоду с нескольких сортов, желательно в разных регионах. В зависимости от вида фитопатогена выделение в чистую культуру проводят либо непосредственно после сбора, либо по мере необходимости (но обычно не позднее 6 месяцев после сбора).

Для выделения грибов пораженные части растений в ламинаре стерилизуют с использованием химических реагентов. Отрезки частей растений с симптомами поражения промывают в стерильной дистиллированной воде и помещают в раствор стерилизующего вещества на 30–120 сек. В этом качестве используют: этиловый спирт (70%), растворы медного купороса (3–5%), гипохлорида кальция (0.5 –1%), марганцевокислого калия (0.1– 0.3%). Затем растительный материал три-

жды промывают в стерильной воде, подсушивают между слоями стерильной фильтровальной бумаги и помещают на питательную среду в чашки Петри. Для каждой болезни и сбора необходимо экспериментальное определение оптимального типа стерилизующего вещества, его концентрации и времени обработки, при которых наблюдается максимальное ингибирование сопутствующей микрофлоры, но не происходит ингибирования роста выделяемого патогена. Чашки переносят в термостат либо на светоустановку с температурой, оптимальной для развития гриба. После появления мицелия на или вокруг растительной ткани его переносят на свежую питательную среду с помощью стерильной микробиологической петли либо иглы.

Полученная таким образом культура является одним изолятом. В ряде случаев необходимо получение клонов и штаммов фитопатогенных грибов. Клон – это генетически однородная культура, полученная в результате размножения клетки или споры гриба. Штамм – клоновая по происхождению культура, отселектированная по отдельным признакам. Для выделения клонов суспензию одиночных спор высевают на чашки Петри с плотной питательной средой. При этом споры с плотной питательной среды смывают стерильной дистиллированной водой или соскабливают микробиологической иглой и переносят в воду. Полученную суспензию фильтруют через 1–2 слойный марлевый фильтр для отделения спор от мицелия. Концентрацию спор определяют, подсчитывая их количество в камере Горяева для грибов с малым размером спор (например, *Rhynchosporim secalis*, грибы рода *Fusarium*). Подсчитывают количество спор в 5-ти больших квадратах, делят эту сумму на 20 и получают число, равное количеству миллионов спор в 1 мл. Если изучаемый гриб имеет крупные споры (например, *Bipolaris sorokiniana, Drechslera teres*) 5 мкл суспензии с помощью микропипетки наносят на предметное стекло и подсчитывают споры; концентрация (спор/мл) равна произведению этого числа на 200.

Исходную суспензию разводят стерильной водой до концентрации 1000–2000 спор/мл. С помощью микропипетки со стерильным носиком 50мкл суспензии

наносят на поверхность агаровой среды и тщательно растирают стеклянным шпателем. Через несколько дней на чашках вырастают отдельные, не сливающиеся колонии клонов..

Для грибов, интенсивно разрастающихся на питательных средах, в них добавляют ограничивающие рост вещества, например, медицинскую желчь (20 мл/л) либо Triton X-100 (0,1 – 0,3 мл/л среды).

Выделенные изоляты или клоны пересевают на свежие питательные среды в чашки Петри с помощью микробиологической иглы либо шпателя. После появления обильного спороношения чашки сохраняют в холодильнике. В зависимости от вида гриба для инокуляции используют споры, сохраняющиеся в холодильнике, либо производят пересев изолятов за 2–3 недели до заражения для того, чтобы иметь свежий инокулюм.

Для экспериментов по оценке устойчивости растений нарабатывают все изоляты, которые смешивают в примерно равных количествах, или предварительно оценивают агрессивность и вирулентность каждого изолята и нарабатывают только наиболее агрессивные. Для некоторых патогенов разработаны специфические методы наработки инокулюма, которые описаны в соответствующих разделах.

1.2.2. ЛИСТОВЫЕ ПЯТНИСТОСТИ

Л.Г. Тырышкин

ТЕМНО-БУРАЯ ЛИСТОВАЯ ПЯТНИСТОСТЬ

Биологические особенности возбудителя болезни

Темно-бурую листовую пятнистость вызывает *Bipolaris sorokiniana* (Sacc in Sorok) Shoem (синонимы *Helmintosporium sorokinianum* (Sacc.) Shoemaker, *Helminthosporium sativum* Pamell, King et Bakke., *Helminthosporium californicum* Mackie et Paxton, *Drechslera sorokiniana* Subramanian et Jain) (телеоморфа *Cochliobolus sativus* (Ito et Curib.) – несовершенный гриб (в половой стадии – аскомицет) с широким ареалом обитания (Hetzler, 1992; Хасанов, 1992). Он является гемибиотрофом, то есть помимо развития на живых органах растений способен к сапрофитному обитанию в почве и на растительных остатках (Reis, 1983).

При росте на искусственных питательных средах образует быстро или медленно растущие колонии, гладкие, бархатистые, серые до почти черных. Конидиеносцы одиночные или в небольших группах, простые, 20-200 × 10 мкм. Конидии изменчивые, вначале прямые, обратно-яйцевидные, элипсоидальные; зрелые обычно изогнутые, веретоновидные, темно-оливково-коричневые, 20-5 – 100-135 × 14-17 – 26-34 мкм с 1–12 дистосептами. В природных условиях на листьях пораженных злаков конидии узкоцилиндрические, субцилиндрические с суженными и закругленными краями (Хасанов, 1992).

Круг хозяев гриба необычайно широк; он поражает листья, листовые влагалища, колосья, семена, стебли, корни и прикорневые органы представителей 52 родов семейства злаковых, а также 15 родов незлаковых растений (Misra, 1973, Хасанов, 1992). Из культурных видов растений патоген вредоносен, в первую очередь, на ячмене и пшенице, у которых вызывает темно-бурую пятнистость листьев и стеблей, обыкновенную гниль корней и прикорневых органов, «черный зародыш» семян (Conner, 1990; Хасанов, 1992).

Источником первичной инфекции могут быть семена, растительные остатки

и почва. В зависимости от температуры и влажности почвы на растительных остатках возбудитель остается жизнеспособным в течение 5–7 лет (Иодко, 1975)..

Из почвы гриб попадает на нижние листья растений, на которых во влажную погоду образуется обильный налет конидиального спороношения. Инкубационный период составляет 3-6 суток, и при благоприятных условиях и 100%-ной влажности болезнь быстро распространяется на листьях. Максимальный лет спор и пик развития темно-бурой листовой пятнистости приходится на период молочно-восковой и восковой спелости (Yadov, 1981). Образование полового спороношения в природных условиях отмечено лишь однажды (Raemaekers, 1991), в лаборатории при скрещивании штаммов разного типа спаривания получено сумчатое спороношение гриба (Tinline, Dickson, 1958; Farr et al, 1989).

Болезнь вначале проявляется в виде округлых и овальных темно-бурых пятен 1–5 × 1–3 мм, окруженных зеленой листовой тканью либо хлорозами, позже неправильными со светло-коричневым или сероватым центром и темно-бурыми краями; на восприимчивых сортах в годы эпифитотий пятна сливаются и листья погибают. Для развития пятнистости необходимы длительный период влажности и повышенная температура. При эпифитотии растения угнетены в росте, листья отмирают; семена мелкие, корневая система слабо развита. Глазковые пятна и язвочки наблюдаются также на листовых влагалищах и стеблях (Хасанов, 1992).

Темно-бурая листовая пятнистость – главное или одно из основных заболеваний пшеницы в странах с теплым и влажным климатом (Бангладеш, Боливия, Бразилия, Вьетнам, Индия, Мексика, Парагвай, Филиппины), где она нередко наблюдаются эпифитотии, приводящие к снижению урожая зерна от 30 до 100% (Villareal et al., 1985; Hetzler, 1992; Хасанов, 1992). При благоприятных для паразита условиях химический метод борьбы неэффективен (Kohli, 1985). В странах и регионах с более умеренным климатом (Дания, Шотландия, европейская часть России, некоторые штаты США) наибольшее развитие болезни наблюдается в аномально теплые годы (среднесуточная температура 25–30°С). В России листовая пятнистость является одним из главных заболеваний пшеницы на Дальнем Восто-

ке и Восточной Сибири, где потери урожая могут превышать ущерб от всех других болезней, вместе взятых (Ермолаева, 1991).

На ячмене болезнь встречается во всех зонах возделывания культуры; эпифитотии наблюдаются при повышенной температуре и влажности. Темно-бурую листовую пятнистость в посевах ячменя обнаруживают при появлении первых трех листьев. Первоначально единичные пятна и некрозы появляются на листьях нижнего ряда, позднее все ярусы, в том числе ости, покрываются пятнистостью. На листьях болезнь проявляется в виде круглых или продолговатых коричневых некрозов с хлоротическим окаймлением, или без него. Характерной особенностью пятнистости является наличие темного, почти черного участка в центре полоски.

Выделение изолятов *B. sorokiniana*

Отрезки пораженных листьев, корней или семена стерилизуют, промывают стерильной водой и помещают в чашки Петри на питательные среды. Наиболее часто используют среду ЧЛМ и среду на основе сока V-8 (сок V-8 – 90 мл/л, $CaCO_3$ – 1,25 г/л, агар-агар – 20 г/л). Чашки инкубируют при температуре 22–25°С в темноте; обильное спороношение гриба обычно наблюдается через 10–14 суток (рис. 1.2.2.1.).

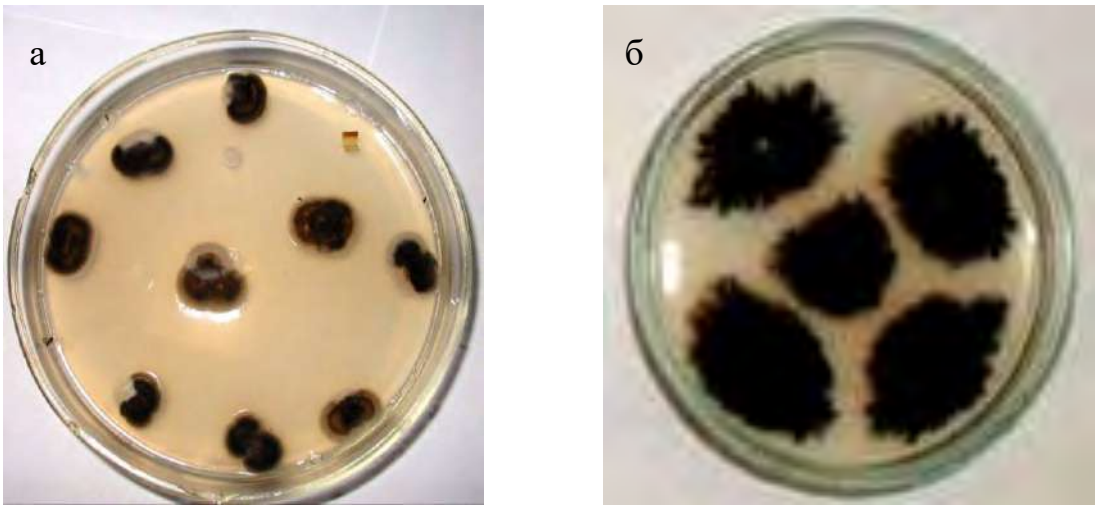


Рис. 1.2.2.1. Рост колоний *B. sorokiniana* на искусственных питательных средах: а – селективная среда; б – среда ЧЛМ.

Для выделения изолятов возможно использование полуселективной среды следующего состава: ЧЛМ с добавками на 1 литр – стрептомицин (200мг/л), хлорамфеникол 50 (мг/л), тетрациклин (50 мг/л), фундазол (20 мг/л), байтан (50 мг/л), топсин М (20 мг/л) и тритон Х100 (10 мл). При этом отсутствует необходимость стерилизации тканей и возможно использование питательной среды без автоклавирования. Через 14 дней после помещения частей растений на среду образуются компактные колонии, часто с обильным спороношением (рис. 1.2.2.1.).

При выделении изолятов из листьев возможно применение следующего метода. Отдельные пятна поражения вырезают из собранных в поле листьев, подсушивают и помещают на смоченную 1%-ным водным раствором лактозы фильтровальную бумагу. Через 2–3 дня наблюдается обильное спороношение патогена; с помощью препаравальной иглы споры переносят на питательую среду.

Наработка инокулюма *B. sorokiniana*

Наиболее часто инокулюм нарабатывают, выращивая гриб в чашках Петри на питательных средах. Для повышения споруляции через 3–4 дня после посева гриба чашки помещают под лампы с близким к ультрафиолетовому излучением. После появления обильного спороношения чашки хранят в холодильнике при 5°С. Для приготовления инокулюма конидии снимают с поверхности агара скальпелем либо смывают водой, суспензию фильтруют через двойной слой марли; концентрацию определяют, подсчитывая споры в капле объемом 5 мкл под микроскопом

Возможна наработка инокулюма на зернах ячменя или пшеницы. При этом в колбы объемом 0,5 л засыпают 100 г семян, автоклавируют 2 раза в режиме 1 атм, 1 ч. Стерильную суспензию конидий (20–30 тыс/мл, 50 мл) заливают в колбы, тщательно встряхивают и помещают в термостат. Раз в 2 дня колбы встряхивают для предотвращения образования мицелия. После образования спор на поверхности зерен, их высыпают на бумагу, подсушивают и хранят в холодильнике.

Нами разработан следующий метод наработки конидий *B. sorokiniana*. В кювету на слой смоченной водой фильтровальной бумаги раскладывают отрезки ли-

стьев восприимчивого сорта (стадия 1–2 листа), которые инокулируют из пульверизатора суспензией конидий необходимого изолята гриба (концентрация 30 тыс./мл). Кювету заворачивают в полиэтилен, помещают в темноту на 24 ч, затем на светоустановку при постоянном освещении (2500 лк) и температуре 22–25°С. Через 2–3 суток после инокуляции при поражении отрезков листьев пятнистостью на 30–50% кювету разворачивают и помещают на светоустановку до полного высыхания листьев (обычно 5–6 часов). Затем в кювету осторожно доливают водный раствор лактозы (1%) до полного обводнения листьев, лишний раствор лактозы сливают. Через 3 дня на отрезках наблюдается обильное спороношение гриба. Отрезки вновь подсушивают и хранят при комнатной температуре, при этом патогенность конидий не снижается, по крайней мере, в течение 2-х месяцев.

Лабораторные методы изучения устойчивости

Для оценки ювенильной устойчивости к темно-бурой листовой пятнистости семена изучаемых образцов высевают в почву или на смоченную водой вату и помещают на светоустановку (2500 лк, 22–25°С) или в теплицу. Через 7–10 дней после посева растения в фазе 1–2 листа используют для инокуляции. Суспензию конидий *B. sorokiniana* процеживают через двойной слой марли, титр доводят до 50×10^3 конидий/мл. Проростки равномерно опрыскивают суспензией конидий и помещают в условия 100% влажности. Для этого используют либо увлажнитель воздуха (humidifier), либо кюветы с растениями заворачивают в полиэтилен. Через 5–7 дней в момент гибели растений восприимчивого контроля оценивают развитие болезни по шкале от 0 до 6, где 0 – отсутствие симптомов поражения, 1, 2, 3, 4 – поражено 10, 20, 30, 40% листовой поверхности, 5 – поражено более 50 % листовой поверхности, 6 – гибель листа. Образцы, поражение которых не превышает 2-х баллов, высоко устойчивы, 3–4 – средне устойчивы, 5–6 – восприимчивы.

При недостатке лабораторной площади, а также при необходимости оценки устойчивости одних и тех образцов к нескольким болезням возможна инокуляция отрезков листьев. Отрезки первых листьев длиной 1 см раскладывают в кюветы

или чашки Петри на смоченную водой вату и опрыскивают суспензией конидий *B. sorokiniana* из пульверизатора. После инокуляции кюветы закрывают полиэтиленом, на 12 ч помещают в темноту, а затем – на светоустановку. Развитие болезни учитывают на 3–5 день после заражения по приведенной выше шкале. Особенно удобно использование отрезков листьев при изучении возможной длительности устойчивости к болезни и компонентов устойчивости.

Для изучения длительности устойчивости отрезки листьев заражают искусственной популяцией *B. sorokiniana*, представляющей смесь большого количества изолятов гриба. После появления симптомов болезни листья высушивают и помещают на вату, смоченную раствором лактозы (1 г/л). Через 3–5 дней, после образования обильного спороношения патогена, конидии переносят на отрезки листьев того же образца (1 цикл субкультивирования). После нескольких циклов субкультивирования субпопуляцию с каждого образца выделяют на полуселективной среде и размножают на среде ЧЛМ. Водную суспензию конидий субпопуляции используют для заражения образцов. Меньший уровень устойчивости образца к субпопуляции по сравнению с исходной популяцией свидетельствует в пользу адаптации патогена к образцу и, следовательно, его устойчивость не является длительной.

Для изучения компонентов устойчивости – количества пятен на единицу листовой поверхности и размера пятен – отрезки 1-х листьев раскладывают на смоченную водой вату, опрыскивают водной суспензией конидий возбудителя (20000 конидий/мл) и через 5 дней подсчитывают пятна поражения на каждом отрезке листа. На отрезки листьев тех же образцов микропипеткой наносят капли суспензии спор возбудителя (10 мкл, 20000 конидий/мл) и через 5 дней измеряют размер сформировавшихся пятен. Наибольший практический интерес представляют образцы, обладающие обоими компонентами устойчивости.

Для оценки ювенильной устойчивости ячменя к темно-бурой листовой пятнистости предложена также шкала, учитывающая тип реакции (наличие некрозов и хлорозов) и размер пятен (Fetch, Steffenson, 1997). Мелкие некротические пятна

при отсутствии либо слабом краевом хлорозе указывают на высокую степень устойчивости (баллы 1–3). Пятна среднего размера с отчетливыми, но ограниченными хлорозами – средний уровень устойчивости (баллы 4–6). Большие некротические пятна с хлоротичными границами и большими хлорозами – высокий уровень восприимчивости (баллы 7–9).

Изучение устойчивости в поле

Оценку возрастной устойчивости к темно-бурой листовой пятнистости проводят на естественном либо искусственном инфекционных фонах.

Для создания искусственного фона растения в теплице или поле в стадии молочной спелости опрыскивают водной суспензией конидий *B. sorokiniana* (50000 конидий/мл) и закрывают полиэтиленом для создания условий высокой влажности. Через 7–10 дней поражение флаг-листьев оценивают по упомянутой выше шкале учета поражения ювенильных интактных растений.

Для оценки возрастной устойчивости пшеницы можно использовать также метод микрокамер. При этом на флаг-листья помещают фильтровальную бумагу (1×1 см), смоченную в конидиальной суспензии *B. sorokiniana* (50000 конидий/мл), и обертывают полиэтиленом (3×5 см), который с двух сторон закрепляют скрепками. Через 5 суток учитывают поражение по шкале от 0 до 6, аналогичной шкале для учета поражения отрезков листьев.

Для оценки устойчивости пшеницы предложена двухцифровая шкала учета развития болезни: первой цифрой отмечают ярусное развитие пятнистости (1 – нижний лист, 9 – флаг-лист), второй цифрой отмечают развитие болезни на верхних пораженных листьях, где 1 – 10% поражения, 5 – 50%, …, 9 – 90% повртжения листовой поверхности (Mujeeb-Kazi et al, 2001).

Для ячменя разработана шкала качественного учета поражения пятнистостью (Fetch, Steffenson, 1997). Она учитывает тип реакции (наличие некрозов и хлорозов) и размер пятен на трех верхних листьях растений в фазе ранней-средней восковой спелости. Устойчивость (R) характеризуется мелкими некрозами при

отсутствии либо слабо развитх краевых хлорозах. При умеренной устойчивости (MR) наблюдаются некротические пятна среднего размера без некроза или с очень слабо выраженным некрозом. Умеренная восприимчивость (MS) проявляется в виде средних или крупных эллиптических некрозов с краевыми хлорозами. Реакция восприимчивости (S) характеризуется крупными удлиненными некрозами с обширно развитыми хлорозами.

Многие зарубежные исследователи для характеристики устойчивости используют показатель «площадь под кривой нарастания болезни» (ПКНБ). При этом поражение образца учитывают несколько раз за сезон вегетации через равные промежутки времени.

$ПКНБ = X \times (\frac{a_1 + a_n}{2} + \sum a_i)$, где

X – интервал между учетами (в днях);

a_1 – развитие болезни при первом учете;

a_n – развитие болезни при последнем учете;

a_i – развитие болезни при промежуточных учетах (все кроме первого и последнего).

Использование данного показателя позволяет дифференцировать образцы, оцененные как восприимчивые в конце вегетации, по степени поражения болезнью в течение онтогенеза.

Литература

Ермолаева В.Л. Исходный материал для селекции сортов яровой пшеницы интенсивного типа на Дальнем Востоке. Автореферат дис. … канд. с.-х. наук. Л. 1991. 21 с.

Иодко И.И. Влияние влажности воздуха и почвы на развитие возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили и пораженность ячменя // Материалы республиканской конференции по защите растений. Минск. 1975. С. 67-69.

Хасанов Б.А. Определитель грибов – возбудителей «гельминтоспориозов» растений из родов *Bipolaris*, *Drechslera* и *Exserohilum*. Ташкент. 1992. 244 с.

Conner R.L. Interrelationship of cultivar reactions to common root rot, black point and spot blotch in spring wheat // Plant Dis. 1990. V. 74. P. 224-227.

Farr D.F., Bills G.F., Chamuris G.P., Rossman A.Y. Fungy on plants and plant products in the United States // APS Press Minnesota. 1989. 125 p.

Fetch T.Jr., Steffenson B.J. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus* // Plant Disease. 1997. V. 83. P. 213-217.

Hetzler J. Host-pathogen interactions in populations of *Bipolaris sorokiniana* in the warm non-traditional areas. Doctoral dissertation. Göttingen, 1992. 132 p.

Kohli M.M. Identifying wheats adapted to more tropical areas of the southern cone of South America // Wheats for more tropical environment. Proc. Int. Symp. CIMMYT, Mexico. 1985. P. 111-115.

Misra A.P. *Helminthosporium* species occurring on cereals and other *Gramineae* // Tirhut Colleage of Agriculture. Muttafarpur Dholi. India. 1973. P. 289.

Mujeeb-Kazi A., Cano S., Rosas V., Cortes A., Delgado R. Registration of five synthetic hexaploid wheat and seven bread wheat lines resistant to wheat spot blotch // Crop Sci. 2001. V.41. P. 1653-1654.

Raemaekers R.H., Tinline R.D. Epidemics of diseases caused by *Cochliobolus sativus* on rainfed wheat in Zambia // Can. J. Plant Path. 1981. V. 3. P. 211-214.

Reis E.M. Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil // Plant Disease. 1983. V. 67. P. 68-70.

Tinline R.D., Dickson J.G. *Cochliobolus sativus*. I. Peretecial development and the incheritance of spore color and mating type // Mycologia. 1958. V. 50. P. 697-706.

Villareal R.L., Rajaram S., Nelson W. Breeding wheats for more tropical environment // Wheats for more tropical environment. Proc. Int. Symp. CIMMYT, Mexico. 1985. P. 89-99.

Yadov B.S. Behaviour of Cochliobolus sativus during its infection of barley and wheat leaves // Austr. J. Botany. 1981. V. 29. P. 53-58.

Л.Г. Тырышкин, М.А. Колесова

СЕПТОРИОЗ ЛИСТЬЕВ

Септориоз листьев – широко распространенная и вредоносная болезнь зерновых колосовых культур. Септориоз вызывают гемибиотрофные грибы рода *Septoria*. Из 15 видов грибов данного рода, вызывающих пятнистость листьев, наиболее вредоносны на пшенице *Stagonospora nodorum* (Berk.) Castell. et Germano (синоним: *Septoria nodorum* (Berk.) Berk.; телеоморфа: *Leptosphaeria nodorum* E. Müll., синоним: *Phaeosphaeria nodorum* (E. Müll.) Hedjar.) и *S. tritici* Rob. ex Desm. (телеоморфа: *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schroet.); на ячмене – *S. hordei* Jacz., на ржи – *S. secalis* Prill, et Del., на овсе – *S. avenae* Frank. (телеоморфа: *Leptosphaeria avenaria* Web.) (Васецкая и др., 1987; Ишкова и др., 2001).

Септориозы пшеницы, вызываемые *S. nodorum* и *S. tritici*, широко распространены во многих районах мира – Северной и Южной Америке, странах Европы, на Ближнем Востоке, в Южной и Юго-Восточной Азии, Западной Австралии, в отдельных странах Африки. Вид *S. nodorum* распространен на территории России повсеместно, но доминирует и наиболее вредоносен на Северном Кавказе, в Поволжье, ЦЧР, Северо-Западном и Центральном районах Нечерноземной зоны, в Алтайском крае, Западной и Восточной Сибири, на Южном Урале. *S. tritici* встречается на Северном Кавказе, в Нижнем Поволжье, ЦЧР, Центральных областях Нечерноземной зоны (Шестиперова, Полозова, 1973; Васецкая и др., 1983; Койшибаев и др., 1990; Ишкова и др., 2001). Потери урожая от септориоза зависят от зоны возделывания, погодных условий года и сортовых особенностей пшеницы. При сильном заражении болезнью потери урожая пшеницы от *S. nodorum* могут достигать 50% (Eyal, 1981; Babadoost, Herbert 1984), *S. tritici* – 17% и более (Brennan, Murray, 1988). *S. nodorum* поражает все надземные органы растений пшеницы: листья, стебли, колосовые чешуйки и семена. *S. tritici* развивается на листьях, листовых влагалищах, реже на стеблях растений (Пыжикова, 1984; Васецкая и др., 1987; Ишкова и др., 2001).

Болезнь, вызываемая *S. nodorum*, известна под название ”коричневая пятнистость колосковых чешуй”, или “шоколадная пятнистость”, или септориоз колоса. Круг хозяев патогена достаточно широк: виды родов *Triticum, Hordeum, Secale, Elytrigia, Aegilops, Alopecurus, Bromus, Festuca* и др. Гриб поражает все надземные органы растения. На листьях и влагалищах образует многочисленные мелкие продолговатые, в виде штрихов или темно-бурые с хлоротичным окаймлением пятна. Пораженные листья подсыхают, начиная с кончика или краев. На пораженной поверхности листа формируются плодовые тела – пикниды. При поражении листового влагалища на нем образуются хлоротичные пятна, которые вскоре приобретают бурую окраску. По форме пятна вытянуты в длину и располагаются между жилками. Часто пятна, увеличиваясь, охватывают все листовое влагалище. На стеблях пятна грязно-бурые, расплывчатые, постепенно обесцвечивающиеся. Пикниды на них образуются редко. Стебли, у которых поражены узлы, изгибаются и часто переламываются.

Пикниды *S. nodorum* темно-коричневые, шаровидные, продолговатые с округлыми или овальными отверстиями 40–250 мкм в диаметре, стенки тонкие, устьице округлое, окруженное слоем более темных клеток. Пикноспоры (конидии) бесцветные, удлиненно-цилиндрические, прямые или слегка изогнутые, на концах притупленные, 13–38,4 × 2,0–3,0 мкм, количество перегородок 1–3 (Васецкая и др., 1987; Пересыпкин и др., 1989).

Для прорастания конидий оптимальны температура 23°С и относительная влажность воздуха 100%. В эпифитотии септориоза пшеницы решающее значение имеют обильные и относительно частые осадки. Поэтому недостаток влаги весной (в период накопления инфекционного начала на всходах) и в последующие летние месяцы снижает распространение болезни (Шестиперова, Полозова, 1973; Пыжикова, 1984).

S. tritici поражает растения родов *Triticum, Avena, Hordeum, Secale, Dactilis, Elytrigia, Aegilops, Festuca* и др. При поражении на листьях пшеницы образуются продолговатые, линейные пятна, расположенные между жилками

листа. Пятна достигают размера 10×2-3 мм. Вначале они имеют темно-бурую, желтовато-коричневую или зеленовато-бурую окраску, часто темно-пурпурной, желтой или темной каймой, затем центральная часть постепенно обесцвечивается и приобретает пепельно-серый цвет. Поэтому септориоз, вызываемый возбудителем *S. tritici*, часто называется “крапчатой” или “серой пятнистостью листьев”.

На верхней и нижней сторонах пораженного листа появляются хорошо заметные черные точковидные пикниды возбудителя, располагающиеся рядами вдоль жилок листа под эпидермисом. Гриб поражает листья и листовые влагалища, встречается на стеблевых узлах и колосковых чешуйках. На чешуйках пикниды располагаются линейно, без образования пятен.

Пикниды *S. tritici* погруженные, черные, яйцевидные, 150–300 мкм в диаметре. Конидии цилиндрические, прямые или слегка изогнутые, на концах закругленные, бесцветные, нитевидные, с 3–7 перегородками, размером 28,5–90,8 ×1,5–2,5 мкм. Количество спор в одной пикниде достигает 20 тыс. (Пыжикова, 1984; Пересыпкин и др., 1989).

Гриб *S. secalis* встречается на растениях родов *Secale, Hordeum, Avena, Agrostis.* Пятна удлиненные, ограниченные жилками листьев, желтые, бледнеющие. Пикниды многочисленные, рассеянные, шаровидные и овальные, 90–120 мкм в диаметре, черные, погруженные, затем слегка выступающие, с округлым устьицем, окруженные слоем более темных клеток с 3–5 слойной оболочкой, темно-коричневые. Конидии палочковидные или цилиндрические, прямые или слегка изогнутые, с обоих концов притуплённые, с 1–3, иногда с 4-мя перегородками, 24–50 × 2,5–3,5 мкм. *S. secalis* распространен в Европе, Азии, Африке, Америке, Австралии. В России встречается повсеместно в районах возделывания ржи. Наиболее вредоносен в Северо-Западном, Центральном и Волго-Вятском районах Нечерноземной зоны (Ишкова и др., 2001).

S. hordei поражает в основном листья, реже влагалища, стебли растений рода *Hordeum*. Пятна продолговатые, неопределенной формы, желтовато-

серые или черновато-серые, иногда покрывающие весь лист. Пикниды многочисленные, рассеяны группами на светлых участках пятна на обеих поверхностях листа, шаровидные или шаровидно приплюснутые, полупогруженные; оболочка тонкая, коричневая или темно-оливковая. Конидии цилиндрические, палочковидные, прямые или слегка изогнутые, с закругленными или заостренными концами, светло-зеленые, с 1–5 перегородками, 25–35 × 3–3,5 мкм. Заболевание встречается в Европе и Азии. В России гриб распространен повсеместно в районах выращивания ячменя. Наиболее вредоносен на Северном Кавказе, в ЦЧР, Поволжье, Нечерноземье, на Урале, в Западной и Восточной Сибири (Ишкова и др., 2001).

Выделение и выращивание возбудителей септориоза

Пораженный септориозом лист с пикнидами тщательно промывают водой, затем в течение 2 мин стерилизуют 96%-ным этиловым спиртом и промывают стерильной водой в ламинар-боксе. С помощью микроскопа или бинокулярной лупы на пораженном листе находят участок со зрелыми пикнидами, устьица которых слегка приоткрыты, препаровальной иглой извлекают одну пикниду и переносят ее в чашку Петри с агаризованной средой для роста гриба.

Для выращивания возбудителей септориоза пшеницы используют картофельно-глюкозный агар (КГА).

Для выращивания *S. nodorum* пригоден также овсяный агар:

овсяные хлопья	– 125 г
агар	– 24 г
вода	– 1000 мл

Для приготовления агарированной питательной среды 125 г овсяных хлопьев заливают 1 л воды, ставят на кипящую водяную баню на 30 мин, затем экстракт фильтруют через двойной слой марли, объем доводят до 1 л, добавляют 24 г агара, стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин. Питательную среду подкисляют 50%-ной кислотой до ph 5,5–6,0. Лимонную кислоту стерилизуют при 1 атм. в течение 30–45 мин.

Монокопикнидиальную культуру возбудителя септориоза выдерживают в течение двух суток в термостате при температуре 20ºС, затем переносят в климатическую камеру или на световую установку и инкубируют при температуре 20–22ºС, освещенности 15–20 тыс. лк и 16-часовом фотопериоде.

Получение спорового материала на сыпучем субстрате

В качестве сыпучего субстрата чаще всего используют перловую крупу, реже – зерно пшеницы, овса, ячменя, кукурузы, пшено.

В колбы объемом 750–1000 мл насыпают по 40 г перловой крупы и наливают по 20 мл воды. Колбы закрывают ватными пробками и автоклавируют дважды через день при 1 атм в течение 40 мин. После второго автоклавирования колбы охлаждают и готовят споровую суспензию гриба концентрацией 10^6 спор/мл. В колбу с субстратом вносят стерильно 20 мл суспензии и тщательно интенсивно встряхивают для равномерного распределения инокулюма. Колбы инкубируют под ультрафиолетовыми лампами (ЛЭ-30) и лампами дневного света 14 дней. Для размешивания культур колбы встряхивают не реже двух раз в сутки. Заросший грибом субстрат рассыпают тонким слоем на полиэтиленовой пленке или в кюветы и сушат при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния (3–4 суток). Хранят споровый материал в холодильнике в течение года.

При использовании в качестве субстрата зерна берут колбы меньшей емкостью (200–300 мл), засыпают зерно и заливают его водой на 8–10 ч. Затем воду сливают, оставляя 1/5 часть ее от объема зерна. Автоклавирование зерна проводят дважды по 1 ч через день при давлении 1,2–1,5 атм. После охлаждения в колбы вносят культуру гриба. Инкубацию проводят при тех же условиях, что и при работе с перловой крупой.

Методы оценки устойчивости к септориозу

При оценке ювенильной устойчивости 15–30 семян каждого образца пшеницы высевают в кюветы на влажную вату. Кюветы с наклюнувшимися

семенами переносят на светоустановку (освещенность 2500 лк, температура 20–22°С). Интактные растения в стадии 1–2 листьев инокулируют водной суспензией спор патогенна (концентрация 10^7 спор/мл). Кюветы с растениями после инокуляции оборачивают полиэтиленом и на 24 ч оставляют в темноте, затем переносят на светоустановку.

Учет поражения проводят на 5–7-й день после инокуляции (при гибели проростков восприимчивого контроля) по 7-балльной шкале, где 0 – отсутствие симптомов поражения; 1, 2, 3, 4 – поражено 10, 20, 30, 40% листовой поверхности; 5 – поражено более 50% листовой поверхности; 6 – гибель растения. Образцы, пораженность которых не превышает 1 балла, высокоустойчивы; 2–4 ⊥ среднеустойчивы; 5 и 6 ⊥ восприимчивы.

При недостатке лабораторной площади или при необходимости оценки устойчивости одних и тех же образцов к нескольким болезням можно инокулировать отрезки листьев. Отрезки первых листьев длиной 1 см раскладывают в кюветы или чашки Петри на смоченную водой вату и опрыскивают суспензией конидий патогена из пульверизатора. Кюветы закрывают полиэтиленом, на 12 ч помещают в темноту, а затем на светоустановку. Развитие болезни учитывают на 3–5 день после заражения по приведенной выше шкале.

Возрастную устойчивость к септориозу оценивают при искусственном заражении суспензией спор патогена интактных флаг-листьев с использованием метода микрокамер либо опрыскивания.

Заражение возбудителями септориоза в полевых условиях может быть осуществлено опрыскиванием растений суспензией спор патогенов. Для надежного выделения устойчивых форм необходимо использовать высокие концентрации конидий (10^7 спор/мл.) патогенов; инокулюм должен содержать как можно большее количество изолятов.

Перед инокуляцией делянки поливают. Инокуляцию проводят в вечернее время в безветренную погоду. Желательно приурочивать инокуляцию к пасмурным, дождливым дням или когда ожидается роса. Необходимо выбрать период времени, когда разница между максимальной дневной и ожида-

емой ночной температурой составит около 12°С. Инокулюм готовят из расчета 200 мл суспензии на 1 м^2 посева. После заражения растения выдерживают во влажной камере, которую создают, накрывая посев полиэтиленовой пленкой. Края пленки плотно присыпают землей. Продолжительность влажного периода не менее 24 ч. Учет развития болезни на флаг-листьях проводят через 10–12 дней после заражения по упомянутой выше шкале (Васецкая и др., 1987). Зарубежные авторы рекомендуют многократное опрыскивание посевов инокулюмом (Fried, 1989; Aguilar et al., 2005).

При использовании метода микрокамер отрезки фильтровальной бумаги 0,5 × 0,5 см смачивают в водной суспензии спор патогена (концентрация 10^7 спор/мл) и помещают на флаг-лист. Лист вместе с бумагой оборачивают полиэтиленом и камеру закрепляют двумя канцелярскими скрепками. Поражение листьев учитывают на 5–7 день после инокуляции.

Для более точной иммунологической характеристики образцов можно вычислить показатель «площадь под кривой нарастания болезни» (см. раздел «Темно-бурая листовая пятнистость»).

Литература

Бабаянц Л., Мештерхази А., Вехтер Ф., Неклеса Н., Дубинина Л., Омельченко Л., Клечковская Е., Слюсаренко А., Бартош П. Методы селекции и оценки устойчивости пшениц и ячменя к болезням в странах – членах СЭВ. Прага. 1988. 321 с.

Васецкая М.Н., Куликова Г.В., Борзионова Т.И. Виды септориальных грибов, распространенных на сортах пшеницы в СССР // Микология и фитопатология. 1983. Т. 17. Вып.3. С. 210-213.

Васецкая М.Н., Куликова Г.В., Кобыльский Г.В., Москвитин Э.В., Баймакова Ч.А., Борзионова Т.И., Чигирев С.М. Методические указания по оценке устойчивости сортообразцов пшеницы к возбудителям септориоза. М. 1987. 24 с.

Ишкова Т.И., Берестецкая Л.И., Гасич Е.Л., Власов Д.Ю. Учебно-методическое пособие по диагностике основных грибных болезней хлебных злаков. СПб. 2001. 76 с.

Койшибаев М.К., Исмаилова Э.Т., Жаманбаланова Л.А. Септориозы пшеницы и меры борьбы с ними. Алма-Ата. 1990. 50 с.

Пересыпкин В.Ф., Кирик Н.Н., Лесовой М.П., Коваленко С.Н., Королева И.Б., Кошевский И.И., Шелехова Л.Н., Минько Н.Д. Болезни сельскохозяйственных культур. Т.1. Болезни зерновых культур. Киев: Урожай, 1989. 216 с.

Пыжикова Г.В. Септориозы зерновых культур. М.: ВНИИТЭИСХ, 1984. 64 с.

Шестиперова З.И., Полозова Н.Л. Мучнистая роса и пятнистости яровых зерновых культур. Л.: Колос, 1973. 56 с.

Aguilar V., Stamp P., Winzeler M., Winzeler H., Schachermayr G., Keller B., Zanetti S., Messmer M.M. Inheritance of field resistance to *Stagonospora nodorum* leaf and glume blotch and correlations with other morphological traits in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 111. № 2. P.325-336.

Babadoost M., Herbert T.T. Factors affecting infection of wheat seedlings by *Septoria nodorum* // Phytopathology. 1984. V.74. P. 592-595.

Brennan J.P., Murray G.M. Australian wheat diseases: Assessing their economic importance // Agric. Sci. 1988. V. 2. P. 26-35.

Eyal Z.E. Integrated control of *Septoria* diseases of wheat// Plant Dis. 1981. V.65. P. 763-768.

Fried P.M. Improved method to produce large quantities of *Septoria nodorum* inoculum // Proc. 3d international workshop on *Septoria* diseases of cereals. Zurich, Switzerland.1989. P. 28–31.

Г.С. Коновалова

РИНХОСПОРИОЗ

Гриб *Rhynchosporium secalis* (Oud.) J.J. Davis – возбудитель ринхоспориоза ржи, озимого и ярового ячменя. Болезнь отмечена практически во всех районах, где сосредоточено мировое производство ячменя и ржи. Ринхоспориоз характеризуется высокой вредоносностью, особенно в зонах с прохладным и влажным климатом. В эпифитотийные годы на Северо-Западе России развитие болезни на ячмене может превышать 62%, а на ржи – 58% (Бутрымович, 1990), а потери урожая восприимчивых сортов могут достигать 70% (Танский, Левитин, 1995). При раннем поражении растений *R. secalis* уменьшается не только длина колоса и его озерненность, но и количество продуктивных стеблей. Возбудитель ринхоспориоза характеризуется значительной изменчивостью патогенных свойств, о чем свидетельствуют данные по гетерогенности популяций гриба по признаку вирулентности (Ali et al., 1976; Tekauz, 1991). Имеются сведения и о нерасоспецифической устойчивости к этому заболеванию (Fowler, Owen, 1971; Habgood, 1977).

Систематическое положение гриба *Rhynchosporium secalis* (syn.: *Rhynchosporium graminicola* Heins; *Marssonica secalis* Oud.; *M. graminicola* Ell. et Sacc.) следующее: подотдел Deuteromycotina, класс Deuteromycota, порядок Moniliales, семейство Moniliaceae.

В природных условиях *R. secalis*, кроме ржи и ячменя, отмечали на пшенице в Германии (Seidel et al., 1973), а также на свыше 50 видах трав из родов *Agrastis*, *Bromus*, *Cynosurus*, *Danthonia* и др. (Owen, 1958; Seidel et al., 1973; Shipton et al., 1974). Наличие у *R. secalis* строго специализированных форм утверждали Г.Джемс и М. Диксон (1956), Х. Р. Рид в США (Reed, 1957), Д. Зейдель в Германии (Seidel et al., 1973), А.А. Домашева и Р. М. Малютина (1966) в Киргизии и др. Однако другие авторы приводят данные, на основании которых нельзя считать, что у *R. secalis* имеется строгая специализация (Ali, Boyd, 1974; Jackson, Webster, 1976). В наших исследованиях гриб, выделенный из ячменя, не поражает рожь.

Морфолого-культуральные и биологические особенности *R. secalis*

На листьях ячменя и ржи гриб вызывает пятна овальной или удлиненной формы (5–20 мм и более). Свежие пятна темно-оливкого цвета, слегка мокнущие, позднее приобретают голубовато-серую или сизую окраску. На ячмене пятна отграничены от здоровой ткани широкой темно-коричневой каймой, на ржи пятна чаще без каймы или с узким коричневым или светлым ободком. Гриб чаще всего поражает листья, при сильном поражении патоген отмечается на стеблях и влагалищах листьев. В период кущения ячменя и ржи пятна появляются на нижних листьях, на верхних они единичны. Вспышка болезни начинается во время цветения и достигает максимума в фазу молочно-восковой спелости.

Гриб образует в клетках эпидермиса листа и в прилегающих клетках мезофилла стромоподобный мицелиальный слой. Из этой стромы на поверхности листа формируется конидиальное спороношение. Конидиеносцы отсутствуют. Конидии образуются из строматических клеток, расположенных в эпидермисе и мезофилле листа. Конидии двуклеточные 12-28 × 3-5 мкм; нижняя клетка прямая, цилиндрическая, суженная книзу; верхняя – широкая с клювовидной согнутой в сторону верхушкой. Кроме конидий, в культуре гриба наблюдаются одноклеточные и двуклеточные структуры, которые можно отнести к дрожжеподобным клеткам (рис. 1.2.2.2.).

Рис. 1.2.2.2. Конидии и хламидоспоры *R. secalis*

На питательной среде *R. secalis* характеризуется очень медленным ростом; формирует плотные дрожжеподобного типа колонии конической формы с ярко выраженной морщинистой поверхностью и грубой радиальной складчатостью. Молодые колонии имеют розовый цвет, но с возрастом большинство колоний становятся темными, практически черными. Мицелий гриба равномерно септированный, утолщенный, с моноподиальным ветвлением; окраска гиф – от бесцветной до темно-оливкового цвета. Встречается и видоизмененный мицелий, у которого некоторые клетки слегка вздуты. В культуре гриба наблюдается большое количество нормальных спор (двуклеточные с клювиком) и небольшое число одно- и двуклеточных структур (дрожжеподобные клетки) с незначительным утолщением клеток по краям. При старении культуры в среде обнаруживают темный пигмент и большое количество микросклероций. Половая стадия у гриба не найдена.

Изучение устойчивости ячменя к возбудителю ринхоспориоза в поле

Данные опыта служат для предварительного выделения устойчивых образцов. Обработка почвы, внесение удобрений, посев и уход за посевом осуществляется по методикам ВИР в соответствии с агротехническими правилами, принятыми для данной зоны.

Полевую оценку ячменя начинают проводить в период трубкования на естественном или на искусственно созданном инфекционном фоне. При этом учитывают тип реакции растений и развитие болезни (%), второй учет проводят через 20 дней после первого.

Тип реакции растений оценивают по шкале (Коновалова и др., 1998):

0 – иммунный (отсутствие симптомов заболевания);

1 – высокоустойчивый (точечный некроз, поражено не более 3-5 % поверхности листьев нижнего яруса);

2 – умеренно устойчивый (некротические пятна вдоль кромки листа, окруженные хлорозом; поражено не более 30% поверхности листьев нижнего яруса и единичные пятна на листьях 2-го яруса);

3 – восприимчивый (сливающиеся некрозы с хлорозом по всей поверхности листа; поражено не более 50% поверхности листьев нижнего яруса и 10% – листьев 2-го яруса);

4 – высоко восприимчивый (сливающиеся некрозы с хлорозом по всей поверхности листа, нижние листья засыхают; поражено до 80% поверхности листьев нижнего яруса, 30% – 2-го яруса, единичные пятна на верхних листьях);

5 – высоко восприимчивый (сливающиеся некрозы с хлорозом по всей поверхности листа, листья нижнего и 2-го ярусов засыхают; поражено 90 – 100 % поверхности листьев нижнего и 2-го ярусов, 20% – верхних листьев).

Развитие болезни рассчитывают по общепринятой формуле:

$$x = \frac{\sum(a \times b)}{n \times 5} 100\%$$, где

a – количество больных растений;

b – соответствующий балл поражения;

n – количество растений в пробе;

5 – высший балл шкалы учета.

Создание искусственного инфекционного фона

В качестве контроля и для усиления инфекционного фона следует через каждые 5-7 рядков испытуемых сортов и линий ячменя высевать 1 рядок универсально восприимчивого сорта (Cambrinus). Заражают растения в фазу проростков или начала выхода в трубку. Инокуляцию растений проводят поздно вечером перед заходом солнца. При этом обеспечиваются оптимальные условия для заражения ячменя *R. secalis*: высокая влажность и пониженная температура.

Инфекционный материал готовят за 3 недели до заражения. В качестве инокулюма используют смесь изолятов и моноспоровых культур гриба.

Для получения инокулюма фрагменты пораженных листьев (2×2 мм) погружают в 70%-ный спирт на 30 сек, затем переносят в раствор 0,5% гипохлорида кальция на 60 сек и тщательно промывают последовательно в 3-х стерильных водах. После каждой промывки кусочки листьев необходимо просушивать между

слоями стерильной фильтровальной бумаги. Обработанные таким способом фрагменты листьев раскладывают по 5 штук на поверхность КГА, в который добавляют антибиотик (например, гентомицин) в концентрации 0,3–1 г/л среды. Через 10–30 дней гриб появляется в виде светлых, растущих вверх колоний. Эти колонии (изоляты) микробиологической иглой переносят на поверхность свежей питательной среды в чашки Петри.

Для получения клонов из изолятов гриба готовят суспензию, фильтруют ее от мицелия через 2 слоя марли и определяют титр в камере Горяева (необходимая концентрация – 1000 спор/мл, то есть в 0,05 мл содержится около 50 спор). С помощью микробиологической пипетки 0,05 мл суспензии переносят на поверхность агаровой среды и растирают стеклянным шпателем. Через 15-20 дней на чашках вырастают изолированные колонии, которые представляет собой отдельные клоны гриба. Затем эти клоны с помощью микробиологической иглы переносят на свежую питательную среду и размножают.

Гриб выращивают на среде КГА в темноте (в термостате) при температуре 15 – 18°С. Для приготовления суспензии культуру гриба с поверхности агара соскабливают микробиологической лопаткой и суспензируют в стерильной водопроводной воде с добавлением детергента Twin-80 (1 микробиологическая петля на 200 мл воды). Полученную суспензию фильтруют через 2 слоя марли и разводят водой до концентрации $0{,}5 \times 10^6$ спор/мл.

Расчет необходимого количества инокулюма проводят следующим образом. В среднем с одной чашки Петри можно приготовить 30 мл суспензии гриба с титром 500–700 тыс. спор/мл. На 1 $м^2$ обрабатываемых растений необходимо 100 мл суспензии гриба и, следовательно, для инокуляции растений на 1 $м^2$ необходимо засеять грибом 3–4 чашки Петри. Для приготовления инокулюма споры с поверхности КГА собирают микробиологической лопаткой или медицинским скальпелем и суспензируют в отстоявшейся водопроводной воде, содержащей детергент Tween 80 (из расчета 1 микробиологическая петля на 200 мл воды). Полученную

суспензию фильтруют через 2 слоя марли, с помощью камеры Горяева определяют титр спор и разводят водой до концентрации 500-700 тыс. спор/мл.

Растения опрыскивают из пульверизатора и укрывают полиэтиленовой пленкой на 12 час. Первый учет типов реакций проводят через 7–10 дней после инокуляции. Второй учет следует провести в фазу молочной спелости, третий – через месяц после заражения.

Лабораторные методы оценки устойчивости

Интактные растения выращивают в сосудах с почвой и в стадии 2–3 листьев проростки опрыскивают суспензией гриба (концентрация 0,8 × 10^6 спор/мл). Для инокуляции используют смесь изолятов и клонов гриба 14-дневного возраста.

Сосуды помещают на сутки во влажную камеру с затемнением (10–15°С), а затем переносят на светоустановку (в климокамеру) с 12-часовым режимом освещения. В качестве контроля используют восприимчивые сорта Зазерский 85 либо Cambrinus. Учет проводят на 18–21 день по упомянутой выше шкале.

Устойчивость образцов можно изучать с использованием **отрезков листьев** ячменя. Семена испытываемых сортов помещают в кюветы на слой смоченной водой ваты или на стекло, обернутое фильтровальной бумагой, концы которой опущены в воду на дне кюветы. Кювету прикрывают стеклом и помещают на светоустановку. После прорастания семян стекло снимают. Для опытов необходимы растения в стадии первого развернутого листа.

Отрезки листьев (4–5 см) раскладывают в чашки Петри на поверхность 1%-ного агара, приготовленного на 0,005%-ном растворе бензимидазола. Кончики листьев прикрывают предметными стеклами или слоем агара такого же состава. На середину каждого отрезка листа наносят каплю (20 мкл) суспензии гриба (0,8 × 10^6 спор/мл). Чашки Петри с инокулированными отрезками листьев помещают в затемненное место на 36 ч при температуре 10–15°С, а затем переносят на светоустановку с 12-часовым режимом освещения и температурой 15–19°С. Учет типа реакции проводят на 17–21 день по шкале (Коновалова и др., 1998):

0 – отсутствие симптомов болезни;

1 – точечный некроз в месте нанесения капли;

2 – некроз с хлорозом или без него, ограниченный диаметром инфекционной капли;

3 – некроз с хлорозом, распростроняющийся по отрезку листа;

4 – окаймленный некроз, занимающий всю поверхность отрезка листа.

Баллы 1 и 2 соответствуют реакции устойчивости; 3 и 4 – восприимчивости.

Литература

Бутрымович Я.З. Биология возбудителя ринхоспориоза ячменя и ржи и приемы ограничения развития некоторых пятнистостей при интенсивном возделывании // Автореф. дисс. … канд. биол. наук. Л. 1990. 18с.

Джемс Г., Диксон М. Болезнь листьев и колосьев злаков // Болезнь растений: ежегодник министерства земледелия США. – М.: Иностранная литература, 1956. С. 336-342.

Домашева А.А., Малютина Р.М. К изучению ринхоспориоза в Чуйской долине Киргизской ССР // Грибные болезни сельскохозяйственных культур в Киргизии. Фрунзе, 1966. С. 106-109.

Коновалова Г.С., Макарова И.Г., Брискина О.С., Афанасенко О.С. Лабораторный метод скрининга устойчивых к ринхоспориозу сортов ячменя // Научные проблемы создания новых сортов сельскохозяйственных культур, адаптированных к современным условиям производства и обработки: Материалы научной сессии, С.Петербург (21-22 июля 1998). С. 32-33.

Танский В.И., Левитин М.М. Экологизация защиты зерновых культур от болезней и других вредных организмов // Сборник научных трудов ВИЗР. Т. 98. СПб, 1995. С. 9-17.

Ali S.M., Boyd W.I.R. Host range and specialization in *Rhynchosporium secalis* // Austr. Soc. Agr. Res. 1974. V. 25. № 1. P. 21-31.

Ali S.M., Mayfield A.H., Clare B.G. Pathogenicity of 203 isolates of *Rhynchosporium secalis* on 21 barley cultivars // Physiol. Plant Pathol. 1976. V. 6. № 1. P. 81-89.

Fowler A.M., Owen H. Studies of leave blotch of barley *Rhynchosporium secalis* // Trans. Brit. Mycol. Soc. 1971. V. 56. № 1. P. 137-152.

Habgood R.M. Resistance of barley cultivars to *Rhynchosporium secalis* // Trans. Brit. Mycol. Soc. 1977. V. 69. P. 281-286.

Jackson L.F., Webster R.R. Seed and grasses as possible sources of *Rhynchosporium secalis* for barley in Colifornia // Plant Dis. Rep. 1976. V. 60. № 3. P. 233-236.

Owen H. Physiologic specialization in *Rhynchosporium secalis* // Trans. Brit. Mycol. Soc. 1958. V. 41. № 1. P. 99-108.

Seidel D., Amelang D., Rolluize W. Zun Auftreten der *Rhynchosporium* Blattfleckenkran-Kheit and Sommergersye // Nachr. Bl. Pflanzenschutzdienst DDR. 1973. № 2, P. 29-31.

Shipton W. A.., Boyd W. I. R., Ali S.M. Scald of barley // Rev. Plant Pathol. 1974. V. 53. № 11. P. 839-861.

Reed H. R. Studies on burley scald //Tenn. Agric. Exp. Sth. Bull. 1957. 43 p.

Tekauz A. Pathogenic variation of *Rhynchosporium secalis* on barley in Canada // Can. J. Plant Protection. 1991. V. 13. P. 298-304.

Г.С. Коновалова

СЕТЧАТАЯ ПЯТНИСТОСТЬ ЯЧМЕНЯ

Сетчатая пятнистость, вызываемая грибом *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem., – одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний ячменя. В эпифитотийные годы потери урожая могут достигать 40% (Steffenson, 1988). На территории нашей страны интенсивное развитие болезни может наблюдаться практически во всех зонах выращивания ячменя. Ранняя инокуляция ячменя приводит к поражению почти 90% поверхности листьев (Deimel, 1988) и к уменьшению числа зерен в колосе на 1–6% (Войтова, 1971; Deimel, 1988).

Морфолого-культуральные и биологические особенности гриба

Drechslera teres (syn.: *Helminthosporium teres* Sacc.) относится к подотделу Deuteromycotina, классу Hyphomycetes, порядку Hyphomycetales, семейству Dematiaceae. Совершенная стадия – *Pyrenophora teres* относится к подотделу Ascomycotina, классу Loculoascomycetes, порядку Pleosporales, семейству Pleosporaceae.

Болезнь проявляется в период кущения ячменя, наиболее сильно – в период цветения и налива зерна. Симптомы появляются на листьях, стеблях и колосковых чешуях в виде коричневых черточек, полосок и округлых некротических пятен. Различают две формы болезни: «net» (темно-коричневые поперечные и продольные полоски, образующие на листе рисунок сетки) и «spot» (мелкие, округлые или эллипсовидные темно-коричневые пятна на листьях и стеблях) (Smedegard-Petersen, 1977). В обоих случаях пораженная ткань становится хлоротичной.

В жизненном цикле *D. teres* преобладает несовершенная (конидиальная) стадия развития. Споры бесполого размножения (конидии) образуются экзогенно на гаплоидном мицелии (на конидиеносцах). Мицелий гриба многоклеточный и многоядерный серого, коричневого и красного цветов. Конидиеносцы отходят от эпидермиса (реже из устьиц) одиночно или пучками (по 2–3) и имеют частые перего-

родки (Kenneth, 1962). Конидии почти бесцветные, цилиндрические, прямые или слегка изогнутые с полусферическими концами. Они так же, как и мицелий, являются многоклеточными (1–10 перегородок) и многоядерными (2–7). Размер конидий составляет 100–130 × 12,8–16,5 мкм (Kenneth, 1962). Прорастают конидии в, отличие от *Bipolaris sorokiniana*, любой клеткой. Конидиальное спороношение обычно образуется на живых растениях и служит для массового расселения гриба. В отличие от паразитической конидиальной стадии, сумчатая стадия *P. teres* является сапротрофной. Сумчатое спороношение возникает после отмирания растений в конце вегетации или после перезимовки. Несмотря на массовое образование плодовых тел, перитеции (с щетинками, 800 мкм в диаметре и до 400 мкм высотой) со зрелыми сумками (асками) и аскоспорами встречаются в природе редко. Сумки образуются пучками, на вершине они закруглены, внизу сужаются в короткую ножку. В сумке обычно формируется 8 аскоспор. Аскоспоры от бесцветных до бледно-бурых, с 3–4 перегородками. У *D. teres* известна способность образовывать пикниды на естественных и искусственных субстратах (Kenneth, 1962). Пикниды – тонкостенные образования, темнеющие с возрастом, внутри которых находятся бесцветные пикноспоры. Роль и функция их неизвестна, так как пикноспоры не прорастают и не заражают растение.

Источником первичной инфекции являются зараженные семена и растительные остатки. При сильном поражении семян, первые признаки болезни могут появляться на первом листе всходов. За счет вторичной инфекции болезнь быстро распространяется и достигает максимума к периоду молочной спелости семян.

Изучение устойчивости в поле

Устойчивость на естественном фоне оценивают в период молочной спелости ячменя. При этом учитывают тип реакции растений и развитие болезни. Тип реакции оценивают по шкале (Афанасенко, 1977, 1987):

0 – иммунный (отсутствие симптомов);

1 – высокоустойчивый (пятна очень мелкие, точечные, без хлороза);

2 – относительно устойчивый (пятна мелкие, в виде коричневых тонких штрихов, с хлорозом или без него);

3 – восприимчивый (типично сетчатые пятна или коричневые полоски с хлоротичным окаймлением);

4 – высоковосприимчивый (сетчатые пятна или полоски по всей поверхности листа, листья отмирают).

Для определения интенсивности поражения на метровой делянке каждого сорта произвольно отбирают 30 растений и каждое оценивают по следующей шкале:

0 – поражение отсутствует;

1 – единичные пятна на нижних листьях;

2 – поражено больше 50% листовой поверхности нижних листьев; единичные пятна на листьях 2-го яруса;

3 – нижние листья отмирают, поражено более 50% листовой поверхности листьев 2-го яруса; единичные пятна на верхних листьях;

4 – нижние листья отмирают, листовая поверхность листьев всех ярусов поражена более чем на 50%.

Развитие болезни рассчитывают по общепринятой формуле:

$$x = \frac{\sum(a \times b)}{n \times 5} 100\%$$, где

a – количество больных растений;
b – соответствующий балл поражения;
n – количество растений в пробе;
5 – высший балл шкалы учета.

При создании **искусственного инфекционного фона** (Афанасенко, 1977, 1987) следует через каждые 2 рядка испытуемых образцов ячменя высевать 1 рядок восприимчивого сорта (Пиркка) – накопителя инфекции.

Для заражения растений используют сборную суспензию из изолятов и моноспоровых культур гриба. За месяц до инокуляции из сухих пораженных листьев, собранных в предыдущий вегетационный период, выделяют чистую культуру гриба. Отдельные изоляты клонируют. Изоляты и моноспоровые культуры гриба

размножают на среде ЧЛМ. Чашки с грибом культивируют на светоустановке в течение 8–10 суток и затем переносят в темноту на 1–2 суток.

С 1-й чашки Петри в среднем можно приготовить 10 мл суспензии с концентрацией конидий 50 тыс./мл. На 1 м^2 обрабатываемых растений необходимо иметь 100 мл суспензии. Следовательно, для инокуляции растений на 1 м^2 необходимо не менее 10 чашек с грибом. Для приготовления суспензии культуры грибов соскабливают с поверхности агара медицинским скальпелем и переносят в отстоявшуюся водопроводную воду, в которую добавлен детергент Tween 80 (1 микробиологическая петля на 200 мл воды). Полученную суспензию фильтруют от мицелия через 1 слой марли и определяют титр с помощью микропипетки (5–10 мкл). Споровую суспензию разводят до необходимого титра (50 тыс./мл). Если спор мало, суспензию отстаивают в течении 20 мин, чтобы споры осели на дно стеклянного стакана, затем осторожно пипеткой убирают лишнюю воду.

Растения инокулируют в фазу начала кущения с помощью опрыскивателя. После заражения ячмень накрывают полиэтиленом на 12–24 ч, что зависит от погодных условий. Перегрев растений под пленкой в солнечную погоду нежелателен, поэтому инокулировать лучше вечером.

Первый учет типов реакций растений проводят через 7–10 дней после заражения, второй – в фазу молочной спелости. При втором учете учитывают не только тип реакции, но и развитие болезни.

Лабораторный метод оценки устойчивости

Лабораторный метод оценки устойчивости сортов к возбудителю сетчатой пятнистости ячменя разработан в ВИЗР (Афанасенко, 1977). Проростки ячменя выращивают в кювете на слое смоченной водой ваты или на стекле, обернутом фильтровальной бумагой, концы которой опущены в воду на дне кюветы. Кювету прикрывают стеклом для поддержания оптимальной влажности и помещают на светоустановку. После прорастания семян стекло снимают. Для заражения используют проростки в стадии первого развернутого листа.

Для получения чистых культур *D. teres* из мест поражения листа вырезают участки размером 4×4 мм, стерилизуют их 5 мин в 2%-ном растворе медного купороса и промывают последовательно в 3-х стерильных водах. Затем кусочки пораженных тканей просушивают между слоями стерильной фильтровальной бумаги и раскладывают (по 4–5 штук) на поверхность ЧЛМ. Чашки помещают на светоустановку при температуре 20–26°С. Через 4–7 дней на кусочке ткани и среде появляется мицелиальный рост и конидиальное спороношение. Споры с мицелием собирают микробиологической иглой и переносят на поверхность свежей питательной среды в чашки Петри. Культивирование грибов в течение 8–9 суток на свету и последующее перемещение в темноту (термостат) на 24–48 ч при температуре 18–20° С обеспечивает обильное спороношение.

Клонирование *D. teres* проводят на среде ЧЛМ, М или П. Этот гриб интенсивно разрастается на питательных средах. Для получения отдельных, не сливающихся друг с другом, колоний в питательную среду добавляют Triton X-100 (0,1 – 0,3 мл/л среды). Среда П ограничивает рост грибов, что позволяет ее использовать для получения отдельных колоний без добавления веществ – ограничителей роста. Для получения клонов *D. teres* готовят суспензию спор гриба, отфильтровывают ее от мицелия с помощью 1 слоя марли и подсчитывают количество спор в капле известного объема. Суспензию разводят до концентрации 500–1000 спор/мл, чтобы в 0,05 мл содержалось около 25–50 спор. С помощью микробиологической пипетки это количество суспензии переносят в чашку Петри и тщательно растирают стеклянным шпателем по поверхности агара. Через 10 дней на чашках вырастают отдельные клоны гриба.

Для инокуляции ячменя используют культуру гриба 7–10 дневного возраста. Изоляты и клоны гриба выращивают на среде ЧЛМ при постоянном освещении и температуре 21–26°С. За сутки перед инокуляцией чашки с грибом помещают в темноту, что способствует усилению спороношения. Для приготовления суспензии культуру гриба с поверхности агара соскабливают микробиологической лопаткой и суспензируют в стерильной водопроводной воде с добавлением детер-

гента Twin-80 (1 микробиологическая петля на 200 мл воды). Полученную суспензию фильтруют через 1 слой марли и разводят водой до концентрации 5–7 × 10^3 спор/мл. Подсчет спор осуществляют в капле известного объема. Для этого используют автоматические микропипетки на 5 или 10 мкл.

Отрезки листьев (1–1,5см) раскладывают в кювету на поверхность стекла с фильтровальной бумагой, концы которой опущены в 0,004%-ный раствор бензимидазола. По вертикали в кювете располагают группы из 4-х отрезков листьев 1-го сорта, а по горизонтали – разные сорта ячменя. Инокуляцию отрезков листьев проводят путем нанесения суспензии в виде капель (20мкл) на середину листа. Кювету с отрезками помещают в затемненное место на 12–16 ч (при температуре 18–20°С), а затем переносят на светоустановку с 12-часовым режимом освещения и температурой 21–26°С. Учет проводят на 4–5 день по шкале:

0 – отсутствие симптомов болезни;

1 – точечный некроз без хлороза в месте нанесения капель;

2 – некротические коричневые пятна с хлоротичным окаймлением или без него, ограниченные диаметром инфекционной капли;

3 – некроз с хлорозом, распространяющийся по отрезку листа;

4 – некроз с хлорозом, занимающий всю поверхность отрезка листа.

Баллы 1 и 2 относят к реакции устойчивости; 3 и 4 –восприимчивости.

Литература

Афанасенко О.С. Лабораторный метод оценки устойчивости сортообразцов ячменя к возбудителю сетчатого гельминтоспориоза // С. х. биология. 1977. Т. 12. № 2. С. 297-299.

Афанасенко О.С. Методические указания по диагностике и методам полевой оценки устойчивости ячменя к возбудителям пятнистостей листьев. Л.: ВИЗР, 1987. 20с.

Войтова Л.Р. Сетчатая пятнистость ячменя // Защита растений. 1971. № 11. С. 44

Deimel L. Greundlagen der Schadenswirkung der Netzfleckenkan-Kheit [Erreger: Drechslera teres (Sacc.) Shoemaker] an Gerste // Diss. Doct. Agrorwiss. Fak. hadwirt. und Gartenbau Techn. Univ., Munchen. 1988. 148 p.

Kenneth R. On the taxonomy, morphology and geographic origin of *Pyrenophora teres* Drechsler and allied species // Bull. of Res. council of Israel sect. D. 1962. V. 11. № 2. P. 55-82.

Smedegard-Petersen V. Isolation of two toxins produced by *Pyrenophora teres* and their significance in disease development of net-spot blotch of barley //Phys. Plant Pathol. 1977. V.10. P. 209-214.

Steffenson B.J. Investigations on *Pyrenophora teres* f. *teres*, the cause of net blotch of barley: pathotypes, host resistance, yield loss, and comparative epidemiology to *Rhynchosporium secalis* by time series analysis. Ph. D. Thesis, University of California Davis, USA. 1988. 88p.

И.Г. Лоскутов

ПЯТНИСТОСТИ ОВСА

Болезни и вредители овса остаются важнейшими факторами снижения урожая и качества зерна. За последние годы вследствие целого ряда факторов фитосанитарная обстановка на полях России осложнилась. Несоблюдение правил севооборотов, насыщение их зерновыми культурами, поверхностная обработка почвы, частые весенне-летние засухи способствуют широкому распространению грибных заболеваний. В последнее время наиболее вредоносны различные виды пятнистостей (Лоскутов, 2003).

Для оценки степени поражения растений в поле используют балловые шкалы. При этом определяют процент поражения растений на делянке и процент поражения листовой поверхности. Для лабораторной диагностики возбудителя используют микроскопический метод определения характера изменений пораженных тканей растения, выявляют и исследуют возбудителя болезни. Для изучения патогенности микроорганизма его размножают в чистой культуре и проводят искусственное заражение растений в теплице, лаборатории или в поле по общепринятым методикам. При этом используют различные питательные среды, поскольку потребности грибных организмов неоднозначны (Никитина и др., 19906).

Наибольшее распространение в северо-западном регионе России получили красно-бурая пятнистость, септориоз и палевая некротическая пятнистость.

Красно-бурая пятнистость. Возбудитель – *Drechslera avenae* (Eidam.) Ito et Kuribay. (синоним *Helmintosporium avenae* Eidam.) из класса Deuteromycetes порядка Hypomycetales.

Заболевание может проявляться с фазы кущения до созревания, поражая, в первую очередь, листья, колосковые и цветочные чешуи, иногда зерновки. На всходах овса и в фазе трех листьев удлиненно-эллиптические, красновато-бурые пятна, нередко сливающиеся, занимают всю пластинку листа и переходят на листовое влагалище. При сильном поражении всходы засыхают. В период выметывания метелки пятна нередко очень крупные, сливающиеся и приобретающие бу-

рый или серый оттенок, края некрозов темнее центральной части пятна. На колосковых чешуйках пятна овальные, часто расплывчатые, красновато-коричневые, с более темной каймой (Пересыпкин, 1987).

Во влажную погоду на поверхности пятен образуется светлый налет, состоящий из спороношения гриба. Конидиеносцы одиночные или в пучках по 2–3; удлиненно-цилиндрические, в верхней части коленчатые, бледно-оливковые, многоклеточные. Конидии цилиндрические, с закругленными концами, иногда к вершине зауженные, с 1–8 перегородками, бледно-оливковые или бесцветные, максимальная длина – 170 мм (Harder et al., 1992b).

Телеоморфа *Pyrenophora avenae* Ito et Kuribay. (класс Ascomycetes, порядок Pseudosphaerialea) образуется на перезимовавших стеблях и листьях. Псевдотеции погружены в ткань субстрата, приплюснуто-шаровидные, 250–300 мкм в диаметре, сверху покрыты бурыми щетинками, у основания более темными, в верхней части бесцветными. Сумки булавовидные на короткой ножке. Сумкоспоры золотисто-желтого цвета с тремя поперечными и одной продольной неполной перегородкой (Никитина и др., 19906).

Заболевание с 20-х годов XX века распространено в странах Скандинавии, в Германии, США и Индии (Harder et al., 1992b). В России патоген наиболее вредоносен в Северо-Западном, Волго-Вятском регионах и на Дальнем Востоке (Ишкова и др., 2002). Устойчивость к болезни наследуется моногенно (Frey, 1981). Для выделения устойчивых линий культурного овса широко используют технику культуры ткани (Rines et al., 1985).

Лабораторный и полевой методы позволяют в сжатые сроки определить с высокой степенью достоверности устойчивость большого количества образцов к возбудителю болезни (Петрова, Афанасенко, 2003).

Для выделения гриба в чистую культуру из листьев с симптомами поражения вырезают кусочки размером 3 × 5 мм таким образом, чтобы захватить край пятна и небольшой участка здоровой ткани. Поверхность листа тщательно стерилизуют (2%-ным раствором медного купороса, 5–10 мин или 0,5–1,0%-ным рас-

твором гипохлорида кальция, 1 мин). После стерилизации отрезки листьев промывают и просушивают и далее помещают на поверхность агаровой среды.

Для получения обильного спороношения используют модифицированную среду Чапека или картофельно-декстрозный агар с добавлением 1% пептона. Гриб культивируют в чашках Петри при комнатной температуре под люминесцентными лампами. Для получения моноконидиальных изолятов суспензию, отфильтрованную через стерильную марлю, рассеивают на среду Чапека. Чашки помещают в термостат при температуре 20–24°С и через 10–14 дней отделяют колонии.

Семена образцов высевают в кюветы на смоченную водой вату, сутки выдерживают в темноте при температуре 27–30°С и помещают на светоустановку. Через 12–14 суток растения можно использовать для эксперимента. Срезанные листья разрезают на 3–4 см фрагменты, которые помещают на фильтровальную бумагу, смоченную раствором бензимидазола. Для приготовления суспензии гриба используют 8–10 суточную культуру в водном растворе Твин 80 (0,0001%), фильтрацию осуществляют через 2 слоя стерильной марли. Каждый образец инокулируют суспензией с титром 30000–35000 конидий/мл.

Тип реакции образцов определяют на 6–7 сутки после заражения по шкале:

1 – точечные некрозы без хлорозов (высокая устойчивость);

2 – мелкие некротические пятна без хлороза или со слабым хлорозом (устойчивость);

3 – некротические пятна крупные, сливающиеся (восприимчивость);

4 – некроз и хлороз занимают весь отрезок листа (высокая восприимчивость).

Полевую оценку устойчивости на естественном и искусственном инфекционных фонах следует проводить в фазе выметывания. В этот период на поле произвольно отбирают 20 проб по 10 растений, а на метровой делянке – 30 растений. Тип реакции определяют по шкале:

1 – иммунный, пятна отсутствуют;

2 – высокоустойчивый, пятна мелкие, без хлороза;

3 – среднеустойчивый, пятна мелкие, с хлорозом или без него;

4 – восприимчивый, типичные пятна с хлоротичным окаймлением;

5 – высоковосприимчивый, пятнистость по всей поверхности.

Степень поражения растений устанавливают по проценту площади листьев, покрытых пятнами:

0 – признаки поражения отсутствуют;

1 – некроз занимает до 10% поверхности листьев;

2 – некроз занимает до 25% поверхности листьев;

3 – некроз занимает до 50% поверхности листьев;

4 – некроз занимает более чем 50% поверхности листьев.

В результате многочисленных работ, проводимых в рамках Европейского питомника по болезням овса (EODN), выявлены наиболее устойчивые к патогену линии овса (Sebesta et al., 2000; 2001). Изучение большого набора сортов в полевых условиях позволило выделить устойчивые формы, которые относятся к культурным видам *A. strigosa, A. strigosa* subsp. *brevis, A. sativa* и *A. byzantina* (Грачев, 1961; Куновский и др., 1981; Лызлов, 1992; Frank et al., 1988; Sebesta et al., 1995) и дикорастущим (Лоскутов, 2002; Loskutov, 2002).

Септориоз. Возбудитель – *Septoria avenae* Frank, (класс Deuteromycetes, порядок Sphaeropsidales). Болезнь проявляется, начиная с фазы кущения. На листьях, влагалищах и колосковых чешуйках пятна красно-бурые, овально-вытянутые, более темные в центре, одиночные, резко ограниченные, иногда окруженные хлорозами. Во второй половине вегетации на верхней стороне листа формируется немногочисленные темноокрашенные пикниды. На стеблях пятна сливаются; пораженные стебли чернеют и становятся блестящими (Harder et al., 1992b).

Гриб образует пикниды до 150 мкм в диаметре с простым устьицем, глубоко погруженные в ткань. Пикноспоры бесцветные, слегка заостренные на концах, прямые или согнутые, 3–4 клеточные с перетяжками у перегородок. В цикле развития отмечены также микропикниды типа *Phoma* – бесцветные, полосковидные, с закругленными концами, слегка согнутые (Никитина и др., 19906).

Телеоморфа *Leptosphaeria avenae* Web. (класс Ascomycetes, порядок Pleosporales). Псевдотеции шаровидные, гладкие, погруженные, до 160 мкм в диаметре, с хорошо выраженным коническим устьицем. Оболочка плотная, перепончатая, темная. Сумки булавовидно-цилиндрические, на короткой ножке. Сумкоспоры веретеновидные, прямые или слегка изогнутые, с закругленными концами, 1–4 клеточные, с расширенной второй клеткой, перетянутые у перегородок, золотисто-желтые (Никитина и др., 19906).

Заболевание широко распространено в странах Европы, Австралии и Северной Америки на протяжении всего XX века. Устойчивость к болезни наследуется полигенно (Harder et al., 1992b). В России патоген вредоносен в Северо-Западном, Центральном, Волго-Вятском регионах, в Западной, Восточной Сибири и на Дальнем Востоке (Ишкова и др., 2002).

Для оценки устойчивости образцов к возбудителю септориоза используют метод инокуляции вегетирующих растений споровой суспензией. Распыление суспензии проводят в фазе всходов. Для заражения используют 7–12 дневную культуру, выращенную при 22°С в темноте на агаре. Концентрация суспензии приблизительно 10^5 спор/мл. Растения заражают вечером при повышенной влажности воздуха из расчета 100 мл суспензии на 1 $м^2$ (Comeau et al., 1976). Тип реакции растений оценивают на 15–20 день после заражения по шкале:

1 – иммунный, пятна отсутствуют;

2 – высокоустойчивый, пятна мелкие, без хлороза;

3 – среднеустойчивый, пятна мелкие, с хлорозом или без него;

4 – восприимчивый, типичные пятна с хлоротичным окаймлением;

5 – высоковосприимчивый, пятнистость по всей поверхности.

В результате работ, проводимых в рамках EODN, выделены устойчивые к септориозу формы и линии овса для Европейского континента (Sebesta et al., 1999). Изучение большого набора сортов и линий гексаплоиного культурного овса в различных условиях позволило выявить источники устойчивости к этому заболеванию (Mielke, 1975; Sebesta et al., 1996). Определено, что дикорастущие ви-

ды овса обладают высокой устойчивостью к септориозу при естественном и искусственном заражении (Clark et al., 1960, Thomas, 1989; Harder et al., 1992a; Zwatz et al., 1994; Sebesta et al., 1999; Лоскутов, 2002; Loskutov, 2002).

Палевая некротическая пятнистость. Возбудитель *Myrothecium verrucaria* Ditmar. ex Fr. (класс Deuteromycetes порядок Hyphomycetales). Заболевание проявляется в начале вегетации, чаще в период кущения или в период выхода в трубку. На листьях нижнего яруса в период кущения светло-зеленые, позднее желтеющие, несколько вдавленные пятна без каймы, одиночные или многочисленными группами. Пятна, расположенные вдоль пластинки листа, сливаясь, образуют некротические полосы с неровными краями. В период выхода овса в трубку пятна можно обнаружить на листьях всех ярусов. Листья, зараженные в сильной степени, быстро засыхают, что приводит к гибели растений. На листьях спороношение обычно отсутствует. Гриб обнаружен на зерне в поле на «перестоявших» растениях. Зерно токсично (Никитина и др., 19906).

Гриб образует ярко-белые спородохии без щетинок, дисковидной формы, одиночные или группами до 1 мм в диаметре. Спородохии сидячие, состоят из рыхлого сплетения мицелия, на котором образуются конидиеносцы, расположенные плотно сжатыми рядами. Конидиеносцы бесцветные, правильно или повторно разветвленные по 2–4 веточки на нескольких уровнях; последние ветви несут конидиогенные клетки (фиалиды), собранные в мутовки. Фиалиды в пучках по 3–6 штук, прозрачные, цилиндрические, суживающиеся к вершине, плотно сближенные в параллельные ряды. Конидии бесцветные или дымчатые, в массе черные, одноклеточные, яйцевидные или эллипсоидные, с одного конца суженные и заостренные, с закругленным и усеченным основанием (Никитина и др., 19906).

Поражение растений в поле иногда выглядит полосчато, что, по всей видимости, связано с направлением ветра или расположением почвенных разностей. Восприимчивость конкретного образца в большой степени зависит от места его нахождения в поле. Чаще всего поражаются растения на крайних делянках, а об-

разцы, посеянные в середине поля на плодородной почве, поражаются патогеном слабее. Таким образом, по нашему мнению, степень поражения данным возбудителем обуславливается не столько генетической природой самого растения, сколько почвенно-климатическими условиями при его возделывании (Лоскутов, 2002). Гриб широко распространен в природе, он встречается в почве и на растительных остатках. Отмечен во многих регионах России, Индии, Египта, в Канаде, США, Новой Зеландии и Австралии (Ишкова и др., 2002).

Полевой метод оценки устойчивости овса к возбудителю палевой некротической пятнистости разработан Е.В. Никитиной и В.Е. Мережко (1989). Оценку устойчивости сортов следует проводить в фазу кущения – выхода в трубку на естественном и искусственном фоне по шкале:

0 – признаки поражения отсутствуют или есть не более одного пятна; высокая устойчивость;

1 – на листьях отдельных растений имеются редкие, единичные пятна; устойчивость;

3 – некроз занимает до 10% поверхности листьев; относительная устойчивость;

5 – некроз занимает до 25% поверхности листьев; слабая восприимчивость;

7 – некроз занимает до 40% поверхности листьев; средняя восприимчивость;

9 – некротические пятна распространены более чем на 40% поверхности листьев; сильная восприимчивость.

Для создания искусственного инфекционного фона образцы высевают в четырехкратной повторности. Инокуляцию вегетирующих растений суспензией спор гриба осуществляют в пасмурную погоду. Оценку проводят на 3–7 сутки после заражения (Никитина и др. 1989).

Изучение коллекции культурного овса позволило выявить продуктивные сорта, сочетающие устойчивость к данному патогену с иммунитетом к головневым и ржавчинным болезням (Мережко и др., 1990; Никитина и др., 1990а). Устойчивые образцы найдены также среди дикорастущих видов (Loskutov, 2002).

Литература

Грачев А.Ф. Устойчивость овса к корончатой ржавчине и гельминтоспориозу в условиях Приморского края // Сб. трудов аспир. и молод/ науч. сотр. ВИР. 1961. 2(6). С. 98-104.

Ишкова Т.И., Берестецкая Л.И., Гасич Е.Л., Левитин М.М., Власов Д.Ю. Диагностика основных грибных болезней хлебных злаков. СПб.: ВИЗР, 2002. 36 с.

Куновский Ж., Брешков Т. Полевая устойчивость сортов овса из мировой коллекции к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *avenae* Eriks et Henn. и *Pyrenophora avenae* Ito // Растениевод. Науки. 1981. V. 18. С. 118-123.

Лоскутов И.Г. Овес. Характеристика образцов видов овса по устойчивости к грибным и вирусным заболеваниям в условиях Северо-запада России. Каталог миро вой коллекции ВИР. СПб., 2002. Вып. 735. 74 с.

Лоскутов И.Г. Видовое разнообразие и селекционный потенциал рода *Avena* L. // Автореф. дисс. ... доктора биол. наук. СПб.: ВИР, 2003. 38 с.

Лызлов Е.В. Селекция овса в нечерноземной зоне Российской Федерации. Автореф. доктор. дисс. в форме науч. докл. М.: НИИСХЦРНЗ, 1992. 37 с.

Мережко В.Е., Никинина Е.В., Кузнецова О.И. Поражение овса палевой некротической пятнистостью // Научно-технич. бюл. ВИР. 1990. вып. 201. С. 68-71.

Никитина Е.Н., Мережко В.Е. *Myrothecium verrucaria* (Ab. et Schw.) Ditmar – возбудитель палевой некротической пятнистости овса в Ленинградской области // Микология и фитопатология. 1989. вып. 5. С. 456-471

Никитина Е.Н., Мережко В.Е. Палевая некротическая пятнистость овса: идентификация данной болезни на коллекции ВИР // Микология и фитопатология. 1990а. вып. 3. С.

Никитина Е.Н., Полозова Н.Т. Диагностика грибных пятнистостей зерновых культур в интенсивном земледелии. Методические указания. Л., 19906. 69 с.

Пересыпкин В.Ф. Атлас болезней полевых культур // Киев: Урожай, 1987. 256 с.

Петрова О.С., Афанасенко О.С. Методические рекомендации по диагностики и методам оценки устойчивости овса к возбудителям пятнистостей листьев // СПб.: ВИЗР, 2003. 28 с.

Clark R. V., Zillinsky F.J. Varietal reaction of oats to the *Septoria* disease under field and green house conditions // Can. Plant Dis. Surv. 1960. V. 40.

Comeau A., Pelletier G.J. Predisposition to *Septoria* leaf blotch in oats affected by barley yellow dwarf virus // Can. J. Plant Sci. 1976. V. 56. № 1. P. 13-19.

Frank J.A., Christ B.J. Rate-limiting resistance to *Pyrenophora* leaf blotch in spring oats // Phytopatology. 1988. V. 78. № P. 957-960.

Frey KJ. Plant Breeding II. Edited, 1981. ISU, 497.

Harder D.E., Chong J., Brown P.D., Sebesta J., Fox S. Wild oat as a source of disease resistance: history, utilization and prospects // Proc. 4th Inter. Oat Confer., Adelaide, Australia, V. II. 1992a. P. 71-81.

Harder D.E., Haber S. Oat diseases and pathologic techniques. In: Oat Science and Technology. Ed. by H.G. Marshall and M.E. Sorrels. Agronomy No.33. USA, 1992b. P. 307-426.

Loskutov I.G. *Avena* L. wild species is a source of diseases resistance, biochemical characters and agronomical traits in oat breeding // Proc. International scientific conference, Dotnuva, Agriculture, Lithuania, 2002. V. 78. № 2. P. 94-103.

Mielke H. Uber die Blattfleckenkrankheit (*Septoria avenae*) des Hafers // Mitt. Bi-

ol. Bundesant. Land-Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 1975. V.163. P. 41-47.

Rines H.W., Luke H.H. Selection and regeneration of toxin-insensitive plants from tissue cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium victoriae* // Theor. Appl. Genet. 1985. V. 71. № 1. P. 16-21.

Sebesta J., Zwatz B., Corazza L., Roderick H.W. Disease resistance index – a multisite indicator of the effectiveness of plant genotypes against diseases // Ochr. Rostl. 1995. V. 31. P. 167-176.

Sebesta J., Zwatz B., Harder D.E., Corazza L, Roderick H.W., Stojanovic S. Incidence and resistance of oats to fungus diseases in Europe in 1988–1994 // Ochr. Rostl. 1996. V. 32. P. 103-113.

Sebesta J., Zwatz B., Roderick H.W., Harder D.E., Stojanovic S., Corazza L. Oat fungal diseases in Europe and their genetic control // Pfianzenschutzberichte. 1999. Bd. 58. H 2. 152 p.

Sebesta J., Roderick H.W., Stojanovic S., Zwatz B., Harder D.E., Corazza L. Genetic basis of oat resistance to fungal diseases // Plant Protection Science. 2000. V. 36. .№ 1. P. 23-38.

Sebesta J., ZwartzB., Roderick H.W., Corazza L, Starzyk M.H, Reitan L, Loskutov I.G. Incidence of *Pyrenophora avenae* Ito et Kurib. in Europe between 1994-1998 and the varietal reaction of oats to it // Plant Protection Science. 2001. V. 37. № 3. P. 91-95.

Thomas H. New species of *Avena* // Proc. 3rd Inter. Oat Confer., Lund, Sweden, 1989. P. 18-23.

Zwatz B., Sebesta J., Corazza L., Herrmann M., Krolikowski J. Incidence of *Septoria avenae* Frank f. sp. *avenae* in Europe in 1990-1993 and the varietal reaction of oats to it // Pflanzenschutzb., 1994. Bd. 54. H. 2. P. 129-135.

1.2.3. БОЛЕЗНИ КОЛОСА

М.М. Ковалева, Т.Ю. Гагкаева

ФУЗАРИОЗ КОЛОСА

Фузариоза колоса (ФК) – широко распространенное по всему миру заболевание зерновых культур, снижающее урожай и качество сельскохозяйственной продукции. При поражении фузариозом ухудшаются посевные, товарные и пищевые качества зерна. Возбудители фузариоза в процессе жизнедеятельности выделяют токсичные вторичные метаболиты, в результате чего зерно становится непригодным для использования в пищевых и кормовых целях. Внедрение устойчивых сортов является лучшим и наиболее экономичным приемом уменьшения вредоносности заболевания.

Биоэкологические особенности возбудителей заболевания

Возбудители ФК – более 20 видов грибы из рода *Fusarium* Link. Наиболее распространены *F. graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. sporotrichioides* Sherb., *F.poae* (Peck) Wollenw., *F. sambusinum* Fuck., *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. semitectum* Berk. et Rav., *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Эти виды различаются между собой по биоэкологическим потребностям, агрессивности и по способности продуцировать различные вторичные метаболиты (фузариотоксины), многие их которых токсичны для теплокровных.

Состав патогенного комплекса зависит в основном от зоны возделывания зерновых культур; доминируют в той или иной зоне обычно 1–3 вида (Левитин и др., 1998). Так, на Северо-Западе европейской части России доминируют преимущественно *F. avenaceum, F. poae, F. sporotrichioides*; в Волго-Вятском и Уральском регионе преобладают *F. avenaceum, F. po*ae, *F. sporotrichioides*, *F. eguiseti;* в Центральном регионе – *F. avenaceum, F. culmorum, F. sporotrichioides* и *F. poae*; в Центральном Черноземье патогенный комплекс включает *F. poae*, *F. avenaceum, F. sporotrichioides*; в Поволжье – *F. eguiseti, F. poae, F. verticillioides*; на Северном Кавказе доминируют *F. graminearum, F. sporotrichioides, F. poae* и *F.*

verticillioides; в Западно-Сибирском регионе – *F.verticillioides, F. sporotrichioides,* в Алтайском крае распространены также *F. eguiseti, F. avenaceum;* в Восточно-Сибирском регионе доминирующее положение в Иркутской области занимают *F. avenaceum, F.acuminatum,* а в Якутии – *F. avenaceum, F. sporotrichioides, F. eguiseti*; на Дальнем Востоке с высокой частой встречаются *F. graminearum, F. avenaceum, F. poae* (Иващенко и др., 2004).

Существует широкая амплитуда агрессивности видов вызывающих заболевание и штаммов внутри одного вида (Chelkowski, 2003; Carter et al., 2002; Parry, Jenkins, McLeod, 1995; Билай, 1977). Безусловно, виды *F. graminearum* и *F. culmorum* являются наиболее агрессивными патогенами, продуцирующие высокие уровни токсинов. При заражении колоса этими грибами на колосе образуются типичные симптомы, хорошо заметные в поле. Однако эти виды имеют довольно ограниченный ареал распространения. На территории России вид *F. graminearum* обычно встречается в Северо-Кавказком, Центрально-Черноземном и Дальневосточном регионах. Вид *F. culmorum* приурочен к более прохладным условия – Центральный, Северо-Западный регионы. К видам с широкой экологической пластичностью относятся *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides, F. poae, F. tricinctum*. Эти виды встречаются на всей зерносеющей территории России. Несмотря на то, что эти виды постулируются как относительно слабые патогены, они почти ежегодно повсеместно выделяются из зерна (Левитин и др., 1998).

Грибы рода *Fusarium* продуцируют вторичные метаболиты различной химической природы, спектр образуемых токсинов имеет выраженный видоспецифичный характер (Marasas et al., 1984; Thrane, 2001; Mirocha et al., 2003). К наиболее распространенным и изученным трихотеценовым микотоксинам относятся дезоксиниваленол – ДОН (основные продуценты *F. graminearum*, *F. culmorum*), ниваленол (*F. poae*), Т-2 токсин (*F. sporotrichioides*).

Показано, что токсины связаны с агрессивностью патогенов. Мутанты *F. graminearum* с нарушенным синтезом трихотеценовых токсинов (Tri5 gene) вызывают незначительное поражение колосковых чешуек по сравнению с диким типом

изолятов, способных продуцировать ДОН (Mirocha et al., 1997; Desjardins et al., 1997; Snijders, Krechting, 1992, Proctor et al., 2002). По данным А. Местерхази, ДОН-продуцирующая способность изолятов *F. graminearum* пропорциональна агрессивности (Mesterhazy, 2002). Корреляция между этими показателями, как правило, выше 0,9, то есть ДОН является одним из компонентов агрессивности. Однако патогенность изолятов коррелирует не столько со способностью продуцировать один токсин, как с их способностью образовывать всю группу трихотеценовых токсинов (Mesterhazy et al., 1999, 2002).

Виды рода *Fusarium*, поражающие зерновые культуры, являются гемибиотрофными патогенами и имеют широкий круг растений-хозяев. Высокая пластичность грибов позволят им существовать на разнообразных субстратах. Сапрофитная фаза в жизненном цикле обеспечивает сохранность, высокую выживаемость и способность к широкому распространению. Накопителями инфекции служат пожнивные и послеуборочные пораженные растительные остатки, сорные растения, семена, а также почва (Билай, 1977). Некоторые виды (например, *F. graminearum* и *F. verticilliodes)* имеют половую стадию (*Gibberella zeae, G. fujikuroi*), которая сохраняется на растительных остатках и служит источником инфекции в следующем вегетационном периоде. Аскоспоры выбрасываются в воздух в ночное время, попадают на колосковые чешуи и прорастают. Заражение растений грибами рода *Fusarium*, развитие болезни происходит при широком диапазоне температур (оптимум 20–25°С) и высокой относительной влажности воздуха в период от цветения до полного созревания зерна. Конидии, образующиеся на пораженных органах, служат для дальнейшего распространения инфекции при помощи дождя, ветра и насекомых (Parry et al., 1995).

Симптомы и вредоносность ФК

Симптомы заболевания проявляются в виде обесцвечивания колосковых чешуй, хорошо заметных в начальный период созревания, на фоне еще зеленой окраски здоровой части колоса. При благоприятных для развития заболевания условиях на колосковых чешуйках появляется налет мицелия и спороношения гриба,

имеющий, в зависимости от вида возбудителя, розово - оранжевую окраску. В регионах распространения грибов имеющих в жизненном цикле половую стадию, в конце вегетации на пораженных колосьях формируются перитеции сине-черного цвета. В естественных условиях заболевание часто протекает без видимых признаков поражения колоса. Бессимптомное течение инфекционного процесса особенно характерно для растений ячменя и овса, однако анализ собранного зерна выявляет высокую зараженность патогенами (например, грибами *F. poae* и *F. sporotrichioides)* и присутствие микотоксинов. Часто на колосковых чешуйках, зараженных фузариозными грибами, образуются темно-коричневые штрихи и пятна, внешне напоминающие симптомы поражение грибами родов *Pyrenophora*, *Cochliobolus*, *Cladosporium*, *Alternaria* (Tekauz et al., 2000; Wong et al., 1992).

Фузариоз колоса приводит к поражению зерна, степень инфицированности которого зависит от вида возбудителя, количества инокулюма, сроков заражения, состояния растения. Усиливают заболевание зерновые предшественники, поверхностная обработка почвы, несбалансированное питание, несоблюдение оптимальных сроков посева, загущение и полегание растений, теплая влажная погода в период цветения и созревания.

Наиболее вредоносно заболевание при заражении колоса в фазу цветения, в это время образуется большое количество щуплых, белесых, легковесных зерен. При более поздних сроках заражения, как правило, пораженные зерновки внешне не отличаются от здоровых. В зависимости от глубины проникновения мицелия патогена зерно может быть невсхожим или из него развиваются слабые, пораженные гнилью проростки. Кроме того, подобные зерна при наличии токсигенных видов грибов способствуют накоплению микотоксинов, так как высокий процент выполненных, но инфицированных зерен остается после сортировки в партиях зерна.

Опасность фузариотоксинов для здоровья человека и сельскохозяйственных животных признана всем мировым сообществом (Marasas et al., 1984; Ueno, 1983), во многих странах установлены предельно допустимые значения содержания ток-

сических метаболитов в продуктах питания и кормах. В Российской Федерации предельно допустимые концентрации на содержание фузариотоксинов введены в 1996 г. (СанПиН 2.3.2.1078-01) и имеют максимальные значения (мг на кг зернового сырья): ДОН – 1, Т-2 токсин – 0.1, зеараленон – 1.0 и афлатоксин B_1 – 0.005.

Инокулюм для создания инфекционного фона

Для оценки устойчивости зерновых культур к ФК в качестве инокулюма используют смесь штаммов одного доминирующего в данном регионе вида гриба (Mesterhazy, 1995; 2000; Bai, Shaner, 1996; Liu et al., 1997; Wilcoxson et al., 1992). В регионах, где активно ведется селекция на устойчивость зерновых культур к ФК (Северная и Южная Америка, Центральная Европа, Китае, Япония, Австралия) вид *F. graminearum* является одним из наиболее опасных возбудителем ФК и, в соответствии с этим, ведется селекция по устойчивости к доминирующему виду патогена. Устойчивость растений к ФК не видоспецифична (Balkandzhieva, Karadzhova, 1994; Mesterhazy, 1997; Stack et al., 1997), то есть устойчивость к одному виду гриба, вызывающему ФК, проявляется и к другим видам *Fusarium* (*F. graminearum, F. culmorum, F. avenaceum, F. sporotrichioides, F. poae, F. sambucinum, F. moniliforme*). Устойчивый к определенному виду патогена сорт будет сохранять устойчивость при его возделывании в другом регионе, на фоне другого состава патогенного комплекса грибов рода *Fusarium*. Выявлено отсутствие специфических взаимодействий генотипа штамма с генотипом растения-хозяина и, как следствие, отсутствие рас у грибов, вызывающих ФК (van Eeuwijk et al., 1995; Parry et al., 1995; Miedaner, Schilling, 1996).

В качестве инокулюма можно использовать аскоспоры, конидии, хламидоспоры и кусочки гиф. Хламидоспоры способны вызывать заражение растений, но редко используются для заражения (Nyvall, 1970). Р. Стак сравнил эффективность заражения колосьев пшеницы аскоспорами и макроконидиями *F. graminearum* и пришел к выводу, что оба типа спор вызывали сходный уровень инфицированности (Stack, 1989). Кусочки мицелия грибов в природе являются существенным ис-

точником инфекции (Wearing, Burgess, 1977). Показано, что одинаковые по концентрации суспензии, состоящие из отрезков мицелия (1–2 мм длиной), или конидий, или аскоспор вызывают одновременное появление и распространение симптомов заражения колоса (Xu, Fang, 1982). На практике в качестве инфекционного начала в основном используют конидии или смесь конидий и фрагментов мицелия. Инокулюм получают путем смыва культур гриба с предварительно инокулированых зерен пшеницы и ячменя (Schroeder, Christensen, 1963), семян фасоли (Liu et al., 1997), питательной агаризованной среды (Gagkaeva et al., 2002). Мицелиальную массу гриба смывают водой, фильтруют через марлю или другой мелкоячеистый материал для освобождения от кусков субстрата. Исходная суспензия на просвет обычно бывает слегка мутно-перламутровой. Концентрацию суспензии измеряют с помощью гемоцитометра (камеры Горяева), однако в этом случае обычно учитывается только концентрация конидий (Bekele, 1984; Schroeder, Christensen, 1963) и не учитывается количество фрагментов гиф (Wilcoxson et al., 1992). Значительно точнее получаются результаты при подсчете колониеобразующих частиц (КОЕ) в суспензии. Для этого 100 мкл исходной суспензии разбавляют в 1000–2000 раз. Каплю суспензии объемом 10–50 мкл растирают шпателем по поверхности агара с ограничителем роста (Triton X-100) или водного агара (ВА) и на 2–3 сутки подсчитывают выросшие колонии. Суспензию конидий можно хранить замороженной от -20 до -80°С. Перед использованием суспензии ее размораживают в холодной воле или холодильнике при 4ºС, разводят до необходимой концентрации и добавляют 2 мл/л Tween 20 (Dill-Macky, 2003).

Метод выделения грибов в чистую культуру

При оценке устойчивости растений к заболеванию необходимо знать виды доминирующих в данном регионе патогенов для последующего использования их в качестве инфекционного материала.

Для этого следует провести выделение и идентификацию грибов в пораженном зерне, выращенном в данной местности. Около 100–200 зерен, тщательно

промывают под струей водопроводной воды, затем дезинфицируют. Дезинфицирующими веществами служат 70% спирт (экспозиция 1 мин), 0,5%-ный раствор $KMnO_4$ (8–10 мин), 0,1%-ный раствор азотнокислого серебра (экспозиция 1 мин). После стерилизации зерно многократно промывают стерильной водой, подсушивают фильтровальной бумагой. В чашки Петри на поверхность агаризованной питательной среды раскладывают по 10 зерен. В питательную среду перед разливом по чашкам Петри для снижения линейного роста колоний грибов добавляют 2×10^{-4} Triton X-100. Спустя 5–7 суток инкубирования чашек Петри при 23°С, учитывают зараженность семян грибами рода *Fusarium,* а выросшие на среде колонии отсевают для идентификации патогенов (рис. 1.2.3.1.).

Рис. 1.2.3.1. Рост мицелия из пораженных зерновок пшеницы на агаризованной среде

Метод разведения спор

Для получения моноспоровых изолятов и культур грибов чистых от биологических примесей используют метод разведения спор. В стерильной воде делают суспензию конидий из активно растущей культуры гриба. Подсчитывают концентрацию спор (в камере Горяева или в капле объемом 10 мкл). При наличии бактериальной примеси в суспензию добавляют антибиотики или каплю 25%-ной молочной кислоты. На тонкую поверхность агаризованной среды с ограничителем

роста (2×10^{-4} Triton X-100) автоматической пипеткой со стерильным наконечником наносят каплю суспензии из расчета 20–30 спор на чашку Петри. Стеклянным шпателем растирают суспензию по поверхности агара. Через сутки под микроскопом с обратной стороны чашки просматривают (×50–100) и отмечают проросшие споры гриба, которые в дальнейшем отсевают в чистую культуру.

Питательные среды

Для выделения и идентификации грибов применяются различные агаризованные среды. Подготовленные по прописям среды стерилизуют 20 мин при 0,5 атмосфере. Для подавления роста бактерий в остуженную до 55–60°С среду вносят антибиотики. Растворы антибиотиков стерильно готовят заранее и хранят при 4°С: сульфат стрептомицина – 5 г и сульфата неомицина – 1 г на 100 мл стерильной воды. На литр среды вносят 12 мл раствора сульфата неомицина и 20 мл раствора сульфата стрептомицина.

Картофельно-декстрозный агар (КДА).Очищенный и нарезанный кубиками картофель (200 г) отваривают в небольшом объеме воды в течении 40 мин. Отвар фильтруют, доводят до 1 л, добавляют в него 15 г агара, 15 г декстрозы и стерилизуют под давлением 1 атм в течении 10 мин. Варианты среды – картофельно-сахарозный агар (КСА), если в качестве источника углевода и используется сахароза, КГА – с глюкозой. Среды на основе картофельного агара используют при описании культуральных характеристик гриба.

Для приготовления кукурузного агара необходимо 40 г кукурузной муки, 20 г агара, 1 л воды. Кукурузную муку заливают водой, размешивают, кипятят 1 ч, фильтруют через марлю и добавляют воду до 1 л.

Гвоздично-листовой агар (carnation-leaf agar, CLA) (Fischer et al., 1982). Готовят голодный водный агар – WA (1000 мл дистиллированной воды и 15–20 г агар-агара). Листья гвоздики режут на кусочки длиной 5–10 мм, стерилизуют в 70%-ном спирте, просушивают стерильной фильтровальной бумагой. Несколько кусочков листьев помещают на поверхность разлитого в чашки Петри и остывшего

голодного агара. Вместо кусочков гвоздичных листьев можно использовать стерильные кусочки листьев лимона или фильтровальной бумаги. На этой среде быстро происходит формирование типичного спороношения (спородохий, макро- и/или микроконидий).

Синтетическая среда по Ниренберг (synthetic nutrient agar, SNA). Состав среды: KNO_3 – 1.0 г, KH_2PO_4 – 1.0 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5 г , KCI – 0.5 г, глюкоза – 0.2 г, сахароза – 0.2 г, агар-агар –15 г, дистиллированная вода – 1000 мл. Кусочки стерильной фильтровальной бумаги (1–2 см) раскладывают на поверхность автоклавированной и разлитой по чашкам Петри питательной среды (Nirenberg, 1976). Гриб на агаризованной среде с низким содержанием углеводов образует стелющийся по поверхности, слабо развитый, паутинистый, бесцветный мицелий, морфологические особенности которого (размеры, форма конидиеносцев, микро- и макроконидий, а также способы их формирования) легко учитываются in situ.

Синтетическая среда Чапека (ЧА): Состав среды: Глюкоза – 20 г, $NaNO_3$ – 2 г, KH_2PO_4 – 1 г, $MgSO_4$ – 0.5 г, KCl – 0.5 г, агар-агар – 15 г и H_2O – 1000 мл.

После выделения грибов в чистую культуру определяют их видовой состав при использовании следующих определители: Booth (1971); Gerlach, Nirenberg (1982); Nelson, Toussoun, Marasas (1983); Билай (1977). При использовании определителя важно обращать внимание, на каких средах и при каких условиях роста дано описание морфолого-культуральных признаков грибов.

Хранение грибов в чистой культуре

Для создания инфекционных фонов необходимо иметь чистые культуры грибов, которые длительное время сохраняли бы свою жизнеспособность и патогенность. Существуют различные методы хранения штаммов грибов, из которых наиболее известны лиофилизация, замораживание, сохранение в почве или силикагеле, на фильтровальной бумаге (Leslie, Summerell, 2006). Одним из самых удобных методов хранения культур – замораживание суспензии спор в глицерине при -70-80°С. В 1 мл стерильного 15%-ного глицерина (15 : 85 глицерин : дистил-

лированная вода) готовят суспензию спор в 2-х мл криопробирках. До помещения криопробирки в морозильную камеру суспензию можно держать при комнатной температуре не более 1 ч. В этом случае непосредственно перед замораживанием суспензия должна быть перемешена для предотвращения оседания спор и фрагментов мицелия на дно пробирки. При необходимости, достаточно достать пробирку из морозильной камеры, открыть не размораживая, взять стерильно небольшое количество суспензии и растереть ее по поверхности питательной среды. Криопробирку с суспензией вновь возвращают в холод. Таким образом, при соблюдении стерильности можно отсевать культуру гриба из одной пробирки многократно без значительного снижения жизнеспособности. Показано, что культуры грибов *F. oxysporum*, *G. fujikuroi* при таких условиях могут храниться без изменения как минимум 10 лет, штаммы *F. graminearum* начинают снижать жизнеспособность после 4–5 лет хранения (Leslie, Summerell, 2006)

УСТОЙЧИВОСТЬ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ФУЗАРИОЗУ КОЛОСА

В настоящее время выделяют несколько типов устойчивости зерновых к фузариозу колоса. Впервые в 1963 году Шроедер и Христенсен описали 2 типа устойчивости: устойчивость к проникновению и устойчивость к распространению (Schroeder, Christensen, 1963). Они же отметили, что эти два типа устойчивости варьируют и наследуются независимо. В дальнейшем были предложено существование еще 3-х типов устойчивости: устойчивость семян к заражению, толерантность и способность к аккумуляции или деградации токсинов (Mesterhazy, 1995; 2000; Miller et al., 1985). Однако ряд авторов считают, что последние три типа устойчивости зависят от проявления первых двух (Bai, Shaner, 2004).

Для выявления различных типов устойчивости растений применяют различные методы инокуляции и оценки.

Тип I. Устойчивость к проникновению выявляют при опрыскивании колосьев суспензией конидий патогена. При этом оценивают количество пораженных

колосьев и колосков в колосе. Метод пригоден для оценки устойчивости большого количества образцов в поле и в теплице.

При опрыскивании растений, предполагают, что большинство колосков в колосе контактируют с суспензией конидий гриба и количество (процент) инфицированных колосков через определенный период времени определяется I типом устойчивости. Время инокуляции растений в этом случае оказывает большое влияние на реакцию растений. Опрыскивание должно проводиться точно в период массового цветения большинства растений анализируемого образца.

Тип II. Устойчивость к распространению выявляют при инокуляции центрального колоска в колосе и визуальной оценке количества инфицированных колосков. Этот способ в последнее время наиболее часто используют в селекционном процессе. У восприимчивых сортов все колоски становятся инфицированными уже через 10 суток после инокуляции. Количество внесенного в колосок инокулюма существенно влияет на реакцию сорта. Оценивали реакцию 5 сортов с различной устойчивостью от высокоустойчивого (Ning 7840) до восприимчивого (Clark) при внесении уколом в колосок от 2-х до 11000 конидий (Bai, Shaner, 2004). Наибольшие различия были выявлены в вариантах с использованием 200 и более спор на колосок. При таких концентрациях симптомы заболевания не распространялись на неинфицированные колоски у устойчивого сорта Ning 7840, а у восприимчивого сорта Clark были заражены все колосья. Однако в варианте, где колосья были опрысканы суспензией в концентрации 10000 спор на колос, различия по сортам не выявлены, поскольку все колосья были инфицированы значительно без различий по сортам.

Тип III. Устойчивость зерен к заражению оценивают по соотношению здоровых и инфицированных зерен в образце. Устойчивость зерен к заражению, с большой вероятностью, является результатом устойчивости I и II типа (Bai, Shaner, 2004). Выявление устойчивости III типа проводится в лабораторных условиях при микологическом анализе поверхностно стерилизованных зерен.

Тип IV. Толерантность (выносливость) оценивают сопоставлением показателей урожайности зараженных и не зараженных растений одного образца, выращенных в одинаковых условиях. В случае отсутствия незараженного фона контролем является стандарт.

Тип V. Способность к аккумуляции и деградации токсинов оценивают по количеству присутствующих в зерне токсинов. Выявляют методами аналитической химии, иммуноферментным анализом, с использованием биотестов (Шевелуха и др., 1988; Леонов и др., 1990).

Наличие токсинов в выраженном урожае, является одним из самых опасных результатов заражения зерна. Количество ДОН различается у разных сортов (Stack et al., 1997; Анпилогова и др., 1996). Низкое содержание ДОН в зернах может быть обусловлено несколькими причинами: низкой способностью гриба образовывать токсин, деградацией токсина ферментами растений в процессе формирования зерна и предотвращением проникновения ДОН из чешуек колоса с высоким содержанием токсина в зерновку, незначительной зараженностью зерна (Bai, Shaner, 2004). Устойчивый сорт Frontana (Бразилия), благодаря комплексу ферментов, способен разрушать ДОН и накапливает его в минимальных количествах (Miller et al., 1985).

В целом существует положительная корреляция между зараженностью и наличием ДОН, если оцениваются образцы с широкой амплитудой устойчивости (Bai, Shaner, 2004). Устойчивые генотипы способны к деградации ДОН лучше, чем восприимчивые. Однако когда оцениваются восприимчивые и средневосприимчивые сорта, связь между этими показателями может быть не выявлена (Miller et al., 1985; Snijders, Perkowski, 1990; Stack et al., 1997; Wong et.al., 1995).

Австрийские исследователи (Lemmens et al., 1997) показали тесную корреляцию (r = 0,78–0,81) между видимыми симптомами на колосе и уровнем микотоксина ДОН. Схожие результаты получены Т. Меданером с коллегами (Miedaner et al., 2002): корреляция между видимыми симптомами на колосе пшеницы и концентрацией ДОН равна 0,78. Дж. Федак и В. Цао (Fedak, Cao, 2000) выявили связь

между проявлением ФК, продуцированием ДОН (r = 0,6) и количеством зараженных зерен и ДОН (r = 0,85). До настоящего времени существуют разногласия по поводу независимого от типов устойчивости I и II наследования устойчивости к деградации токсинов.

На устойчивость влияют также морфологические особенности растений: высота, длина верхнего междоузлия, наличие или отсутствие остей на колосе, плотность колоса, положение колоса (вертикальное или поникающее). Показано, что высокие растения (более 1 м) меньше поражаются патогенами, чем короткостебельные (ниже 70 см) (Mestearhazy, 1995; Lienemann, et al., 2000), и этот признак имеет генетическую основу (Hilton et at., 1999). Негативная корреляция между высотой растений и устойчивостью к ФК (r = -0.37, P<0.001) выявлена австрийскими исследователями (Buerstmayr et al., 2000). Показана позитивная связь (r = 0,8) проявления заболевания и расстояния между флаг-листом и колосом (Lienemann et al., 2000). Остистые формы пшеницы более устойчивы к заражению ФК, чем безостые (Shnijders, 1990; Meshterhazy, 1989).

Таким образом, пассивная устойчивость, обусловленная морфологическими признаками растения, способствующими ухудшению (или улучшению) условий для проникновения патогена оказывает существенную роль на развитие болезни в естественных условиях. Для высоко устойчивого генотипа эти признаки не играют большой роли, однако, их роль увеличивается с повышением восприимчивости растения. Чем более восприимчив растительный материал, тем более значимы его морфологические признаки (Mesterhazy, 2002).

Полевые методы оценки устойчивости

Оценка устойчивости на естественном инфекционном фоне

В районах с частыми эпифитотиями фузариоза колоса можно проводить полевую оценку зараженности образцов на естественном инфекционном фоне при благоприятных условиях для развития заболевания. Однако такой подход имеет ряд существенных ограничений, поскольку такие условия складываются не каж-

дый год и на ограниченной территории. Как правило, даже в регионах благоприятных для фузариоза, исследователи подстраховываются внесением инфекционного начала в период максимальной восприимчивости растений (Аблова, Грицай, 2001; Dill-Macky, 2003). Устойчивость растений в таких условиях в основном определяется устойчивостью I типа.

Первый учет производят через две недели после массового цветения образца и далее через каждые 4–5 суток. По каждому образцу определяют распространенность и интенсивность развития болезни.

Оценка устойчивости на искусственном инфекционном фоне

Инфекционный фон лучше создавать на участке вне севооборота, изолированном от хозяйственных посевов. Необходимо, чтобы участок был ровным, хорошо обработанным, растения должны находиться в равных условиях. Весь участок обсевают стандартным восприимчивым сортом. При оценке большого количества сортов их сеют рядками (0,8–1,5 м) с часто повторяющимся контрольным, восприимчивым к заболеванию сортом. Используют также сплошные посевы площадью от 1 м^2 и более (Бабаянц и др., 1988).

Используют различные методы инфицирования растений грибами рода *Fusarium*. В каждом конкретном случае можно выбрать свой метод заражения в зависимости от объема работы и поставленных задач. Интенсивность инфекционного фона регулируют инфекционной нагрузкой и условиями, сложившимися в период взаимодействия патогена и хозяина. Под инфекционной нагрузкой понимают количество инокулюма возбудителя болезни на единицу учета (на 1 растение, на единицу площади посева). Величина инфекционной нагрузки должна быть оптимальной, так как слабый фон не даст возможности развиться заболеванию в полной мере, а при очень высокой нагрузке выбракованными окажутся и устойчивые образцы.

1. Опрыскивание растений – один из самых распространенных методов инокуляции растений, позволяющий выявить устойчивость к проникновению гриба. В зависимости от объема заражения производится ранцевым или ручным опрыс-

кивателями. Для инокуляции колосьев применяют суспензии от 10^3 до 10^7 КОЕ на 1 мл воды. Расход суспензии 30-100мл/м^2. Патогены способны вызывать заболевание от начала выдвижения колоса до полного созревания зерна. Наиболее восприимчивой является фаза полного цветения колосьев, в которую и производят заражение растений.

Растения желательно заражать в вечернее время при оптимальных для инокуляции условиях: высокой влажности (более 70%) и температуре воздуха 22–25°С. Влажность поддерживается периодическим дождеванием или созданием влажных камер. Для повышения влажности используют пергаментные или целлофановые пакеты, которыми покрывают инфицированные колосья на 24 ч. Ряд авторов предпочитает двукратное инфицирование колосьев с промежутком в 3–4 суток пониженной концентрацией суспензии гриба (Аблова, Тараненко, 2004; Dill-Macky, 2003). Среди биотических факторов следует отметить влияние других вредных организмов. Так, Диль и Ферманн (1989) указывают, что заселение растений тлями существенно увеличивает пораженность фузариозом

2. Метод инъекции. Суспензию патогена (10^3 до 10^7 КОЕ на 1 мл воды) с помощью шприца вводят (10–20 мкл) в средний цветок колоска в центре колоса, стараясь не повредить растительную ткань (Grausgruber et al., 1995). Для оценки образца инокулируют 10 – 25 и более колосьев одного возраста. Этот метод в последнее время наиболее часто используют в селекционном процессе для оценки устойчивости образцов к распространению гриба. Вариантом этого метода являются метод ватного тампона (cotton-method), когда ватный тампон определенного размера, смоченный суспензией патогена, помещают в центр колоса (Bekele, 1987).

3. Размещение инфекционного материала на поверхность почвы под растениями. В качестве субстрата для инокулюма используют зерна пшеницы в количестве 10 кг/га (Xu, Fang, 1982), смесь зерен пшеницы, ячменя и кукурузы – 20 кг/га (Dill-Macky, 2003). Для приготовления инокулюма к 1 кг зерна добавляют 1 литр воды, выдерживают при комнатной температуре (3–5 часов – пшеницу, яч-

мень и 10–12 часов – кукурузу), затем автоклавируют 30 мин при 120ºС. После остывания, в зерно стерильно вносят культуру гриба. На 1 кг сухого зерна достаточно 5 чашек Петри с колониями 7–10-суточного возраста. В течение 2-х недель при регулярном перемешивании зерно полностью зарастает грибом и готово для использования. Инфекционный материал можно использовать в течение 6 недель, или смесь можно высушить и хранить при комнатной температуре до 4 месяцев (Dill-Macky, 2003). Инфицированные зерна разбрасывают на почву в период начала цветения растений. Заражение грибом происходит в течение всего периода восприимчивости растений, поэтому способ максимально приближен к заражению растений в естественных условиях. При распределении инфекционного материала по поверхности почвы, зараженность растений в большой степени зависит от погодных условий, поэтому желательно периодически проводить дождевание опытных посевов.

Методы оценки устойчивости растений к ФК

Первые симптомы заражения колосьев видны уже через 7–10 суток после инокуляции. Учет поражения колосьев проводят спустя 18–21 суток после инокуляции, в период когда хорошо видны симптомы заболевания. Для более детального исследования учеты проводят через 14 суток после инокуляции вплоть до максимального проявления болезни (обычно молочно-восковая спелость, реже – восковая спелость) через каждые 4 дня. Данные визуальной оценки используют для построения графика нарастания заболевания. Полученная площадь под кривой нарастания болезни (AUDPC), адекватно описывающей устойчивость растений (Buerstmayr et al., 2000). Для сравнения большого количества образцов используют индекс болезни (Index = распространенность × развитие заболевания/100), который характеризует устойчивость к проникновению и распространению инфекции (McCallum et al., 2004).

Существуют различные шкалы оценки устойчивости ФК, использование их определяется целями исследований, методами инокуляции и сложившейся практикой.

В таблице 1.2.3.1. и на рисунке 1.2.3.2. приведена шкала оценки устойчивости пшеницы и ячменя при инокуляции методом опрыскивания (I тип устойчивости).

Таблица 1.2.3.1. Шкала оценки устойчивости колосьев к ФК при инокуляции методом опрыскивания (Бабаянц и др., 1988)

Балл	Симптомы болезни	Характеристика устойчивости
9	Поражение отсутствует	Очень высокая
8	Возможно легкое пожелтение колоса; поражение в виде побурения чешуй отдельных колосков или зерновок	и высокая устойчивость
7	Поражение рассеяно по всему колосу	Устойчивость
6	или локально, но небольшое по площади	
5	Поражение среднее в виде побурения отдельных колосков или частей колоса	Слабая восприимчивость
4	Поражение от половины	Восприимчивость
3	до 2/3 части колоса	
2	Поражен почти	Высокая и
1	или весь колос	очень высокая восприимчивость

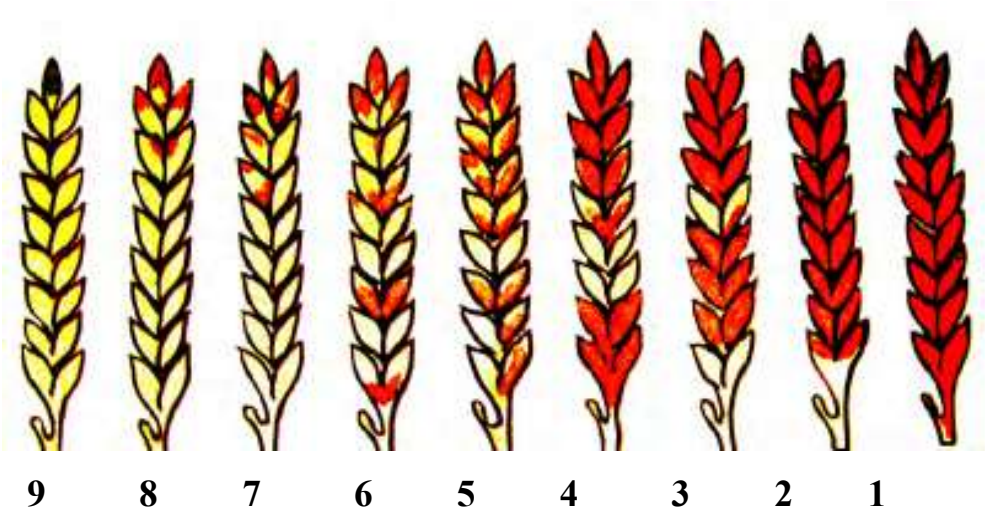


Рис. 1.2.3.2. Шкала интенсивности поражения колосьев пшеницы фузариозом колоса при инокуляции методом опрыскивания (по Бабаянц и др., 1988).

На рисунке 1.2.3.3. приведена шкала интенсивности поражения колосьев при инокуляции шприцом (II тип устойчивости). Эти мелкоинтервальные шкалы были рекомендованы для использования в станах СЭВ при оценке устойчивости образцов в селекционных целях (Бабаянц и др., 1988).

Рис. 1.2.3.3. Шкала интенсивности поражения колосьев пшеницы фузариозом колоса при инокуляции шприцом (по Бабаянц и др., 1988).

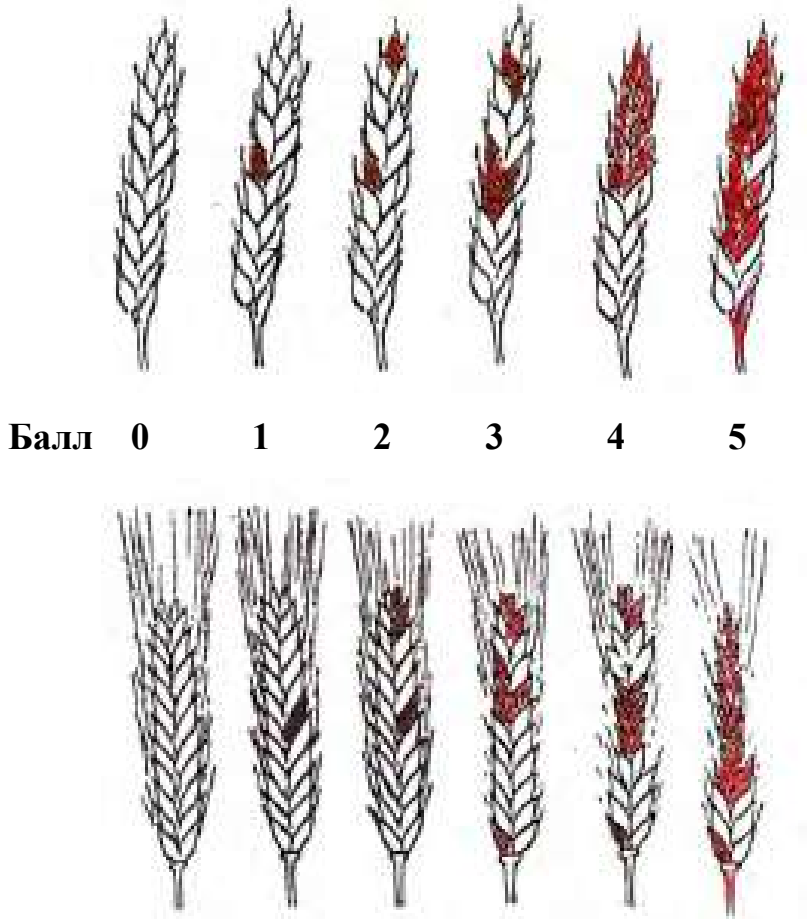


Рис. 1.2.3.4. Шкала интенсивности поражения колосьев пшеницы и ячменя фузариозом колоса при инокуляции методом опрыскивания (по Chelkowski, 1989).

Польские исследователи (Chelkowski, 1989) предлагают шкалу оценки пораженности ФК пшеницы и ржи в баллах – I тип устойчивости (рис. 1.2.3.4.).

Многие исследователи используют процентную шкалу: оценивают площадь поражения каждого инокулированного колоса и по среднему проценту поражения ранжируют их по устойчивости:

Высокая устойчивость (HR) – средняя пораженность колоса до 10%;

Устойчивость (R) – средняя пораженность колоса 11–25%;

Средняя устойчивость (MR)– средняя пораженность колоса 26–50%;

Умеренная восприимчивость (MS)– средняя пораженность колоса 51–75%;

Восприимчивость (S) – средняя пораженность колоса свыше 75%.

Для оценки устойчивости II типа при инокуляции центрального колоска предложена 5-бальная шкала (табл. 1.2.3.2.).

Таблица 1.2.3.2. Шкала оценки устойчивости образцов к фузариозу колоса

Балл	Локализация симптомов поражения	Градация устойчивости
1	В пределах одного колоска	HR – высокая устойчивость
2	Колосок и ость колоса	R – устойчивость
3	Болезнь распространяется на соседние колоски	MR – умеренная устойчивость
4	Распространение выше пораженных колосков; верхняя часть колоса усыхает	MS – умеренная восприимчивость
5	Болезнь распространяется на весь колос	S – восприимчивость

Если поражение образцов в результате инокуляции соответствует или превышает поражение восприимчивого стандарта, дальнейшее изучение таких образцов можно не проводить. Оценку образцов умеренно устойчивых, устойчивых и высокоустойчивых необходимо проводить не менее трех лет.

Лабораторные методы оценки устойчивости

Лабораторный метод оценки пораженности колоса

В лабораторных условиях для оценки устойчивости образцов можно применить метод «срезанных колосьев» (Takeda, Heta, 1989; Takeda et al., 1992). Во вре-

мя цветения колосья срезают по второму междоузлию, помещают в сосуды с водой и заражают суспензией гриба. Колосья содержат при температуре 25°С и 100%-ной влажности воздуха в течении 2-х дней после заражения, а затем переносятся в ростовые камеры. Температура регулируется в пределах 15–23°С (в зависимости от времени суток), относительная влажность воздуха составляет 95%. Сорта оценивают через 8 суток после заражения, определяя процент зараженных колосков. По нашим данным (Ковалева, 2003), результаты оценки устойчивости сортов, полученные с помощью этого метода и при искусственной инокуляции сортов в поле, тесно коррелируют (r = 0,75). Данный метод можно использовать для оценки большого количества образцов.

Лабораторный метод оценки зараженности зерна

Убранные с инфекционного поля колосья обмолачивают, определяют массу 1000 семян, количество зерен в колосе.

Для того чтобы оценить зараженность зерна недостаточно визуальной оценки количества внешне инфицированных зерен. Поскольку помимо зерна, явно пораженного фузариями, в образце всегда есть зерна, внешне здоровые, но несущее скрытую инфекцию (Ячевский, 1917; Иващенко и др., 2004). Пропорция такого скрыто зараженного зерна зависит от времени инокуляции, вида патогена и выносливости образца. Значительно более точную оценку получают при анализе 50–100 поверхностно стерилизованных зерен помещенных в стерильную влажную камеру или на поверхность питательной агаризованной среды (Гагкаева et al., 2002; Wong et al., 1992).

Для оценки устойчивости сорта к фузариозу по зараженности зерна используют шкалу:

Высокая устойчивость (HR) – до 5 % инфицированного зерна;

Устойчивость (R) – 6–15% инфицированного зерна;

Средняя устойчивость (MR) – 16–30% инфицированного зерна;

Умеренная восприимчивость (MS) – 60% инфицированного зерна;

Восприимчивость (S) – свыше 60% инфицированного зерна.

Известны и другие шкалы для определения устойчивости по зараженности зерна. Приведем наиболее распространенные (табл. 1.2.3.3., 1.2.3.4.).

Таблица 1.2.3.3. Универсальная шкала оценки устойчивости пшеницы фузариозом (Котляров, 1986)

Балл	Зараженность зерна, %	Поражение колоса, %	Степень устойчивости растения
0	0	0	Полностью устойчивые
1	до 8	1 –5	Устойчивые
2	9 – 11	5 – 25	Умеренно устойчивые
3	12 – 20	25 – 50	Умеренно восприимчивые
4	21 – 50	50 – 75	Восприимчивые
5	более 50	Более 75	Сильно восприимчивые

Таблица 1.2.3.4. Шкала учета поражения семян фузариозом (Гонтаренко, 1990)

Балл	Поражение семян, %	Характеристика устойчивости
9	0	Очень высокая устойчивость
8	5	Высокая устойчивость
7	10	Устойчивость
6	15	Умеренная устойчивость
5	25	Слабая восприимчивость
4	40	Умеренная восприимчивость
3	65	Восприимчивость
2	90	Сильная восприимчивость
1	100	Очень сильная восприимчивость

Источники и доноры устойчивости зерновых культур к ФК

Интенсивные исследования по созданию новых устойчивых сортов проводятся во всем мире. Показано, что большинство европейских сортов мягкой пшеницы средневосприимчивы, а тетраплоидные пшеницы (*Triticum durum*) – высоковосприимчивы к ФК (Аблова, Грицай, 2001; Buenmauer et all., 1996; Mesterhazy, 1997, Shnijders, 1990).

Наиболее активно используемые в современном селекционном процессе источники устойчивости имеют китайское (Sumai-3, Ning 7840 и Ning 8026), японское (Nobeoka-bozu), южноамериканское (Frontana и Encruzilhada) и европейское

(озимые сорта пшеницы Arina, Praag-8) происхождение (Bai, Shaner, 1994; Gilbert, Tekauz, 2000; Gilchrist at al., 2000; Shnijders, 1990).

Как известно, один из методов селекции – это повторяющиеся циклы скрещиваний. Современные устойчивые сорта созданы при скрещивании средневосприимчивых родителей или при скрещивании устойчивого родителя с восприимчивым. Активно используемый донор устойчивости Sumai-3 отобран из потомства средневосприимчивых сортов Taiwanmai и Funo. Сорт Sumai-3 имеет уникальную устойчивость II типа и передает ее потомкам. Симптомы заболевания не распространяются на неинфицированные колоски при заражении уколом в условиях теплицы. Иногда в поле пораженными бывают несколько колосков на колосе Sumai 3, что является результатом множественного инфицирования колосьев грибом из окружающей среды, а не распространении инокулюма из искусственно инфицированного колоска (Bai, Shaner, 2004). К сожалению, наряду с высокой устойчивости к ФК, сорт Sumai-3 характеризуется и рядом отрицательных признаков (низкое качество зерна, восприимчивость к ржавчине и мучнистой росе). Однако в гибридном потомстве Sumai-3 может комбинироваться высокая устойчивость к болезни с другими улучшенными агрономическими характеристиками. Например, высокоустойчивые и среднеурожайные сорта Ning 7840 и Ning 8026, имеющие в родословной Sumai-3, проявили устойчивость к бурой и стеблевой ржавчинам, мучнистой росе (Wu et al., 1987; Bai, Shaner, 1994). Это происходит не всегда: сорт Wanshuibai более устойчив, чем Sumai-3 к ФК, но в его потомстве не комбинируются устойчивость с улучшенными агрономическими характеристиками (Wu et al., 1987; Liu, Wang, 1991; Bai, Shaner, 1994).

В России активные исследования проводятся Краснодарским НИИСХ, где созданы относительно устойчивые к ФК сорта озимой пшеницы, накапливающие низкие количества ДОН – Краснодарская 6, Юна, Дельта, Деметра, Колос, Леда, Руфа, Эхо, Басианка (Анпилогова и др., 1996; Аблова, Грицай, 2001; Колесников и др., 2001; Ribalkin at al., 2000). Основные методы, используемые краснодарскими селекционерами – гибридизация эколого-географически отдаленных форм в

сочетании с индивидуальным отбором в ранних поколениях гибридов и сложная ступенчатая гибридизация.

Генетическое разнообразие растений – необходимое условие выполнения любой селекционной программы. Для поиска источников устойчивости к ФК несомненный интерес представляет коллекция ВИР (Gagkaeva et al., 2002; Ковалева, 2001). Поиск источников устойчивости проводят среди многообразия родичей мягкой пшеницы из родов *Triticum* L. и *Aegilops* L. (Гагкаева, Наврузбеков, 1991; Гагкаева и др., 1993; Stack et al., 1999; Goral et al., 1997; Lianfa et al., 2000). В Краснодарском НИИСХ для гибридизации и отбора линий с устойчивостью к ФК и токсинам гриба *F. graminearum* используют образцы ржи, а также *T. militinae, Ae. squarosa, Ae. sharonensis, Ae. umbellulata, Ae. speltoides, Ae. glaucum* (Колесников и др., 2001). Скрещивания озимой пшеницы с *Ae. cylindrica* для получения линий с устойчивостью к ряду заболеваний, в том числе к ФК, проводят в Селекционно-генетическом институте УААН (Бабаянц и др., 2001).

Твердая пшеница (*T. durum*, A^uB) чрезвычайно восприимчива к ФК. Видимо поэтому скрещивания Sumai-3 (A^uBD) с тетраплодной пшеницей не имели успеха (Gilbert et al., 1997; Stack et al., 1999). Для повышения устойчивости *T. durum* к ФК в селекционных программах используют *T. dicoccoides* (Stack et al., 1999).

Дж. Федак с коллегами (Fedak et al., 1997) идентифицировал устойчивость среди разнообразных диких сородичей пшеницы и произвел скрещивания с целью переноса генов устойчивости в адаптированные сорта пшеницы. Скрещивая пшеницу с бразильской дикорастущей рожью, *Thinopyrum intermedium*, *Dasupyrum villosum, Hordeum californicum* исследователи показали сложный комплекс наследования устойчивости. В настоящее время сообщается об образцах *Roegneria ciliaris*, *R. kamoji, Elymus giganteus* (Bai, Shaner, 1994), *Lophopyrum elongatum, Thinopyrum janceiforme* (Jauhar, Peterson, 1998; 2000), *Leymus racemosus* (*Elymus giganteus*) (Zhou et al., 2000; Liu et al., 2000), относительно устойчивых к ФК. Виды *Roegneria* показали высокую устойчивость к проникновению и распространению инфекции, образцы *Agropyron (Elymus) ciliare* и *A. repens* средневосприимчивы к

проникновению и высокоустойчивы к распространению инфекции (Wan et al., 1997; Fedak et al., 1997; Chen, Liu, 2000). В результате скрещиваний этих видов с пшеницей получены устойчивые амфидиплоиды, некоторые из них имеют хорошие агрономические показатели.

Селекция на устойчивость к ФК сложна по разным причинам:

- наиболее устойчивые генотипы имеют экзотическое происхождение и низкие агрономические параметры;

- наблюдается отрицательная корреляция между устойчивостью и многими агрономическими характеристиками;

- оценка устойчивости – длительный и дорогой процесс, во многом зависящий от условий окружающей среды;

- устойчивость, в основном, полигенного типа с аддитивным эффектом и количественным наследованием в потомстве (Shaner, 1994; Miedaner, 1997; Bai, Buerstmayr et al., 1999; Buerstmayr et al., 2001).

Генетические основы устойчивости пшеницы к ФК начали активно изучать с 80-х гг. прошлого века. Показано, что несколько генов с аддитивным эффектом ответственны за устойчивость к заболеванию. Так, Гуй-Хуа Бай (Bai et al., 1993) после проведения диаллельного скрещивания между тремя устойчивыми и тремя восприимчивыми сортами озимой пшеницы предположил, что 3 основных гена и несколько минорных генов ответственны за устойчивость. Согласно исследованиям японских исследователей (Ban, Suenaga, 1997), устойчивость к ФК контролируется двумя главными генами с аддитивным эффектом. Ч. Снайдерс (Snijeders, 1990), скрещивая во всех комбинациях 10 разных по устойчивости озимых пшениц, подсчитал, что количество генов, отвечающих за устойчивость, колеблется между 1 и 6-ю, и показал возможность аккумуляции этих генов в растении.

В последние годы при изучении устойчивости к ФК широко используются молекулярно-генетические методы. Проводится анализ локализации генов устойчивости с использованием различных маркеров (RAPD, RFLP, AFLP), когда амплификации подвергаются случайные или определенные, заранее выбранные по-

следовательности. Среди STS-PCR методов сегодня чаще используется амплификация гипервариабельной микросателлитной ДНК– SSR (simple sequence repeats).

Полученные к настоящему времени результаты показывают, что устойчивость к ФК контролируется несколькими крупными количественными локусами (QTL), оперирующими вместе с минорными генами (табл. 1.2.3.5.).

Таблица 1.2.3.5. Локализация QTLs устойчивости пшеницы к фузариозу колоса

Метод анализа	Устойчивый партнер*	Хромосомная локализация	Автор
Моносомный	Sumai-3	2A, 5A, 1B, 6D, 7D	Yu, 1982
Моносомный	U-226.1,* U-136.1*	3A, 3B, 4D, 6D	Buerstmayr et al., 1997
RAPD	Sumai-3	5AL или 6BL	Ban, Suenaga, 1997
AFLP	Ning 7840*	7B	Bai et al., 1999
RFLP	Sumai-3	3BS, 6BS	Waldron et al., 1999
AFLP, PFLP, SSR	ND2603* (Sumai-3/ Wheaton)	3AL, 6AS, 3BS, 6BS	Anderson et al., 2001
AFLP, PFLP, SSR	Sumai-3	3BS, 6BL	Kolb et al., 2001
AFLP, SSR	CM 82036*	3BS, 5A, 1B	Buerstmayr et al., 2001
SSR	WEKO60DH4*	7A	Tamburic-Ilincic et al., 2002
AFLP, PFLP, SSR	Sumai-3, Ning 894037*	3BS, 5A, 7A, 7D	Zhang et al., 2002
SSR	Sumai-3/ HY368	3BS, 6BS, 5AS	Yang et al., 2002
AFLP, PFLP, SSR	Renan	2B, 5A, 2A, 3A, 3B, 5D, 6D	Gervais et al., 2003
SSR	Sumai 3	2B, 3B, 6B, 7A, 3B, 7A	Zhou et al., 2002
SSR	Ning 894037*	3BS, 2D, 6B	Shen et al., 2002
SSR	Huapei 57-2*	3BS, 3BL, 3 A, 5B	Bourdoncle, Ohm, 2003

*В качестве устойчивого партнера использовали гибрид или сорт, имеющий в родословной сорт Sumai-3.

Австрийские исследователи оценили устойчивость к распространению ФК популяции 364 двойных гаплоидных линий F_1, полученных в результате скрещивания сортов CM-82036 (устойчивый) и Remus (восприимчивый) (Buerstmayr et al., 2001), и выявили 3 участка генома, существенно связанных с устойчивостью к

ФК. QTL на коротком плече 3B хромосомы объяснял до 56,8% проявления реакции устойчивости к ФК. Добавочные QTL локализованы на хромосомах 5A и 1B. На 3B и 5A хромосомах выявлены QTL, отмеченные SSR маркерами; QTL регион на 1B хромосоме ассоциирован с маркером высокомолекулярного глютенина.

В линиях, имеющих в родословной Sumai-3, идентифицированы от 1 до 4 QTL на хромосомах 3BS и 6BL, которые объясняют до 63% вариации устойчивости (Kolb et al., 2001). В популяциях Sumai-3 × Stoa и ND2603 × Butte86 QTL регион на 3BS хромосоме контролирует 41,6% и 24,8% устойчивости к ФК соответственно (Anderson et al., 2001).

Регион 3BS ответственен за 42.5%, а совместно с локусами 2D и 6B – за 51.6% фенотипического варьирования устойчивости к ФК, что выявлено при скрещивании устойчивого сорта Ning 894037 и средне восприимчивого Alondra (Shen et al., 2002).

Канадскими исследователями (Tamburic-Ilincic et al., 2002) показано, что маркер Xgw 332 на 7A хромосоме выявляет регион, связанный с наличием ДОН в популяциях гибридных растений озимой пшеницы, который объясняет около 8,4% варьирования аккумуляции ДОН. Этот же маркер обуславливает 30,3% фенотипического варьирования распространения ФК в популяциях растений. Маркер Xgw 533 выявляет локус на хромосоме 3B, объясняющий 39,9% проявления ФК, однако этот маркер не существенно связан с накоплением ДОН. Китайскими исследователями показан также локус на 3BS хромосоме, отмеченный маркерами *Xgwm*493 и *Xgwm*533, в большой степени ответственный за устойчивость в сортах Sumai-3 и Ning894037 (Zhang et al., 2002). Кроме них, SSR маркеры *Xgwm*493 (3B), Xgwm415d (5A), Xgwm350a (7A), Xgwm276 (7A) и Xgwm350b (7D) показывали существенную связь с проявлением ФК (Zhang et al., 2002).

Французскими учеными в результате скрещивания сортов озимой пшеницы Renan (устойчивый) и Recital (восприимчивый) показаны QTL на 2B и два – на 5A хромосомах, каждый из которых объяснял 6,9–18,6 % вариации устойчивости. Кроме того, идентифицированы локусы на хромосомах 2A, 3A, 3B, 5D и 6D, ко-

торые слабое влияли на устойчивость к ФК (Gervais et al., 2003). Один из локусов на 5А хромосоме связан с геном *B1*, контролирующим наличие остей на колосе.

По данным Zhou с соавторами (2002), при скрещивании Sumai-3 и моносомных линий Chinese Spring положительное влияние на устойчивость к распространению болезни оказывали локусы, расположенные на 2B, 3B, 6B и 7A хромосомах. Показано, что QTL хромосом 3B и 7A уменьшали накопление ДОН в зернах, а локусы 1B, 2D и 4D хромосом повышали концентрацию токсина.

Сорта яровой пшеницы Sumai-3, Frontana и Nobeoka Bozu имеют различную генетическую основу. Сорта Sumai-3 и Frontana имеют по 2 различных гена устойчивости, Nobeoka Bozu – 3, причем один из них может быть сходным с геном Sumai-3 (Van Ginkel et al., 1996; Ban, 2000; Mesterhazy, 2002).

Поскольку QTL имеют, в основном, аддитивный эффект, теоретически возможно конструировать пирамиду, состоящую из 3–4 эффективных QTL, гарантируя даже более высокий уровень устойчивости, чем у лучших на сегодняшний день источников устойчивости.

Другим возможным подходом к повышению устойчивости растений может быть включение в геном растений чужеродных генов, продукты которых способны защитить растение от патогена и его метаболитов. Такой возможностью является, например, использование трансгенных растений, несущих гены, кодирующие синтез патоген зависимых белков – таких, как тионин хитиназа, β-1,3 – глюканаза, пероксидаза, оксалат окидаза, полифенол охидаза, тауматин-подобные протеины (tlp-1). Изучение линий с одним геном или с комбинацией подобных генов показало, что наибольшую устойчивость к ФК проявляют линии с сочетанием генов хитиназа/глюканазной активности: устойчивость повышалась на 40–50% по сравнению с родительской линией сорта Bobwhite (Dahlen, 2002).

Исследуются линии пшеницы с введенными в них чужеродными генами, ответственными за деградацию токсинов. Растения, "вооруженные" такими генами, будут обладать новой мощной формой защиты. Созданы линии пшеницы с внедренным геном TRI-R, ответственным за деградацию Т-2 токсина гриба *F. spo-*

rotrichioides. По-видимому, наличие этого гена защищает самого патогена от продуцируемого им токсина, деградируя его до нетоксичных соединений. Из штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* клонирован ген PDR5, обладающий способностью выводить токсины из клеток. Предварительные данные показали, что линии пшеницы с внедренными в них чужеродными генами имели меньший уровень ФК, но только линии с PDR5 существенно редуцировали концентрацию трихотеценовых токсинов (Internet, 1999).

Таким образом, для успешной борьбы с фузариозом колоса зерновых культур необходимы (Гагкаева, Левитин, 2003):

- поиск новых источников устойчивости среди культурных растений и их дикорастущих родичей;

- поиск образцов, характеризующихся низким накоплением микотоксинов;

- изучение генетического контроля устойчивости;

- создание традиционными селекционными методами сортов зерновых культур, сочетающих высокоэффективные гены устойчивости со способностью растений не накапливать микотоксины;

- создание биотехнологическими методами трансгенных сортов, устойчивых к фузариозу колоса и не накапливающих микотоксины.

Литература

Аблова И. Б, Тарасенко С.А. Методические аспекты создания искусственного инфекционного фона по фузариозу колоса озимой пшеницы. Сб. научных труд. Эволюция научных технологий в растениеводстве. Том I. Пшеница. Краснодар. 2004. С. 382-390.

Аблова И.Б., Грицай Т.И. Исходный материал для селекции озимой мягкой пшеницы на устойчивость к фузариозу колоса в Краснодарском крае // Пшеница и тритикале. Краснодар, 2001. С. 337-351.

Анпилогова Л.К., Сидоров И.А., Есауленко Е.А., Соколов М.С. Загрязнение фузариотоксинами различных по толерантности к Fusarium graminearum Schwabe сортов озимой пшеницы // Агрохимия. 1996. Т. 10. С.100-104.

Бабаянц Л., Мештерхази А., Вехтер Ф., Неклеса Н., Дубинина Л., Омельченко Л., Клечковская Е., Слюсаренко А., Бартош П. Методы селекции и оценки устойчивости пшениц и ячменя к болезням в странах – членах СЭВ. Прага. 1988. 321 с.

Бабаянц Л.Т., Рыбалка А.И., Бабаянц О.В., Бушулян М.А., Васильев А.А., Дубинина Л.А., Мирось С.Л. Новый исходный материал для селекции пшеницы на устойчивость к инфекционным заболеваниям // Пшеница и тритикале. Краснодар, 2001. С. 329- 337.

Билай В.И. Фузарии. Киев. 1977. 444 с.

Гагкаева Т.Ю., Богуславский Р.Л., Михайлова Л.А., Гультяева Е.И., Рустамов Х.Н. Оценка устойчивости образцов различных видов пшениц к фузариозу колоса // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1993. Т. 147. С. 27-32.

Гагкаева Т.Ю., Левитин М.М. Устойчивость пшеницы к фузариозу колоса: достижения и перспективы // Вестник защиты растений. 2003. С. 31-37.

Гагкаева Т.Ю., Наврузбеков Н.А. Предварительная оценка некоторых видов *Aegilops* L. на устойчивость к *Fusarium graminearum* Schwabe // Научно-техн.бюллетень ВИР. 1991. вып. 216. С. 91-93.

Гонтаренко О.В. Устойчивость сортов пшеницы к фузариозу колоса на юге Украины // Сборник научных трудов «Проблемы повышения устойчивости зерновых культур и подсолнечника к болезням и вредителям». Одесса. 1990. С. 44-53.

Диль Т., Ферманн Г. Фузариозные заболевания пшеницы – влияние срока заражения повреждения тканей, а также влияние тлей на поражение листьев и колосьев // Симпозиум по фузариозным заболеваниям зерновых культур. СССР. 1989.

Иващенко В.Г., Шипилова Н.П., Назаровская Л.А. Фузариоз колоса хлебных злаков. СПб.: ВИЗР, 2004.164 с.

Иващенко В.Г., Шипилова Н.П., Нефедова Л.И., Гагкаева Т.Ю., Назаровская Л.А., Хлопунова Л.Б. Биологические и фитосанитарные аспекты исследования фузариоза колоса // Микология и фитопатология 1997. Т. 31. вып. 2. С.58-63

Клечковская Е.А. Проблемы отбора устойчивости генотипов озимой пшеницы к фузариям // Сборник научных трудов «Проблемы повышения устойчивости зерновых культур и подсолнечника к болезням и вредителям». Одесса: ВСГИ. 1990.

Ковалева М.М. Изучение образцов различных видов пшениц по устойчивости к фузариозу колоса // Сб. научн. трудов по прикл. бот., ген. и сел. Т. 159. С-Пб.: ВИР. 2001. С. 14-16.

Ковалева М.М. Лабораторный метод оценки пшеницы по устойчивости к фузариозу колоса // Материалы конф., посвященной 100-летию научной селекции в России. М., 9–11 декабря 2003 г. М., 2003. С.83-84.

Колесников Ф.А., Аблова И.Б., Беспалова Л.А., Давоян Р.А. Подходы к селекции на устойчивость к фузариозу колоса в Краснодарском НИИ сельского хозяйства им. П.П.Лукьяненко // Пшеница и тритикале. Краснодар, 2001. С. 318-329.

Котляров В.В.Устойчивость сортов пшеницы к фузариозу и методы ее определения. // Селекция и семеноводство. 1986. № 6. С. 51-54.

Левитин М.М., Иващенко В.Г., Шипилова Н.П., Гагкаева Т.Ю. О видовом и внутривидовом разнообразии грибов рода Fusarium на зерновых культурах. // Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии. М., 1998, С. 64-66.

Леонов А.Н., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. Особенности биосинтеза трихотеценов у изолятов Fusarium graminearum (579А ВНИИЗ) на зерне // Микология и фитопатология. Т. 24. вып. 6. С. 551-557.

Шевелуха В.С., Новожилов К.В., Сидорова С.Ф. и др. Рекомендации по борьбе с фузариозом пшеницы и других зерновых колосовых культур, использованию пораженного зерна и определению содержания в нем микотоксинов. М. 1988. 52 с.

Ячевский А.А. Ежегодник наблюдений о болезнях и повреждениях культурных и дикорастущих полезных растений. 1917. 464 с.

Anderson J.A., Stack R.W., Liu S., Waldron B.L., Fjeld A.D., Coyne C., Moreno-Sevilla B., Mitchell-Fetch J., Song Q.J., Cregan P.B., Frohberg R.C. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations // Theor. Appl. Genet. 2001. V.102. P. 1164-1168.

Backhouse D., Burgess L.W., Summerell B.A. Biogeography of *Fusarium* // Fusarium. APS PRESS. 2001. P. 122-137.

Bai G. Kolb F.L., Shaner G.,Domier L.L. Amplified fragment length polyorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat // Phytopathology. 1999. V. 89. P. 343-348.

Bai G.-H., Shaner G. Management and resistance in wheat and barley to Fusarium head blight // Annu. Rev. Phytopath. 2004. V. 42. P. 135-161.

Bai G.-H., Shaner G. Scab of wheat: Prospect for control // Plant Disease. 1994. V. 78. P. 760-766.

Bai G.-H., Shaner G. Variation in Fusarium graminearum and cultivar resistance to wheat scab // Plant Disease. 1996. V. 80. P. 975-979.

Bai G.-H., Shaner G., Ohm H. Inheritance of resistance to Fusarium graminearum in eight wheat cultivars // Phytopathology. 1993. V. 83. P.1414.

Balkandzhieva Yu., Karadzhova Y genetic sources of resistance to *Fusarium* on the ear // Plant science, Sofia. 1994. V. 31. № 7-10. P. 79-82.

Ban T. Evaluation of resistance to Fusarium head blight in indigenous Japanese species of *Agropyron* (*Elymus*) // Euphytica. 1997. V. 97. P. 39-44.

Ban T. Studies on the genetics of resistance to Fusarium head blight caused by Fusarium graminearum in wheat // Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab resistance, 5-11 May, 2000, China. 2000. P. 82-93.

Ban T., Suenaga K. Inheritance of resistance to Fusarium head blight caused by Fusarium graminearum in wheat // Cereal Res. Commun. 1997. V. 25. № 3/2. P. 727-728.

Bekele G.T. Head scab screening methods used at CIMMYT. In book: Wheats for more tropical environments. Edit. by Vallareal R.L., Kratt A.R. CIMMYT, Mexico, 1987. P. 169-173.

Booth C. The genus Fusarium. England. 1971. 237 p.

Bottalico A., Perrone G. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe // European J. of Plant Pathology. 2002. V. 108. P. 611-624.

Bourdoncle W., Ohm H.W. Quantitative trait loci for resistance to Fusarium head blight in recombinant inbred wheat lines from the cross Huapei 57-2/Patterson // Euphytica. 2003. V. 131. № 1. P. 131-136.

Buerstmayr H. Lemmens M., Harti L., Doldi L., Steiner B., Ruckenbauer P. Molecular mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in spring wheat. /Healthy Cereals. Proceeding. Ludvik Tvaruzek (edit.) Kromeriz, 2001. P. 15- 18.

Buerstmayr H., Doldi L., Stierschneider M., Lemmens M., Steiner B., Berlakovich S., Ruckenbauer P. Classical and molecular genetic analysis of Fusarium head blight resistance in wheat // Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab. resistance, 5-11 May, 2000, China. 2000. P. 82-93.

Buerstmayr H., Lemmens M., Grausgruber H., Ruckenbauer P. Scab resistance of international wheat germplasm // Cereal Res.Commun. 1996. V. 24. P. 195-202

Buerstmayr H., Lemmens M., Ruckenbauer P. Chromosomal location of Fusarium head blight resistance genes in wheat // Cereal Res.Commun. 1997. V. 25. № 3/2. P. 731-732.

Buerstmayr H., Steiner B., Lemmens M., Ruckenbauer P. Resistance to Fusarium head blight in two winter wheat crosses: heritability and trait associations // Crop Sci. 2000 V. 40. P. 1012-1018.

Carter J.P., Rezanoor H.N., Holden D., Desjardins A.E., Plattner R.D., Nicholson P. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum* // European J. Plant Pathology. 2002. V. 108. P. 573-583.

Chelkowski J. Formation of mycotoxins produced by Fusaria in head of wheat, triticale and rye. Fusarium: Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity. Seminar, Warsaw, 8-10, sept., 1987. Amsterdam, 1989. P. 63-84.

Chen P., Liu D. Transfer scab resistance from *Leymus racemosus*, *Roegneria ciliaris*, and *Roegneria kamoji* into common wheat // Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab resistance, 5-11 May, 2000, China. 2000. P. 62- 67.

Dahlen L., Internet, www.scabusa.com, 2002

Desjardins A.E., Proctor R.H., McCormik S.P., Hohn T. M. Reduced virulence of trichothecene antibiotics-nonproducing mutants of Gibberella zeae in wheat field tests // Fusarium Head Scab: Global Status and Future prospects. CIMMYT, Mexico, 1997. P. 29-34.

Dill-Macky R. Inoculation methods and evaluation of Fusarium head blight resistance in wheat. In book: Fusarium head blight of wheat and barley. Edit. by Leonard K. and Bushenell W. APS, 2003. P. 184-210.

Fedak G., Armstrong K.C., Sinha R.C., Gilbert J., Procunier J.D., Miller J.D., Pandeya R. 1997. Wide crosses to improve Fusarium head blight resistance in wheat // Cereal Res. Commun. 1997. V. 25. № 3/2. P. 651-654.

Fedak J., Cao W. The Fusarium head blight situation in Canada. /In: Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab resistance, 5-11 May, 2000, China. 2000. P. 234-237.

Fischer N.L., Burgess L.W., Nelson P. E., Toussoun T. A. Carnation leaves as a substrate for preserving cultures of Fusarium species // Phytopathology. 1982. V.72. P. 151-153.

Gagkaeva T.Yu., Levitin M.M., Zuev E., Terentjeva I. Evaluation of genetic resources of wheat and barley from Far East of Russia for resistance to Fusarium head blight // J. Applied Genetics. 2002. V. 43A. P. 229-236.

Gerlach W., Nirenberg H. The genus Fusarium – a Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Ld. Berlin. 1982. P. 1-406

Gervais L., Dedryver F., J.-Y. Morlais, Bodusseau, Negre S., Bilous M., Roos C., Trottet M. Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat // Theor. Appl. Genet. 2003. V.106. P. 961-970.

Gilbert J., Aung T., Procunier J.D. Influence of D genome in Fusarium head blight resistance // Cereal Res. Commun. 1997. V. 25. № 3/2. P. 647-649.

Gilbert J., Tekauz A. Review: Recent developments in researches on Fusarium head blight of wheat in Canada // Can. J. Plant Pathology. 2000. V. 22. № 1. P. 1-8.

Gilchrist L., Rajaram S., Crossa. J. New sources of scab resistance and breeding progress at CIMMYT // Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab resistance, 5-11 May, 2000, China. 2000. P. 194-199.

Goral T., Gruszecka D., Stefanowska G. The characteristics of Fusarium head blight resistance of hyprids of triticale with Aegilops and wheat x wheatgrass hybrids of wheat and durum wheat with Aegilops. In book of abstracts "Second International Symposium Cereals –Pathogens and stress factors interaction. Poznan, Polish, 15-17 September, 1997. P. 42.

Grausgruber H., Lemmens M., Burstmayr H., Ruckenbauer P. Evaluation of inoculation method for trsting Fusarium head blight resistance of winter wheat on single plant basis // Bodenkultur. 1995. V. 46. № 1. P. 39-49.

Hilton A.J., Jenkinson P., Hollins T.W., Parry D.W. Relationship between cultivar height and severity of Fusarium ear blight in wheat // Plant Pathology. 1999. V. 48. P. 202-208.

Internet, www.nps.arsusda.gov/programs/cppvs.htm, 1999.

Jauhar P.P., Peterson T.S. Progress in producing scab-resistant germplasm of durum wheat. /In: Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab resistance, 5-11 May, 2000. China, 2000. P. 77-81.

Kolb F.L., Bai G.-H., Muehlbauer G.J., Anderson J.A., Smith K.P., Fedak G. Mapping and manipulation with molecular markers // Crop Science. 2001. V. 41. P. 611-619.

Lemmens M., Josephs R., Schuhmacher R., Grausgruber H., Buerstmayer H., Ruckenbauer P., Neuhold G., Fidesser M., Krska R. Head blight (Fusarium spp.) on wheat: investigations on the relationship between disease symptoms and mycotoxin content // Cereal Res. Commun. 1997. V. 25. № 3/2. P. 459-465.

Leslie J.F., Summerell B.A. The Fusarium laboratory manual. Blackwell. 2006. 388 p.

Levitin M., Ivashenko V., Shipilova N., Gagkaeva T. Fusarium head blight of the cereal crops in Russia // Plant Protection. 2000. V. 51 P. 111-122.

Lianfa S., Song Q., Qi S. A preliminary study on application of synthetic hexaploids derived from T.durum/ Ae.tauschii crosses in common wheat for resistance to Fusarium head blight // Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab resistance, 5-11 May, 2000, China. 2000. P. 42-46.

Lienemann K., Oerke E., Dehne H.-W. Effect of differences among wheat genotypes on the occurrence and damage caused by Fusarium head blight. /Book of abstracts: 6th European Fusarium Seminar and Third COST 835 Workshop of Agriculturally Important Toxigenic Fungi, Berlin, Germany, 11-16 September 2000, 2000. P. 26.

Liu S, Abate Z.A., McKendry A.L. Inheritance of Fusarium head blight resistance in the soft red winter wheat Ernie // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 110. № 3. P. 454-461.

Liu W., Langseth W., Skinnes H., Elen O.N., Sundheim L. Comparison of visual head blight rating, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with Fusarium culmorum // Europ. J. Plany Pathology. 1997. V. 10. P. 589-595.

Luzzardi G.C. Wheats for tropical environment // Proc. Intern. Symp. Mexico, D.F. 1984. P. 158-168.

Marasas W.F.O., Nelson P.E., Toussoun T.A. Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press. 1984. P. 1-328.

Mesterhasy A. Types and components resistance to Fusarium head blight of wheat // Plant Breed. 1995. V. 114. P. 377-386.

Mesterhazy A. Methodology of resistance testing and breeding against Fusarium head blight in wheat and results of the selection // Cereal Res.Commun. 1997. V. 25. № 3/2. P. 651-654.

Mesterhazy A. Progress in breeding of wheat and corn genotypes not susceptible to infection by Fusaria // Fusarium: mycotoxins, taxon. and pathogenicity. 1989. P. 357-386.

Mesterhazy A. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of Fusarium graminearum and F.culmorum and in resistance to Fusarium head blight // European J. of Plant Pathology. 2002. V. 108. № 7. P. 675-684.

Mesterhazy A. Theory and practice of the breeding for Fusarium head blight in wheat // J. Appl. Genetic. 2002. V. 43A. P. 289-302.

Mesterhazy A. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat // Plant Breeding. 1995. V. 114. P. 377-386.

Mesterhazy A., Bartok T., Mirocha C.G., Komoroczy R. Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding // Plant Breeding. 1999. V. 118. P. 97-110.

Miedaner T. Breeding wheat and rye for resistance to Fusarium head blight // Plant Breeding. 1997. V. 116. P. 201-220.

Miedaner T., Schilling A. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* tested on winter rye // European J. Plant Pathology. 1996. V. 102. P. 823-830.

Miller J.D., Young J.C., Sampson D.R. Deoxynivalenol and Fusarium head blight resistance in spring cereals // Phytopath. Z. 1985. V. 113. P. 359-367.

Mirocha Ch.J., Xie W., Filho E.R. Chemistry and detection of Fusarium Mycotoxins. In book: Fusarium head blight of wheat and barley. Ed. by K.J.Leonard and W.R.Bushnell. APD Press. 2003. P. 144- 164.

Mirosha C.J., Yu H., Evans C.K., Kolaczkowski E.K., Dill-Macky R. Chemistry and physiology of deoxynivalenol in pathogenesis // Cereal Res. Commun. 1997. V. 25. № 3/1. P. 309-313.

Muthomi J.W., Oerke E.-C., Dehne H.-W., Mutitu E.W. Susceptibility of kenyan wheat varieties to head blight, fungal invasion and deoxynivalenol accumulation inoculated with Fusarium graminearum // J. of Phytopathology. 2002. V. 150. № 1. P. 30-36.

Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identifications. The Pennsylvania State University Press. 1983. P. 1-193.

Nirenberg H. I. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium–Sektion Liseola // Mill. Biolog. Bundesan. für Land- und Forstwirt. Berlin-Dahlem, 1976. V. 169. P. 1–117.

Nyvall R.F. Chlamydosporum of Fusarium roseum 'graminearum' as survival structures // Phytopathology. 1970. V. 60. P. 1175-1177.

Parry D.W., Jenkins P., McLeod L. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review // Plant Pathology. 1995. V. 44. P. 207-238.

Proctor R.H., Desjardins A.E., McCornick S.P., Plattner R.D., Alexander N.J., Brown D.W. Genetic analysis of the role of trichothecene and fumanisin mycotoxins in the virulence of Fusarium // European J. of Plant Pathology. 2002. V. 108. № 7. P. 691-698.

Ribalkin P.N., Bespalova L.A., Kolesnikov F.A., Ablova I.B., Davoyan R.A. Breeding winter wheat for resistance to Fusarium head scab at the Krasnodar Research Institute of Agriculture // Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab resistance, 5-11 May, 2000, China. 2000. P.167-172.

Samuels G.J., Nirenberg H.I., Seifert K.A. Perithecial species of Fusarium // Fusarium. APS PRESS. 2001. P..1-13.

Schroeder H.W., Christensen J.J. Factor affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae* // Phytopathology. 1963. V. 53. P. 831-838.

Shen X. , Zhou M., Lu W. , Ohm H. Detection of Fusarium head blight resistance QTL in a wheat population using bulked segregant analysis // Theor Appl Genet. 2003. V. 106. P. 1041-1047.

Shnijders C.H.A. Diallel analysis of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat // Euphytica. 1990. V. 50. P. 171-179.

Snijders C.H.A. The inheritance of resistance to head blight caused by Fusarium culmorum in winter wheat // Euphitica. 1990. V. 50. P. 9-17.

Snijders C.H.A., Krechting C.F. Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in Fusarium head blight resistant wheat // Can J. Botany. 1992. V. 70. P.1570-1576.

Snijders C.H.A., Perkowski J. Effect of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and wheat kernels // Phytopathology. 1990. V. 80. P. 566-570.

Stack R.W. A comparison of the inoculum potential of ascospores and conidia of *Gibberella zeae* // Can.J. Plant Pathology. 1989. V. 11. P. 137-142.

Stack R.W., Elias E., Joppa L.R. Fusarium head blight reaction of durum wheat lines conditioned by *Triticum dicoccoides* // Phytopathology. 1999. V. 89. P. 74.

Stack R.W., Frogberg R.C., Casper H. Reaction of spring wheats incorporating Sumai#3- derived resistance to inoculation with seven Fusarium species // Cereal Res.Commun. 1997. V. 25. № 3/2. P. 667-671.

Takeda K., Kanatani R., Zhang C.L. Varietal variation of the scab disease resistance in wheat evaluated by the «Cut-spike» inoculation method // Breeding Sci. 1992. V. 42. № 3. P. 549-565.

Takeda. K., Heta H. Establishing the testing method and search for the resistant varieties to Fusarium head blight in barley // Japan. J. Breed. 1989. V. 39. Suppl. 2. P. 203-216.

Tamburic-Ilincic L., Fedak G., Schaafsma A.W. Study on deoxynivalenol (DON) and Fusarium head blight (FHB) resistance in a F_2 winter wheat population //J .Appl. Genetic. 2002. V. 43A. P. 333-340.

Tekauz A., McCallum B., Gilbert J. Fusarium head blight of barley in western Canada // Can. Plant Pathol. 2000. V. 22. P. 9-16

Thrane U. Developments in the taxonomy of Fusarium specie based on secondary metabolites. In book: Fusarium. APS PRESS. 2001. P. 29-49.

Ueno Y. Ceneral toxicity. In book: Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Ed. By Y.Ueno. Amsterdam. 1983. P. 135-146.

Van Eeuwijk F.A. Mesterhazy A., Kling Ch.I., Ruckenbauer P., Saur L., Burstmayr H., Lemmens M., Keizer L.C.P., Maurin N., Snijders C.H.A. Assessing non-spexificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of Fusarium culmorum, F.graminearum and F.nivale using a multiplicative model for interaction // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 221-228.

Van Ginkel M., Van der Schaar W., Yang Z.P., Rajaram S. Inheritance of resistance to scab in two cultivars from Brazil and China // Plant Disease. 1996. V. 80. P. 863-867.

Waldron B.L., Moreno-Sevilla B., Anderson J.A., Stack R.W., Frohberg R.C. RFLP mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in wheat // Crop Sci. 1999. P. 805-811.

Wan Y.,-F., Yen C., Yang J.-L., Liu D.-C. The diversity of resources resistant to scab in Triticeae (Poaceae) // Wheat Information Service. 1997. V. 84. P. 7-12.

Wearing A.H., Burgess L.W. Water potential and saprophytic growth of *Fusarium roseum* 'Graminearum' // Soil Biochem. 1977. V. 11. P. 661-667.

Wilcoxson R.D. Busch R.H., Ozmon E.A.Fusarium head blight resistance in speing wheat cultivars // Plant Dis. 1992. V. 76. P. 658-661.

Wisniewska H., Chelkowski J., Perkowski J., Busko M., Bocianowski J. Components of resistance against Fusarium culmorum in spring wheat // J .Appl. Genetic. 2002. V. 43A. P. 345-354.

Wong L.S.L., Abramson D., Telaus A., Leisle D., McKenzie R.I.H. Pathogenicity and mycotoxin production of Fusarium species causing head blight in wheat cultivars varying in resistance // Can. J. Plant Sci. 1995. V. 75. P. 261-267.

Wong L.S.L., Tekauz A., Leisle D., Abramson D., McKenzie R.I.H. Prevalence, distribution, and importance of Fusarium head blight in wheat in Manitoba // Can. J. Plant Pathol. 1992. V. 14. P. 233-238.

Wu Z, Shen Q., Lu.W., Yang Z. Development of gene pool with improved resistance to scab // Taigu Genetic Male –Sterile Wheat. 1987. P.134-144.

Xu Y., Fang Z. Method of testing the resistance of wheat cultivars to the scab and the differentiation of the virulence of the causal organism // Acta Phytopathological Sinica. 1982. V. 12. P. 53-57.

Yang Z., Gilbert J., Fedak G. New microsatellite markers for type I and type II resistance to Fusarium head blight in spring wheat // J .Appl. Genetic. 2002. V. 43A. P. 359-362.

Zhang X., Lijuan R., Zuowei Z., Weizhong L. Molecular markers for Fusarium head blight resistance in Chinese wheat cultivar // J. Appl. Genetic. 2002. V. 43A. P. 355-358.

Zhou B., Wang X., Chen P.D., Liu D.J., Friebe B., Gill B.S. Molecular cytogenetic characterization of wheat – *Leymus racemosus* translocation lines // Proceedings of the international symposium on wheat improvement for scab resistance, 5-11 May, 2000, China. 2000. P. 68-72.

Zhou W.-C., Kolb F.L., Bai G.-H., Domier L.L., Yao J.-B. Effect of individual Sumai 3 chromosomes on resistance to scab spread within spikes and deoxynivalenol accumulation within kernels in wheat // Hereditas. 2002. V. 137. P. 81-89.

Л.Г. Тырышкин, М.А. Колесова

СЕПТОРИОЗ КОЛОСА

Септориоз колоса пшеницы вызывает *S. nodorum*. Биология развития, вредоносность, методы работы с чистой культурой патогена описаны в разделе «Септориоз листьев». При поражении *S. nodorum* колосковых чешуй на них появляются темно-бурые и темно-фиолетовые пятна неправильной формы, которые быстро увеличиваются, темнеют и покрывают всю поверхность чешуй. Пятна в дальнейшем светлеют и на их поверхности проявляются пикниды. Заболевание может захватить и стержень колоса. При сильной вспышке болезни поражаются все чешуи, и инфекция распространяется на формирующееся зерно.

В пораженных колосьях образуются щуплые и морщинистые семена с бурыми пятнами. На срезах больных семян обнаруживается мицелий гриба. Инкубационный период возбудителя септориоза на колосе длится 12–16 дней. В зависимости от степени поражения колосьев *S. nodorum* масса колоса снижается на 2,3 – 14,6%, масса зерна с одного колоса – на 8,3 – 27,3%, а масса 1000 семян – на 15,8 – 31,3%. Всхожесть семян из колосьев, пораженных септориозом в средней и сильной степени, снижается на 9,5 – 12%. Заражение семян и поражение всходов находятся в прямой зависимости – из больных семян появляются пораженные всходы (Шестиперова, Полозова, 1973; Пыжикова, 1984; Васецкая и др., 1987; Пересыпкин и др., 1989).

Для изучения устойчивости пшеницы растения в ранней молочно-восковой стадии созревания опрыскивают суспензией спор гриба с концентрацией 10^7 спор/мл. Для приготовления суспензии должны использоваться споры как можно большего количества изолятов патогена, выделенных из популяций, собранных в разных эколого-географических регионах. Зараженные посевы укрывают полиэтиленом; учет развития болезни проводят на 15–17 день после инокуляции по шкале: 0 – отсутствие симптомов поражения; 1, 2, 3, 4 – поражено 10, 20, 30, 40% поверхности колосковых чешуй; 5 – поражено более 50% поверхности чешуй; 6 –

поражен весь колос (рис. 1.2.3.5.). Образцы без симптомов болезни и пораженные на балл 1 – высокоустойчивы; 2–4 ⌟ среднеустойчивы; 5 и 6 ⌟ восприимчивы.

Для экономии инфекционного материала возможно опрыскивание отдельных колосьев в поле или теплице. После инокуляции на зараженные колосья надевают полиэтиленовые пакеты и закрепляют их на растении скотчем. Кроме того, можно срезать колосья с выращенных в теплице растений. Срезанные колосья кладут на смоченную водой вату и опрыскивают суспензией спор патогена. В этом случае учет поражения грибом проводят на 10–12 день после инокуляции.

Для более точной характеристики образцов пшеницы можно вычислить показатель «площадь под кривой нарастания болезни» (раздел «Темно-бурая листовая пятнистость»). Для его вычисления необходима оценка поражения одних и тех же растений несколько раз после искусственной инокуляции.

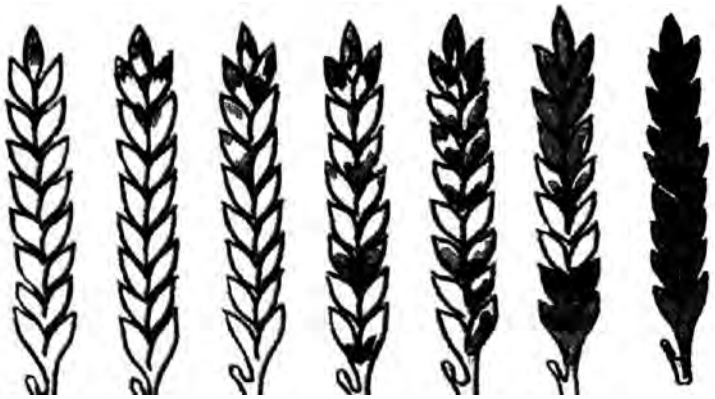


Рис. 1.2.3.5. Шкала учета поражения колосьев пшеницы *S. nodorum* (по Бабаянц и др., 1988).

Литература

Бабаянц Л., Мештерхази А., Вехтер Ф., Неклеса Н., Дубинина Л., Омельченко Л., Клечковская Е., Слюсаренко А., Бартош П. Методы селекции и оценки устойчивости пшениц и ячменя к болезням в странах – членах СЭВ. Прага. 1988. 321 с.

Васецкая М.Н., Куликова Г.В., Кобыльский Г.В., Москвитин Э.В., Баймакова Ч.А., Борзионова Т.И., Чигирев С.М. Методические указания по оценке устойчивости сортообразцов пшеницы к возбудителям септориоза. М. 1987. 24 с.

Пересыпкин В.Ф., Кирик Н.Н., Лесовой М.П., Коваленко С.Н., Королева И.Б., Кошевский И.И., Шелехова Л.Н., Минько Н.Д. Болезни сельскохозяйственных культур. Т.1. Болезни зерновых культур. – Киев: Урожай, 1989. 216 с.

Пыжикова Г.В. Септориозы зерновых культур. М.: ВНИИТЭИСХ, 1984. 64 с.

Шестиперова З.И., Полозова Н.Л. Мучнистая роса и пятнистости яровых зерновых культур. Л.: Колос, 1973. 56 с.

Л.Г. Тырышкин, М.А. Колесова

1.2.4. КОРНЕВЫЕ ГНИЛИ

Корневые гнили – заболевания корней и прикорневой части стеблей, вызываемые одним или комплексом видов полупаразитных грибов, приводящие к гибели всходов, отставанию в росте, отмиранию продуктивных стеблей, пустоколосице, щуплости зерна. Отмирание продуктивных стеблей происходит у растений, зараженных в период всходов, более позднее заражение приводит к щуплости колоса. Различают следующие типы корневых гнилей: обыкновенную, фузариозную), офиоболезную, церкоспореллезную, питиозную, ризоктониозную и др. (Фадеев и др., 1986; Ишкова и др., 2001). Растения могут одновременно поражаться возбудителями разных типов корневых гнилей, состав которых зависит, прежде всего, от почвенно-климатических условий региона возделывания культуры.

Обыкновенная (гельминтоспориозная) корневая гниль вызывается грибом *B. sorokiniana.* Встречается на растениях родов *Triticum, Hordeum, Secale, Avena, Elytrigia, Poa, Festuca, Bromus, Setaria, Lolium.* Биология возбудителя описана в разделе «Темно-бурая листовая пятнистость».

Болезнь вызывает деформацию, побурение проростков и корней, которые зачастую гибнут. В период всходы – кущение на влагалищах первых листьев появляются бурые полосы и пятна. Во время трубкования – формирования зерновки происходит побурение узла кущения и оснований стеблей, первого подземного и надземного междоузлий. Грибница коричневая, располагается по межклеточникам, а на поверхность растений через устьица или между клетками эпидермиса появляются конидиеносцы с темно-оливковыми, веретеновидными или удлиненно-яйцевидными конидиями. При наличии капельной влаги конидии прорастают конечными клетками. Источниками инфекции являются зараженное зерно, почва и пожнивные остатки пораженных растений (Бабаянц и др., 1988).

Обыкновенная корневая гниль часто развивается в эпифитотийной форме на Алтае, в Западной Сибири, на Урале, в Северном Казахстане и Поволжье с еже-

годными потерями урожая зерна пшеницы 10–20% и более (Тупеневич, 1970; Головин и др., 1971; Чулкина, 1979; Пересыпкин и др., 1991; Хасанов, 1992), в годы сильного поражения болезнью ущерб может достигать 50% (Шевченко, 1970).

Фузариозная корневая гниль вызывается грибами из рода *Fusarium* Link – *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. oxisporum,* реже *F. sporotrichiella*, *F. graminearum*. Поражает виды семейства *Poaceae*.

Конидиальное спороношение этих грибов образуется в спороложах. Конидии бесцветные, серповидные или прямые, на вершине тупые или заостренные, многоклеточные (макроконидии) и одноклеточные микроконидии.

Болезнь вызывает гибель семян и проростков, побурение корней, подземного междоузлия, оснований стеблей. Проявляется в виде бурых или коричневых штрихов, полос, пятен, окольцовывающих пораженные органы. Обычно в начале цветения наблюдается побурение оснований стеблей, которое увеличивается к уборке. Во влажную погоду пораженные части растений покрываются беловато-розовым налетом. Болезнь приводит к гибели всходов, отмиранию продуктивных стеблей, развитию неполноценных колосьев с щуплым зерном или к пустоколосице. Источниками инфекции являются зараженное зерно, почва и пожнивные остатки пораженных растений.

Оптимальными условиями для развития болезни являются температура почвы 18–26°С и относительная влажность 40–80%. Однако лучше болезнь развивается при недостаточной влажности и ее колебаниях. (Бабаянц и др., 1988).

Фузариозная корневая гниль распространена в Северо-Западных областях России, Западной Сибири, на Дальнем Востоке, в Ставропольском крае (Чулкина, 1989). Потери урожая зерна пшеницы от фузариозной корневой гнили могут достигать 50% (Шевченко, 1970).

Возбудитель **офиоболезной корневой гнили** – *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et D. L. Olivier. (синоним *Ophiobolus graminis* (Sacc.) Sacc., анаморфа – *Phialophora radicicola* Cain.). Встречается на видах родов *Triticum, Avena, Hordeum, Setaria* и некоторых других представителях семейства *Poaceae*.

Заболевание начинает проявляться в фазе всходов. Поражаются корни, основания стеблей, влагалища листьев. Корни темнеют, загнивают и разрушаются около узла кущения. При сильном поражении наблюдается гибель всходов. На нижней части стебля (первое и второе междоузлия) появляются некротические темно-коричневые пятна, которые покрываются черным бархатистым налетом гриба. Растения отстают в росте, желтеют. Листья, а иногда и все растение, отмирают. В фазе колошения образуются очаги белостебельных, карликовых, пустоколосых растений; после колошения наблюдается гибель продуктивных стеблей.

Мицелий частично поверхностный, формирующий аппрессории, частично погруженный в ткани хозяина; бледный или коричневый. Аскомы (перитеции) черные, гладкие, одиночные или скученные, образуются на стебле под прикрытием влагалища первого отмершего листа и созревают к концу вегетации; сначала погруженные, позднее при созревании выступающие; 330–500 мкм в диаметре, с изогнутым хоботком, часто достигающим длины перитеция; оболочка плодового тела толстая, угловатой текстуры. Аски удлиненно-булавовидные, прямые или изогнутые, на короткой ножке или сидячие, на верхушке закругленные, с тонкой оболочкой, 80–115 × 9–13 мкм, 8-споровые. Аскоспоры в пучках, нитевидные, изредка согнутые, посредине более широкие, к концам постепенно суживающиеся, молодые одноклеточные, при созревании с 3–7 перегородками, почти бесцветные, в массе слегка желтоватые, 60–90 × 3 мкм.

Анаморфа имеет длинные, коричневые, гладкие, септированные конидиеносцы с короткими прямостоячими веточками, слабо или сильно разветвленными, несущими на апексах фиалиды. Фиалиды гиалиновые или светло-коричневые, более широкие у основания и суживающиеся на вершине, прямые или изогнутые с хорошо заметным воротничком, 10–23 × 3–4 мкм. Конидии гиалиновые, серповидные, изогнутые, 5–9 × 0,7–1,7 мкм; формируют слизистые головки в виде шара у апекса фиалиды, которые, часто сливаясь с соседними, образуют вязкую массу. Склероции многочисленные, черные, округлые, около 1 мм в диаметре (Ишкова и др., 2001).

Церкоспореллезная корневая гниль. Возбудитель *Pseudocercosporella herpotrichoides* (Fron) Deighton. (Синоним *Cercosporella herpotrichoides* Fron, *Ramulispora herpotrichoides* (Fron) Arx., телеоморфа *Tapesia yallundae* Wallwork et Spooner).

Гниль основания стеблей (steam break, eye spot) называют также "эллипсовидной", "медальеновидной", "глазковой" пятнистостью, или "ломкостью стеблей" (Григорьев, 1976). Встречается на видах родов *Triticum, Hordeum, Secale, Avena, Elytrigia, Apera, Poa, Alopecurus, Agrostis, Dactylis, Festuca* и др.

Поражаются всходы и взрослые растения. Заболевание на всходах обнаруживается на колеоптиле и основании стебля в виде светлых овальных пятен, окруженных темно-коричневой каймой. На влагалищах нижних листьев и стебле (первое и второе междоузлие) пятна более вытянутые, эллипсовидные, желтоватые или бурые, 5–25 × 2–3 мм. К концу вегетации на поверхности пятен образуются мелкие черные микросклероции. На продольном разрезе стебля в зоне некрозов хорошо видна серая грибница. Во влажную погоду пораженные стебли полегают вследствие перелома в местах образования пятен. Снижение урожая зерновых от болезни может достигать 30% и более (Фадеев и др., 1986).

Гифы мицелия сначала тонкие, гиалиновые или желтоватые до коричневого, с тонкой и гладкой оболочкой, затем темнеющие: содержат вздутые почти шаровидные толстостенные клетки, формирующие строматические агрегации на поверхности и внутри тканей растений.

Конидиеносцы гриба цилиндрические или коленчато изогнутые, бесцветные или светло-оливковые, простые, иногда разветвленные, на вершине слегка утолщенные, выходящие пучком из устьица, короткие или удлиненные, 5–40 (обычно 10–20) × 2–3,5 мкм, иногда с 1–2 перегородками. Конидиогенные клетки моно- и полибластические, симподиально или реже перкуррентно пролиферирующие.

Конидии одиночные или небольшими группами (по 2–4 на конидиеносце), бесцветные, нитевидные или игловидные, слегка изогнутые, суживающиеся к вершине, с 4-8 перегородками, 30–105 × 1–3,5 мкм, с нетемнеющим рубчиком.

Ширина конидий у основания 2–3,5 мкм, в верхушечной части – 1–1,5 мкм. Нередко образуются короткие вторичные конидии, одноклеточные или с 2–3 перегородками, отходящие от основания или средней части конидий. Микросклероции черные, 100–500 мкм в диаметре, прорастающие мицелием или образуют на поверхности конидиальное спороношение (Ишкова и др., 2001).

Различные типы корневых гнилей часто имеют сходные симптомы заболевания. Однако они могут иметь характерные признаки, по которым их можно различить даже в полевых условиях. Труднее всего различить гнили, вызываемые *B. sorokiniana* и грибами рода *Fusarium* – различия между ними могут быть выявлены только во влажную погоду. На отмерших тканях растений развивается характерное спороношение грибов: бархатистый темно-оливковый, темно-бурый или почти черный конидиальный налет – при гельминтоспориозной инфекции, слизистый розовый или желтоватый – при фузариозной (Фадеев и др., 1986).

При офиоболезной гнили вначале корни, а затем влагалища прикорневых листьев и нижняя часть стебля покрываются бархатисто-черным налетом мицелия и загнивают; вся подземная часть и отчасти приземная часть растений чернеет и разрушается – становится трухлявой; растения легко выдергиваются из почвы.

При церкоспореллезной корневой гнили на пораженных участках появляются светлые эллиптические пятна, окруженные темно-кофейной каймой, а верхняя часть стебля заполняется дымчато-серым мицелием. Пораженные участки стебля теряют прочность, легко ломаются, и растения погибают (Фадеев и др., 1986).

Однако точная диагностика возможна только при микроскопировании грибов, выделенных из пораженных растений.

Выделение грибов и наработка инокулюма

Инфекционный материал выделяют из пораженных растений, собранных на посевах зерновых (Бабаянц и др., 1988).

Наиболее хорошее развитие мицелия грибов отмечают при выращивании на следующих питательных средах: для грибов рода *Fusarium, G. graminis* – агаровой

Чапека, на картофельно-глюкозном агаре (картофель (отвар) – 200 г, глюкоза – 20 г, агар – 20 г, дистиллированная вода – 1000 мл) с добавлением тиамина (100 мг/л) и биотина (15 мг/л); фузарии и *P. herpotrichoides* – на суслоагаре (7% неохмеленное пивное сусло, агар – 20 г, 50% молочная кислота – 2 мл, дистиллированная вода – 1000 мл); *B. sorokiniana* – на агаровой среде Чапека либо ЧЛМ (Григорьев и др., 1976; Бабаянц и др., 1988).

Наилучшее развитие различных грибов происходит на тех субстратах, на которых они развиваются в природе – соломе, зерне овса, ячменя, пшеницы, кукурузы. Возбудители корневых гнилей гриба родов *Fusarium* и *Bipolaris* лучше растут и образуют токсичные вещества на зернах овса и пшеницы, гриб *P. herpotrichoides* – кукурузы, *G. graminis* – овса с добавлением соломы (Григорьев, 1976).

Для наработки инокулюма в колбы емкостью 200–300 мл засыпают зерно и заливают его водой на 8–10 ч, после чего воду сливают, оставляя 1/5 часть ее от объема зерна. Автоклавирование зерна проводят дважды по 1 ч через день при давлении 1,2–1,5 атм. После охлаждения в колбы вносят культуру гриба. Колбы инкубируют в течение 14 дней. Для размешивания культур колбы встряхивают не реже двух раз в сутки. Заросший грибом субстрат рассыпают на полиэтиленовой пленке или в кюветы и сушат при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния 3–4 суток. Хранят споровый материал в холодильнике в течение года.

Методы оценки устойчивости к корневым гнилям

При оценке ювенильной устойчивости к обыкновенной и другим видам корневых гнилей в лабораторных условиях используют "рулонный" метод. Предварительно инфицированные патогенами семена изучаемых образцов раскладывают зародышевой частью вниз по 100 штук на увлажненных лентах фильтровальной бумаги, отступив от края на 5 см. Затем семена накрывают второй лентой фильтровальной бумаги и лентой коррекса на уровне расположения семян. Ленты сворачивают в нетугой рулон и помещают в стеклянный стакан, заполненный на 1/4 водой (Бенкен, Хрустовская, 1977).

Мы используем модифицированный "рулонный" метод оценки. На полоску пергамента раскладывают не зараженные семена, рулоны сворачивают и вертикально помещают в эксикатор с водой. После прорастания семян эксикатор переносят на светоустановку (освещенность 2500 лк, температура 20–22°С). Через 2–3 дня рулоны разворачивают, корни и колеоптиле опрыскивают из пульверизатора водной суспензией спор *B. sorokiniana* с концентрацией 50 тыс. конидий в 1 мл.

Учет развития болезни на корнях и колеоптиле проводим на 15-й день после заражения по шкале: 0 – отсутствие симптомов; 1 – отдельные темные точки на колеоптиле и корнях; 2, 3 и 4 –потемнение 10, 50 и 70% корневой системы; 5 – вся корневая система коричневого цвета, 6 – гибель растения.

Выделившиеся слабо пораженные образцы обязательно тестируют при выращивании в твердом субстрате, инфицированном патогенами. Например, возможна оценка в «инфицированном песке». Песок стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 120–180°С в течение 6–8 часов. Охлажденный песок помещают в кюветы с высоким бортиком, тщательно перемешивают с водной суспензией конидий гриба. Для *B. sorokiniana* окончательный титр гриба должен составлять не менее 2×10^4 конидий на 1 г песка.

Семена образцов предварительно замачивают в небольшом количестве воды. При появлении первых корней и проростка без симптомов заболевания, растения высаживают в инфицированный песок. Через 15 дней растения промывают и оценивают поражение корневой системы и колеоптиле по упомянутой выше шкале.

Все выделившиеся в лаборатории устойчивые формы обязательно должны быть оценены в условиях полевых инфекционных фонов.

Для создания инфекционного питомника подбирают участок, отличающийся высоким плодородием почвы и выравненностью. На участке производят уравнительный посев какой-либо культуры с последующим дробным учетом урожая. Культуру грибов вносят в почву под пахоту за 15–20 дней до посева. Для этого поле разбивают на равные участки площадью не более 25 м^2. Соответственно числу намеченных участков отвешивают навески инфекционного материала. Ин-

фекцию вносят вразброс, равномерно распределяя ее по полю, после чего его дважды перепахивают. Первый раз (немедленно после разброса инокулюма) пашут на глубину 10–12 см, второй раз – на глубину, обычную для посева зерновых в данной зоне. Если почва мягкая, первую вспашку заменяют культивацией. Дальнейшая работа заключается в изучении эффективности действия инфекционного фона и его выравненности. Для этого производят повторный уравнительный посев, но теперь уже той культуры, испытание которой предполагается на инфекционном фоне. Сеют обычно районированный в данной зоне сорт. После всходов участок разбивают на квадраты, площадь которых примерно равна площади делянки, предполагаемой при проведении испытания. На каждом из них выделяют учетный рядок растений (1–2 погонных м), на котором в процессе вегетации определяют процент выживших и белостебельных растений. Урожай зерна учитывают поделяночно. По варьированию показателей проявления болезни и вредоносности определяют пригодность инфекционного фона к работе. Нормальной считается выравненность, при которой коэффициенты вариации показателей проявления болезни составляют 12–15%, а вредоносности – 8–10%. Инфекционный участок делят на 2 части, одну из которых отводят под опыт, а вторую – под уравнительный посев. На следующий год участок чередуют. (Григорьев, 1976).

Для оценки устойчивости к фузариозной и офиоболезной корневым гнилям семена до посева выдерживают 24 ч в растильнях на фильтровальной бумаге, смоченной суспензией грибов (Бабаянц и др., 1988).

Для оценки устойчивости возможен посев образцов в почву, на которой длительное время (не менее 5 лет) выращивали восприимчивые сорта зерновых (McKenzie, Atkinson, 1968). Мы применяем индивидуальный полив растений в стадии 1–2 листьев суспензией возбудителя обыкновенной корневой гнили.

Учет корневых гнилей проводят после уборки по шкале: 9 – здоровые части и органы, 7 – желтоватая окраска пораженных частей и органов; 5 – изменение окраски от желтоватой до буроватой, единичные бурые полосы и пятна; 3 – сильное побурение, частичная трухлявость; 1 – отмершие части тканей и органов (Ба-

баянц и др., 1988). Для более точной характеристики устойчивости образца учитывают отдельно развитие болезни на первичных и вторичных корнях, подземных междоузлиях, корневой шейке, основании стебля (Григорьев, 1976). Мы применяем шкалу, используемую для оценки устойчивости ювенильных растений, дифференцированно для корней, подземного междоузлия и основания стебля.

Литература

Бабаянц Л., Мештерхази А., Вехтер Ф., Неклеса Н., Дубинина Л., Омельченко Л., Клечковская Е., Слюсаренко А., Бартош П. Методы селекции и оценки устойчивости пшениц и ячменя к болезням в странах – членах СЭВ. Прага. 1988. 321 с.

Бенкен А.А., Хрустовская В.Н. Лабораторная оценка болезнеустойчивости растений и паразитических свойств возбудителей обыкновенной корневой гнили злаков // Труды ВИЗР. 1977. Вып. 56. С. 55-57.

Головин П.Н., Арсеньева М.В., Халеева З.Н., Шестиперова З.И. Фитопатология. Л.: Колос, 1971. 360 с.

Григорьев М.Ф. Методические указания по изучению устойчивости зерновых культур к корневым гнилям. Л. 1976. 59 с.

Ишкова Т.И., Берестецкая Л.И., Гасич Е.Л., Власов Д.Ю. Учебно-методическое пособие по диагностике основных грибных болезней хлебных злаков. СПб. 2001. 76 с.

Пересыпкин В.Ф., Кирик Н.Н., Лесовой М.П., Коваленко С.Н., Королева И.Б., Кошевский И.И., Шелехова Л.Н., Минько Н.Д. Болезни сельскохозяйственных культур. Т. 1. Болезни зерновых культур. Киев: Урожай, 1989. 216 с.

Пересыпкин В.Ф., Тютерев С.Л., Баталова Т.С. Болезни зерновых культур при интенсивных технологиях их возделывания. М.: Агропромиздат, 1991. 272 с.

Тупеневич С.М. Корневая гниль яровой пшеницы в засушливых районах Северного Казахстана и степных районах Западной Сибири // Корневые гнили хлебных злаков и меры борьбы с ними. М.: Колос, 1970. С. 3-8.

Фадеев Ю.Н., Бенкен А.А., Буга С.Ф., Обухович Е.М., Жевите-Кульветене З.И., Лопухина Г.П. , Чулкина В.А. , Рейтер Б.Г., Койшибаев М.К., Григорьев М.Ф., Михайлина Н.И., Андреева Е.И., Барбаянова Т.А., Черпак В.Ф., Тарабрин Г.А., Кирюхина Р.И., Кузнецова И.Ф. Защита зерновых культур от корневых гнилей. М.: Агропромиздат, 1986. 37с.

Хасанов Б.А. Определитель грибов – возбудителей «гельминтоспориозов» растений из родов *Bipolaris*, *Drechslera* и *Exserohilum*. Ташкент. 1992. 244 с.

Чулкина В.А. Защита зерновых культур от обыкновенной гнили. М.: Россельхозиздат, 1979. 72 с.

Шевченко Ф.П. Корневые гнили яровой пшеницы в Западной Сибири и система мер борьбы с ними // Корневые гнили хлебных злаков и меры борьбы с ними. М.: Колос, 1970. С. 14-17.

Mathre D.E., Johnston R.H., Grey W.E. Diagnosis of common root rot of wheat and barley. 2003. – Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-0819-01-DG.

McKenzie H., Atkinson T.G. Inheritance of Thatcher-type resistance to common root rot in spring wheat // Can. J. Plant Sci. 1968. V. 48. P. 479-486.

2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К НАСЕКОМЫМ

А.Г. Семенова

2.1. ЗЛАКОВЫЕ МУХИ

Распространенными вредителями зерновых культур являются мухи из различных семейств отряда двукрылых (Diptera): галлиц (Cecydomyiidae), опомизид (Opomyzidae), злаковых мух (Chloropidae), минирующих мух (Agromyzidae), цветочниц (Antomyiidae). Личинки этих насекомых ведут скрытный образ жизни. Одни из них повреждают стебли, реже – колосья, другие – минируют листья, выедая паренхиму.

Вредоносность двукрылых различна и зависит как от культуры, так и от зоны распространения. В Башкирии, Татарстане, Кировской, Воронежской областях всходы озимых почти ежегодно повреждают личинки озимой мухи и опомизы. Количество погибших растений нередко достигает 30–50%, недобор урожая при этом может составлять 2,3–2,8 ц/га (Дядечко, 1980). По наблюдениям А.Г. Махоткина (2003), гибель поврежденных растений до кущения в среднем составляет 12,6%. Подгоны, которые интенсивно развиваются после гибели центрального листа, уже не в состоянии компенсировать потери урожая. В центральном Черноземье озимая муха может быть более опасна для озимых зерновых, чем шведская муха. Вредоносность минирующих мух проявляется, если на листе питаются 2–3 личинки. Во Франции в 1973 г. отмечалось до 12 личинок на лист. Это привело к тому, к середине июня листья ячменя были полностью иссушены (Агильяр, Шамбон, 1975). Однако влияние на урожай этих фитофагов плохо изучено. Точное определение видов мух, особенно на вредящей фазе, является обязательным условием при организации работ по выявлению устойчивых форм растений. Ниже приведена таблица с краткими характеристиками морфологии и биологии основных видов двукрылых, вредящих на злаках, а также рисунки личинок некоторых из них.

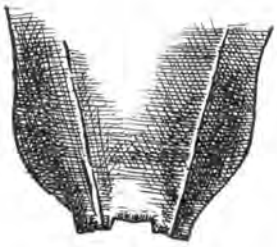
Таблица 2.1.1. Характеристика основных видов мух, повреждающих стебли зерновых культур.

Вид	Семейство	Морфология		Зимует (фаза развития)	Поколений в год	Характеристика повреждений	Распространение	Повреждаемые культуры
		имаго	личинки					
Гессенская муха *Mayetiola destructor* Say.	Галлицы Cecidomyiidae	2,5-3,5 мм, комарообразное тело, усики 17-члениковые	4-4,5 мм, тело плоское веретеновидное, молочно-белое с зеленой полоской	Личинка в пупарии за влагалищем листа	2 – 5	Кущение, трубкование: стебли темно-зеленые, утолщенные, остановка в росте; колошение: коленчатые изгибы	Европейская часть России (кроме севера), Кавказ, Средняя Азия	Пшеница, рожь, ячмень, дикорастущие злаки
Овсяная шведская муха *Oscinella frit* L.	Злаковые мухи Chloropidae	1,5-2 мм, тело черное, переднеспинка выпуклая, голени черные	4-4,5 мм, тело цилиндрическое, анальный сегмент с короткими, широко расставленными отростками.	Личинка или пупарий внутри стебля	2 – 5	Кущение: усыхание центрального листа; налив зерна: питание внутри отдельных зерновок	Повсеместно. Вредит преимущественно в нечерноземной зоне	Овес, ячмень, рожь, пшеница
Ячменная шведская муха *Oscinella pusilla* Mg.	Злаковые мухи Chloropidae	1,5-2 мм, тело черное, переднеспинка выпуклая, голени передних и средних ног желтые	4,5-5 мм, тело цилиндрическое, анальный сегмент с короткими, широко расставленными отростками.	Личинка или пупарий внутри стебля	2 – 5	Кущение: усыхание центрального листа.	Повсеместно. Вредит преимущественно в засушливых районах	Ячмень, пшеница, рожь, кукуруза
Зеленоглазка *Chlorops pumilionis* Bjerk	Злаковые мухи Chloropidae	3-4 мм, тело светло-желтое, на переднеспинке 3 темные полосы, на голове треугольное пятно	7 мм, тело цилиндрическое, анальный сегмент уплощен, отростки короткие, над жвалами – окуляры	Личинка II – III возраста внутри стебля	2	Кущение: побег укорочен, утолщен; колошение: бороздка на колосоножке	Северо-запад, центр России, Кавказ, Западная Сибирь	Пшеница, ячмень

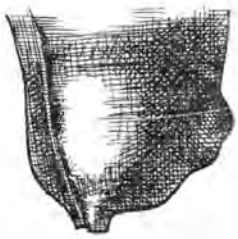
Меромиза *Meromiza nitriventris* Meg.	Злаковые мухи Chloropidae	3-3,5 мм, тело светло-желтое, узкое, задние бедра утолщены, 3 темные полосы на брюшке	7-8 мм, тело изумрудно-зеленое, анальный сегмент без отростков, с глубокой выемкой, при основании жвал хитиновое полукольцо	Личинка последнего возраста внутри стебля	2	Кущение: усыхание центрального листа; трубкование: уничтожение зачаточного колоса; колошение: уничтожены отдельные колоски	Европейская часть России, Кавказ, Западная и Восточная Сибирь, Ср. Азия	Рожь, ячмень, пшеница, овес
Опомиза *Opomiza florum* L.	Опомизиды Opomyzidae	3-4,3 мм, тело тонкое, ржаво-желтое, крылья желтые с 3-я пятнами, концы тупо закруглены	8 мм, тело кремово-желтое, анальный сегмент с выемкой и широкими отростками, добавочный склерит у основания жвал	Яйца в почве	1	Кущение: усыхание центрального листа, личинка может переходить в другие побеги (у основания стебля – отверстие)	Лесная, степная зоны Европейской части России	Озимые пшеница, ячмень, рожь
Яровая муха *Phorbia securis* Tien	Цветочницы Anthomyiidae	4,5-5 мм, тело черное в коричнево- сером опылении, крылья дымчатые	8 мм, тело желто-белое, цилиндрическое, анальный сегмент не скошен, 14 конических бугорков	Пупарии в почве	1 – 2	Кущение: центральный лист засыхает; при повреждении узла кущения растение погибает	Степная зона Европейской части России, Кавказ, Сибирь	Яровые и озимые пшеница, рожь, ячмень; пырей
Озимая муха *Delia coarctata* Flt.	Цветочницы Anthomyiidae	5-8 мм, тело светло-серое в густых волосках, ноги желтые	7 мм, тело белое, анальный сегмент тупой, скошен, по нижнему краю 4 бугорка	Яйца в почве	1	Как у опомизы, у основания стеблей входные и выходные отверстия	Лесостепь Европейской части России, Урал, Сибирь.	Озимые пшеница, рожь, из дикорастущих – пырей

Шведская муха

1



2

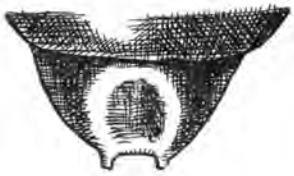


3

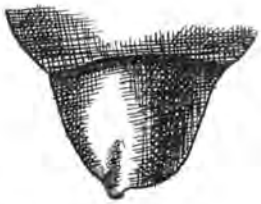
4

Зеленоглазка

1



2



3

4

Меромиза

1

2

3

4

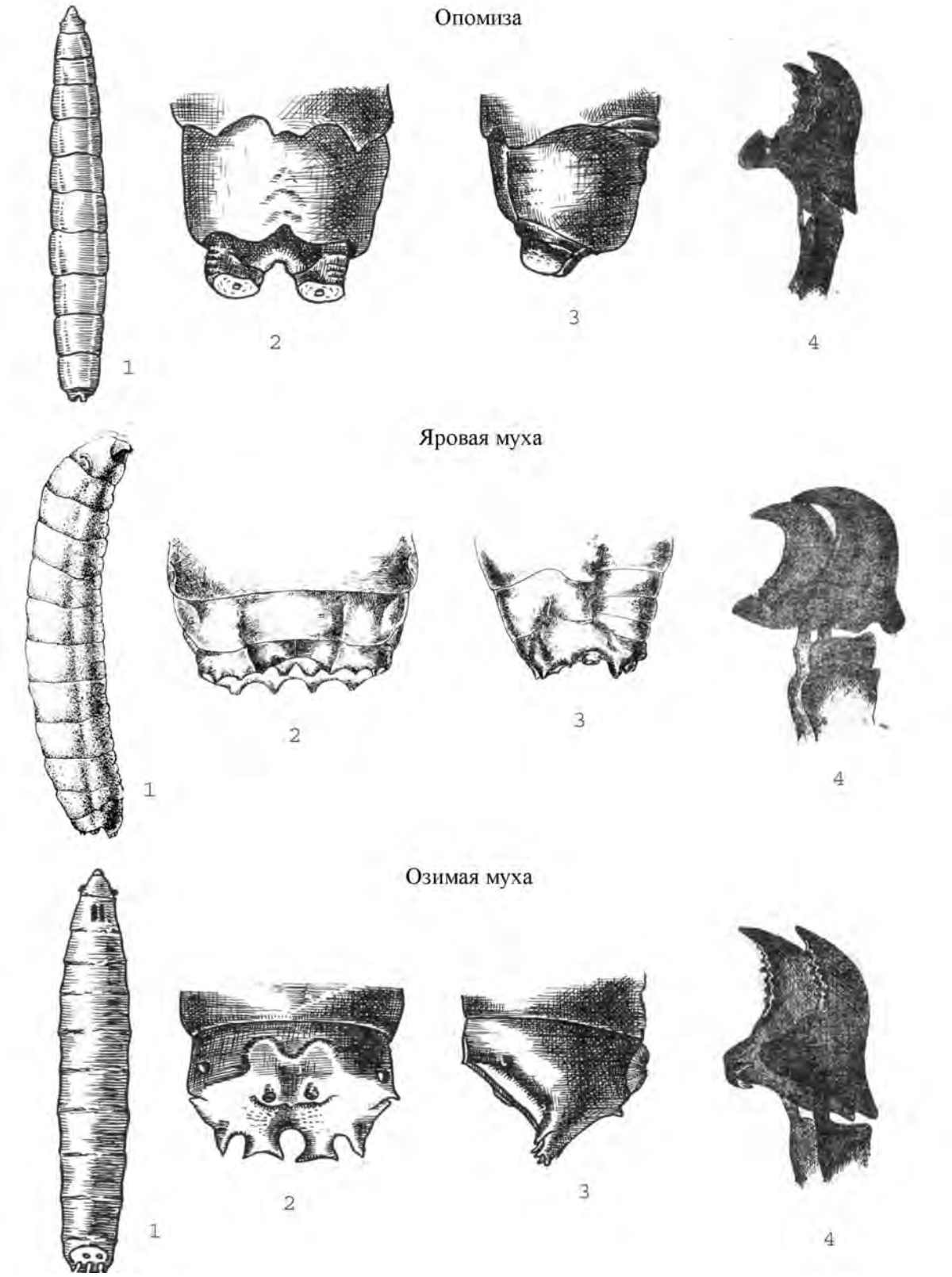


Рис. 2.1.1. Личинки мух, вредящих на злаках:
1 – общий вид; 2 – последний сегмент, вид сверху; 3 – последний сегмент, вид сбоку;
4 – ротовые крючья (по Заговора, 1979)

Шведская и гессенская мухи, вследствие своей высокой вредоносности, уже многие годы привлекают достаточно пристальное внимание иммунологов. Известен ряд механизмов, определяющих устойчивость растений к этим насекомым, разработаны методы оценки устойчивости растений.

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ШВЕДСКОЙ МУХЕ

Эколого-биологические особенности насекомого

Зерновые культуры повреждают 2 вида шведских мух – овсяная (*Oscinella frit* L.) и ячменная (*Oscinella pusilla* Meig.). Овсяная шведская муха (рис. 2.1.2.) гигрофильна, распространена преимущественно в местностях с влажным климатом, в то время как ячменная шведская муха более сухо- и теплолюбива, поэтому она преобладает в южных регионах России с засушливым климатом. Овсяная шведская муха повреждает овес, ячмень, рожь, пшеницу, кукурузу, в то время как *O. pusilla* – узкий олигофаг, предпочитающий развиваться на ячмене.

Зимуют личинки последнего, третьего возраста в стеблях озимых, падалицы, диких злаков. Сильные морозы в малоснежные зимы отражаются на численности перезимовавшего поколения. Весной личинки, не приступая к питанию, окукливаются. Начало вылета мух зависит от предшествующего развития насекомого. Осенью в холодную погоду в зиму уходят личинки младших возрастов, а в теплую осень они достигают последнего возраста, часть из них окукливается, поэтому весной имаго появляется раньше обычного. В годы с холодной весной развитие куколок и вылет мух задерживается. Фенологически лет имаго шведских мух совпадает с цветением ранних сортов яблони. В Нечерноземной зоне начало лета первого поколения вредителя отмечено с третьей декады мая до второй декады июня, второе поколение обычно вылетает в конце июля, а третье, личинки которого уходят на зимовку, – на месяц позже. В южных регионах России шведские мухи дают до 5 поколений в год, вылет имаго перезимовавшего поколения происходит в конце апреля.

Рис. 2.1.2. Овсяная шведская муха:
1 – имаго; 2 – яйца; 3 – личинка; 4 – анальный сегмент личинки; 5 – пупарий;
6 – поврежденное растение, 7 – повреждение колоска (по Волкову и др., 1955)

Мухи дополнительно питаются 1–2 недели нектаром цветов и пасокой трав. Для обитания и откладки яиц насекомые предпочитают участки с низкой растительностью, хорошо освещенные и прогреваемые солнцем, защищенные от ветра. Самки откладывают яйца преимущественно на молодые растения в фазе 2–3 листьев, что соответствует II этапу органогенеза. Яйца самки располагают на листьях, за колеоптиле, на стебле. Личинки обоих видов питаются внутри стебля недифференцированными тканями конуса нарастания. Кроме того, личинки второго и последующих поколений овсяной шведской мухи повреждают зерновки в колосьях, уничтожая эндосперм и зародыш семени. В этом случае самки откладывают яйца на колосья, сбоку чешуек колосков. Условия для полноценного питания вредящей фазы создаются только при строгой синхронизации в развитии личинок и повреждаемых ими органов растений. Личинки должны проникнуть в побег или зерновку, когда органообразовательные процессы в них только начинаются, а питательные вещества находятся в простых формах. Пищеварительные секреты личинок богаты протеолитическими ферментами, расщепляющими белки, и бедны амилолитическими ферментами, которые расщепляют сложные углеводы (крахмал). Однако известно, что личинки используют простые сахара, которыми богаты именно эмбриональные и слабо дифференцированные ткани (Нарчук, 1987; Шапиро, 1989). Выделение слюнными железами ферментов приводит к обширному лизису клеток и тканей в зоне питания, в результате чего образуется так называемая «физиологическая капсула», которая стабилизирует условия жизни личинки внутри стебля. Пищеварительные ферменты приостанавливают рост и развитие растения и, кроме того, обладая бактериостатическими свойствами, сдерживают размножение микрофлоры, что способствует нормальному питанию и окукливанию вредителя. В случае совпадения уязвимой фазы растения и агрессивной фазы шведской мухи происходит полное разрушение конуса нарастания внутри стебля, что внешне проявляется в усыхании центрального листа. Для овса установлен критический показатель – 90 градусо-дней (при пороге развития

вредителя 8℃), при совпадении которого с фазой растения 1–2 листа возможно значительное повреждение культуры (Lindblad, 1996). При более позднем проникновении личинки к конусу нарастания, когда он уже прошел первые этапы дифференциации, наблюдается частичное уничтожение точки роста. В таком случае поврежденные растения формируют неполный, часто деформированный колос или метелку.

Реакция растений на повреждение стеблей шведской мухой зависит от их возраста. Чем моложе растение, тем оно более чувствительно к повреждению. При повреждении главного стебля молодое растение погибает или снижает урожай более чем на 50%, количество зерен в колосе уменьшается на 36–66,9% (Беляев, 1974; Чаева, Иванова, 1982). Повреждение боковых стеблей не вызывает значительных потерь урожая. Считают, что гибель 40% подгона не причиняет вреда растению, так как в этом случае больше питательных веществ и воды достается оставшимся продуктивным стеблям (Володичев, 1982). Анализ поврежденности растений в зависимости от сроков сева показал, что посев ячменя в оптимальные для Нечерноземной зоны сроки – в начале мая – (естественный фон) часто позволяет растениям "уйти" от повреждения насекомым. Смещение сроков сева на 20–30 дней обуславливает повышение поврежденности в 5–8 раз (провокационный фон), что необходимо для более объективной дифференциации образцов по устойчивости (Нефедова, Семенова, 1996).

Механизмы устойчивости

Органогенетический барьер

Ускоренное прохождение растениями фазы 2–3 листьев (II-III этапов органогенеза), сопряженной с агрессивной фазой шведской мухи. Всходы успевают пройти критическую фазу до начала откладки яиц вредителем. В этом случае самки откладывают яйца не на главный стебель, а на боковые побеги растения. Устойчивые сорта характеризуются высокими темпами закладки и дифференциации в конусах нарастания основных элементов продуктивности, что определяет равномерное выколашивание.

Ростовой барьер

Быстрый рост растений с интенсивным разворачиванием листьев. Яйца, отложенные насекомыми на быстрорастущие части растений, за инкубационный период оттесняются от конуса нарастания на значительное расстояние. Отродившиеся личинки вынуждены питаться дифференцированными тканями растения, что приводит их к гибели.

Морфологический барьер

Сомкнутая, прямостоячая форма куста с продуктивной кустистостью более 3-х. Создаются условия микроклимата, неблагоприятные для откладки яиц и питания шведской мухи. Высокая продуктивная кустистость обеспечивает компенсацию потерь урожая при повреждении растений насекомым.

Растения с плотно прилегающим к стеблю колеоптиле, узкими опушенными листьями, частым расположением проводящих пучков на них, а также высоким содержанием сухого вещества.

Физиологический барьер

Выявлен репеллентный эффект бензойных кислот и кумарина, присутствующих в листьях, по отношению к имаго шведской мухи. Устойчивые сорта характеризуются более низким содержанием хлорофилла, каротиноидов, а также меньшей активностью фермента пероксидазы по сравнению с повреждаемыми образцами.

Совокупность действия этих механизмов создает неблагоприятные условия как при откладке яиц вредителем, так и при питании личинок (Рябченко, 1992; Вилкова и др, 2004; Семенова, 2004).

Методы оценки устойчивости

Полевые методы

Естественный фон

Оценку устойчивости образцов зерновых культур к шведской мухе на естественном фоне целесообразно проводить при средней поврежденности стеблей на

посеве не ниже 10–15%. Образцы высевают на метровых делянках, через каждые 20 номеров – стандарт (районированный сорт с известной устойчивостью). Оценку проводят визуально в фазу начала выхода в трубку культуры – период полного проявления вреда, нанесенного фитофагом. Используют следующую шкалу:

1 – повреждено менее 5% стеблей;

2 – повреждено от 6 до 15% стеблей;

3 – повреждено от 16 до 25% стеблей;

4 – повреждено от 26 до 40% стеблей;

5 – повреждено более 40% стеблей.

Провокационный фон

Образцы, выделившиеся по устойчивости к шведской мухе на естественном фоне, подвергают более жесткой оценке на провокационном фоне, при создании которого учитывают положительные поведенческие реакции насекомого.

Изучаемые образцы высевают в части поля общего посева яровых зерновых культур, которое защищено от холодных северо-западных ветров лесополосой. Производят разреженный посев (расстояние между семенами 5 см), на 2–3 недели позже общепринятых для данной зоны сроков. Образцы высевают по 2 рядка длиной 1 м в 3-х кратной повторности. С целью повышения концентрации шведской мухи на посеве изучаемых образцов, по периферии участка с осени (в случае оценки яровых культур) высевают неустойчивый сорт, в стеблях которого происходит зимовка личинок вредителя. Весной, после вылета имаго, посев неустойчивого сорта подкашивают. Пасока, выделяющаяся на скошенном посеве, обеспечивает дополнительное питание взрослых насекомых. Вследствие этого мухи не улетают, а остаются вблизи растений изучаемых образцов и после созревания половой продукции откладывают на них яйца (Чесноков, 1956). На провокационном фоне проводят более детальные учеты, чем на естественном. Первый – в начале фазы кущения, определяют поврежденность главного стебля; 2-й – в фазу выхода в трубку подсчитывают общее ко-

личество поврежденных стеблей; 3-й – в фазу молочной спелости устанавливает продуктивную кустистость отдельных образцов.

В связи с большим количеством получаемых показателей для окончательной оценки используют метод суммы мест, где каждому образцу присваивают место (ранг) в ряду возрастающих (или убывающих) значений отдельного показателя (табл. 2.1.2.). Место 1 соответствует наилучшей характеристике устойчивости. После установления ранговых значений признака для каждого образца подсчитывают общую сумму мест и вычисляют индекс устойчивости, который представляет среднее арифметическое из суммы мест. К устойчивым относят образцы с наименьшим значением индекса (Васильев, 1980). Конечная цель проводимых исследований – выделить образцы конкретной зерновой культуры, характеризующиеся меньшей поврежденностью стеблей личинками шведской мухи, а также выносливостью растений, и включить их в селекционный процесс по выведению сортов, сочетающих признак устойчивости к фитофагу с высокими хозяйственными показателями.

На ячмене, овсе и пшенице, особенно в южных районах их выращивания, в период молочной спелости проводят учет поврежденности зерен в колосьях или метелках. Для этого по каждому образцу просматривают 10–15 колосьев, подсчитывают общее число зерен в каждом колосе, число поврежденных шведской мухой и вычисляют процент повреждения.

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ГЕССЕНСКОЙ МУХЕ

Эколого-биологические особенности насекомого

Гессенская муха (*Mayetiola destructor* Say) широко распространена в европейской части России, в Сибири, Средней Азии. Особенно вредоносна в Черноземной полосе, повреждает озимую и яровую пшеницу, встречается также на ячмене и диких злаках.

Таблица 2.1.2. Результаты оценки устойчивости сортов ячменя к шведской мухе

№ по каталогу ВИР	Сорт	Повреждено главных стеблей		Повреждено всех стеблей		Повреждено зерновок		Продуктивная кустистость		Сумма мест	Ранг устойчивости
		%	ранг	%	ранг	%	ранг	стеблей	ранг		
27928	Эней	20,8	4	5,6	4	2,5	2	4,9	3	13	3
27930	Прикумский 319	8,7	2	2,8	2	1,2	1	2,8	5	10	2
21796	Оренбургский 33	40	5	6,5	5	4,2	4	5,4	2	16	5
28969	Empress	2,7	1	2,7	1	3,0	3	5,7	2	6	1
28190	Kilta	10	3	3,8	3	5,5	5	3,5	4	15	4

Зимует взрослая личинка за влагалищем листа озимых злаков. Весной личинки окукливаются, мухи вылетают в конце апреля – начале мая и без дополнительного питания приступают к откладке яиц. Яйца размещаются на верхней стороне листьев цепочкой по 2–3 шт. Имаго живут 5–7 дней. Отродившиеся личинки мигрируют за влагалища листьев, где питаются в зоне меристематических тканей, там же по окончании питания они окукливаются. Критическими в жизни личинок являются период миграции и внедрение в ткани растений для питания.

Уровень потерь урожая зависит от фазы развития растения в период активного питания личинок, что определяется сортовыми особенностями и сроками сева. При заселении растений в фазе кущения поврежденные стебли выделяются темно-зеленой окраской и некоторой утолщенностью; листья расширены, затем желтеют и погибают. Останавливается рост растения. Имаго летних поколений вылетают, когда злаки находятся в фазе выхода в трубку, колошения и цветения. Отродившиеся личинки питаются за влагалищами листьев интеркалярной (вставочной) меристемой, находящейся в узлах. В местах питания личинок появляются вмятины, стебель сильно утончается и поникает. В силу гелиотропизма поникшее растение стремится выпрямиться, и на стебле образуется коленчатый изгиб.

Растения пшеницы поздних сроков сева больше страдают от повреждений гессенской мухой, чем при ранних сроках высева. При этом количество погибших растений возрастает в 2–3 раза и в 3–5 раз увеличивается число невыколосившихся главных стеблей (Жармухамедова, 1987). Позднеспелые сорта более подвержены повреждению мухой, чем раннеспелые, так как активная деятельность личинок совпадает с кущением и началом выхода в трубку, когда растения в меньшей степени могут противостоять вредителю. Муха развивается в 2–5 поколениях, что зависит от зоны. При низкой влажности в степной зоне личинки в пупариях впадают в летнюю диапаузу. В этом случае вылет мух происходит в конце периода вегетации, а личинки развиваются на всходах озимых. При благоприятных условиях диапаузы нет.

Механизмы устойчивости

Органогенетический барьер

Выносливость растений к повреждениям мухой обеспечивает скорость прохождения начальных фаз развития – всходы-кущение-начало выхода в трубку, когда идет интенсивный рост и вытягиваются нижние междоузлия, идет закладка и формирование генеративных органов. К моменту массового вылета мух главные стебли таких растений менее привлекательны для откладки яиц вредителем, так как они быстро грубеют за счет лигнификации тканей и накопления кремнезема. Основную массу яиц самки откладывают на менее продуктивные стебли II и III порядков.

Морфологический барьер

1. Отсутствие опушенности листьев. Самка охотно откладывает яйца на опушенные листья (трихомы раздражают яйцеклад, стимулируя процесс откладки яиц).

2. Слабая степень выраженности жилок на листовой пластинке. Листья с четко выраженным жилкованием обеспечивают отродившейся личинке защиту от внешних воздействий и способствуют снижению затрат энергии на продвижение к месту питания – за влагалища листьев. Важная барьерная роль на пути проникновения личинок за влагалище листа принадлежит также лигуле (язычку).

3. Повышенное содержание кремния в клетках наружного эпидермиса листа, листовых влагалищ, стебля. Кремний придает прочность клеточным стенкам и способствует адсорбции пищеварительных ферментов личинки, затрудняя ее питание.

4. Механическая прочность стебля. Препятствует обламыванию колосоносных стеблей в месте питания личинок.

Репарационный барьер

Высокая способность поврежденных растений к кущению и быстрые темпы формирования нижнего узла кущения. Способствует образованию и отрастанию дополнительных стеблей при повреждении или гибели побегов из первого (верхнего) узла кущения (Вилкова и др., 2004).

Методы оценки устойчивости

Полевые методы

На естественном фоне устойчивость оценивают при уровне поврежденности растений 15–20%. В посеве достаточно иметь 200–300 растений каждого образца, а также устойчивый и неустойчивый контрольные сорта, высеваемых через каждые 10 образцов в опыте. Оценивают устойчивость в период кущения – выхода в трубку, когда поврежденные растения хорошо заметны. Такие растения находятся преимущественно в нижнем и среднем ярусах стеблестоя. Оценку проводят по шкале, учитывая состояние стеблестоя и наличие растений с явными признаками повреждения (усиленно кустящиеся, отстающие в росте, имеющие коленчатость стеблей):

1 – количество нормально развившихся стеблей близко к нормальному стеблестою, ярусность и коленчатость отсутствует (устойчивые сорта);

2 – 50–75% развившихся стеблей (среднеустойчивые сорта);

3 – 25–50% развившихся стеблей (слабоустойчивые сорта);

4 – не более 25% развившихся стеблей (неустойчивые сорта).

Образцы, поврежденность которых не превышает 2-х баллов, обследуют более детально. Отбирают пробы осенью на озимых посевах в фазе кущения; на яровых культурах – весной в начале выхода растений в трубку. Размер пробы – 2–4 погонных метра, а составляют ее из отрезков по 0,5 м, взятых в разных местах посева. Каждое растение вскрывают препаровальной иглой. При анализе проб учитывают:

- общее количество растений;
- количество поврежденных растений;
- количество погибших растений из числа поврежденных;
- общее количество личинок и пупариев в растениях;
- количество личинок и пупариев на одно поврежденное растение;
- рассчитывают среднее количество личинок и пупариев на 100 растений или на 1 $м^2$ посева.

Провокационный фон используют для повышения численности вредителя с целью проверки в более жестких условиях образцов, выделившихся по устойчивости к гессенской мухе на естественном фоне. Этот фон создают по такой же методике, как и для шведской мухи. Особенностью является отсутствие необходимости подкашивать приманочный посев для дополнительного питания имаго, поскольку *M. destructor* сразу после вылета из пупариев, не питаясь, приступают к откладке яиц.

Искусственный (инвазионный) фон

Образцы испытывают на фоне искусственного заселения вредителем. Ранжирование по устойчивости оцениваемых образцов проводят в сравнении с контролями (устойчивый и неустойчивый сорта), которые высевают через каждые 5 образцов. Посевы изолируют марлей. При появлении второго листа растения заселяют пупариями. Сбор пупариев проводят заблаговременно на сильно поврежденных посевах зерновых культур. Можно использовать растения с пупариями или непосредственно пупарии, предварительно извлеченные из растений. Необходимо помнить, что пупарии гессенской мухи очень мелкие и могут погибнуть от высыхания. Поэтому материал для заселения посева должен быть увлажнен (стебли с пупариями положены на влажную паклю, а непосредственно пупарии – в стеклянные трубки с влажным песком), после чего их необходимо притенить. Для интенсивного заселения опытных делянок требуется использовать не менее 50 жизнеспособных пупариев на 1 м^2 посева. После заселения растений в период массовой откладки яиц осматривают 10–15 растений, подсчитывают среднее количество отложенных яиц на 1 растение, а спустя 15–17 дней анализируют поврежденность вредителем (Шапиро, Гуслиц, 1988).

Степень устойчивости оцениваемых образцов в целом определяют по:

- количеству отложенных яиц и развившихся из них личинок (на 1 растение);
- заселенности растений яйцами и личинками (на 1 растение);
- количеству выживших личинок (на 1 растение);
- интенсивности поврежденности растений (%).

Литература

Агильяр Ж.Д., Шамбон Ж.П. Предварительные замечания о популяциях нескольких видов рода *Agromyza* на культурах злаковых во Франции. VIII Международный конгресс по защите растений. М., 1975. С. 9-12.

Беляев И.М. Вредители зерновых культур. М.: Колос, 1974. 44 с.

Васильев С.В. Некоторые приемы статистического анализа материалов по устойчивости растений к вредителям // Методические рекомендации по оценке устойчивости картофеля и кукурузы к главнейшим вредителям. Л., 1980. С. 56-60.

Вилкова Н.А., Нефедова Л.И., Асякин Б.П., Фесулати С.Р., Конарев А.В., Юсупов Т.М. Научно-обоснованные параметры конструирования устойчивых к вредителям сортов сельскохозяйственных культур. СПб. 2004. 76 с.

Волков С.М., Зимин Л.С., Руденко Д.К., Тупеневич С.М. Альбом вредителей и болезней сельскохозяйственных культур нечерноземной полосы европейской части СССР. М.-Л. 1955. 93 с.

Володичев М.А. Защита зерновых культур от вредителей. М.: Росагропромиздат, 1982. 22 с.

Дядечко Н.П. Защита всходов пшеницы от мух // Защита растений. 1980. № 12. С. 45.

Жармухамедова Г.А., Факторы устойчивости яровой пшеницы к гессенской мухе в Северном Казахстане. ВАСХНИЛ, ВИЗР, 1987. 22 с.

Заговора А.В., Грамма В.Н., Белецкий Е.Н., Красиловец Ю.Г., Кравченко А.Б., Бартенев А.Ф. Методические указания по определению злаковых мух и их повреждений. Харьков, 1979. 12 с.

Махоткин А.Г. Вредоносность пшеничной мухи на юге России и Украины // Защита растений. 2003. № 8. С.22-25.

Нарчук Э.П. Злаковые мухи. Их система, эволюция и связи с растениями. Л.: Наука, 1987. 277 с.

Нефедова Л.И., Семенова А.Г., Юсупов Т.М. Особенности повреждения злаков шведской мухой // Сб. научных трудов СПГАУ «Защита растений от вредителей, болезней и сорняков», СПб., 1997. С. 87-91.

Рябченко Н.А. Эколого-генетические основы устойчивости озимой пшеницы и ярового ячменя к шведским мухам. Автореф. дисс. … доктора биол. наук. СПб, ВИЗР,1992. 36 с.

Семенова А.Г. Некоторые причины устойчивости ячменя к шведской мухе // Сб. научных трудов СПГАУ «Защита растений от вредителей, болезней и сорняков», СПб., 2004. С. 72-77.

Чаева Т.Ф., Иванова Н.С. Устойчивость овса коллекции ВИРа к шведской мухе в естественных и провокационных условиях // Сб. научн. трудов Бел. НИИ земледелия. 1982. Вып. 26. С. 162-167.

Чесноков П.Г. Устойчивость зерновых культур к насекомым. М.: Советская наука, 1956. 307 с.

Шапиро И.Д. Шведские мухи. М.: Агропромиздат, 1989. С. 32-41.

Шапиро И.Д., Гуслиц И.С. Методические рекомендации по оценке устойчивости зерновых колосовых культур к вредителям. М., 1988. 35 с.

Lindblad Mats. A degree-day model for regional prediction of first occurrence of frit fly in oats in Sweden // Crop Protection. 1996. V. 15. № 6. P. 559-565.

Е.Е. Радченко

2.2. ЗЛАКОВЫЕ ТЛИ

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЗЛАКОВЫХ ТЛЕЙ

По особенностям развития и составу питающих растений тлей делят на 2 группы: мигрирующие и немигрирующие. По месту питания можно выделить тлей, вредящих на надземных частях злаков и на корнях. Наиболее вредоносны и широко распространены тли, питающиеся на надземных органах злаков.

Немигрирующие виды злаковых тлей

Зимуют обычно яйца на озимых зерновых и дикорастущих злаках. В южных регионах возможна зимовка взрослых особей. Весной отрождаются личинки, развивающиеся в бескрылых самок-основательниц, которые размножаются партеногенетически и дают несколько поколений. Появляющиеся крылатые самки-расселительницы перелетают на яровые злаки, где продолжают размножаться. Число поколений и плодовитость тлей зависят преимущественно от погодных условий. После уборки яровых культур тли питаются на падалице, дикорастущих злаках, а затем мигрируют на всходы озимых. Осенью появляются самки-полоноски, отрождающие личинок, превращающихся в крылатых самцов и бескрылых самок. После спаривания самки откладывают зимующие яйца.

Наиболее вредоносны обыкновенная злаковая тля – *Schizaphis* (*Toxoptera*) *graminum* Rond., ячменная (русская пшеничная) тля – *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (*Brachycolus noxius* Mordv.), большая злаковая тля – *Sitobion* (*Macrosiphum*) *avenae* F. и кукурузная тля – *Rhopalosiphum maidis* Fitch. (табл. 2.2.1.).

Обыкновенная злаковая тля распространена преимущественно в степной и лесостепной зоне бывшего СССР, северная граница ареала доходит до Москвы. Вредит также в Средней Азии, Закавказье, на юге Сибири, в южном Приморье (Шапошников, 1964). Наиболее часто и сильно вредит в Ростовской, Саратовской и Волгоградской областях (Бей-Биенко и др., 1941).

Зимуют преимущественно яйца. Отрождение личинок из яиц обычно происходит в начале – середине мая. В конце мая появляются расселительницы. С повышением среднесуточной температуры в колониях преобладают бескрылые самки. Наибольшая численность вредителя наблюдается в конце июня – июле (Морошкина, 1930; Якушев, Добрякова, 1980).

Оптимальная температура для развития бескрылых партеногенетических самок составляет 20–21°С при относительной влажности воздуха 65–70% (тли живут до 35 дней и рождают до 80 личинок), для крылатых партеногенетических самок – 25,8°С при влажности воздуха 70% (тли живут 17–20 дней и рождают до 42 личинок) (Цинцадзе, Надирадзе, 1977). Продолжительность развития личинки – примерно 8 дней (Невский, 1929). Нижний температурный порог личиночного развития – 5,86°С, верхний – 28,33°С (Walgenbach et al., 1988). По мнению R. Kirkland et al. (1981), увеличение смертности и замедление скорости развития личинок вызывает повышение температуры до 35°С.

При созревании яровых злаков численность тлей на полях снижается. После появления всходов озимых наблюдается массовый лет насекомых (Морошкина, 1930). В октябре появляются самцы и самки, но одновременно происходит и партеногенетическое размножение. На появление амфигонного поколения основное влияние оказывает фотопериод (Якушев, Добрякова, 1980), но на изменение доли яйцекладущих самок влияет также температура (Puterka, Slosser, 1983). С октября и до наступления морозов продолжается яйцекладка. Одна самка способна отложить в естественных условиях при среднесуточной температуре 8,6°С до 12 яиц за период жизни, равный 38 дням. Яйца откладываются обычно за влагалище листа, небольшими группами по 2–4 (Морошкина, 1930). Понижение ночных температур до 0°С и ниже останавливает рост популяций тлей (Arnold, 1981).

В бывшем СССР обычно развивается до 15 поколений тли в год (Морошкина, 1930). В некоторых странах отмечено 20 и более поколений (Dahms, Starks, 1973), а также круглогодичный партеногенез. Для массового размножения тли благоприятна прохладная и влажная погода в предыдущий год (Dahms, Starks, 1973).

Таблица 2.2.1. Наиболее вредоносные злаковые тли (бескрылые девственницы)

Вид	Тело			Усики	Соковые трубочки	Хвостик	Непарный вырост на 8-м тергите
	цвет	форма	восковой налет				
Diuraphis noxia	светло-зеленый	веретеновидная	есть	светло-зеленые, по длине равны 1/3 тела	в виде пор, не более 0,75 длины хвостика	треугольный	пальцевидный, равен 1/2 длины хвостика
Schizaphis graminum	светло-зеленый, на спине зеленая срединная полоса	веретеновидная	нет	зеленые, достигают половины длины тела	светлые, цилиндрические, в 1,7–2 раза длиннее хвостика	светлый, пальцевидный	нет
Sitobion avenae	желто-зеленый, красноватый или бурый; на брюшке темное пятно	веретеновидная	нет	черные, длиннее тела	черные, цилиндрические, в 1,1–1,5 раза длиннее хвостика	светло-зеленый	нет
Rhopalosiphum maidis	серо-зеленый, пятна на боках брюшка	удлиненно-овальная	есть	черные, не превышают половину длины тела	черные, цилиндрические, не более чем в 1,5–1,8 раза длиннее хвостика	пальцевидный	нет
Rhopalosiphum padi	серо-зеленый, вокруг трубочек ржаво-красные пятна	яйцевидная	есть	темные, превышают половину длины тела	темные, цилиндрические, не более чем в 1,5–1,8 раза длиннее хвостика	пальцевидный	нет
Metopolophium dirhodum	светло-зеленый, на спине продольная более темная полоса	веретеновидная	нет	светлые, равны длине тела	светлые, цилиндрические, в 2–3 раза длиннее хвостика	пальцевидный	нет

Тля повреждает преимущественно листья. В местах питания наблюдается хлороз или покраснение (у сорго). Затем лист все больше обесцвечивается, желтые пятна сливаются и лист начинает усыхать с верхушки. При сильном заселении до начала колошения поврежденные растения не выколашиваются (Морошкина, 1930; Бей-Биенко и др., 1941).

Пищевая специализация обыкновенной злаковой тли довольно широка. Так, Патч (Patch, 1938) приводит список 62 растений-хозяев вредителя. Позднее была исследована возможность питания насекомого на ряде других хозяев (Dahms et al., 1954; Jackson et al., 1981). Наиболее предпочтительной для питания культурой является ячмень, наименее – рожь (Знаменский, 1926; Schwessing, Wilde, 1979a) и рис (Wilson, Starks, 1981).

Большая злаковая тля распространена повсеместно. Северная граница ареала доходит до Хибин (Шапошников, 1964). Наибольший вред насекомое причиняет в степной и лесостепной зоне Европейской части бывшего СССР (Николенко, Омельченко, 1974).

Зимуют обычно яйца тлей на озимой пшенице и злаковых сорняках. В южных регионах отмечена зимовка партеногенетических самок (Dedryver, Tanguy, 1984). Эмбриональное развитие начинается при температуре 5°С (Дудник, 1981). При температуре 7°С и высокой относительной влажности воздуха отмечено 50% отрождение личинок из яиц. Низкая влажность сдерживает отрождение. Высокая температура (10°С и выше) не прекращает диапаузы (Hand, 1983). По данным R.W. Kieckhefer et al. (1989) нижний температурный порог личиночного развития равен 4,0°С, верхний – 24,6°С. На территории бывшего СССР массовое отрождение личинок из яиц обычно наблюдается в апреле (Мордвилко, 1921; Шаруда, Голосняк, 1977). Период преимагинального развития составляет в среднем 10–12 дней (Дудник, 1981; Phillips, 1916) и, в зависимости от температуры и влажности воздуха, варьирует от 5–6 (Везиров, 1966) до 20 дней (Markkula, Myllymaki, 1963). Продолжительность I и IV нимфальных возрастов несколько больше продолжительности развития нимф II и III возрастов (Lykouressis, 1985).

Партеногенетические самки живут 30–60 дней, а плодовитость составляет 20–40 (до семидесяти) личинок, что определяется условиями среды (Николенко, Омельченко, 1974; Phillips, 1916; Markkula, Myllymaki, 1963; Dean, 1974a). Продолжительность жизни зависит главным образом от продолжительности пре- и пострепродуктивного периодов (Dean, 1974a). Бескрылые самки *S. avenae* более плодовиты, чем сходные по массе крылатые особи (Wratten, 1977). Для развития тли оптимальными условиями являются среднесуточная температура 16–20°С и относительная влажность воздуха 65–80% (Дудник, 1981). В условиях чередования температур индивидуальное развитие тли замедляется (Ghanim u.a., 1981).

Интенсивное заселение растений тлями обычно наблюдается в конце мая – июне (Шаруда, Голосняк, 1977; Дудник, 1981). Максимум численности тлей на посевах приходится на фазы формирования зерновки, молочной и молочно-восковой спелости (Watt, 1979). Скопление имаго и личинок тлей вызывает увеличение появления крылатых расселительниц (Muller, 1977).

Массовому размножению вредителей предшествуют годы с умеренно теплым влажным летом и влажной осенью (Дудник, 1982). Б.Г. Шуровенков (1972) отмечал вспышку массового размножения вредителя после холодной бесснежной зимы. Сроки миграции и степень заселенности растений тлями зависят от температуры в начале года (Watson, Carter, 1983), а также от обилия осадков летом (A'Brook, 1983).

Распределение тли на полях является агрегированным (Kieckhefer, 1975). В наибольшей степени заселяются обычно краевые части посевов (Dean, 1974b), но, вследствие переноса тли воздушными течениями, может наблюдаться очажное и даже рендомизированное распространение вредителя на полях (Шуровенков, 1975; Ba-Angood, Stewart, 1980). С наступлением восковой спелости яровых культур тли мигрируют на молодые зеленые растения. В сентябре, при появлении всходов озимых, наблюдается лет тлей на поля из мест летних резерваций. В конце сентября – октябре появляются полоноски, которые живорождают самцов и самок.

У большой злаковой тли отмечено варьирование окраски тела от зеленой до бурой. Филлипс (Phillips, 1916) связал красноватый цвет насекомых с периодом полового размножения. Однако в опытах других исследователей красно-коричневые тли постоянно размножались партеногенетически (Bruchl, Damsteegt, 1962).

Откладка яиц происходит в конце октября и ноябре, до наступления заморозков. Начало яйцекладки обычно наблюдается при суточной температуре 4–7°С (Дудник, 1979). Плодовитость самок составляет 10–12 яиц (Шуровенков, 1977). На территории бывшего СССР развивается от 14 до 20 поколений вредителя в год (Шуровенков, 1972; Дудник, 1981).

Большая злаковая тля может питаться на всех органах растения, однако в большей степени предпочитает колосья. Заселяет преимущественно верхнюю часть колоса, питаясь у основания колосков. При сильном заселении растения угнетены, могут наблюдаться различные уродства, невыколашивание.Кормовыми растениями являются, преимущественно, различные злаки. Встречается также и на других однодольных – *Juncaceae, Cyperaceae, Liliaceae* (Шапошников, 1964; Markkula, Roukka, 1972). Наиболее предпочтительной зерновой культурой является ячмень (Markkula, Roukka, 1972).

Мигрирующие виды злаковых тлей

Мигрирующие тли живут на злаках только летом, а осенью переселяются на свои первичные растения-хозяева, обычно древесные или кустарниковые. На них насекомые зимуют в фазе яйца. Весной из яиц отрождаются личинки, дающие начало многочисленным колониям на листьях. Ухудшение условий жизни на деревьях вынуждает тлей к перемене образа жизни. Появляющиеся крылатые расселительницы мигрируют на злаки, где тли размножаются партеногенетически в течение лета. Осенью появляются крылатые особи, которые переселяются на первичные кормовые растения. Появление ремигрантов и последующего полового поколения в большинстве случаев стимулируется коротким фотопериодом в соче-

тании с понижением температуры. Возможно также и развитие вредителей только на вторичных растениях-хозяевах (зерновых культурах).

Из мигрирующих видов наибольшее значение имеют обыкновенная черемуховая *Rhopalosiphum padi* L. и розанно-злаковая *Metopolophium dirhodum* Walk. тли (табл. 2.2.1.).

Обыкновенная черемуховая тля распространена повсеместно. На севере встречается, по крайней мере, до Хибин. Вредит также в Закавказье, Казахстане, Сибири, Приморье, Средней Азии. Первичным хозяином является черемуха, в Западной Сибири – также слива. Там, где нет черемухи, развивается неполноцикло на злаках (Шапошников, 1964).

В зависимости от климата и распределения кормовых растений могут зимовать яйца в пазухах почек на молодых ветках черемухи или живородящие бескрылые и крылатые самки на злаках. Количество отложенных яиц коррелирует с долготой местности, а численность отрождающихся весной основательниц коррелирует с числом яиц (Leather, Lehti, 1981). Начало отрождения основательниц обычно совпадает со временем распускания почек. Одна самка рождает до 70 личинок (в среднем около 40), причем наравне с бескрылыми особями появляются и крылатые мигранты, перелетающие на злаки (Мамонтова, 1953). На листьях и зеленых побегах черемухи развивается не менее 3-х генераций, из которых вторая состоит частью из бескрылых, частью из крылатых самок, а третья – почти исключительно из крылатых (Мордвилко, 1901). Максимальная численность тли на первичном хозяине совпадает с периодом цветения черемухи, а массовое появление крылатых особей – с остановкой роста главных побегов (Новокшонова, 1983).

Большинство авторов считает, что миграция тлей с черемухи обусловлена изменениями в химизме тканей хозяина. Период отсутствия насекомого на черемухе совпадает с наименьшим содержанием в растительных тканях растворимого азота (Dixon, Glen, 1971). В.П. Лебедев (1981) полагает, что причиной миграции тли на злаки является усиление образования черемухой фитонцидов в начале

июня. При зимовке насекомого в фазе яйца корреляция между началом миграции тлей и температурой в течение зимы – начале весны не выявлена (Wiktelius, 1982). В годы с теплой погодой в мае обычно наблюдается более раннее появление тлей на злаках (Rautapaa, 1976). Мигранты обыкновенной черемуховой тли предпочитают проростки злаков.

Период преимагинального развития в зависимости от условий варьирует от 5,2 до 21,7 дней (Villanueva, Strong, 1964). Личинки имеют 4 возраста. Наиболее продолжителен третий возраст, наименее – первый. Нижний температурный порог развития равен 3,3°С (Kuroli, 1984). Продолжительность жизни бескрылых девственниц при температуре 21°С варьирует от 15,2 до 19 дней и в среднем составляет 17,7 дня. Средняя плодовитость самки – около 70 личинок (Kuroli, 1984). По данным Маркюла и Миллимяки (Markkula, Myllymaki, 1963) продолжительность жизни бескрылых самок составляла 44 дня, а крылатых – 49 дней. Бескрылые партеногенетические самки более плодовиты при пониженной относительной влажности воздуха (35%), чем при более высокой (55%) (Leather, 1985). Крылатые самки рождают обычно меньше личинок, чем бескрылые (Мордвилко, 1901; Markkula, Myllymaki, 1963).

Со второй половины августа появляются первые ремигранты. На появление крылатых морф влияют качество пищи, скученность, короткий день и низкие температуры (Dixon, Glen, 1971). Самцы развиваются еще на злаках. Таким образом, на основные растения возвращаются и крылатые полоноски, и крылатые самцы. Полоноски рождают на черемухе только половых самок (Мордвилко, 1901). Миграция самцов на первичного хозяина происходит позже, чем полоносок. Самцы прилетают на черемуху синхронно максимуму численности зрелых яйцекладущих самок (Leather, 1981). Температурный порог лета тли осенью равен 9–10°С. Летная активность отмечена только в середине дня с 11 до 16 часов (Wiktelius, 1981). Полоноски на черемухе не питаются, а плодовитость обеспечивается только питанием на вторичном хозяине (Leather, 1982b). Наступление

листопада, детерминированное, главным образом, длиной дня, предопределяет наиболее поздние сроки откладки яиц (Ward et al., 1984).

Насекомое питается на листьях, стеблях и на колосьях зерновых культур. Бескрылые особи развиваются быстрее и более плодовиты при питании на первом листе злаковых растений. Место питания тлей на взрослом растении также имеет значение: наиболее крупные и плодовитые особи развиваются на стеблях (Leather, Dixon, 1981).

Кормовыми растениями тли являются злаки и другие однодольные – *Juncaceae, Cyperaceae, Liliaceae*. Насекомое питается на более широком круге растений-хозяев по сравнению с большой злаковой тлей (Rautapaa, 1970; Markkula, Roukka, 1972).

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ТЛЯМ

Известно, что у зерновых культур обнаружены все три типа устойчивости к тлям по классификации Р. Пайнтера (1953): непредпочитаемость (антиксеноз), антибиоз и выносливость (толерантность). Существующие в настоящее время полевые и лабораторные методы позволяют оценить как суммарный эффект данных факторов устойчивости, так и каждый фактор по отдельности.

ПОЛЕВЫЕ МЕТОДЫ

Оценка устойчивости_исходного материала в коллекционных и селекционных питомниках. Данные опыты служат для предварительного выделения устойчивых форм. Закладка питомников производится по методикам ВИР, принятым для изучаемой культуры. Обработка почвы, внесение удобрений, посев и уход за посевом осуществляется в соответствии с агротехническими правилами, принятыми для данной зоны. Оценку образцов проводят осмотром растений на делянке.

Для выявления устойчивых сортов часто рекомендуют оценивать число заселенных вредителем растений (стеблей). Однако на практике при высокой числен-

ности тлей все растения оказываются в той или иной степени заселены вредителями. Поэтому определение процента заселенных растений имеет смысл лишь при незначительной численности тлей или в начальный период заселения для оценки привлекательности кормовых растений для вредителей. В ГНЦ РФ ВНИИ растениеводства им. Н.И.Вавилова принята система 9-балльной оценки, при которой 1 означает самое слабое проявление признака, 9 – самое сильное (Лукьянова и др., 1981; Мережко и др., 1999):

1 – устойчивость очень низкая: заселено более 40% растений;

3 – " низкая " 26–40 "

5 – " средняя " 16–25 "

7 – " высокая " 6–15 "

9 – " очень высокая " не более 5 "

В зависимости от вида тли и фазы развития растений в период максимального заселения ВИЗР рекомендуются различные шкалы (I – III) учета численности (Гендрик, Шапиро, 1978; Шапиро, Рапопорт, 1988).

Обычно проводят 2 учета: первый учет – в период массового заселения культуры, второй – через 3–4 недели. На пшенице наибольшая численность обыкновенной злаковой и черемуховой тли обычно наблюдается в фазе кущения – трубкования; большой злаковой – в период налива зерна. Максимум численности черемуховой тли на яровом ячмене сопряжен с VIII–X этапами органогенеза. С продолжительностью протекания этих фаз у пшеницы и ячменя связан характер нарастания численности видов в природе. Обычно чем продолжительней соответствующие этапы органогенеза растений – тем выше численность насекомых. Поэтому при оценке устойчивости сортов рекомендуется параллельно с учетом численности тлей определять морфофизиологическое состояние растений.

Как уже указывалось выше, при численности тлей на посевах, достаточной для оценки устойчивости растений, все растения оказываются заселены насекомыми. Поэтому мы рекомендуем модифицированные шкалы ВИЗР, где баллы 0–2 объединены.

I Если заселение растений приурочено к фазам кущение – выколашивание, рекомендуется следующая шкала:

(0) – растения не заселены тлей;

1 (1) – отдельные особи на одном из нижних листьев;

(2) – отдельные особи на двух-трех нижних листьях;

3 (3) – небольшие колонии из 3–5 особей на двух-трех нижних листьях;

5 (4) – колонии средних размеров из 10–15 особей на половине всех листьев;

7 (5) – колонии средних и больших размеров из более 20 особей на 2/3 всех листьев;

9 (6) – колонии средних и больших размеров на всем растении.

П Если массовое размножение тлей приурочено к фазе выколашивания:

(0) – растения не заселены тлей;

1 (1) – растения заселены отдельными особями;

(2) – единичные небольшие колонии (3–5 особей);

3 (3) – не более 5–6 небольших колоний на листьях и листовых влагалищах;

5 (4) – колонии со средней и высокой численностью особой, располагающихся, главным образом, за влагалищем верхнего листа; вследствие питания тлей колос может быть несколько искривлен;

7 (5) – многочисленные колонии тлей за влагалищем верхнего листа и частично других листьев; влагалища обесцвечены, пластинка верхнего листа гофрирована и скручена, колос после выхода из влагалища сильно искривлен;

9 (6) – множество тлей за влагалищем большинства листьев; вышедшие из влагалища колосья сильно деформированы и частично обесцвечены, часть колосьев погибает внутри влагалища.

Ш Для оценки степени заселения колосьев:

(0) – растения на заселены тлей;

1 (1) – единичные особи на колосе;

(2) – единичная небольшая колония (3–6 особей) на колосе;

3 (3) – колония (10–15 особей) занимает 1/4 колоса;

5 (4) – несколько колоний (20–30 особей) занимают 1/2 колоса;

7 (5) – несколько слившихся вместе колоний (30–50 особей) занимают 3/4 колоса;

9 (6) – весь колос усыпан тлями (более 50 особей)

По нашим наблюдениям, шкала I пригодна для оценки на устойчивость к *R. padi*, *S. avenae, M. dirhodum*; шкала П – для *D. noxia*; шкала Ш – для *S. avenae* и *R. padi*.

Оценку заселенности кукурузы и сорго *R. maidis* и *R. padi* рекомендуется проводить путем осмотра 20–25 растений каждого образца дважды – на IX и XП этапах органогенеза (Вилкова и др., 1983):

1 – отсутствие тлей на растении;

2 – небольшие колонии тлей (10–20 особей) на веточках метелки и (или) на верхних листьях;

3 – колонии тлей средних размеров (20–50 особей) на веточках метелки и (или) на верхних листьях;

4 – большие колонии тлей на метелке и верхних листьях растений;

6 – сплошное заселение колониями тлей метелки и верхних листьев, заселенные органы отмирают.

Данная шкала пригодна для 1 и 2 учета на сорго и для первого – на кукурузе. Шкала для второго учета степени заселенности кукурузы:

1 – отсутствие тлей на растении;

2 – небольшие колонии (10–20 особей) на обвертке и (или) листьях среднего яруса растений;

3 – небольшие колонии (25–50 особей) на обвертке и (или) листьях среднего яруса;

4 – большие колонии тлей на обвертке и листьях среднего яруса растений, заселенные органы покрыты медвяной росой;

5 – сплошное заселение растений большими колониями тлей, растение покрыто медвяной росой, отмирает.

Оценку устойчивости сорго к обыкновенной злаковой тле можно проводить по реакции образцов на повреждения (обесцвечивание, покраснение листьев) и по численности тлей на растениях. В соответствии с этим разработана комбинированная шкала, которая рекомендуется авторами и для *R. maidis* (Гендрик, Шапиро, 1978; Николенко и др., 1979; Николенко, Омельченко, 1980). Оценка производится дважды (табл. 2.2.2.).

Таблица 2.2.2. Шкала для определения устойчивости образцов сорго к злаковым тлям

Балл	Численность тлей по фазам развития растений		Характер изменения поврежденной части листа
	4–8 листьев	трубкование	
1	единичные	единичные	листья без видимых изменений
2	до 100	до 200	наличие красноватых или светло-желтых пятен в виде точек, не более 5% поверхности
3	110–200	210–500	светло-желтые или красноватые пятна с фиолетовым окаймлением, занимающие 5–30% поверхности
4	210–300	510–1000	крупные, сливающиеся и буреющие пятна с фиолетовой окраской, 30–50% поверхности
5	более 300	более 1000	побурение и гибель листьев

Американские исследователи используют 9-балльные шкалы. Так, в фазу выметывания рекомендуется применять шкалу (Teetes et al., 1975):

1 – отсутствие красных пятен на листьях;

2 – имеются красные пятна;

3 – часть листа погибла;

4 – 1 лист погиб;

5 – 2 листа погибло;

6 – 4 листа погибло;

7 – 6 листьев погибло;

8 – листья погибли;

9 – растения погибли.

Для детальной оценки степени устойчивости целесообразно использовать следующую шкалу:

1 – нет признаков повреждений;

2 – повреждено 1–10% площади листовой поверхности;

3 – повреждено 11–20% площади листовой поверхности;

4 – повреждено 21–30% площади листовой поверхности;

5 – повреждено 31–40% площади листовой поверхности;

6 – повреждено 41–50% площади листовой поверхности;

7 – повреждено 51–60% площади листовой поверхности;

8 – повреждено 61–70% площади листовой поверхности;

9 – повреждено 71–80% площади листовой поверхности;

10 – повреждено 91–100% площади листовой поверхности.

Рекомендуют оценивать поврежденность 5–10 рендомизированно выбранных растений данного образца (Archer et al., 1982).

Для массовой оценки коллекционного материала удобна следующая шкала повреждения листьев (Якушевский и др., 1982):

1 – очень слабое (<5%);

3 – слабое (5–20%);

5 – среднее (21–35%);

7 – сильное (36–50%);

9 – очень сильное (> 50%).

Устойчивость можно определять или по средневзвешенному, или по максимальному баллу, присваиваемым изучаемым образцам. В случае большого объема работы, которая должна проводиться в сжатые сроки, целесообразно использовать

максимальный балл. Вместе с тем, среди генофонда зерновых культур встречаются иммунологически неоднородные формы, которые выявляются при высокой заселенности коллекционного материала. В данном случае наряду с общим (максимальным) баллом в скобках необходимо указать редко встречающиеся баллы. Данный материал можно впоследствии отселектировать по признаку устойчивости. При небольшом числе изучаемых образцов более точные результаты дает определение среднего (средневзвешенного) балла и степени варьирования признака.

Изучение устойчивости с использованием провокационного фона. В поле следует создавать условия, способствующие накоплению и повышению численности насекомых. Участки для оценки сортов располагают вблизи от летних или зимних резерваций тлей. Применяют поздний широкорядный посев при сниженных нормах высева семян. Для повышения численности вредителей по периферии участка высевают неустойчивые образцы половинной нормой семян, при этом их площадь должна составлять не менее 1/3 площади опытного участка. Посев испытываемых сортов проводят спустя 1–2 недели после оптимального срока (Гендрик, Шапиро, 1978; Шапиро, Рапопорт, 1988).

Для снижения численности энтомофагов Lowe рекомендует проводить крупнокапельные обработки инсектицидами в низких дозах (Lowe, Benevicius, 1981; Lowe, 1984).

Устойчивость сортов на провокационном фоне можно оценивать по приведенным выше шкалам. С целью контроля выравненности фона через 10 образцов в опыте высевают неустойчивый контроль. Для проведения балловой оценки в коллекционных питомниках достаточно высеять по 1–2 рядка каждого сорта. Объем выборки составляет не менее 20 растений (стеблей) с делянки.

Кроме того, заселенность растений можно определять путем подсчета тлей в рендомизированных пробах по 10–25 стеблей в 3–5 повторностях или на этикетированных растениях (Forbes, 1962; George, Gair, 1979; Roberts, Foster, 1983). Ряд исследователей рекомендует учет тлей на пробных рядках длиной 30 см в 3-х – 4-х повторностях (Dahms, Wood, 1957; Kieckhefer, 1975) .

Изучение устойчивости на инвазионном фоне. Наиболее эффективным способом иммунологического изучения зерновых культур является искусственное заселение насекомыми. В данном случае время заселения, видовой состав и численность вредителей находятся под контролем исследователя.

Заселение производят путем равномерной раскладки на опытных делянках растений с тлей, предварительно размноженной в лабораторных условиях. При работе с большой злаковой тлей рекомендуется исходить из расчета 10 тлей на растение (Van Marrewijk, Dieleman, 1977).

Если работа с тлями не проводится круглогодично, Николенко и Омельченко (1980) предлагают заготовлять зимующие яйца *S. avenae*. Яйца большой злаковой тли черные, овальные, откладываются самками на верхней стороне листьев одиночно, реже по 2–3.

Сбор яиц проводят в сухую погоду на посевах озимых зерновых ранних сроков сева, а при низкой численности вредителя – у лесополос. В холодную погоду в таких местах целесообразно отобрать растения с корнями и поместить их для временного хранения в деревянные ящики, а затем небольшими порциями анализировать в помещении.

Обнаруженные яйца срезают вместе с листовой пластинкой и помещают в чашки Петри. Так как листья после подсыхания сворачиваются и в дальнейшем затруднен подсчет яиц, то целесообразно иметь 3 чашки: в первую класть отрезки с одним яйцом, во вторую – с двумя, в третью – с тремя. Чашки этикетируют и хранят в неотапливаемых помещениях. В период зимнего хранения яиц фильтровальную бумагу, на которую помещены яйца, систематически увлажняют дистиллированной водой.

Предлагается также следующий способ сбора яиц. Осенью во время кущения озимых на поле устанавливают вертикально пластины 10×20 см из оцинкованной жести так, чтобы 1/2 их поверхности находилась в почве. Тли в холодную погоду покидают растения и скапливаются на пластинах, температура которых выше, чем температура растений. В ноябре пластины с отложенными на них яйцами снима-

ют, нумеруют, заворачивают во влажную фланель и хранят при температуре 1–5°С и относительной влажности воздуха 70–90%. С целью большей сохранности яиц на одну из сторон пластины целесообразно напаять проволоку толщиной 1–2 мм (Омельченко, Николенко, 1983).

Выведение самок-основательниц из яиц, размножение исходных линий в лабораторных условиях начинают в феврале. Растения пшеницы выращивают заблаговременно в 1–3 вазонах и перед заселением накрывают стеклянными или полиэтиленовыми вентилируемыми изоляторами, под которые помещают по 2–3 постепенно (в течение 3–5 дней) отогретые яйца. Через 10–12 дней после отрождения самок-основательниц вазоны нумеруют и выбраковывают колонии обыкновенной злаковой тли, а также самок с низкой репродуктивной способностью. Тлю размножают в контролируемых условиях до наступления теплой погоды и в период выхода растений в трубку переносят в поле. Насекомых поселяют в бязевые садки-рукава размером 30×20 см, которые навешивают на растения, заключая в каждый садок по 15–20 стеблей. По мере роста растений и размножения вредителей один раз в 7–10 дней тлей переселяют в новые садки, обеспечивая накопление искусственной популяции;

Перед заселением опытных делянок визуально определяют численность естественной популяции тли, относя делянки в одну из трех групп: насекомые отсутствуют, имеются единичные экземпляры, заселение значительное. Растения под изоляторами срезают и затем насекомых стряхивают равномерно по делянке (Николенко, Омельченко, 1980).

Заселение сорго тлями можно проводить путем раскладывания в междурядьях сильно заселенных растений, которые обычно отбирают на защитных полосах. Кроме того, заселение кукурузы и сорго также осуществляют вредителями, предварительно размноженным в контролируемых лабораторных условиях. Для этого посев неустойчивых образцов необходимо провести с таким расчетом, чтобы к моменту заселения опытных делянок растения, на которых искусственно размножается тля, достигли фазы выметывания (VIII–X этап органогенеза).

В период заселения (всходы – 4 лист) такие растения срезают ниже скопления колоний, переносят на опытный участок и помещают в сосуды с водой на дорожках между делянками. Обычно используют бутылки емкостью 0,5 л, которые укрепляют на шесте с таким расчетом, чтобы заселенные тлями растения несколько возвышались над исследуемыми образцами. Через 7–8 дней необходимо заменить маточные растения новыми. С помощью одного такого растения создается надежный фон для заселения около 300 исследуемых растений кукурузы и сорго (Вилкова и др., 1983).

Устойчивость к вредителям на инвазионном фоне оценивается с использованием балловых шкал или путем подсчета тлей.

Lowe (1984a) в опытах с искусственным заселением опытных делянок для оценки устойчивости пшеницы к большой злаковой тле предлагает логарифмическую шкалу с основанием 2. На опытном посеве в рендомизированно отобранной пробе стеблей определяют число тлей на каждом побеге, которое соответствует определенному баллу шкалы:

число тлей на побег	шкала
0	0
1	1
2–3	2
4–7	3
8–15	4
16–31	5
32–63	6
и т.д.	и т.д.

Размер пробы зависит от степени заселенности растений тлями. На сильно заселенных делянках достаточно 35–40 побегов. Среднее число тлей на стебель определяют по формуле:

$$\frac{\sum\left(\sqrt{[(N_1-0{,}5)(N_2+0{,}5)]}\times C\right)}{T}$$, где

N_1 и N_2 – число тлей в нижнем и верхнем пределах данного балла шкалы;
C – число стеблей, заселенных по данному баллу;
T – общее число стеблей в пробе.

Кроме того, определяют средний балл заселения по формуле:

$S = \frac{\sum(L \times C)}{T}$, где

C – число стеблей, заселенных по данному баллу L;

T – общее число стеблей в пробе.

Необходимо отметить, что искусственное заселение без изоляции эффективно только в течение непродолжительного времени, так как в данном случае наблюдается значительное нарастание численности энтомофагов тлей. Кроме того, заселение непосредственно опытного посева может привести к увеличению неравномерности распределения тлей.

Наиболее корректные результаты получают при использовании полевых садков различных конструкций. С другой стороны, работа с садками более трудоемка и дорогостояща, а повторная оценка затруднена. В подобных опытах обычно наблюдают слабую корреляцию полученных данных с результатами оценки на естественном фоне заселения вредителем (Van Marrewijk, Dieleman, 1977).

В ВИРе разработан метод создания выравненного инвазионного фона, максимально приближенный к естественному заселению насекомыми (Радченко, Кривченко, 1987). Вдоль опытных делянок высевают сорт-накопитель, который в фазу кущения заселяют размноженными в лабораторных условиях вредителями из расчета 5 тлей на растение и изолируют. В качестве изолятора используют проволочные дуги высотой 0,6 м, скрепленные в верхней части скобами длиной 1,5 м и обтянутые укрывным нетканым материалом. В фазу выколашивания укрывной материал с накопителя снимают и изолируют опытный посев. Для этого проволочные рамы большего размера соединяют при помощи скоб и накрывают марлей. Для пшеницы ширина рам 1,2 м (1 м опытный посев + 0,2 м накопитель), высота 1,4–1,6м. Для проведения учетов внутри садка с одной из сторон садка марлю поднимают и закрепляют с помощью прищепок. Подсчет тлей осуществляют на рендомизированных пробах стеблей. Можно также проводить наблюдения за динамикой нарастания численности вредителей на рендомизированно выбранных или этикетированных растениях. В данном случае показателем устойчивости мо-

жет служить площадь под кривой нарастания численности насекомых: чем она больше – тем менее устойчив образец.

Для оценки в поле антибиотического воздействия растений на тлей широко используют различные изоляторы, изготовленные из бязи, капроновой сетки, пергамента, полимерных материалов.

В каждый изолятор подсаживают определенное количество самок (обычно 1–5) и через 5–20 дней определяют выживаемость, плодовитость, продолжительность жизни, массу тела тлей. В таких опытах должно быть 10–20 повторностей.

Так, в опытах Lee (1984) под садок (длиной 27 см и диаметром 1,8 см), изготовленный из тонкого прозрачного пластика, на колос пшеницы помещали 5 бескрылых имаго *S. avenae*. Через 7 дней стебель срезали и в лаборатории подсчитывали живых и мертвых имаго, а также личинок. Изолировали не менее 12 колосьев каждого сорта пшеницы на четырех фазах роста. Дворянкина и Михайлова (1988) на 20 колосьях пшеницы изолировали по одной крылатой самке. Через 20 дней колосья срезали, подсчитывали число тлей и определяли массу тела.

Плодовитость тлей удобно определять с помощью колосовых пергаментных изоляторов. Под каждый изолятор подсаживают по одной бескрылой самке, взятой с исследуемого образца и через 5 дней (минимальная продолжительность преимагинального развития отрожденных самкой личинок) определяют плодовитость вредителя. В каждом варианте опыта – 20 повторностей.

Для оценки антибиоза растений широко используют легкие микросадки, прикрепляемые на листья. Такие садки обычно изготавливаются из подручных материалов (Mac Gillivray, Anderson, 1957; Noble, 1958; Puterka, Peters, 1988). Наиболее прост садок, сделанный с использованием штампованных капсул из-под лекарств (Гендрик, Шапиро, 1978). Для аэрации в капсуле прокалывают примерно 20 отверстий с помощью тонкой энтомологической булавки, нагретой на пламени спиртовки. Микрокамера прикрепляется к листу зажимом из упругой проволоки. Наиболее удобно использовать зажимы микрокамер Дунина или, при их отсутствии – большие канцелярские скрепки. В каждый изолятор подсаживают 1 бес-

крылую самку, взятую с изучаемого образца, и через сутки подсчитывают отродившихся личинок. В опыте должно быть 20 повторностей.

С использованием микросадков можно проводить и более длительные эксперименты. Первоначально изолируют самку, на следующий день имаго и личинок (кроме одной) удаляют и ведут наблюдения за личиночным развитием, плодовитостью и продолжительностью жизни развившихся самок (Вилкова и др., 1983).

При работе с обыкновенной злаковой тлей в таких опытах показателем устойчивости может служить поврежденность листовой поверхности (Puterka, Peters, 1988). Под садок подсаживают по 2 бескрылых самки и через 4–6 часов тлей удаляют в том же порядке, как и при заселении растений. Подсчитывают некротические пятна диаметром 0,5–1 мм через 72 ч после заселения. В каждом варианте опыта – не менее 6 повторностей. И микрокамеры, и колосовые изоляторы можно применять в лабораторных экспериментах. В данном случае лучше использовать не пергаментные, а целлофановые садки-изоляторы, в которых с помощью тонкой булавки предварительно делают вентиляционные отверстия.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ

Изучение устойчивости зерновых культур к тлям в лабораторных условиях позволяет детально оценить каждый фактор устойчивости. Наиболее точные результаты получают в климатических камерах или световых залах с автоматически поддерживаемыми температурным и световым режимами. Оптимальная температура 22–24°С, освещенность 10–12 тыс. лк при 14–16-часовом фотопериоде.

Разведение насекомых. Тлей можно размножать как на вегетирующих растения, так и на искусственных питательных средах. Однако более простой способ – разведение на молодых проростках зерновых культур.

Ячмень является наиболее предпочтительным хозяином для злаковых тлей, поэтому на данной культуре за короткий срок можно получить наибольшее количество насекомых. Однако ячмень быстро гибнет, особенно при питании обыкновенной злаковой тли. В связи с этим ряд исследователей рекомендует применять

смесь зернового сорго и ячменя (Starks, Burton, 1977). С другой стороны, форма, на которой разводят тлей, может повлиять на результаты оценки. Особенно важно учитывать это обстоятельство при изучении антибиоза. Поэтому перед началом таких экспериментов тлей необходимо размножать в течение двух поколений на растениях испытываемых образцов.

В сосуды с почвой высевают по 10–15 семян неустойчивого сорта. Проростки заселяют тлями путем раскладки на них растений с насекомыми. Во избежание миграции тлей всходы изолируют. В качестве изоляторов удобно использовать стекла от фонарей «летучая мышь», верхнюю часть которых затягивают мелкоячеистой капроновой сеткой или бязью. Изоляторами могут служить также проволочные каркасы, обтянутые бязью, или пластиковые цилиндры с вентиляционными отверстиями в верхней части и по бокам, которые затягивают сеткой. Насекомых удобно разводить также на молодых проростках, выращенных в половинках чашек Петри на вате, смоченной водой. Заселенные всходы изолируют с помощью фонарных стекол (рис. 2.2.1.).

а б

Рис. 2.2.1. Разведение злаковых тлей:
а – трехъярусная светоустановка;
б – растения, изолированные фонарным стеклом.

Изучение типов устойчивости (антиксеноза, антибиоза, выносливости) необходимо проводить в контролируемых условиях с применением биологически выравненного материала. В таких опытах обычно используют клоны тлей. Для их получения на проростках изучаемой культуры изолируют одну самку, отловленную в природе. В зависимости от целей исследований количество клонов может быть различным.

Массовый скрининг

Наиболее простым и распространенным способом массовой оценку является методика Starks, Burton (1977). Для оценки устойчивости используют ящики, наполненные нестерильной смесью почвы, песка и торфа в соотношении 3:1:1. В каждом ящике с помощью маркерной доски делают 10 рядков, в которые высевают примерно по 30 семян испытываемых образцов и закрывают их слоем песка. Семена предварительно можно обработать фунгицидами. После появления всходов в рядках оставляют по 20 растений. Удобно также высевать предварительно пророщенное зерно.

В каждый ящик рендомизированно помещают неустойчивый контроль. Кроме того, в тест включают сорт с известной степенью устойчивости. Обычно в каждой серии экспериментов используют 20 ящиков, то есть одновременно можно оценить около 180 образцов (исключая стандарт). Новый набор сортов высевают с недельным интервалом.

Через 2 дня после появления всходов растения единообразно заселяют тлями разных возрастов путем стряхивания насекомых на оцениваемые образцы или размещения растений с тлями между рядками. Ящики просматривают через 2 дня и при необходимости производят дополнительное заселение. В этот период достаточной нагрузкой является 2 тли на растение для колосовых злаков, для сорго – 4 особи. При гибели растений неустойчивого сорта (обычно на 10–14 день после заселения) производится визуальная оценка устойчивости по шкале от 1 (растения не повреждены) до 6 (гибель образца). Сорта делят на 3 группы – устойчивые, промежуточные и неустойчивые. На первом этапе оценивают рядок целиком в

одной повторности, а для выделившегося материала проводят оценку каждого растения в рядке индивидуально в 3-х повторностях.

Дополнительным критерием устойчивости может служить сравнение средней высоты растений во время заселения и в момент гибели неустойчивого сорта. Подсчет тлей при оценке не эффективен, так как насекомые мигрируют после гибели неустойчивых растений на соседние образцы. Численность тлей на растениях можно определить через 1–2 суток после заселения, что позволяет судить о степени привлекательности сортов.

Описанная выше методика наиболее пригодна для изучения устойчивости зерновых культур к *S. graminum* и *D. noxia*. При оценке устойчивости зерновых к другим видам вредителей для выявления различий между образцами необходима чрезвычайно высокая нагрузка насекомых на растение. Это является существенным недостатком данного метода. Американские исследователи при изучении устойчивости ячменя к кукурузной тле ослабляли испытываемые растения путем подрезки, что позволило произвести балловую оценку (Hormchong, Wood, 1963).

В литературе описано довольно много модификаций этого метода, в которых исследователи применяют разные шкалы, высевают иное число семян в рядок, заселяют растения большим или меньшим количеством тлей в разные фазы роста и т.п. (Chedester, Michels, 1982; Webster et al., 1987; Du Toit, 1988).

Важным моментом является равномерность заселения исследуемых образцов. Harvey, Martin (1990) стряхивали тлей с растений, однородно распределяя их на листе плотной бумаги. Лист переворачивали над кюветой с тестируемыми образцами и постукивали по тыльной стороне бумаги (нагрузка – 10 тлей/растение). Другой способ – раскладка отрезков листьев (примерно 5 тлей/отрезок) у основания каждого растения (Nkongolo et al., 1990). В опытах Du Toit (1988) бескрылых тлей разных возрастов с помощью мягкой кисточки осторожно снимали с растений, на которых размножали насекомых, в чашки Петри. Тлей переносили в стеклянные пузырьки (60 тлей/пузырек) и затем содержимое равномерно стряхивали над оцениваемым рядком (10–15 растений в фазе первого листа).

При работе с обыкновенной злаковой тлей наиболее удобна следующая шкала (Puterka, Peters, 1988):

1 – нет повреждений;

2 – повреждено до 25% листовой поверхности;

3 – " 26–50

4 – " 51–75

5 – " 76–99

6 – 100%, гибель растений.

Шкала Archer et al. (1982) позволяет уловить более тонкие различия и может быть легко трансформирована в любую другую шкалу (см. раздел «Полевые методы» настоящего издания).

Для оценки устойчивости растений к ячменной тле предлагается шкала (Du Toit, 1988):

1 – высоко устойчив: маленькие изолированные хлоротичные пятна на листьях;

2 – устойчив: изолированные хлоротичные пятна большего размера;

3 – умеренно устойчив: хлоротичные пятна имеют тенденцию становиться полосами;

4 – умеренно неустойчив: явные небольшие полосы, листья имеют тенденцию скручиваться в длину;

5 – неустойчив: заметные бело-желтые полосы, листья сильно скручены;

6 – очень неустойчив: большие бело-желтые полосы, листья сильно скручены и начинают отмирать.

Известно, что на устойчивость к тлям воздействует целый ряд факторов, в том числе уровень минерального питания растений, почвенная инфекция и т.п. В связи с этим лабораторные эксперименты необходимо проводить в строго контролируемых условиях, очень тщательно готовить и довольно часто заменять почву.

Результаты наших опытов показали, что массовый скрининг зерновых колосовых по устойчивости к обыкновенной злаковой тле можно проводить с исполь-

зованием всходов, полученных на вате. Для этого по 20 предварительно пророщенных семян изучаемых образцов раскладывают рядками в кюветы на слой увлажненной водой ваты. Методика оценки аналогична описанной Старксом и Бертоном. Кюветы размещают на трехъярусных светоустановках, помещенных в контролируемые условия.

Lowe (1984) рекомендует метод оценки антибиоза и непредпочитаемости пшеницы к большой злаковой тле. В небольшие сосуды высевают по 15 проросших семян изучаемых сортов. Молодые растения рендомизированно этикетируют. Сосуды располагают в случайном порядке так, чтобы между ними был максимальный контакт. Заселяют сорта в ювенильной фазе (2–3 лист) или позже – в зависимости от того, на какой стадии развития растений изучают устойчивость. Для этого тлей разных возрастов стряхивают на каждую группу растений. Через 6–15 дней оценивают численность насекомых по шкале от 0 до 9 (9 – очень сильное заселение). Если сравнивают растения в разных фазах развития, то 2–3 сосуда помещают рядом, одновременно заселяют образцы и затем оценивают в один и тот же день. Для каждого сорта определяют средний балл, а также процент растений (от 15-ти), оцененных как устойчивые (≤ 4 балла).

Изучение типов устойчивости

Исследование типов устойчивости (антиксеноз, антибиоз, выносливость) необходимо проводить в контролируемых условиях с применением биологически выравненного материала. В таких опытах обычно используют клоны тлей. Для их получения на проростки изучаемой культуры (неустойчивый или районированный сорт) подсаживает одну самку, отловленную в природе, и изолируют с помощью стекол от фонарей «летучая мышь».

Тесты на антиксеноз

Howitt, Painter (1956) предложили методику оценки антиксеноза сорго к кукурузной тле, которую можно использовать и при работе с другими объектами. В ящики высевают 10 сортов по одному рядку в рендомизированном порядке. После посева ящики закрывают тканью с целью предотвращения преждевременного за-

селения растений. Тлей размножают на неустойчивом образце в сосудах. При заселении снимают ткань с ящиков, вокруг них располагают сосуды на таком расстоянии, чтобы опытные образцы могли заселять только крылатые особи. Ежедневно осматривают каждый всход и переставляют ящики в новом порядке. Отмечают число крылатых тлей и личинок на каждом сорте. Основными недостатками данного метода являются громоздкость и трудоемкость.

Методика с использованием ящиков, которую рекомендуют Roberts, Foster (1983) менее трудоемка. По 50 всхожих семян двух оцениваемых сортов высевают в противоположных сторонах ящика, В фазе всходов примерно 200 бескрылых самок помещают в центр и в течение 2–3 дней отмечают число тлей на растениях. Кроме того, определяют количество незаселенных насекомыми растений.

При изучении предпочитаемоети бескрылыми самками *R. padi* 6 видов злаков Leather, Dixon (1982) использовали кюветы (60 × 40 см), наполненные почвой. Тестируемые образцы высевали по определенной схеме (рис. 2.2.2.) и насыпали слой песка. В фазу всходов 30 имаго помещали в центр кюветы и через 72 ч подсчитывали тлей на каждом проростке. Тест включал 3 повторности.

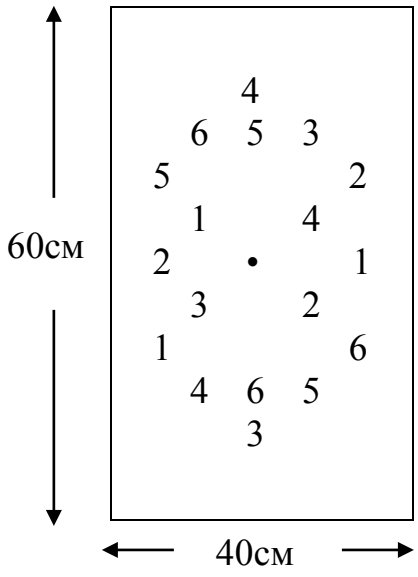


Рис. 2.2.2. Размещение тестируемых образцов (1–6) для изучения антиксеноза (по Leather, Dixon, 1982, с изменениями)
• – место размещения тлей

Ряд исследователей (Schuster, Starks, 1973; Teetes et al., 1974; Wilson et al.,

1978: Webster et al., 1987) рекомендует определять антиксеноз изолированных проростков в сосудах. В круговом порядке рендомизированно высевают семена изучаемых сортов и стандарт. Через неделю после появления всходов оставляют по 1–2 растения каждого образца и заселяют обычно бескрылыми самками (из расчета 5 тлей на растение). Проростки изолируют с помощью фонарных стекол. Подсчет тлей на растениях производят через 2–4 дня или ежедневно в течение 2-х и 3-х дней. Каждый тест состоит из 8–30 повторностей.

Rautapää (1970) изучает непредпочитаемость в 2 этапа. Первоначально в чередующемся круговом порядке высевают 3 изучаемых сорта и стандарт (по 4 растения), которые изолируют и заселяют тлями (по 120–160 крылатых особей стряхивают в центр садка). Число тлей на растениях подсчитывают через 15 мин, затем 3 раза с 15-ти минутными интервалами, и еще раз через 3 ч. Последний учет производят через 24 ч после начала эксперимента (в предыдущих экспериментах было найдено, что различия по антиксенозу проявляются в пределах 24 ч и впоследствии существенно не изменяются). Выделившиеся образцы высевают также в круговом порядке по 2 сорта (8 + 8 растений) и оценивают как и в предварительном испытании.

Webster, Inayatullah (1988) показали, что опыты с высевом исследуемых образцов в круговом порядке и размещением тлей в центре характеризуются большой ошибкой. Считается, что в данном случае при выборе насекомыми кормового растения большое значение имеет освещенность. Поэтому рекомендуется подобные эксперименты проводить в темноте, увеличивая число повторностей.

Предлагаются 2 схемы опыта (рис. 2.2.3.). В металлические кюветы с почвой (51 × 35 × 9 см) рендомизированно высевали 4 сорта ячменя. При способе размещения **а**) в кювете было 24 учетных растения, 24 – нетестируемых. Тлей размещали на почву в центре каждой серии из 4-х растений. Всего – 35 мест размещения насекомых, на каждую точку – 14 особей, то есть примерно 10 тлей/растение. В тесте **б**) каждый из 4-х образцов высевали в "бубнообразном" порядке. Тест состоял из 24-х экспериментальных растений, которые были окружены 27 неучет-

ными. Тлей помещали в 37 точек по 14 особей, то есть 10 тлей/растение. Через 48 ч после заселения подсчитывали тлей. В тесте **б**) растения разных образцов в равной степени контактируют друг с другом, однако при таком способе оценки одновременно можно оценить не более 5–6 образцов.

а

2 4 3 2 1 4 3 2
• • • • • • •
1 (1) (2) (4) (3) (1) (2) 1
• • • • • • •
2 (3) (4) (1) (2) (3) (4) 4
• • • • • • •
3 (2) (4) (2) (4) (3) (1) 3
• • • • • • •
4 (3) (1) (3) (2) (1) (4) 2
• • • • • • •
1 1 2 3 4 1 2 1

б

3 1 3
1 • 2 • 4 • 2
3 • (1) • (3) • (1) • 3
4 • (2) • (4) • (2) • (4) • 2
1 • (3) • (1) • (3) • (1) • 3
2 • (4) • (2) • (4) • (2) • 4
• (3) • (1) • (3) • (1) • (3) • 1
4 • (2) • (4) • (2) • (4) • 2
1 • 3 • 1 • 3 • 1
4 2 4 2

Рис. 2.2.3. Рендомизация растений для тестов на антиксеноз (по Webster, Inayatullah, 1988)

• – места размещения тлей;
(1) – учетное растение;
1 – растение не учитывается

Существует ряд методик с использованием отделенных листьев, которыми особенно удобно пользоваться при изучении антиксеноза взрослых растений.

Изучаемые сорта выращивают в теплице в сосудах до необходимой фазы развития растений. Срезают 15-см отрезки листьев, примерно равные по площади поверхности, объединяют в "букеты" из 4-х листьев и помещают в пузырьки с водой. Пузырьки затыкают ватой и переносят в ящик с почвой так, чтобы отрезанные листья находились над поверхностью. Для каждого образца делают по 4 таких "букета" и размещают их рендомизированно в рядках со значительным расстоянием между пузырьками. Каждый ящик закрывают садком. Примерно 500 тлей отлавливают эксгаустером в разведочном садке и помещают в садок с "букетами". Тлей подсчитывают через 24 ч после заселения (Kieckhefer et al., 1980).

Lowe (1984b) использует прозрачные боксы 15 ×10,5 × 7,3 см, в которые на агаровый гель толщиной 1 см (5 г на литр) помещает по одному листу каждого

изучаемого сорта. Для этих опытов отделяют два 7,5 см отрезка листа (основание и средняя часть пластинки). На агар в случайном порядке под углом помещают 16–20 отрезков (то есть 8–10 сортов) – так, чтобы их верхние концы контактировали с крышкой бокса. Поверхность агара между рядами отрезков листьев закрывают полосами фильтровальной бумаги для предотвращения гибели тлей в жидкой среде. Заселение производится 25–30 молодыми бескрылыми самками (по 3 тли на сорт), после чего боксы оставляют на свету. Через 17 ч подсчитывают имаго на каждом отрезке, а число отрожденных личинок определяют на 24 ч позже. В опыте должно быть 10–15 повторностей (боксов).

При исследовании привлекательности различных сортов для тлей можно использовать методы, применяемые при изучении хемотаксиса членистоногих (Чесноков, 1953; Кожанчиков, 1961). Чашки Коха или Петри выстилают влажной фильтровальной бумагой и по окружности раскладывают отрезки равноценных в физиологическом отношении листьев исследуемых сортов с минимальными промежутками между ними. Удобно использовать одновременно 4–6 вариантов корма. В свободный центр чашки помещают 50–100 особей тлей одного возраста и физиологического состояния. Учет производят через 12 ч или через сутки. Для получения надежных результатов необходимо 15–20 повторностей. Наши исследования показали, что для продления жизнеспособности отрезки листьев лучше раскладывать на бумагу, смоченную 0,004%-ным раствором бензимидазола.

Тесты на антибиоз

Антибиоз – основной тип устойчивости. Наиболее часто используемые критерии антибиоза растений к тлям – продолжительность преимагинального развития и плодовитость насекомых (общая или за определенный период времени). Кроме того, показателями антибиотического воздействия растений могут служить продолжительность жизни тлей, масса и размеры их тела, особенности поведения на различных сортах и т.п.

Наиболее простым является метод изучения коэффициента размножения тлей при питании на разных сортах (Гендрик, Шапиро, 1978). В тепличных ус-

ловиях в сосудах выращивают по 5 растений одного сорта. В опыте должно быть не менее 10 повторностей. На всходы под изоляторы подсаживают личинок первого возраста из расчета 1 особь на растение. Через определенный промежуток времени (10–20 дней) подсчитывают абсолютное количество тлей. Коэффициент рассчитывают по формуле: К = средняя плодовитость самки за время опыта / продолжительность опыта в днях.

При небольшом количестве оцениваемых образцов численность тлей рекомендуется учитывать несколько раз через каждые 5 дней. При проведении учетов регистрируют также число погибших взрослых особей и личинок.

Большинство экспериментов по изучению антибиоза предусматривает индивидуальную изоляцию тлей. Испытываемые растения данного образца выращивают по одному в сосудах до фазы двух листьев. Всходы заселяют 1–5 бескрылыми самками и изолируют. Через сутки имаго и молодых личинок (кроме одной) удаляют. За развитием оставшейся нимфы производят ежедневные наблюдения. После начала репродуктивного периода ежедневно или один раз в два дня подсчитывают и удаляют отрождающихся личинок. В результате экспериментов можно определить: время до начала репродуктивного периода (в том числе и продолжительность развития каждого возраста личинок), репродуктивный и пострепродуктивный периоды в днях, плодовитость самок, смертность тлей. Большинство исследователей рекомендует подобные опыты проводить в 10–20 повторностях (Schuster, Starks, 1973; Teetes et al., 1974; Wilson et al., 1978; Webster et al., 1987).

Известно, что тли наиболее плодовиты в начальной фазе репродуктивного периода (Chaudhary et al., 1969), поэтому многие исследователи определяют не общую плодовитость самок, а число отрожденных нимф за определенный промежуток времени (обычно 5–7 дней). В данных экспериментах также должно быть не менее 10 повторностей (Hsu, Robinson, 1962).

Наши исследования (Радченко, 1986) показали, что в качестве критерия антибиотической устойчивости можно использовать площадь под кривой нарастания численности вредителя. Данный показатель суммирует продолжительность

развития, плодовитость и смертность тлей. Первоначально определяют плодовитость индивидуально изолированных насекомых на пятый день репродуктивного периода. Вновь отрождающееся потомство не удаляют, а проводят дальнейшие учеты численности с интервалом 2 дня в течение двух недель, после чего определяют площадь под кривой. Чем больше площадь – тем менее устойчив образец.

Как указывалось выше, работа с растениями в сосудах с почвой может служить источником ошибок классификации. Ряд ученых для того, чтобы элиминировать влияние на устойчивость растений возможной неоднородности почвы, получают проростки на вермикулите, а затем переносят их в контейнеры с питательным раствором. Изоляторами служат стеклянные трубки с вентиляционными отверстиями, заклеенными мелкоячеистой сеткой. Для определения плодовитости по 1 личинке четвертого возраста помещают на проросток и после начала живорождения один раз в 2 дня учитывают и удаляют личинок. Имаго каждые 8 дней переносят на новый проросток. В каждом варианте опыта – 12 повторностей (Morgan et al., 1980).

В ходе наших опытов разработан метод оценки антибиоза, который практически полностью исключает воздействие варьирующих условий на растения и вредителей (Радченко, 1987). На смоченную водой вату, помещенную в половинки чашек Петри, раскладывают по одному проросшему здоровому зерну оцениваемого образца. Примерно через 3–5 дней всходы заселяют двумя бескрылыми самками и изолируют фонарными стеклами. На следующий день имаго и молодых личинок (кроме одной) удаляют. Для установления начала репродуктивного периода садки просматривают 2 раза в день, а затем определяют плодовитость тлей за период, равный минимальной продолжительности преимагинального развития отрожденных самкой личинок (5–7 дней от начала живорождения самки, что зависит от вида тли). При необходимости в чашки подливают воду. Садки размещают на светоустановке. В каждом варианте опыта 12–15 повторностей.

Насекомых разводят в аналогичных садках. Перед началом эксперимента тлей предварительно размножают в течение 2-х поколений на растениях испыты-

ваемых образцов, а затем переносят самок на соответствующий сорт для получения одновозрастных личинок.

Плодовитость насекомых при питании на взрослых растениях обычно определяют путем подсадки определенного количества тлей в целлофановые изоляторы на колосья и листья в 10–20 повторностях. Такие садки-изоляторы удобно клеить с помощью насыщенного водного раствора хлористого цинка (целлофан сохраняет прозрачность), но можно применять и различные синтетические клеи. Для опытов используют также микрокамеры (см. полевые методы).

Lowe (1984) при изучении устойчивости озимой пшеницы к большой злаковой тле применяет индивидуальную изоляцию личинок 2 и 3 возраста на листьях или колосьях в цилиндрических целлофановых изоляторах длиной 18,5 см и диаметром 2,5 см. Для каждого варианта опыта – 8 повторностей. Изоляторы плотно закрепляются на растениях с помощью поролоновых прокладок. Садки срезают и производят учеты в тот момент, когда старшее потомство первоначально отсаженных насекомых созревает и начинает размножаться. Те садки, которые невозможно просмотреть в один день с остальными, хранят при -22°С до 10 дней. Для каждого садка отмечают фазу роста побега, степень некроза листовой пластинки, число тлей, число взрослых особей и общую массу всех тлей из садка.

Массу тлей в качестве показателя антибиотической устойчивости рекомендуют определять многие исследователи. Так, Wood (1971) определял массу 10 имаго после питания вредителей на различных сортах с точностью до 0,002 мг. Schuster, Starks (1973) на индивидуально изолированных проростках получали по 5 пятидневных нимф (аналогично методу по определению плодовитости) и быстро взвешивали. В опыте – 10 повторностей,

Размеры тела насекомых также являются важным критерием антибиоза. В своих экспериментах Wood (1961) определял средние длину и ширину тела, а также средний размах крыльев тлей. Для этого по 20 особей (10 крылатых и 10 бескрылых) рендомизированно брали с растений изучаемых сортов, на которых насекомых размножали в течение восьми поколений, помещали в хлороформ и

производили соответствующие измерения.

Белошапкин (1984) предлагает следующую схему опыта. В пробирках длиной 18 и диаметром 2 см на торфо-песчаной смеси получают проростки восприимчивого сорта, заселяют их тлями (по 1 самке на всход) и закрывают ватными пробками. Из первоначально отсаженных 3–5 особей выбирают одну и для дальнейших опытов оставляют 5 личинок, рожденных этой самкой на второй день репродуктивного периода. Тлей размножают на восприимчивом сорте в течение 3-х – 4-х поколений, получая в итоге 70–80 тлей одного клона и поколения. 60 особей используют для предварительного размножения в течение двух поколений на изучаемых образцах. В итоге получают по 30 тлей, адаптированных к питанию на определенных образцах. Для оценки антибиоза на 10 растений данного сорта в пробирки подсаживают по 2 особи, питавшихся на этом же образце, и после имагинальной линьки измеряют длину тела самок от основания усиков до основания хвостика. Обычно удобно работать одновременно с десятью сортами. После проведения измерений тлей переносят для адаптации на следующую серию образцов.

Известно, что выделение медвяной росы тлями на устойчивых сортах значительно меньше, чем на неустойчивых. Трех бескрылых самок помещают в микросадок и после начала живорождения на листе оставляют одну личинку. Степень экскреции определяют как количество капелек, выделенных за 24 часовые интервалы. В одном тесте подсчитывают количество капель в течение 10 дней после имагинальной линьки личинок, в другом подсчет производят и для имаго, и для личинок. В каждом варианте опыта – 6 повторностей (Teetes et al., 1974).

Ряд исследователей отмечает тесную корреляцию плодовитости с числом хорошо развитых эмбрионов у самок. Молодых имаго помещают по одной на проростки изучаемых сортов. После живорождения на каждом растении 2-х – 3-х личинок самок удаляют. Затем аналогичным способом получают на проростках по 5–8 самок второго поколения. Отбирают по 5 особей с растения, взвешивают их и вскрывают. Для оценки каждого сорта берут по 60 тлей.

Вскрытие производят в 70% спирте путем вытягивания хвостика с помощью

тонкого пинцета, стараясь давить на переднюю часть брюшка. Подсчитывают общее число эмбрионов и количество эмбрионов с пигментированными глазами. Если объем работы большой, то можно часть тлей хранить в живом состоянии после взвешивания при температуре 2°С в течение 3-х дней (Dewar, 1977). Необходимо отметить, что фактическая плодовитость тлей обычно несколько больше, чем число эмбрионов.

Выживаемость и плодовитость тлей оценивают и ни отделенных листьях растений (Gill, Metcalfe, 1977; Behura, Bohidar, 1983). Так, Gill, Metcalfe (1977) оценивали антибиотическую устойчивость ячменя к *R. maidis*. В фазе 5–6 листа срезали 3-й и 4-й листья с оцениваемых образцов. Один конец каждого образца погружали во влажный песок в чашках Петри и заселяли крылатыми особями тли. Через 24 ч отрожденных нимф переносили на вновь отрезанные листья соответствующего сорта в чашках Петри. После начала живорождения каждые 2–3 дня потомство подсчитывали и удаляли, а первоначально отсаженных самок переносили на вновь отделенные листья.

Нами установлена возможность использования бензимидазольной техники, широко распространенной в фитопатологических исследованиях, для изучения устойчивости зерновых культур к тлям (Радченко, Семенова, 1988; Кривченко, Радченко, 1989). Метод основан на продлении жизнеспособности отделенных листьев изучаемых образцов за счет воздействия на них водного раствора бензимидазола.

В кюветах на смоченной водой вате получают всходы оцениваемых сортов. Равноценные в физиологическом отношении 5–10 отрезков листьев длиной 1–2 см раскладывают в чашки Петри диаметром 100 мм на вату, обильно смоченную 0,004%-ным раствором бензимидазола. Первоначально готовят маточный раствор (1 г вещества на 1 л воды), а затем – рабочий (40 мл маточного раствора на 960 мл воды). Листья в чашке заселяют партеногенетическими самками (3 особи на отрезок). На следующий день имаго удаляют, оставляя личинок первого возраста. Через 4–5 дней отрезки листьев испытуемых сортов раскладывают по одному в пла-

стиковые чашки Петри диаметром 40 мм на смоченную раствором бензимидазола вату, после чего на них индивидуально изолируют подросших личинок 4-го возраста. Возможно использование чашек Петри и большего диаметра, что менее удобно для работы. Антибиоз оценивают по плодовитости тлей на 5–7 день репродуктивного периода. В каждом варианте опыта 12–20 повторностей (чашек Петри).

Бензимидазольную технику можно применять и для проведения более длительных опытов. В наших опытах *R. padi* на периодически заменявшихся отрезках листьев жила и размножалась (плодовитость до 70–80 личинок) в течение месяца. Поэтому в опытах с применением бензимидазола очень удобно определять продолжительность развития каждого возраста индивидуально изолированных тлей, репродуктивный и пострепродуктивный периоды в днях, плодовитость самок. Можно оценивать и другие показатели (масса тлей, размеры тела и др.). При работе с обыкновенной злаковой и ячменной тлями устойчивость растений можно оценивать по степени обесцвечивания отрезков листьев с применением балловой шкалы. Оценку производят при отмирании неустойчивого контроля.

С помощью бензимидазольного метода можно оценивать устойчивость и взрослых растений, выращенных в поле или в теплице.

Необходимо отметить, что при одновременной оценке образцов различных видов пшеницы мы иногда получали несколько искаженные результаты, что, видимо, можно объяснить неодинаковой реакцией их растений на бензимидазол. Однако это нельзя рассматривать как препятствие для использования метода, так как на практике обычно оценивают образцы, относящиеся к одному ботаническому виду.

Бензимидазольная техника наиболее целесообразна для массовой оценки антибиоза, в то время как детальное изучение этого фактора устойчивости лучше проводить с использованием интактных растений.

Якшин (1990) предлагает для сорго следующую модификацию метода. Физиологически равноценные круглые высечки первого листа раскладывают в кру-

говом порядке в чашки Петри на слой ваты, покрытый фильтровальной бумагой и смоченный 0,004%-ным раствором бензимидазола. В центр чашки помещают 25–30 особей обыкновенной злаковой тли. Высечки листьев размещают блоками по 5 штук, причем один блок – устойчивый контроль, один блок – неустойчивый контроль. Подсчет тлей через 8 ч позволяет судить о привлекательности испытываемых образцов. Дальнейшие учеты имаго и личинок через 24, 48 и 70 ч характеризуют уровень антибиоза. Наиболее надежные результаты оценки антибиотической устойчивости дает показатель, основанный на вычислении разности числа тлей, подсчитанных через 70 и 48 часов.

Тесты на выносливость

Оценку толерантности сортов обычно проводят по реакции растений на чрезвычайно сильное заселение насекомыми.

Чесноков (1956) при изучении выносливости пшеницы к повреждению тлями высевал в ящики по 4 опытных сорта. Заселение насекомыми проводили в фазу кущения из расчета 30–40 особей на растение. Ящики закрывали марлевыми изоляторами и через 30 дней описывали состояние растений каждого сорта.

В опытах Hsu, Robinson (1962) на каждое индивидуально изолированное растение ячменя подсаживали по 10 личинок последнего возраста одного клона черемуховой тли, размноженной на неустойчивом образце. Еженедельно проводили учеты, отмечая количество погибших и выживших растений. В каждом варианте опыта было 10 повторностей. Эксперимент продолжался в течение 6–8 недель. К устойчивым относили те образцы, где не менее 5-ти растений из десяти выживали к концу шестой недели опыта.

Более корректное изучение выносливости предусматривает поддержание на растениях фиксированного количества тлей.

При работе с *R. padi* растения испытываемых сортов выращивают индивидуально в сосудах. Через 4 дня после появления исходов проростки измеряют от уровня почвы до кончика листа, а затем каждое растение заселяют десятью бескрылыми самками и изолируют. Постоянную численность тлей поддерживают

путем удаления через каждые 48 ч отрождающихся личинок в течение двух недель, после чего растения повторно измеряют и результаты сравнивают с первоначальным измерением. В тест можно включить контроль без заселения, с которым и проводить сравнение высоты растений. Кроме того, определяют также степень нанесенного тлями вреда по шкале от 1 (растения не повреждены) до 6 или 9 (гибель всходов). Оценку проводят в 8–10 повторностях (Schuster, Starks, 1973; Wilson et al., 1978; Starks et al., 1983).

При изучении выносливости растений к ячменной тле в подобных опытах нагрузку необходимо увеличивать (15 насекомых/растение), а учет степени повреждения проводить через 3 недели (Webster et al., 1987) .

Schwessing, Wilde (1979b) рекомендуют определять выносливость растений по величине потерь сухой массы листьев вследствие питания тлей.

На питательном растворе получают проростки оцениваемых сортов, заселяют их десятью личинками 4-го возраста или имаго и изолируют. Через 7 дней растения срезают, а тлей стряхивают и подсчитывают. Листья и тлей высушивают при температуре 60°С в течение 10 ч. В эксперимент включают контроль без заселения. Опыт состоит из 8 повторностей. Вычисляют средние потери сухого вещества листьев (разница между массой заселенных и незаселенных растений). Затем путем деления потерь сухого вещества листьев на сухую массу тлей определяют единицу потерь сухой массы листьев на единицу сухой массы тлей.

Необходимо отметить, что при изучении толерантности необходимо использование вирулентных клонов насекомых. На сложность отчленения толерантности прежде всего от антибиоза указывают и другие авторы, предлагая ряд способов более корректной оценки выносливости растений (Dixon et al., 1990b; Reese, Schwenke, 1994; Lamb, MacKay, 1995), которые, однако, все же не могут полностью исключить влияние антибиотической устойчивости. Более того, даже при работе с биотипом вредителя, вирулентным к определенному гену устойчивости, выявляемая "выносливость" может быть вызвана действием малых генов антибиоза и антиксеноза.

Литература

Белошапкин С.И. Совершенствование метода оценки устойчивости злаков к злаковым тлям (лабораторные опыты с *Rhopalosiphum padi* L. на пшенице) // Известия ТСХА. 1984. Вып. 3. С. 134-140.

Бей-Биенко Г.Я., Богданов-Катьков Н.Н., Ильинский А.М., Фалькенштейн Б.Ю., Щеголев В.Н. Сельскохозяйственная энтомология. М.-Л.: Сельхозгиз. 1941. 648 с.

Везиров Н.Д. Тли, вредящие злаковым культурам в Нахичеванской АССР //Труды нахичеванской комплексной зональной опытной станции. Баку. 1966. Вып. 4. С. 52-61.

Вилкова Н.А., Шапиро И.Д., Гуслиц И.С., Рабичук А.В. Методические рекомендации по оценке устойчивости зерновых культур к вредителям. М. 1983. 46 с.

Гендрик Ю.Н., Шапиро И.Д. Злаковые тли // Методические рекомендации по оценке устойчивости с.-х. культур к вредителям. Л. 1978. С. 33-56.

Дворянкина В.А., Михайлова Н.А. Морфо-физиологические признаки устойчивости пшеницы к большой злаковой тле // Интегрир. защита с.-х. культур в условиях интенсивного земледелия. Воронеж. 1988. С. 33-41.

Дудник Г.Ф. К биологии злаковых тлей в условиях Винницкой области // Труды УСХА. 1979. Вып. 230. С. 83-84.

Дудник Г.Ф. Фенология и прогноз развития большой злаковой тли *Sitobion avenae* Fabr. в условиях Винницкой области.– В кн.: Интегрирован. защита раст. от вредителей и болезней зерн. и корм. культур. Киев. 1981. С. 149-151.

Дудник Г.Ф. Прогнозирование злаковых тлей // Защита растений. 1982. № 8. С. 35.

Знаменский А.В. Насекомые вредящие полеводству. Ч.1 Вредители зерновых злаков // Труды Полтавской с.-х. опытной станции. 1926. Вып. 50. 296 с.

Кожанчиков И.В. Методы исследования экологии насекомых. М. 1961. 287 с.

Кривченко В.И., Радченко Е.Е. Бензимидазольный метод оценки устойчивости зерновых культур к тле//Селекция и семеноводство. 1989. № 2. С.18-19.

Лебедев В.П. Динамика фитонцидной активности листьев черемухи обыкновенной и ее связь с циклом развития черемуховой тли. – В кн.: Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины. Материалы VIII совещания. Киев: Наукова думка. 1981. С. 312-314.

Лукьянова М.В., Родионова Н.А., Трофимовская А.Я. Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса. Л.: ВИР, 1981. 32 с.

Мамонтова В.А. Тли сельскохозяйственных культур правобережной лесостепи УССР. Киев: Изд-во АН УССР. 1953. 72 с.

Мережко А.Ф., Удачин Р.А., Зуев В.Е., Филатенко А.А., Сербин А.А., Ляпунова О.А., Косов В.Ю., Куркиев У.К., Охотникова Т.В., Наврузбеков Н.А., Богуславский Р.Л., Абдуллаева А.К., Чикида Н.Н., Митрофанова О.П., Потокина С.А. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале: (Методические указания). СПб.: ВИР, 1999. 82 с.

Мордвилко А.К. К биологии и морфологии тлей (сем. Aphididae Poss.) // Труды Русского энтомологического общества. Пб. 1901. Т. 33. С. 1-84, 162-1012.

Мордвилко А.К. Злаковые тли (Aphidodea). Часть 1. // Известия Петрогр. обл. ст. защ. раст. Пб. 1921. Т. III. № 3. 72 с.

Морошкина О.С. Злаковая тля (*Toxoptera graminum* Rond.). (Биология, экология, испытание мер борьбы). Ростов-на Дону. 1930. 60 с.

Невский В.П. Тли Средней Азии. Ташкент: Узбекистанская опытная станция защиты растений. 1929. 424 с.

Николенко М.П., Омельченко Л.И. Злаковые тли на озимой пшенице и обоснование мер борьбы с ними в условиях юга Украины: Методические рекомендации. Одесса. 1974. 10 с.

Николенко М.П., Омельченко Л.И. Злаковые тли // Энтомологическая оценка селекционного материала зерновых и зернобобовых культур: Методические указания. Харьков, 1980. С. 39-46.

Николенко М.П., Омельченко Л.И., Дремлюк Г.К., Драненко И.А. Об устойчивости сорго к злаковым тлям // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. Одесса. 1979. Вып. 33. С. 50-54.

Омельченко Л.И., Николенко М.Н. Сбор и хранение яиц большой злаковой тли для создания инвазионного фона //Науч.-техн. бюл. ВСГИ. Одесса. 1983. Вып. 2 (48). С. 55-58.

Новокшонова В.Г. Биоэкологические особенности развития черемуховой тли *Rhopalosiphum padi* L. на черемухе.– В кн.: Биол. основы освоения, реконструкции и охраны живот. мира Белоруссии. Тез. докл. 5 зоолог. конф. Минск. 1983. С. 58-59.

Пайнтер Р. Устойчивость растений к насекомым. М. 1953. 442 с.

Радченко Е.Е. Об устойчивости некоторых видов пшеницы к черемуховой тле //Селекция и семеноводство. 1986. № 2. С.35-36.

Радченко Е.Е. Лабораторный метод оценки антибиотической устойчивости зерновых культур к тлям // Сб. науч. тр. по прикл. бот., ген и сел. Л. 1987. Т. 110. С. 109-110.

Радченко Е.Е., Кривченко В.И. Создание инвазионного фона для оценки устойчивости зерновых культур к тлям // С.-х. биология. 1987. № 8. С. 119-122.

Радченко Е.Е., Семенова А.Г. Изучение устойчивости зерновых и зернобобовых культур к тлям в лабораторных условиях: Методические указания. Л. 1988. 18 с.

Цинцадзе Н.К., Надирадзе Н.В. К изучению биологии обыкновенной злаковой тли *Schizaphis* (=*Toxoptera*) *graminum* Rond. в Грузии // Труды Грузинского с.-х. ин–та. 1977. Т. 102. С. 97-104.

Чесноков П.Г. Методы исследования устойчивости растений к вредителям. М.-Л. 1953. 136 с.

Чесноков П.Г. Устойчивость зерновых культур к насекомым. М. 1956. 307 с.

Шапиро И.Д., Рапопорт Е.Г. Злаковые тли // Методические рекомендации по оценке устойчивости зерновых колосовых культур к вредителям. М. 1988. С. 7-13.

Шапошников Г.Х. Подотряд Aphidinea – тли. – В кн.: Определитель насекомых Европейской части СССР. Т.1 Низшие, древнекрылые, с неполным превращением. Под редакцией Г.Я. Бей–Биенко. М.-Л.: Наука. 1964. С. 489-616.

Шаруда Г.И., Голосняк Н.М. Злаковые тли зерновых культур в Харьковской области // Труды Харьковского с.-х. ин-та. 1977. Т. 232. С. 3-6.

Шуровенков Б.Г. Большая злаковая тля // Защита растений. 1972. № 5. С.19-20.

Шуровенков Б.Г. Большая злаковая тля // Защита растений. 1975. № 9. С.16-17.

Шуровенков Ю.Б. Сосущие вредители злаковых культур в лесостепи Северного Зауралья // Труды Всеросс. НИИ защиты растений. 1977. Т. 5. С. 29-38.

Якушев Б.С., Добрякова Е.П. Некоторые особенности биологии обыкновенной злаковой тли на сорго в Саратовской области // Защита растений от вредителей и болезней на юго-востоке и в западном Казахстане. Саратов. 1980. С. 3-7.

Якушевский Е.С., Варадинов С.Г., Корнейчук В.А., Баняи Л. Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ возделываемых видов рода *Sorghum* Moench. Л. 1982. 34 с.

Якшин Г.В. Устойчивость сорго к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. в связи с селекцией на иммунитет: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Л. 1990. 18 с.

A'Brook J. Forecasting the incidence of aphids using weather data // Bull. OEPP. 1983. V. 13. № 2. P. 229-233.

Archer T.L., Oncen A.B., Matheson R.L., Bynum E.D., Jr. Nitrogen fertilizer influence on greenbug (Homoptera: Aphididae) dynamics and damage to sorghum // J. Econ. Entomol. 1982. V. 75. № 4. P. 695-698.

Arnold D.C. Effects of cold temperatures and grazing on greenbug populations in wheat in Noble County, Oklahoma, 1975–76 // J. Kans. Entomol. Soc. 1981. V. 54. № 3. P. 571-577.

Ba–Angood S.A., Stewart R.K. Occurence, development, and distribution of cereal aphids on early and late cultivars of wheat, barley, and oats in Southwestern Quebec // Can. Entomol. 1980. V. 112. № 6. P. 615-620.

Behura B.K., Bohidar K. A comparison of the reproductive patterns of apterous and alate virginoparae of three species of aphids//The Aphids. Recent Trends Aphidologic Stud. Proc. Symp. Bhubaneswar.1983. P. 403-408.

Bruchl G.W., Damsteegt V.D. Re–examination of vector – specifity in the barley yellow dwarf virus in Washington // Phytopathology. 1962. V. 52. № 10. P. 1056-1060.

Chaudhary J.P., Ramzan M., Atwal A.S. Preliminary studies on the biology of wheat aphids // Indian J. Agr. Soi. 1969. V. 39. № 7. P. 672-675.

Chedester L.D., Michels G.J., Jr, An evaluation of greenbug resistance in oats // South-west. Entomol. 1982. V. 7. № 3. P. 166-169.Dahms R.G., Connin R.V., Guthrie W.D. Grasses as hosts of the greenbug // J. Econ. Entomol. 1954. V. 47. № 6. P. 1151-1152.

Dahms R.G., Storks K.J. Preventing greenbug outbreaks // USDA. 1973. leaflet № 309. 8p.

Dahms R.G., Wood E.A., Jr. Evaluation of greenbug damage to small grains // J. Econ. Entomol. 1957. V. 50. № 4. P. 443-446.

Dean G.J. The overwintering and abundance of cereal aphids //Ann. Appl. Biol. 1974a. V, 76. № 1. P. 1-7.

Dean G.J. The four dimensions of cereal aphids // Ann. Appl. Biol. 1974b. V. 77. № 1. P. 740-78.

Dedryver C.–A., Tanguy S. Biologie des pucerons des cereales dans l'Ouest de la France. V: – Influence de la date de semis du ble d'hiver sur les modalites d'infestation des parcelles par *Rhopalosiphum padi* (L.), *Sitobion avenae* (F.) et *Metopolophium dirhodum* (Wlk.) et sur le developpement de leurs populations au printemps // Agronomie. 1984. V. 4. № 8. P. 711-719.

Dewar A.M. Assessment of methods for testing varietal resistance to aphids in cereals // Ann. Appl. Biol. 1977. V. 87. № 2. P. 185–190.

Dixon A.G.O., Bramel-Cox P.J., Reese J.C., Harvey T.L. Mechanisms of resistance and their interactions in twelve sources of resistance to biotype E greenbug (Homoptera: Aphidi-dae) in sorghum // J. Econ. Entomol. 1990. V. 83. № 1. P. 234-240.

Dixon A.F.G., Glen D.M. Morph determination in the bird cherry–oat aphid, *Rhopalosiphum padi* L. // Ann. Appl. Biol. 1971. V. 68. № 1. P. 11-21.

Du Toit A. A greenhouse test for screening wheat seedlings for resistance to the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) // Phytophylactica. 1988. V. 20. № 3. P. 321-322.

Forbes A.R. Aphid populations and their damage to oats in British Columbia // Can. J. Plant Ssi. 1962. V. 42. № 4. P. 660-666.

George K.S., Gair R. Crop loss assessment on winter wheat attacked by the grain aphid, *Sitobion avenae* (F.),1974-77 // Plant Pathol. 1979. V. 28. № 3. P.143-149.

Ghanim A. el B., Freier B., Wetzel T. Zum Einflub von konstanten und Wecheseltempera-turen auf die Entwicklungsdauer der Getreidelaus (*Macrosiphum avenae* (Fabr.)) und der Haf-

erlaus (*Rhopalosiphum padi* (L.)) //Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz. 1981. Bd. 17. H.1. S.47-52.

Gill C.C., Metcalfe D.R. Resistance in barley to the corn leaf aphid *Rhopalosiphum maidis* // Canad. J. Plant Sci. 1977. V. 57. № 4. P. 1063-1070.

Hand S.C. The effect of temperature and humidity on the duration of development and hatching success of eggs of the aphid, *Sitobion avenae* // Entomol. exp. et appl. 1983. V. 33. № 2. P. 220-222.

Harvey T.L., Martln T.J. Resistance to Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia*, in wheat, (*Triticun aestivum*) // Cereal Res. Commun. 1990. V. 18. № 1-2. P. 127-129.

Hormchong T., Wood E.A.,Jr. Evaluation of barley varieties for resistance to the corn leaf aphid // J. Econ. Entomol. 1963. V. 56. № 1. P.113-114.

Howitt J., Painter H.H. Field and greenhouse studies regarding the sources and nature of resistance of sorghum, *Sorghum vulgare* Pers., to the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch.) // Kansas agric. exp. st. 1956. Techn. bull. № 82. 38 p.

Hsu S.-J., Robinson A.G. Resistance of barley varieties to the aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) // Can. J. Plant Sci. 1962. V. 42. № 2. P. 247-251.

Jackson O.W., Vessels K.J., Potter D.A. Resistance of selected cool and warm season turfgrasses to the greenbug (*Schizaphis graminum*) //Hort Science. 1981. V.16. № 4. P. 558-559.

Kieckhefer R.W. Field populations of cereal aphids in South Dakota spring grains // J. Econ. Entomol. 1975. V. 68. № 2. P. 161-164.

Kieckhefer R.W., Elliott N.C., Walgenbach D.D. Effects of constant and fluctuating temperatures on developmental rates and demographic statistics of the English grain aphid (Homoptera: Aphididae) // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1989. V. 82. № 6. P. 701-706.

Kieckhefer R.W., Jedlinski H., Brown G.M. Host preferences and reproduction of four cereal aphids on 20 Avena selections // Crop. Sci. 1980. V. 20. № 3. P. 400-402.

Kirkland R., Peries I.D., Hamilton G.C. Differentiation and developmental rate of nymphal instars of greenbug reared on sorghum // J. Kans. Entomol. Soc. 1981. V. 54. № 4. P. 743-747.

Kuroli G. Laboratory investigation of the ontogenesis of oat aphis (*Rhopalosiphum padi* L.) // Z. angew. Entomol. 1984. V. 97. № 1. P. 71-76.

Lamb R.J., MacKay P.A. Tolerance of antibiotic and susceptible cereal seedlings to the aphids *Metopolophium dirhodum* and *Rhopalosiphum padi* //Ann. App. Biol. 1995. V. 127. № 3. P. 573-583.

Leather S.R. Reproduction and survival: a field study of the gynoparae of the cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera, aphididae) on its primary host *Prunus padus* // Ann. Entomol. fenn. 1981. V. 47. № 4. P. 131-135.

Leather S.R. Do gynoparae and males need to feed? An attempt to allocate resources in the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* // Entomol. exp. et appl. 1982. V. 31. № 4. P. 386-390.

Leather S.R. Atmospheric humidity and aphid reproduction // Z. angew. Entomol. 1985. V. 100. № 5. P. 510-513.

Leather S.R., Dixon A.F.G. The effect of cereal growth stage and feeding site on the reproductive activity of the bird-cherry aphid, *Rhopalosiphum padi* // Ann. Appl. Biol. 1981. V. 97. № 2. P. 135-141.

Leather S.R., Dixon A.F.G. Secondary host preferences and reproductive activity of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* // Ann. Appl. Biol. 1982. V. 101. № 2. P. 219-228.

Leather S.R., Lehti J.P. Abundance and survival of eggs of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* in southern Finland //Ann. entomol. fenn. 1981. V.47. № 4. P. 125-130.

Lee G. Assessment of the resistance of wheats to *Sitobion avenae* feeding on the ear // Ann. Appl. Biol. 1984. V. 104. Suppl. P. 100-101.

Lowe H.J.B. The assessment of populations of the aphid *Sitobion avenae* in field trials // J. Agric. Sci. 1984a. V. 102. № 2. P. 487-497.

Lowe H.J.B. Characteristics of resistance to the grain aphid *Sitobion avenae* in winter wheat //Ann. Appl. Biol. 1984b. V .105. № 3. P.529-538.

Lowe H.J.B., Benevicius L.A.D. Increase of numbers of cereal aphids by insecticide application as an aid to plant breeding // J. Agric. Sci. 1981. V. 96. № 3. P.703-705.

Lykouressis D.P. Temperature requirements of *Sitobion avenae* (F.) necessary for ecological studies, by assessing methods for the estimation of instar duration // Z. angew. Entomol. 1985. V. 100. № 5. P. 479-493.

Mac Gillivray M.E., Anderson G.B. Three useful insect cages // Canadian Entomol. 1957. V. 89. № 1. P. 43-46.

Markkula M., Myllymaki S. Biological studies on cereal aphids, *Rhopalosiphum padi* (L.), *Macrosiphum avenae* (F.), and *Acyrthosiphum dirhodum* (Wlk.) (Hom., Aphididae) // Ann. agr. fenn. 1963. V.2. № 1. P.33-43.

Markkula M., Roukka K. Resistance of cereals to the aphids *Rhopalosiphum padi* (L.) and *Macrosiphum avenae* (F.) and fecundity of these aphids on *Graminae*, *Cyperaceae* and *Juncaceae* // Ann. agric. fenn. 1972. V. 11. № 6. P. 417-423.

Morgan J., Wilde G., Johnson D. Greenbug resistance in commercial sorghum hybrids in the seedling stage // J. Econ. Entomol. 1980. V. 73. № 4. P. 510-514.

Muller F.P. Uberwinterung und fundatrix der Getreideblattlaus *Macrosiphum* (*Sitobion*) *avenae* (F.) //Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz. 1977. Bd 13. H. 5. S. 347-353.

Nkongolo K.K., Quick J.S., Peairs F.B., Meyer W.L. Gene location for Russian wheat aphid resistance of "Imperial" rye using wheat-rye addition lines // Cereal Res. Commun. 1990. V. 18. № 4. P. 307-313.

Noble M.D. A simplified clip cage for aphid investigations // Canadian Entomol. 1958. V. 90. № 12. P. 760.

Patch E.M. Food plant catalogue of the aphids of the world including the Phylloxeridae //Maine Agr. Exp. Stn. 1938. Bull. № 293. P. 35-431.

Phillips W.J. *Macrosiphum granarium*, the English grain aphis // J. Agric. Res. 1916. V. 7. № 11. P. 463-480.

Puterka G.J., Peters D.C. Rapid technique for determining greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes B, C, E, and F // J. Econ. Entomol. 1988. V. 81. № 1. P. 396-399.

Puterka G.J., Slosser J.E. Inducing oviparae and males of biotype C greenbugs, *Schizaphis graminum* (Rond.) // Southwest. Entomol. 1983. V. 8. № 4. P. 268-272.

Rautapaa J. Preference of cereal aphids for various cereal varieties and species of *Graminae*, *Juncaceae*, and *Cyperaceae* //Ann. agric. fenn. 1970. V. 9. № 4. P. 267-277.

Rautapaa J. Population dynamics of cereal aphids and method of predicting population trends //Ann. agric. fenn. 1976. V. 15. № 3. P. 272-293.

Reese J.C., Schwenke J.R. Importance and quantification of plant tolerance in crop pest management programs for aphids: greenbug resistance in sorghum // J. Agric. Entomol. 1994. V. 11. № 3. P. 255-270.

Roberts J.J., Foster J.E. Effect of leaf pubescence in wheat on the bird cherry oat aphid (Homoptera: Aphidae) // J. Econ. Entomol. 1983. V. 76. № 6. P. 1320-1322.

Schuster D.J., Starks K.J. Greenbugs: components of host-plant resistance in sorghum // J. Econ. Entomol. 1973. V. 66. № 5. P. 1131-1134.

Schweissing F.C., Wilde G. Temperature and plant nutrient effects on resistance of seedling sorghum to the greenbug // J. Econ. Entomol. 1979a. V. 72. № 1. P. 20-23.

Schweissing F., Wilde G. Predisposition and nonpreference of greenbug for certain host cultivars // Environ. Entomol. 1979b. V. 8. № 6. P. 1070-1072.

Starks K.J., Burton R.L. Greenbugs: determining biotypes, culturing, and screening for plant resistance with notes on rearing parasitoids // USDA. 1977. Tachn. bull. № 1556. 12 p.

Starks K.J., Burton R.L., Merkle O.G. Greenbugs (Homoptera: Aphididae) plant resistance in small grains and sorghum to biotype B // J. Econ. Entomol. 1983. V. 76. № 4. P. 877-880.

Teetes G.L., Johnson J.W., Rosenow D.T. Response of improved resistant sorghum hybrids to natural and artificial greenbug population//J.Econ.Entomol. 1975. V.68. № 4. P.546-548.

Teetes G.L., Schaefer C.A., Johnson J.W. Resistance in sorghums to the greenbug; laboratory determination of mechanisms of resistance // J. Econ. Entomol. 1974. V.67. №3. P.393-396.

Van Marrewijk G.A.M., Dieleman F.L. Screening techniques for determination of aphid resistance in barley // Bulletin SROP. 1977. V. 3. P. 37-43.

Villanueva J.R., Strong F.E. Laboratory studies on the biology of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphidae) //Ann. Entomol. Soc. Amer. 1964. V. 57. № 5. P. 609-613.

Walgenbach D.D., Elliott N.C., Kieckhefer R.W. Constant and fluctuating temperature effects on developmental rates and life table statistics of the greenbug (Homoptera: Aphididae) // J. Econ. Entomol. 1988. V. 81. № 2. P. 501-507.

Ward S.A., Leather S.R., Dixon A.F.G. Temperature prediction and the timing of sex in aphids // Oecologia. 1984. V. 62. № 2. P. 230-233.

Watson S.J., Carter N. Weather and modelling cereal aphid populations in Norfolk (UK) //Bull. OEPP. 1983. V. 13. № 2. P. 223-227.

Watt A.D. The effect of cereal growth stages on the reproductive activity of *Sitobion avenae* and *Metopolophium dirhodum* // Ann. Appl. Biol. 1979. V. 91. № 2. P.147-157.

Webster J.A., Inayatullah C. Assessment of experimental designs for greenbug (Homoptera: Aphididae) antixenosis tests // J. Econ. Entomol. 1988. V. 81. № 4. P. 1246-1250.

Webster J.A., Starks K.J., Burton R.L. Plant resistance studies with *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae), a new United States wheat pest // J. Econ. Entomol. 1987. V. 80. № 4. P. 944-949.

Wiktelius S. Diurnal flight periodicities and temperature thresholds for flight for different migrant forms of *Rhopalosiphum padi* L. (Hom., Aphididae) // Z. angew. Entomol. 1981. V. 92. № 5. P. 449-457.

Wiktelius S. Flight phenology of cereal aphids and possibilities of using suction trap catches as an aid in forecasting outbreaks // Swed. J. Agr. Res. 1982. V. 12. № 1. P.9-16.

Wilson R.L., Starks K.J. Effect of culture–host preconditioning on greenbug response to different plant species // Southwest. Entomol. 1981. V. 6. № 3. P. 229-232.

Wilson R.L., Starks K.J., Pass H., Wood E.A. Resistance in four oat lines to two biotypes of the greenbug // J. Econ. Entomol. 1978. V. 71. № 6. P. 886-887.

Wratten S.D. Reproductive strategy of winged and wingless morphs of the aphids *Sitobion avenae* and *Metopolophium dirhodum* //Ann. Appl. Biol. 1977. V. 85. № 3. P.319-331.

Wood E.A., Jr. Biological studies of a new greenbug biotype // J. Econ. Entomol. 1961. V. 54. № 6. P. 1171-1173.

Wood E.A., Jr. Designation and reaction of three biotypes of the greenbug cultured on resistant and susceptible species of sorghum // J. Econ. Entomol. 1971. V. 64. № 1. P. 183-185.

Н.А. Вилкова, Л.И. Нефедова

2.3. ХЛЕБНЫЕ КЛОПЫ

Проведенный нами анализ современных сортов зерновых культур на основе применения приведенных ниже методов с использованием световой и инфракрасной микроскопии позволил исследовать их иммунологическое состояние по отношению к хлебным клопам. Среди сортов пшеницы, включенных в Государственный реестр селекционных достижений для использования в Северо-Кавказском регионе, неустойчивые сорта составляют более 60%, а устойчивые – всего лишь 15%. Такой уровень насыщенности посевных площадей устойчивыми генотипами в этом регионе в условиях массового размножения вредной черепашки является крайне недостаточным для решения задач повышения урожая и его качества и стабилизации фитосанитарного состояния агробиоценозов. Из мирового опыта известно, что стабилизирующий эффект достигается при насыщении устойчивыми формами около 70–80% посевной площади зерновых культур.

Хлебные клопы занимают довольно широкий ареал. Они встречаются в Центрально-Черноземном, Северо-Кавказском, Поволжском (особенно в Волгоградской и Самарской областях) и Уральском регионах Российской Федерации. Дальше всех на Север проникает австрийская черепашка, граница ареала которой доходит до южных районов Московской области. Маврская черепашка встречается также в Сибири и на Дальнем Востоке, вредная черепашка – в Казахстане. Но более многочисленны и вредоносны хлебные клопы в Северо-Кавказском регионе.

На колосовых злаках питаются щитники-черепашки (*Scutelleridae*) – вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Put.), маврский клоп (*E. maura* L.), австрийский клоп (*E. austriaca* Schrahk.) (рис. 2.3.1.); щитники (*Pentatomidae*) – остроголовая элия (*Aelia acuminata* L.), носатая элия (*A. rostrata* Boh.), сибирская элия (*A. sibirica* Reut.), остроплечий клоп (*Carpocoris fuscispinus* Boh.), ягодный клоп (*Dolycoris baccarum* L.) и клопы-слепняки (*Miridae*) – хлебный клопик (*Trigonotylus ruficornis* Geoffr.), травяной клоп (*Lygus rugulipennis* Popp.) и др. виды.

Особое экономическое значение имеют клопы-черепашки.

Вредная черепашка развивается в одном поколении, клопы-щитники – поливольтинны. Клопы зимуют в лесополосах, на опушках леса. Весной перелетают на посевы озимой пшеницы, затем заселяют яровые зерновые культуры. Самки вредной черепашки откладывают яйца на нижней стороне листа по 7 штук в два ряда. Клопы-щитники откладывают по 16–18 яиц в два ряда по 8–9 штук в каждом, окраска яиц желтовато-коричневая, их поверхность покрыта шипиками. Продолжительность развития яйца в зависимости от температуры воздуха составляет: у вредной черепашки – 6–25 дней; у щитников около 10 дней. Продолжительность развития личинок этих видов хлебных клопов 40–46 дней. За это время личинки проходят 5 возрастов.

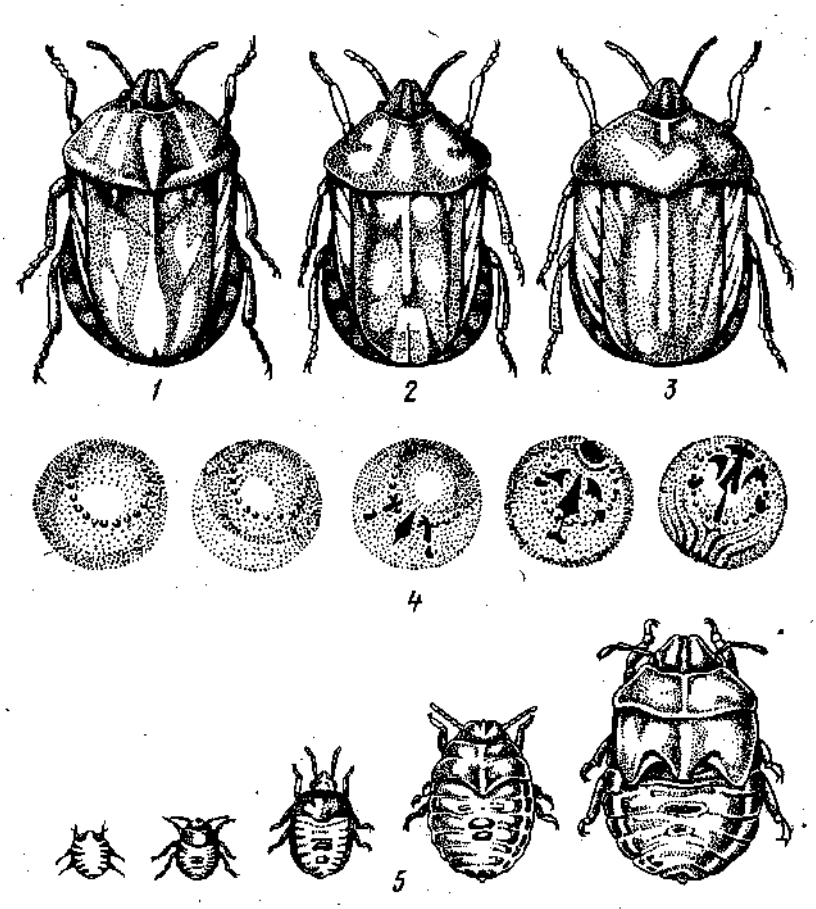


Рис. 2.3.1. Клопы черепашки (по Гриванову, Захарову, 1958):
1 – вредная черепашка; 2 – маврский клоп;
3 – австрийский клоп; 4 – этапы эмбрионального развития;
5 – личинки I – V возрастов

Численность имаго и личинок клопов-щитников на посевах и их вредоносность существенно ниже, чем вредной черепашки.

Среди рассмотренных видов хлебных клопов наиболее опасным видом является вредная черепашка. Получение полноценных компонентов пищи у этого вредителя связано с четко выраженной онтогенетической специфичностью, органо- и гистотропностью (Вилкова, 1979), то есть с изменением мест питания на растении по мере прохождения определенных для каждого этапа органогенетических процессов, за центрами локализации которых перемещаются насекомые. В период всходы-кущение клопы питаются меристематическими тканями конуса нарастания побегов; в фазу трубкования – в зоне формирующегося зачаточного колоса; в период колошения-цветения растений они используют в пищу отдельные части колоса (колосковые и цветковые чешуи, завязи); при наступлении молочной спелости клопы питаются – эмбрионально-эндоспермальными тканями зерновок; восковой и полной спелости – резервными веществами семени.

Личинки и имаго разных видов хлебных клопов существенно различаются по продолжительности питания на колосе и на зерновках в зависимости от их спелости. Так, питание личинок хлебного клопика в период формирования и налива зерновок происходит исключительно на остях, колосковых чешуях и формирующейся зерновке до достижения ею молочно-восковой спелости. Продолжительность питания при этом составляет 20–25 дней. С наступлением восковой спелости численность хлебного клопика на посевах зерновых культур заметно снижается (Михайлова, 1973). Остроплечий и ягодный щитники также не способны питаться на зерновках полной спелости и покидают посевы зерновых культур. Продолжительность их питания на зерновках составляет около 35 дней (Крайнов, 1972). Питание черепашек и некоторых видов элий продолжается 45-50 дней, т.е. до достижения ими полной спелости (Вилкова, 1980).

При этом хлебные клопы обнаруживают четкую топическую приуроченность к определенным частям зерновки (Вилкова, 1979; Вилкова и др., 1976а).

Клопы рода *Eurygaster* наиболее часто располагают свои уколы у основания зерновки, в то время как у ее верхушки уколы обнаруживаются редко. Максимальное количество уколов локализуется на боковых сторонах зерновки, при этом большее их число находится на наружной стороне бочков. На брюшной стороне зерновки уколы, как правило, отсутствуют. Практически не повреждается клопами рода *Eurygaster* и зародыш. Предпочтение клопами боковых сторон зерновок связано с более слабой защитой этих зон колосковыми и цветковыми чешуями. Меньшее количество уколов у верхушки зерновки связано с тем, что виды рода *Eurygaster* предпочитают питаться, располагаясь на колосе головой вниз, что вынуждает их выбирать более удобную базальную часть зерновки.

Для клопов рода *Aelia* характерна более узкая зона атаки зерновки по сравнению с клопами рода *Eurygaster*. Наиболее часто элии избирают при питании боковые части зерновки преимущественно в верхней ее половине.

Клопы рода *Miridae*, повреждающие зерновые культуры в фазе молочно-восковой и восковой спелости, в отличие от щитников, делают подряд несколько уколов вдоль узкого края брюшной части зерновки. Они питаются в основном в верхней части зерновки на брюшке, располагая уколы очень узкой полосой, что обусловлено неспособностью этой группы клопов прокалывать чешуи.

Таким образом, нарушение синхронности прохождения онтогенезов кормовых растений и вредителей, морфологические особенности строения колоса, его метамерных частей и зерновок, определяющие пищевое поведение хлебных клопов, имеют значение в качестве механизмов органогенетического и морфологического барьеров зерновых культур.

При повреждении зерновых культур хлебными клопами возникают различного рода повреждения вегетативных и репродуктивных органов растений.

Типы повреждений растений клопами перезимовавшего поколения:

- усыхание и пожелтение верхушечных листьев (фазы всходы-кущение) возникает при нанесении уколов в зону конуса нарастания; при этом наблюдается отмирание отдельных стеблей или гибель растений;

- гофрированность колосоножки, петлеобразный изгиб колоса, измочаленность остей и верхнего листа проявляются после выколашивания растений и возникают в зачаточном колосе в местах, расположенных выше уколов, нанесенных клопами.

- частичная или полная белоколосость возникает при питании клопов у основания верхнего междоузлия в фазу колошения-цветения растений. При этом происходит повреждение проводящих пучков стебля, в результате этого нарушается поступление транспортных биополимеров к колосу и зерно в таком колосе не образуется.

Повреждения растений клопами перезимовавшего поколения связаны с количественными потерями урожая.

Типы повреждений растений клопами летнего поколения главным образом касаются поврежденности зерна и проявляются в виде белесых пятен, вмятин на поверхности зерновок, частичной или полной их деформации. Возникают в результате ферментативного воздействия вредителей на микроструктуры зерновки. При этом происходит значительное ухудшение качества углеводно-белкового, липидного комплексов и технологических свойств поврежденного зерна, что отражается на качественной стороне урожая.

Ниже приводятся методы оценки устойчивости зерновых культур к наиболее вредоносному виду среди группы хлебных клопов – вредной черепашке.

Полевые методы изучения устойчивости

Для оценки устойчивости при высокой численности популяции вредной черепашки – более 30 взрослых насекомых или более 200 личинок на 1м^2, используют естественный фон. При недостаточной численности вредителя на посевах целесообразно применение искусственного фона. Для его создания проводят следующие работы: 1) сбор клопов в местах зимовки (лесополосы) или на ранних посевах злаков в период колошения-цветения растений; 2) разведение их в специальных садках изоляторах на неустойчивом сорте; 3) заселение опытных делянок

вредителем. При этом в каждый разводочный садок помещают 30–40 клопов (соотношение самцов и самок 1:1), затем его надевают на 50–60 стеблей пшеницы и завязывают снизу и сверху. В период массовой откладки яиц садки с растениями через каждые 4–5 дней срезают, выбранные яйца и личинок используют для заселения опытных делянок, а взрослых насекомых вновь используют для получения новой партии яиц или личинок. Численность яиц или личинок 2–3 возраста на опытных делянках должна составлять 500 шт. на 1 м^2. Преимущественно для заселения растений используют яйца, а личинок – в годы с повышенным количеством осадков.

Поврежденность растений клопами перезимовавшего поколения оценивают дважды. Первый – в начале выхода растений в трубку. При этом учитывают количество погибших и поврежденных растений, имеющих признаки усыхания и пожелтения верхушечных листьев. Определяют процент погибших и поврежденных растений по отношению к общему количеству растений на 1 м^2. Для этого просматривают 8–16 растений (стеблей) в 6–8 кратной повторности по каждому образцу.

Второй учет поврежденности растений проводят в период цветения-налива зерновок. При этом выявляют следующие типы повреждений растений: гофрированность колосоножки, петлеобразный изгиб колоса, измочаленность остей, частичную или полную белоколосость. Результаты поврежденности выражают в процентах по отношению к общему количеству растений на средней площади 1 м^2. Для этого также анализируют 8–16 растений (стеблей) в 6–8 кратной повторности по каждому образцу. Вредоносность клопов в этот период главным образом связана с количественными потерями урожая.

Поврежденность зерна клопами летнего поколения определяют в фазу восковой или полной спелости. По диагонали опытного участка (контрольной единицы) отбирают 100 колосьев (по 25 колосьев в 4-х кратной повторности по краям и в середине участка) каждого исследуемого генотипа. Поврежденные зерна отлича-

ются наличием белесых пятен, иногда с темной точкой в центре пятна (место укола), вмятин на их поверхности, частичной или полной деформацией зерновок.

Вредоносность личинок и клопов летнего поколения связана с качественными потерями урожая из-за резкого снижения товарных и технологических свойств зерна – ухудшения качества клейковины, состава и физико-химических свойств основных биополимеров зерновки.

Параллельно с проведением анализа поврежденности вегетативных и репродуктивных органов растений на тех же учетных делянках выявляют: 1) численность клопов перезимовавшего поколения; 2) после появления личинок 4–5 возрастов летнего поколения дважды с интервалом в 5–7 дней учитывают численность вредителей на растениях, определяют их выживаемость, средневзвешенный возраст, анализируют особенности развития личинок и имаго на разных образцах зерновых культур. Учеты численности вредителя лучше всего проводить в утренние и вечерние часы при хорошем солнечном освещении.

Таким образом, степень устойчивости опытных образцов в полевых условиях оценивают по комплексу показателей. При этом используют популяционные характеристики вредителя (численность, выживаемость, продолжительность развития и т.д.), а также количественные и качественные параметры поврежденности растений.

Лабораторные методы изучения устойчивости

Вымолоченное из отобранных в поле растений зерно составляет исходный образец для анализа поврежденности хлебными клопами. Из полученного исходного образца выделяют средний образец. Для этого зерно исходного образца высыпают на гладкую поверхность, тщательно перемешивают двумя планками и разравнивают в виде квадрата, затем при помощи планок делят зерно по диагонали на 4 треугольника. Из двух противоположных треугольников зерно объединяют, остальное откидывают, исключая из анализа. Такое деление продолжают до тех пор, пока в 2-х противоположных треугольниках не останется необходимое

для анализа количество семян, составляющих средний образец – 25–30 г. Из этого количества семян для анализа отсчитывают 5 проб по 100 зерен в каждой.

Анализ поврежденности зерновок

Для более точной диагностики поврежденности зерна хлебными клопами используют **инфракрасную насадку** НИК-4 (Шапиро и др., 1973, Вилкова и др., 1976а), которую монтируют на обычный световой микроскоп. В основе этого метода лежит разный характер поглощения инфракрасных лучей зерновкой в зависимости от плотности ее структуры. В местах повреждений плотность эндосперма нарушается, в зерне образуются пустоты, в которых задерживаются инфракрасные лучи. Места повреждений становятся видимыми и выглядят в инфракрасном свете в виде темных пятен разной плотности и конфигурации. Неповрежденные зерновки пропускают инфракрасные лучи и в поле зрения микроскопа выглядят прозрачными. Используя инфракрасную насадку, удается выявить не только сильные повреждения, но и незначительные уколы. Обычно центральная часть укола более темная, чем периферийная зона. Такая неравномерность затемнения поврежденного участка эндосперма отражает диффузный характер проникновения пищеварительных ферментов черепашки в зону питания. Для диагностики проб зерна используют шкалу (рис. 2.3.2.):

1 – на зерновке одно небольшое пятно, его видимая площадь под микроскопом (окуляр 4^x, объектив $3{,}5^x$) составляет 0,75 мм^2, если оно плотное, или до 1,5 мм^2, если пятно менее плотное;

2 – на зерновке одно пятно большего размера, очень плотное (темное) или два небольших, менее плотных, занимающих в сумме 1/4-1/5 часть зерновки; общая площадь пятен 2–3 мм^2;

3 – пятна занимают около 1/3 зерновки; общая площадь до 4 мм^2 (плотное) или до 6 мм^2 (менее плотное);

4 – зерновка слабо деформирована; пятно занимает более 1/3 зерновки. Общая площадь 7 мм^2 (плотное) или до 10 мм^2 (менее плотное);

5 – вся зерновка черная и грубо деформирована.

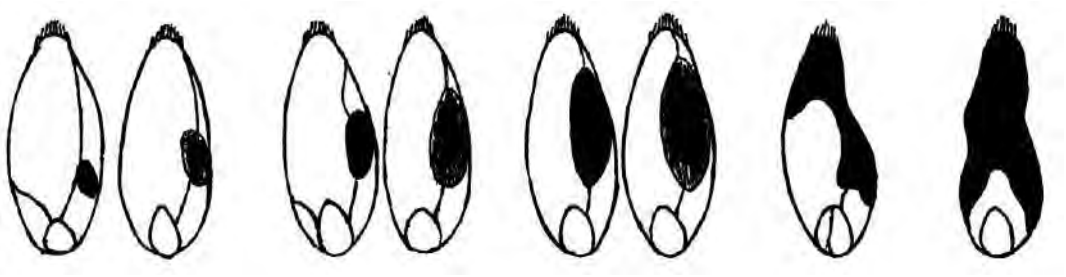


Рис. 2.3.2. Шкала оценки поврежденности зерна ашеницы под инфракрасным микроскопом (Вилкова и др., 1976а)

Отобранные для анализа зерновки просматривают под микроскопом со стороны спинки и брюшка. Рассчитывают среднее количество и процент поврежденных зерен, в том числе по каждому баллу, определяют средневзвешенный балл. Баллы 1–2 отражают меньшую степень повреждения зерновок клопами на завершающих этапах созревания, 4-й и 5-й типы повреждений возникают в случае нанесения уколов в период формирования и налива зерна. Исследования технологических свойств муки показали, что наличие зерновок, характеризующихся наиболее вредоносными типами повреждений (3–4 баллы), вызывает снижение вязкости крахмала при клейстеризации в 2,5 раза и более, повышение уровня разжижения клейковины, а наличие в партиях только 5% зерновок, поврежденных по 4 баллу, резко снижает газообразующую (на 17%) и газоудерживающую (на 20%) способности теста (Шапиро и др., 1989). Такие партии зерна используют только для фуражных целей.

Анализируемые образцы в соответствии с размерами зон повреждения, фиксируемых под инфракрасным микроскопом определенными баллами, по степени их устойчивости к фитофагу делят на 3 группы:

1 – устойчивые сорта. Поврежденность зерна не превышает 10%, в т.ч. содержание зерновок с повреждениями по 3 баллу составляет не более 3%, по 4 баллу до 1,5%; средневзвешенный балл 0,04–0,3.

2 – среднеустойчивые сорта. Поврежденность зерна 10,1–20%, в т.ч. содержание зерновок поврежденных по 3 баллу 3,1–10%, по 4 баллу 1,5–4,0%; средневзвешенный балл 0,35–0,65.

3 – неустойчивые сорта. Поврежденность зерна 20,1–30% и более, в т.ч. содержание зерновок с повреждениями по 3 баллу составляет 10,1–15,0% и более, по 4 баллу 4,1–12,0% и более; средневзвешенный балл 0,75–1,5 и более.

При отсутствии инфракрасной насадки используют простое устройство: на электрическую лампочку надевают металлический каркас и в выходящем свете просматривают пробу зерна, помещенную в чашку Петри. При этом следует отметить, что исследователь анализирует общую поврежденность зерна вредителем, а качественные показатели поврежденности не могут быть оценены в должной мере.

Метод «тонких шлифов», разработанный применительно к энтомологическим объектам (Вилкова и др., 1976б), позволяет исследовать микроструктуры зерновки в нативном состоянии. Метод не требует применения трудоемких цитологических процедур, дает четкую картину распределения тканевых структур зерновки на гистологических препаратах толщиной 20–25 мкм. Показана возможность получения не только временных препаратов, но и перевод их в постоянные, удобные для демонстрации картин мозаики эндосперма зерновок образцов с различной степенью устойчивости к вредной черепашке.

Крахмал, находящийся в эндосперме в виде крахмальных зерен, является основной составной частью пищи вредной черепашки. Размеры, форма, взаимное расположение и структурные особенности крахмальных зерен составляют мозаику эндосперма зерновок злаков. Мозаика эндосперма генетически обусловлена (Александров, 1939; Яковлев, 1950) и может служить маркером устойчивости к вредной черепашке. Различия в структуре мозаики эндосперма зерновок пшеницы разных сортов – одна из причин различной атакуемости ее биополимеров.

Наиболее быстро и полно гидролизуются биополимеры мелких крахмальных зерен в силу их большей удельной поверхности; биополимеры крупных крахмальных зерен разрушаются медленнее и менее полно. Скорость патологических процессов в зерновках при повреждении вредной черепашкой прежде всего зависит от представленности механизмов иммунитета, главным образом атрептического и морфологического барьеров, и определяется генотипом сорта.

Ход выполнения работы.

1. Приготовление шлифа. Зерновка прикрепляется продольной брюшной стороной на предметное стекло с помощью пихтового бальзама, слегка разогретого на огне спиртовки, и шлифуется до четкого проявления зародыша и бороздки. Затем зерновку откалывают скальпелем, снова разогревают бальзам на стекле, прикрепляют зерновку сточенной частью и шлифуют ее до толщины 20–25 мкм.

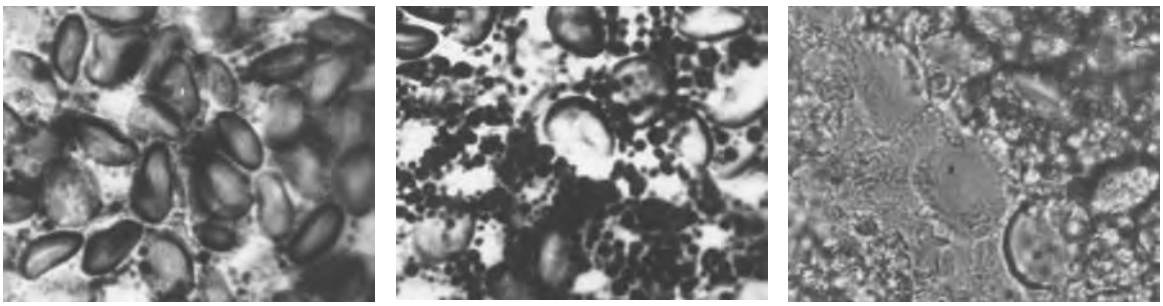
2. Окраска препарата. Для удаления поврежденных крахмальных зерен шлиф тщательно промывают водой. Окрашивание производят раствором Люголя (раствор йода в йодистом калии). Излишки краски оттягивают фильтровальной бумагой. В качестве заключающей среды используют глицерин, разбавленный дистиллированной водой в соотношении 1:1. Приготовленный препарат накрывают покровным стеклом.

3. Анализ препарата под микроскопом включает: определение цены деления окулярмикрометра, измерение крахмальных зерен, подсчет и распределение крахмальных зерен по фракциям – крупные (более 15 мкм), промежуточные 10–15 мкм и мелкие до 10 мкм.

Для выполнения работ необходимы: образцы зерна, шлифовальный станок, микроскоп, окуляр-и объектмикрометры, предметные и покровные стекла, пинцет, скальпель, лезвие, спиртовка, капельницы, пихтовый бальзам, раствор Люголя, глицерин, марлевые салфетки, полоски фильтровальной бумаги.

Для получения статистически достоверных данных изготавливают 10–15 шлифов по каждому образцу; на каждом изготовленном препарате просматривают 4 поля зрения. Результаты заносят в соответствующую таблицу.

Устойчивые к насекомому сорта пшеницы отличаются высоким содержанием (51–65% в поле зрения микроскопа) крупных крахмальных зерен (рис. 2.3.3.), размеры которых больше 15 мкм. Основной фон мозаики эндосперма неустойчивых сортов составляют мелкие крахмальные зерна (57–80%), их размер до 10 мкм. Среднеустойчивые сорта занимают промежуточное положение – содержание крупных крахмальных зерен в поле зрения микроскопа составляет 30–50%.



1 2 3

Рис. 2.3.3. Особенности мозаики эндосперма различных сортов пшеницы:
1 – мозаика эндосперма устойчивого сорта;
2 – мозаика эндосперма неустойчивого сорта;
3 – патологические изменения мозаики эндосперма неустойчивого сорта в зоне питания вредной черепашки.

Литература

Александров В.Г. О строении эндосперма зерновки злаков (обзор) // Ботан. журн. 1939. № 1. С. 58-92.

Вилкова Н.А. Иммунитет растений к вредителям и его связь с пищевой специализацией насекомых-фитофагов // Чтения памяти Н.А. Холодковского. Л., 1979. Т. 31. С. 68-103.

Вилкова Н.А. Физиологические основы теории устойчивости растений к вредителям. Автореф. докт. дисс. Л., 1980. 48 с.

Вилкова Н.А., Шапиро И.Д., Борщова Т.А. Использование инфракрасной микроскопии для диагностики повреждения и устойчивости зерновок к клопам // Методы исследований патологических изменений растений. М., 1976а. С. 216-219.

Вилкова Н.А., Шапиро И.Д., Слепян Э.И., Гапонова А.Г. К методике определения устойчивости пшеницы к вредной черепашке // Методы исследований патологических изменений растений. М., 1976б. С. 203-209.

Гриванов К.П., Захаров Л.З. Вредители полевых культур на юго-востоке. Саратов, Саратовское книжное изд-во, 1958. 236 с.

Крайнов Ю.П. Особенности питания и пищеварения хлебных клопов в связи с их взаимоотношениями с кормовыми растениями. Автореф. канд. дисс. Л., 1972. 24 с.

Михайлова Н.А. Эколого-физиологическое обоснование вредоносности слепняков (*Trigonotylus ruficornis* Geoffr. и *Lygus rugulipennis* Popp.) на пшенице. Автореф. канд. дисс. Л., 1973. 26 с.

Шапиро И.Д., Борщова Т.А., Вилкова Н.А. Методика оценки поврежденности зерновок пшеницы вредной черепашкой // Тр. ВИЗР, 1973. В. 37. С. 185-186.

Шапиро И.Д., Вилкова Н.А., Нефедова Л.И., Иващенко Л.С., Васильев С.В. Практикум по иммунитету растений к вредителям. Л., 1989. 181 с.

Яковлев М.С. Структура эндосперма и зародыша злаков как систематический признак // Тр. БИН им. В.Л.Комарова АН СССР, 1950. В. 1. Сер. VII. С. 121-218.

Н.А. Вилкова, Л.И. Нефедова

2.4. СТЕБЛЕВЫЕ ХЛЕБНЫЕ ПИЛИЛЬЩИКИ

Наибольший вред зерновым культурам наносят 2 вида стеблевых хлебных пилильщиков: обыкновенный хлебный (*Cephus pygmaeus* L.) и черный хлебный (*Trachelus tabidus* F.). Зона распространения – юг Европейской части России, Закавказье, Южный Урал, Средняя Азия. В Крыму и Ростовской области черный пилильщик преобладает над обыкновенным, а в Поволжье, на Кубани и в Ставропольском крае – обыкновенный над черным. Оба вида пилильщика развиваются в одном поколении и имеют сходную биологию.

Зимуют взрослые, закончившие питание личинки в нижней части стеблей злаков в «пеньке» в пергаментном коконе. Весной здесь же личинки окукливаются. Имаго появляются в мае–июне, живут 15–25 дней. Они дополнительно питаются на крестоцветных культурах. Плодовитость самок составляет 35–50 яиц. Самка с помощью пиловидного яйцеклада надпиливает соломину и откладывает внутрь стебля по одному яйцу. Пилильщики откладывают яйца в верхние междоузлия. Самки при этом предпочитают растения с более развитыми, полыми стеблями, имеющими толстые стенки. К фазе восковой спелости зерна личинки, прогрызая все междоузлия, оказываются в нижней части стебля. Они надрезают изнутри основание стебля примерно на уровне почвы и формируют кокон.

Личинки внутри стебля питаются тканями паренхимы. При питании они разрушают элементы проводящей системы растений, что ухудшает отток ассимилятов в колос. При этом может наблюдаться частичная или полная белоколосость. Поврежденные стебли белеют, легко обламываются и падают.

Общие потери урожая из-за повреждений стеблевыми хлебными пилильщиками на озимых культурах составляют 5–10%, яровых – 14–22%. Кроме того, ухудшаются качество зерна и кормовые свойства поврежденной соломы, увеличиваются косвенные потери урожая при уборке посевов, поврежденных пилильщиками.

Полевые методы изучения устойчивости

Оценку устойчивости зерновых культур к стеблевым хлебным пилильщикам проводят на естественном фоне при численности свыше 10 личинок на 1 м^2 посева; при более низкой численности используют искусственный фон. Искусственный фон создают несколькими способами: путем выкапывания пеньков (стерни) на полях, где была сильная заселенность пилильщиком, и путем обсева опытного участка нектароносами (озимый или яровой рапс, горчица, сурепка и др.), привлекающими имаго. При первом способе на 1 м^2 посева заготавливают 10 пеньков с зимующими в них личинками. Выкопанные осенью пеньки хранят в холодном помещении или под навесом. Весной пеньки прикапывают между рядками высеянных образцов на глубину 10 см и более: на озимых культурах – в начале их отрастания, на яровых – в период появления всходов. Обсев опытного участка нектароносами (ширина полосы 4–6 м) производят в несколько сроков: первый – в начале отрастания озимых или одновременно с посевом яровых культур; повторный посев – через 7–10 дней.

Для предварительной оценки устойчивости образцов зерновых культур к хлебным пилильщикам используют глазомерный метод. Оценку проводят в фазу молочно-восковой спелости. Основными показателями в этом случае служат: количество и процент полегших (подпиленных вредителем) стеблей к общему числу на делянке. Полегшие растения проверяют легким потягиванием стебля вверх. Для оценки образцов используют шкалу:

1 – поврежденность стеблей до 1%;

2 – 1–4%;

3 – 5–20%;

4 – 21–40%;

5 – 41% и более.

Образцы с поврежденностью стеблей 1–2 балла относят к устойчивым, 3 балла – среднеустойчивым, 4–5 баллов – к неустойчивым.

В некоторых случаях для выявления количества зимующих личинок проводят обследование посевов после уборки урожая. Площадь учетной делянки на каждом опытном образце 1 м^2. «Пеньки» выкапывают, и каждый стебель анализируют на наличие личинок.

Для более детальной оценки устойчивости в поле отбирают по 100 растений каждого из опытных образцов, которые далее анализируют в лабораторных условиях. Оценивают поврежденность насекомыми отобранных растений, используя приведенную выше шкалу.

Лабораторные методы изучения устойчивости

Для заключительной оценки устойчивости исследуемых образцов проводят детальные лабораторные исследования: определяют основные элементы структуры урожая; проводят морфометрический анализ стеблей; устанавливают поврежденность стеблей и междоузлий личинками вредителя; определяют параметры механизмов устойчивости.

Анализ основных элементов продуктивности растений включает:

1) измерение длины;
2) подсчет общего количества стеблей, в том числе продуктивных;
3) подсчет междоузлий на каждом стебле;
4) измерение длины колоса;
5) подсчет числа колосков на колосовом стержне;
6) обмолот колосьев и определение массы зерна с каждого растения, массы 1000 семян, установление натуры зерна (единицы объема).

Для определения поврежденности растений личинками вредителя каждый стебель вскрывают скальпелем или лезвием безопасной бритвы. При этом:

1) проводят подсчет количества обнаруженных личинок и место их нахождения;
2) измеряют длину хода личинок;
3) определяют количество поврежденных междоузлий;

4) определяют выполненность стебля и каждого междоузлия сердцевинной паренхимой.

Степень поврежденности междоузлий устанавливают в соответствии со шкалой:

1 – повреждено 1 междоузлие;

2 – повреждено 2 междоузлия;

3 – повреждено 3 междоузлия;

4 – повреждено 4 междоузлия;

5 – повреждено 5 междоузлий.

Для определения степени выполненности соломины паренхимой анализируют по 25 растений исследуемых образцов. Для этого в середине каждого междоузлия лезвием безопасной бритвы делают поперечные срезы. Выполненность междоузлий паренхимой оценивают по шкале:

1 – стебель выполнен паренхимой на 1/5 часть;

2 – 2/5;

3 – 3/5;

4 – 4/5;

5 – стебель выполнен полностью.

Пример расчета индекса выполненности стебля сердцевинной паренхимой: при 4 полых междоузлиях индекс равен 4 ед. (4·1), если все междоузлия заполнены паренхимой, индекс составляет 20 ед. (4·5). Известно, что снижение численности вредителей наблюдается при индексе выполненности стебля 15 ед. При этом 1 междоузлие может быть выполнено паренхимой на 1/5 часть (1·1=1 ед.); 1 на 4/5 (1·4=4 ед.) и 2 междоузлия – полностью выполненными (2·5=10 ед.), что в сумме составляет 15 ед. При анализе исследуемых растений возможна разная встречаемость вариантов расчетов.

Установлено, что выполненность стебля сердцевинной паренхимой является наиболее эффективным и иммунологически значимым механизмом устойчивости зерновых культур к стеблевым пилильщикам.

В выполненных или частично выполненных паренхимой стеблях большое количество яиц и личинок погибает от механического сдавливания и обезвоживания, так как такие стебли быстрее теряют влагу. Наличие паренхимы существенно ухудшает условия питания и продвижения личинок к основанию стебля. Личинки при этом не достигают корневой шейки и образуют колыбельки на высоте 50 см, вследствие чего они вымерзают или уничтожаются при комбайновой уборке. В стеблях сортов пшеницы с выполненной соломиной длина личиночного хода в 11,2 раза больше длины личиночного хода у сортов с полой соломиной. В связи с этим личинки при питании и продвижении расходуют во много раз больше энергии, чем при развитии в полых стеблях, при этом затраты энергии восполняются недостаточно. В результате размеры имаго и личинок, и плодовитость самок существенно снижаются (Шапиро, 1985). Масса имаго, личинки которых развивались на сортах с выполненной соломиной, в 2,5 раза меньше, а плодовитость в 9 раз ниже, чем при развитии на сортах с полой соломиной.

Необходимо иметь в виду, что сорта с полностью выполненной соломиной менее продуктивны, так как на формирование паренхимы расходуется значительная часть первичных ассимилятов. Считают, что для снижения численности стеблевых хлебных пилильщиков до уровня экономического порога вредоносности (ЭПВ) без ущерба для продуктивности сорта индекс выполненности соломины должен составлять 15 единиц.

Одним из показателей устойчивости к пилильщикам также может служить диаметр верхнего междоузлия. Для изучения этого механизма устойчивости анализируют 15 главных стеблей каждого оцениваемого образца. У основания верхнего междоузлия бритвой делают тонкие поперечные срезы. Повторность 5–10 кратная. Диаметр среза измеряют под бинокуляром с помощью окулярмикрометра. К устойчивым относят образцы с диаметром верхнего междоузлия 2,5 мм и менее; к среднеустойчивым – 2,5–3 мм; к неустойчивым – 3,1 мм и более.

Для определения вредоносности пилильщиков анализируют 20 стеблей каждого образца: 10 – неповрежденных и 10 – поврежденных. Определяют основные

элементы продуктивности колоса: длину, число зерен, массу зерна с 1 колоса, массу 1000 семян, количество недоразвитых (щуплых) зерен; определяют натуру зерна.

Потери урожая из-за недобора колосоносных стеблей, подпиленных пилильщиком и не попавших в общий урожай, определяют на поле после уборки методом пробных площадок размером 1 м^2 каждая. Количество площадок составляет 16–20. В пробах учитывают общее количество колосоносных стеблей, в том числе поврежденных пилильщиком. Далее колосья обмолачивают и определяют продуктивность неповрежденных и поврежденных стеблей по основным элементам урожая, описанным выше.

Таким образом, степень устойчивости зерновых культур к стеблевым пилильщикам определяют по комплексу показателей и параметров полевых и лабораторных опытов. Особое внимание при этом уделяют проявлению механизмов иммуногенетической системы зерновых культур, ограничивающих вредоносность стеблевых хлебных пилильщиков.

Литература

Шапиро И. Д. Иммунитет полевых культур к насекомым и клещам. Л., ЗИН АН СССР, 1985. 321 с.

Н.А. Вилкова, Л.И. Нефедова

2.5. КРАСНОГРУДАЯ ПЬЯВИЦА

Красногрудая пьявица – *Lema melanopus.* L. – повреждает пшеницу, ячмень, овес. Зоны наибольшего вреда – важные районы хлебосеяния – Северный Кавказ, степной Крым, Поволжье, Северный Казахстан, юг Западной Сибири и др. Развивается в одном поколении.

Жуки зимуют в почве. Весной они появляются неполовозрелыми и заселяют в начале мая посевы озимых, затем яровых злаков. Жуки выгрызают продолговатые отверстия в листьях. После 1–2 недель дополнительного питания и спаривания самки откладывают яйца на листья, обычно группами по 3–7 яиц в ряд, в виде цепочки. Это совпадает с фазой кущения яровых культур. Продолжительность откладки яиц 1,5–2,0 месяца, наиболее интенсивная – в первые 2 недели. Средняя плодовитость самок 150–200 яиц. Личинки отрождаются из яиц через 13–14 дней. Развитие личинок продолжается около 2 недель. За это время они проходят 4 возраста. Окукливаются личинки в почве на глубине 2–3 см, через 2 недели появляются жуки, которые остаются зимовать в почве.

Во время питания, спаривания и откладки яиц жуки держатся группами, поэтому характер распределения жуков, яиц и личинок по посевам неравномерный – очажный. Миграционная способность личинок очень низкая. Личинки скелетируют листья продольными полосами, выедая паренхиму листовой пластинки. Листья увядают, растения задерживаются в росте, урожай зерна снижается. Наиболее сильные повреждения жуки наносят яровой пшенице и овсу в фазу выхода растений в трубку. Снижение урожая неустойчивых сортов яровых культур достигает 48–50%; озимых – до 15%.

Полевые методы изучения устойчивости

Оценку устойчивости проводят на естественном фоне при численности вредителя на посевах 50 и более жуков на 1 м^2. При более низкой численности создают искусственный фон. Искусственное заселение посевов пьявицей проводят

путем выпуска перезимовавших жуков (свободный выпуск или выпуск под изоляторы). Соотношение самцов и самок должно быть 1:1. Жуков собирают утром с 10 до 12 ч и вечером с 16 до 18 ч. На 1 м^2 посева озимой пшеницы достаточно 50 жуков, при неблагоприятных условиях (холодная весна, засуха и др.) – 100 жуков; на яровой пшенице, овсе и ячмене – 25 жуков на 1 м^2.

Оценку устойчивости зерновых культур к пьявице проводят, учитывая: 1) выбор растений самками при откладке яиц; 2) степень поврежденности растений; 3) уровень снижения продуктивности растений при повреждении фитофагом.

Избирательность растений насекомыми определяют по количеству отложенных яиц и количеству отродившихся личинок. Учет яиц (в среднем на 1 растение или на 1 стебель) проводят в период их массовой откладки в фазу кущения яровых культур и в фазу выхода в трубку озимых. Для этого на 1 м^2 просматривают 25 растений (стеблей) на делянках, расположенных в местах высокой численности вредителя. Повторность 2-х кратная. Через 3 недели на этих опытных делянках проводят учет численности личинок по возрастам (в среднем на 1 растение или 1 стебель). Определяют выживаемость, продолжительность развития и массу личинок при питании на разных по устойчивости образцах зерновых культур. Для этого на 1 м^2 просматривают 50 растений (стеблей). Повторность 2-х кратная.

Для анализа степени поврежденности растений после окончания питания личинок отбирают 100 растений (2 пробы по 50 растений). Используют шкалу:

0 – без повреждений;

1 – точечные выгрызы, следы питания;

2 – небольшие слитные выгрызы, захватывающие не более 4 жилок на 1–2 листьях на стебле;

3 – те же размеры повреждения на 3-х и более листьях;

4 – выгрызы, захватывающие 50% поверхности листа на 1–2 листьях, или 75–100% на 1 листе;

5 – выгрызы, захватывающие 50% поверхности листа на 3–4 листьях, или 75–100% на 2-х и более листьях.

Устойчивые образцы характеризуются 0 и 1, 2 баллами поврежденности растений; среднеустойчивые – 3 баллом; образцы с преобладанием 4 и 5 баллов относят к неустойчивым.

В случае подробного анализа вредоносности пьявицы проводят определение снижения продуктивности растений. Для этого на делянках исследуемых образцов этикетируют по 25 стеблей, поврежденных по определенному баллу. Стебли выбирают одного порядка и с одинаковой степенью развития. Далее стебли анализируют в лабораторных условиях по основным элементам структуры урожая.

Лабораторные методы изучения устойчивости

Снижение продуктивности зерновых культур при повреждении красногрудой пьявицей рассчитывают по следующим формулам:

$К = \frac{a-b}{a}\ 100$, где

К – коэффициент вредоносности;
a – масса 1000 семян неповрежденных стеблей;
b – масса 1000 семян поврежденных стеблей отдельно по каждому баллу.

Далее по коэффициенту вредоносности и проценту поврежденных стеблей по каждому баллу определяют недобор урожая (C_n):

$C_n = \frac{P_n \cdot K_n}{100}$, где

C_n – недобор урожая по определенному баллу;
P_n – процент поврежденных стеблей по данному баллу;
K_n – коэффициент вредоносности для данного балла поврежденности.

Общий недобор урожая рассчитывают по следующей формуле:

$C = C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5$

Используя предложенные формулы, можно определить также недобор массы соломы в результате повреждения растений пьявицей.

В случаях более детального изучения факторов устойчивости зерновых культур к пьявице требуется искусственное разведение вредителя. Для этого в условиях теплицы при определенных параметрах: температуре воздуха 25–27°С, относительной влажности 40–50% и 16-часовом световом дне, проводят разведение жу-

ков в специальных садках на ячмене и овсе. Растения выращивают в вегетационных сосудах, и в фазу 3–4 листа осуществляется выпуск жуков (от 2 до 5 пар на 1 садок). Продолжительность питания вредителя на растениях от 3 до 6 суток.

Показателями физиологического состояния насекомых при питании на разных по устойчивости генотипах зерновых культур служат: среднее количество яиц, отложенных на листья, выживаемость личинок, динамика массы личинок за период питания и др.

В результате изучения факторов устойчивости зерновых культур к пьявице установлено, что одним из наиболее важных иммунологически значимых механизмов морфологических особенностей растений является густота трихом на листьях, включая такие параметры, как плотность, длина, особенности расположения волосков и шипиков на листовой пластинке. На растениях с сильно опушенными листьями большая часть яиц, отложенных самками, и около 30% личинок 1-го возраста погибают от высыхания. Трихомы, попадая в кишечник личинок, не перевариваются, травмируют его слизистую, что значительно ухудшает физиологическое состояние особей и повышает их смертность.

Методика определения опушенности листьев злаков

Для выявления плотности опушения листовой пластинки изготавливают временные препараты. Пробы листьев отбирают в период откладки яиц пьявицей в фазу кущения растений – по 1–2 сформировавшихся листа на 25 растениях каждого анализируемого образца. Листья фиксируют в 70% этиловом спирте, в котором их можно хранить и далее. Лучше для хранения использовать смесь 70% спирта и глицерина в соотношении 2:1, что будет способствовать более легкой мацерации растительных тканей и их просветлению при изготовлении препаратов.

Последовательность работ следующая.

1. Приготовление высечек с базальной, средней и верхней частей листа. Высечки листьев нижним эпидермисом помещают на предметное стекло в каплю глицерина, разведенного дистиллированной водой в соотношении 1:1. Скальпе-

лем или лезвием бритвы осторожно соскабливают мезофилл до верхнего эпидермиса. Затем высечку переворачивают и промывают в растворе глицерина с водой. Излишки глицерина убирают фильтровальной бумагой.

2. На изготовленный препарат наносят краситель (1%-ный раствор сафранина в глицерине в соотношении 1:1) и накрывают покровным стеклом.

3. Анализ препарата под микроскопом. Проводят подсчет числа волосков в поле зрения микроскопа при увеличении 200^x (окуляр 10^x, объектив 20^x). Анализируют 5–10 полей зрения.

4. Пересчет количества волосков на 1 мм^2 поверхности листа.

4.1. Определяют площадь поля зрения микроскопа при данном увеличении по формуле:

$S = \pi r^2$, где

S – площадь поля зрения микроскопа;
r – радиус поля зрения микроскопа;
π – 3,1416.

Диаметр поля зрения (d) измеряют объектмикрометром, используя его цену деления (см. маркировку на пластинке). Анализируемая ткань листа должна занимать все поле зрения микроскопа.

4.2. Определяют количество волосков на 1 мм^2 листовой поверхности по формуле:

$$X = A \times \frac{1mm^2}{S, mm^2}$$, где

X – количество волосков на 1 мм^2;
A – количество волосков в поле зрения микроскопа, шт.;
S – площадь зрения микроскопа, мм^2.

Пример: увеличение микроскопа 200^x (окуляр 10^x, объектив 20^x). Диаметр поля зрения микроскопа (d) при таких данных оптики составляет 74 деления объектмикрометра по 0,01 мм каждое (маркировка), то есть 0,74 мм (0,01 мм × 74 = 0,74 мм); радиус (r) соответственно – 0,37 мм. Подставив эти данные в первую формулу, определяют площадь поля зрения микроскопа ($S = 3{,}1416 \times 0{,}37^2 = 0{,}43$

мм^2). На эту площадь в поле зрения микроскопа приходится 10 волосков. Подставив эти данные во вторую формулу, определяют плотность опушения листа.

$$X = 10 \times \frac{1mm^2}{0{,}43mm^2} = 10 \times 2{,}32 = 23{,}2$$ волоска на 1 мм^2

Отношение $\frac{1mm^2}{S, mm^2} = 2{,}32$ является постоянным коэффициентом при данном увеличении микроскопа.

Для выполнения работ необходимы следующие материалы и оборудование: свежие или фиксированные листья разных образцов, микроскоп, объектмикрометр, предметные и покровные стекла, пинцет, скальпель, препаровальные иглы, фильтровальная бумага, марлевые салфетки, раствор глицерина в дистиллированной воде (1:1), раствор сафранина в глицерине (1:1).

Устойчивые генотипы зерновых культур характеризуются плотностью опушения свыше 50 волосков на 1 мм^2 листа; среднеустойчивые – 3--50 волосков на 1 мм^2; неустойчивые – до 30 волосков на 1 мм^2. Волоски и шипики, расположенные между жилками, в большей мере препятствуют откладке яиц пьявицей, затрудняют передвижение личинок при их питании на листьях, чем волоски, расположенные на жилках.

А.Н. Фролов

2.6. КУКУРУЗНЫЙ МОТЫЛЕК

Кукурузный мотылек *Ostrinia nubilalis* (Hbn.) – один из наиболее опасных вредителей кукурузы *Zea mays* L. Самки откладывают яйца в виде кладок, похожих на капельки стеарина. Гусеницы большую часть времени питаются скрытно, проделывая ходы внутри растений, чаще стеблей, однако повреждают все надземные части, включая листья, метелку, початок.

Вредоносность кукурузного мотылька зависит от фазы развития растения, во время которой происходит питание. Наиболее вредоносны повреждения стебля до, во время и сразу после выметывания метелки. Чем ближе к созреванию, тем слабее повреждение влияет на продуктивность растения. Вредоносность кукурузного мотылька зависит от условий произрастания, скороспелости и сортовой устойчивости растений.

В центральной части России развивается одно поколение вредителя в году, на Северном Кавказе — два, причем вредоносность первого поколения существенно выше, чем второго, несмотря на то, что его численность, как правило, значительно ниже.

Использование генетически модифицированных форм кукурузы, несущих продуцирующий токсин ген Bt, стало общепринятым приемом борьбы с вредителем в США (Barry et al., 2000; Walker et al., 2000; Burkness et al., 2001; Baute et al., 2002; Pilcher et al., 2002; Catangui, 2003; Willmot et al., 2004; Wilson et al., 2005). Однако, интерес к природной устойчивости кукурузы к вредителю и в этой стране не угас (Labatte et al., 1997; Abel et al., 2000; Bohn et al., 2003), ибо ее источники характеризуются многими преимуществами.

Впервые образец кукурузы с природной устойчивостью к кукурузному мотыльку — местный аргентинский сорт Maiz Amargo — был обнаружен в конце 20-х годов прошлого века (Marston, 1933).

К настоящему времени выделено множество генотипов, проявляющих устойчивость к кукурузному мотыльку (Шмараев, 1975; Вилкова и др., 1988; Фролов,

Чумаков, 1990; Guthrie, Dicke, 1972; Hudon et al., 1979; Hudon, Chiang, 1985 и др.). Методические приемы изучения и выделения устойчивых форм кукурузы разрабатывали также и в нашей стране, начиная с конца 50-х годов прошлого века (Шапиро и др., 1971, 1980; Вилкова и др., 1989).

У насекомых, питающихся на устойчивых растениях, обнаруживается прямой токсический (особенно в отношении гусениц I-П возрастов), антиметаболический, детеррентный, антифидантный и другие эффекты, снижается репродуктивный потенциал, и в конечном счете — численность популяции (Шапиро и др., 1979, 1980; Переверзев, 1986; Иващенко, 1988; Penny, Dicke, 1959; Chiang, Holdaway, 1960; Guthrie et al., 1960; Reed et al., 1972; Niemeyer et al., 1987).

Благодаря селекционной работе, особенно активно проводившейся в США, уровень устойчивости гибридов непрерывно рос (Chiang, 1968; Windels et al., 1974). С конца прошлого - начала нынешнего века были усилены работы по созданию устойчивых генотипов кукурузы к кукурузному мотыльку, как в Европе, так и в Китае (Coppolino, 1979; Zhou et al., 1987).

В иммунологической системе кукурузы, как и других растений, выделяют барьеры, обуславливающие антиксеноз, антибиоз и выносливость к повреждениям (Пайнтер, 1953).

Больше всего информации накоплено по антибиотической устойчивости кукурузы к вредитедю, что связано с высокой ее эффективностью, простотой идентификации и относительной легкостью практического использования.

Максимальная смертность гусениц кукурузного мотылька отмечается в I-II возрастах в течение нескольких дней после начала питания (Huber, 1936; Patch, 1943; Chiang, Holdaway, 1960; Dharmalingam et al., 1984; Buske, Witkowski,1985; Robinson et al., 1978). В этот период происходят активные миграции гусениц, более интенсивные при неблагоприятности мест питания (Neiswander, Savage, 1931; Chiang, Hodson, 1959; Robinson et al., 1978; Hudon, LeRoux, 1986). Различия в поврежденности растений разных генотипов главным образом связаны с дифференциальной выживаемостью насекомых в этот период их развития (Chiang,

Holdaway, 1960; Guthrie et al., 1960; Guthrie, 1971; Buske, Witkowski,1985; Hudon, LeRoux, 1986и др.). На устойчивых сортах смертность гусениц достигает 95% и более, снижается скорость развития насекомых, ухудшается их физиологическое состояние (Шапиро и др., 1979a; Chiang, Holdaway, 1960; Penny, Dicke, 1959; Guthrie et al., 1960).

Места питания гусениц I-II возрастов меняются в зависимости от фазы развития растений. Так, питание гусениц первого поколения обычно начинается внутри свернутых спиралью этиолированных частей листьев воронки (Beck, 1956); гусеницы второго поколения питаются пыльцой, скопившейся в основании листьев, тканями влагалищ и воротничков листьев, листовыми обвертками початка и пестичными нитями (Beck, 1956a; Guthrie et al., 1970, 1989). Смертность гусениц зависит от фазы развития растений: она минимальна в период цветения (Neiswander, Huber, 1929; Patch, 1942; Luckmann, Decker, 1952).

Как показывает мировой опыт, с наибольшей частотой устойчивость к кукурузному мотыльку обнаруживается у растений до цветения (в фазу листовой воронки) (Guthrie et al., 1960; Guthrie, Dicke, 1972; Hudon, Chiang, 1985 и др.), тогда как позднее она весьма редка (Pesho et al., 1965; Barry et al., 1983; Barry, 1989; Guthrie, 1989; Mihm, 1985) и известен лишь один источник наследуемой устойчивости — линия В 52, а также несколько генотипов (BS9, В 86 и некоторые другие), созданных с ее использованием (Barry, 1989; Guthrie et al., 1970, 1989).

В устойчивости свернутых в воронку листьев определяющую роль играют вещества вторичного обмена (Beck, 1957). Уже в 50-х г.г. прошлого века было выделено, по крайней мере, два химических компонента, влияющих на устойчивость листьев (Beck et al., 1957). Один из них был идентифицирован как 6-метокси-2,3-бензоксазолинон (6-МБОА) (Smissman et al., 1957). Второе соединение было идентифицировано как 2,4-дигидрокси-7-метокси-1,4-бензоксазин-3-он (ДИМБОА) (Klun et al., 1967). ДИМБОА обнаружил высокий токсический, антифидантный и репеллентный эффект, связанный с нарушением обменных процессов, ингибированием питания, сдерживания роста гусениц, снижения массы тела

и плодовитости имаго (Gahukar, 1979; Campos et al., 1988), и его связь с устойчивостью кукурузы очень хорошо прослежена (Klun et al., 1970, 1973). Полагают, что мишенью действия бензоксазолинонов является энергетический обмен; на митохондриях млекопитающих установлено, что ДИМБОА ингибирует перенос электронов в электроннотранспортной цепи и, кроме того, ингибирует процесс образования АТФ (Niemeyer et al., 1987). При питании источником корма с повышенным содержанием ДИМБОА у гусениц отмечается активизация окислительных ферментов, обнаруживаются другие адаптивные сдвиги в обмене, приводящие к усилению экскреции, депонированию и метаболизму гидроксамовых кислот (Philogène, Arnason, 1988).

ДИМБОА и родственные ему соединения широко распространены среди злаковых (Zuñiga et al., 1983). В естественном состоянии ДИМБОА не содержится в тканях растений, а является продуктом деградации гликозида 4-0-гликозил-2,4-дигидрокси-7-метокси-1,4-бензоксазин-3-она, который при повреждении тканей ферментативно гидролизуется до аглюкона ДИМБОА. ДИМБОА сравнительно нестоек и легко превращается в 6-МБОА (Woodward et al., 1978; Perez, Niemeyer, 1986). Полагают, что ДИМБОА служит основным фактором устойчивости листьев кукурузы, а по концентрации продукта его разложения (6-МБОА) можно судить о его первоначальном содержании в растении и, соответственно, устойчивости (Klun et al., 1970, 1973; Russell et al., 1975; Robinson et al., 1982, 1982a; Rojanaridpiched et al., 1984; Tseng et al., 1984 и др.).

Уровень концентрации ДИМБОА наследуется количественно с преобладанием аддитивных и аддитивно-аддитивных эпистатических эффектов, хотя доминирование и иные эпистатические эффекты также обнаруживаются при отдельных скрещиваниях (Klun et al., 1970; Russell et al., 1975). Косвенный отбор на устойчивость к кукурузному мотыльку по концентрации ДИМБОА оказался не менее эффективным, чем прямой отбор по поврежденности листьев (Tseng et al., 1984).

ДИМБОА – не единственный фактор антибиоза листьев кукурузы. Некоторые из латиноамериканских генотипов содержат так же мало ДИМБОА, как и

неустойчивые стандарты, однако они устойчивы к повреждениям кукурузным мотыльком (Sullivan et al., 1974; Manuwoto, Scriber, 1985). Концентрация ДИМБОА у американских образцов кукурузы в значительной мере является функцией географической широты местности, а также высоты над уровнем моря, что свидетельствует о зависимости концентрации этого соединения от обилия местных патогенных организмов (Reid et al., 1990). Полагают, что помимо ДИМБОА в устойчивости листовых воронок кукурузы могут участвовать также кремнийсодержащие соединения, гемицеллюлоза, лигнин (Rojanaridpiched et al., 1984).

В зависимости от этапа иммунологического изучения материала могут применяться разные планы экспериментов:

1) первоначальный скрининг растительного материала (коллекционных и селекционных номеров);

2) изучение иммунологических свойств у образцов, отобранных на этапе 1;

3) проверка на экологическую стабильность иммунологических свойств;

4) изучение донорских свойств у выделившихся источников устойчивости.

Этап первоначального скрининга имеет целью отбраковать крайне неустойчивые формы при большом объеме материала (сотни и тысячи номеров) и дефиците рабочей силы, средств и времени, так что вполне допустим посев в одном повторении с минимальной площадью делянки (до 1 м^2, 5-гнездная однорядковая делянка) с включением стандартного генотипа через 20-30 номеров. Оценивается антибиотическая устойчивость (по степени повреждения листьев). При получении образцом оценки 6 и более баллов он может быть выбракован как неустойчивый. Отсутствие существенных (более чем в два балла) различий оценок повторений стандартного образца свидетельствует о выровненном фоне заселения. В случае интенсивного естественного фона (если заселено не менее 30–40% растений), допустимо проведение оценок поврежденности листьев без проведения искусственного заселения. Образцу присваивается максимально высокая оценка поврежденности, обнаруженная на делянке. Заслуживают внимания различия в поврежденности образцов, достигающие двух баллов. Как правило, при последующем

изучении в повторениях, такие образцы статистически существенно дифференцируются.

На этапе изучения иммунологических свойств у образцов, прошедших первоначальный скрининг, количество номеров сокращается до такой степени, когда рационально использование делянок больших размеров, высеянных в повторениях (как правило, в трех). Образцы внутри повторений рендомизируются. Площадь делянки увеличивается до 3,4–4,9 м^2 (15–20-гнездная однорядковая делянка). В каждом повторении стандартный генотип повторяется не менее двух раз. Это делается для того, чтобы оценить достоверность опыта. В том случае, если оценки, полученные одним и тем же образцом (стандартом), высеянным два раза, будут выходить за пределы наименьшей существенной разницы, опыт приходится браковать. Как правило, оценки антибиотической устойчивости отличаются стабильностью; меньшая стабильность оценок свойственна ломкости и уровню скрытых потерь урожая зерна от вредителя. При оценке поврежденности листьев проводят искусственное заселение 5-7 растений на делянке, при оценке выносливости — все растения или в крайнем случае не менее 10. Краевые растения на внешней (где установлены этикетки) и на внутренней дорожке рассматриваются как защитные. При обеспечении выровненного интенсивного фона заселения уровень устойчивости образца может быть определен в течение одного цикла изучения (одного года). Характеристика выносливости требует двух-трехлетнего изучения как минимум.

Для проверки на экологическую стабильность устойчивости выделившиеся образцы наряду со стандартами высеваются в разных экологических зонах, при различных сроках посева. Схема опыта — такая же, как при изучении иммунологических свойств (этап 2). Степень экологической стабильности (или пластичности) оценивается разными методами, среди которых наиболее распространены модели Эберхарда-Рассела (Eberhart, Russell, 1966).

На последнем этапе проводится изучение донорских свойств у выделившихся источников устойчивости. Требуется установить наследуется ли устойчивость и

какого можно ожидать повышения устойчивости в гибридных комбинациях от скрещивания с источником устойчивости. Для этого проводят испытания линий на комбинационную способность. Различают общую комбинационную способность (ОКС) и специфическую (СКС). Первая характеризует средний вклад линии по отклонению от среднего по всем гибридным комбинациям, а отклонение фактически наблюдаемых значений от ожидаемых на основании оценок ОКС будет характеризовать СКС линий. Практически для выявления комбинационной способности применяют методы поликросса, тест-кросса и диаллельных скрещиваний. Теория и практика проведения диаллельных скрещиваний обоснованы в работах Б.Гриффинга (Griffing, 1956, 1956a); подробное описание расчетов можно найти и в других руководствах (Фолконер,1985). Испытания гибридов диаллельных схемы (наиболее пригодна 4 модель — без реципрокных комбинаций) проводятся по той же схеме, как и на этапе 2. Для увеличения точности желательно увеличить число повторений минимум до 6 (оценка антибиотической устойчивости) или 8 (оценка выносливости). Хороший пример использования диаллельных скрещиваний для оценки антибиоза кукурузы в отношении кукурузного мотылька можно найти в работах Д.С. Переверзева (1978, 1980), а выносливости — В.С. Сотченко и соавторов (1989). Следует подчеркнуть, что ценность передаваемых источников устойчивости для селекционеров значительно возрастает, если охарактеризованы их генетические свойства.

Выявление устойчивых форм требует создания искусственных фонов заселенности. Лишь в редких случаях и то на первоначальном этапе изучения можно ограничиться проведением оценок на естественном фоне заселения. Работа по созданию фона заселения складывается из следующих этапов: 1) заготовка живого материала в природе и (или) его разведение в лаборатории; 2) получение стадии развития вредителя, с помощью которой создается фон заселения (яйца или гусеницы 1 возраста); 3) заселение растений.

За рубежом (США, Франция, Венгрия и др.) получение яиц кукурузного мотылька в массовом масштабе обеспечивается благодаря использованию искус-

ственных питательных сред (Guthrie, 1982). Детальное описание технологии массового разведения кукурузного мотылька в промышленных масштабах можно найти в публикации И.Д. Шапиро и соавторов (1980).

Исходный живой материал заготавливается осенью (сентябрь-октябрь). После того, как гусеницы закончили питание и ушли в диапаузу, выбирают участки на полях кукурузы, в сильной степени поврежденные кукурузным мотыльком. Выше численность насекомых на орошаемых участках. Стебли срезают, увязывают в снопы (или помещают в мешки из бумаги) и привозят в лабораторию. Стебли хранят на холоде, в недоступном для мышей месте. В течение ноября-декабря они должны быть порезаны (стебель расщепляется с помощью ножа), из них извлекают гусениц, помещаемых в 0,5–0,75 л стеклянные банки по 50 особей в каждой. В сосуд предварительно помещается гофрированная бумажная лента, используемая как субстрат для коконирования и успешной перезимовки гусениц. Банки закрывают чашками Петри или двумя слоями бязи, ставят вниз горлышком. В течение зимы насекомых содержат в неотапливаемом помещении. Низкие температуры (-30°С и ниже) гусеницы переносят легко. На 100 оцениваемых образцов (из расчета по 15 заселяемых растений в каждом) заготавливают не менее 1000 гусениц (с учетом 30–40% смертности за период зимовки и в период реактивации). В отдельные годы смертность может превышать средний уровень, достигая 60%. Необходимое количество заготавливаемых стеблей рассчитывают по пробным резкам в поле. За период хранения от срезки в поле и до извлечения гусениц последние способны покидать стебли, особенно при температуре выше 15°С. Поэтому необходимо заготавливать стебли, по крайней мере, с небольшим запасом (10–15%) по отношению к расчетному их количеству.

Сразу после посева гусениц реактивируют. Для этого банки переносят в термостат, где поддерживают температуру 26–28°С. Перед этим необходимо хорошо смочить бумагу, в которой находятся гусеницы. Увлажнение повторяют по мере подсыхания бумаги (в течение 2–3 недель 1–4 раза). Недостаточное увлажнение тормозит окукливание, избыточное – способствует распространению грибной

инфекции. Оптимум достигается следующим образом: бумага должна быть мокрой сверху донизу, но на дне банки не должно быть стоячей воды. Через 10–12 дней после увлажнения начинается окукливание, еще через 7–8 дней начинается вылет бабочек.

Как дополнительный источник живого материала могут быть использованы взрослые насекомые — бабочки, отловленные в природе. В зоне с одной генерацией плотность популяции часто весьма высока (на светоловушку за ночь попадает до 50 и более особей). В отдельные годы численность бабочек перезимовавшего поколения в зоне с двумя генерациями также бывает высокой и насекомых можно отлавливать на источник ультрафиолетового освещения.

Можно использовать разные способы содержания имаго для получения кладок яиц в лаборатории. Наиболее простой и одновременно наиболее трудоемкий способ — содержание насекомых в 0,5 л банках. Способ этот используется при небольшом объеме работ: заселении 300-500 делянок. Банки занимают относительно большой объем, а пересадка бабочек при извлечении партии яиц требует много времени. Вылетевших за ночь имаго рассаживают по 2–3 пары на банку, куда предварительно помещают цилиндрик из парафинированной бумаги или пергамента. Сверху банки закрывают куском марли, закрепляют резинкой, и помещают мокрую вату. Через 2–3 дня появляются первые кладки. Смену бумажек с яйцами производят через 3–4 дня после появления на них яиц; бабочек пересаживают с помощью стеклянных стаканчиков. Не следует допускать развития яиц до стадии "черной головки" (перед отрождением из яиц через хорион просвечивает потемневшая головная капсула гусениц).

Второй способ — содержание бабочек в цилиндрах стандартного размера (высота 35–40 см, диаметр 20–25 см). В такие садки можно поместить до 80–100 пар бабочек. Для манипулирования насекомыми может быть использован включенный через реостат пылесос (рис. 2.6.1); с его помощью можно за считанные минуты перенести из садка в садок сотню бабочек. Перед пересадкой имаго в садки вставляют и закрепляют булавками или скрепками минимум в двух местах

лист парафинированной бумаги или пергамента, на который самки откладывают яйца. Сверху цилиндр накрывают куском марли, последнюю закрепляют резинкой, на марлю помещают мокрую вату. Ускорение манипулирования бабочками по сравнению с первым способом — пяти-шестикратное. Способ особенно удобен, если используются бабочки, отловленные в природе на ультрафиолетовое излучение. Способ вполне оправдывает себя при объеме работ по заселению около 1,5–2,0 тыс. делянок. Недостатком как первого, так и второго способов является то, что бабочки откладывают некоторое количество яиц на марлю (особенно под ватным тампоном); такие кладки нельзя использовать для заселения растений.

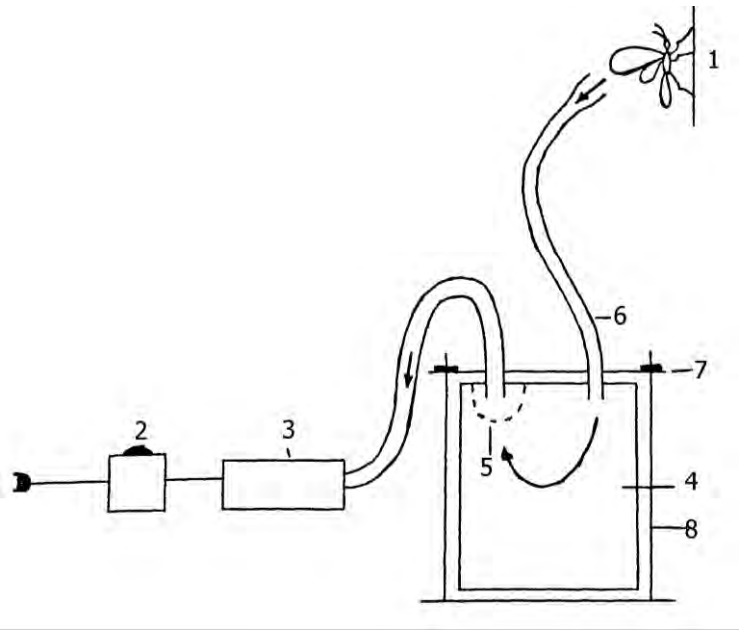


Рис. 2.6.1. Принципиальная схема устройства для пересадки чешуекрылых:
1 – имаго, 2 – лабораторный автотрансформатор, 3 – пылесос, 4 – садок для сбора насекомых, 5 – предохранительная сетка от попадания насекомых внутрь пылесоса, 6 – шланг для сбора насекомых, 7 – верхняя съемная крышка, 8 – система крепления верхней крышки. Стрелками показано движение воздуха в системе.

Третий способ — содержание бабочек в садках, изготовленных проволоки. Каркас садков — деревянный или металлический, изнутри полностью выстлан медной или бронзовой сеткой с мелкими ячеями около 5 мм. Наиболее оптимален садок высотой 60 см, размерами дна 30 × 30 см^2. Внутреннее покрытие сеткой предохраняет от откладки бабочками яиц на гладкую поверхность каркаса. Сверху садок закрывается съемной крышкой из проволочной сетки с размерами ячей

около 5 мм. В садок помещают куколки, которых выбирают периодически из банок с реактивированными гусеницами. Плотность куколок в таком садке можно довести до 300 особей. На крышку сверху помещают лист парафинированной бумаги, пергамента или полиэтиленовой пленки и закрепляют его. Самки откладывают яйца через сетку на бумагу, которую сменяют ежедневно. Откладка яиц в садке продолжается около двух недель. Садки опрыскивают водой минимум дважды в день. В отличие от первых двух способов, рассчитанных на последующее заселение растений кладками яиц, третий способ применяется при заселении гусеницами 1 возраста.

В том случае, если объем работ по заселению растений не превышает 5–6 тыс. делянок, можно проводить заселение кладками яиц. Кладки вырезают ножницами (используют пробойник для пробок), при этом размер бумажки, на которой они располагаются, не должен превышать 15 мм. Кладки раскладывают по чашкам Петри (удобны чашки диаметром 20 см). Верхнюю крышку следует постоянно смачивать водой (необходимо, чтобы вода не попадала непосредственно на кладки яиц), т.к. низкая влажность воздуха вызывает сильную гибель яиц. Яйца можно задерживать в развитии, помещая их в холодильник при температуре 4°С на период не более одной недели. При 28°С развитие яиц длится двое суток, после чего наступает отрождение гусениц. Поскольку при первом и втором способе содержания бабочек партии яиц получаются разновозрастными, требуется минимум дважды в день просматривать чашки и выбирать (с помощью пинцета) потемневшие кладки.

Если объем работ по заселению превышает 7 тыс. делянок, удобнее заселять растения гусеницами 1 возраста. В этом случае для откладки яиц бабочкам дают листы тонкой парафинированной бумаги или тонкого полиэтилена. С плотных листов кладки отстают плохо и травмируются. После снятия с садка листы с кладками должны в течение не менее 3-4 час выдерживаться при низкой влажности воздуха (около 50%). Для снятия кладок с листа последний пропускают обратной стороной вдоль металлической пластинки с острым краем. Кладки легко отвали-

ваются, а чтобы они не слипались, в емкость, куда падают кладки, добавляют крахмал. Кладки помещают в сосуды, стенки которых спрыснуты дистиллированной водой. Легкими вращательными движениями добиваются, чтобы кладки равномерно прилипли к стенкам сосуда; последнее предотвращает слипание кладок в комок. Сверху сосуд закрывают мокрым листом бумаги и кладки инкубируют при комнатной температуре в течение 3–4 суток; при этом бумажную крышку следует периодически увлажнять. Перед отрождением кладки начинают "чернеть"; в это время необходимо сменить мокрый лист крышки бумаги на сухую, плотно прилегающую стеклянную крышку. Сосуды перед отрождением гусениц следует держать в темноте, поскольку на свету гусеницы начинают активно перемещаться в направлении источника света, сбиваясь в плотный комок. Это приводит к повышенной смертности насекомых, затрудняет последующую работу с ними. После того, как 90–100% гусениц отродилось, в сосуд насыпают крупу из мелкораздробленных и просеянных через сито с отверстиями 1 мм кочерыжек кукурузы. Насыпанную в сосуд крупу осторожно перемешивают для того, чтобы гусеницы равномерно распределились по объему. Крупу с гусеницами просеивают через сито с отверстиями диаметром 3 мм для удаления кладок с неотродившимися гусеницами, а также остатков хорионов. Смесь из крупы с гусеницами пересыпают через воронку по пластмассовым бутылям объемом 0,5 л. Удобно использовать пустую и тщательно промытую тару из-под химических реактивов, где на горлышке имеется винтовая резьба. Такая бутылка навинчивается на специальное устройство для механического заселения растений, названное "базукой" (Mihm et al., 1978; Wiseman et al., 1980) (рис. 2.6.2).

После заполнения пластмассовой бутыли и закрепления ее на "базуке" следует как можно быстрее заселить растения. До использования бутыль со смесью в закрытом виде можно держать на холоду (например, в термосе со льдом).

Заселенные "базукой" растения легко отличимы от незаселенных, т.к. на листьях сохраняются остатки крупы, оплетенные паутинными нитями гусениц. В то же время заселенные кладками яиц растения, по крайней мере, пока не проявятся

первые признаки повреждения листьев, неотличимы от незаселенных (Хроменко и др., 1988).

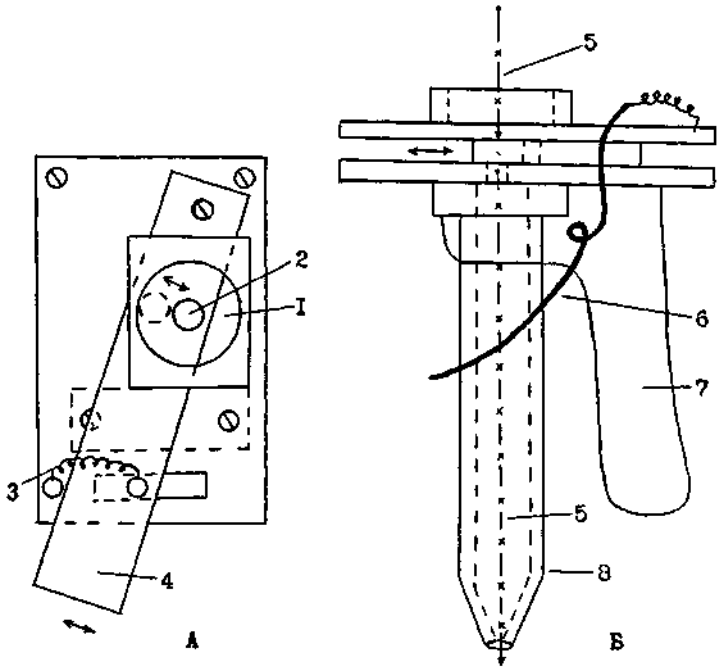


Рис. 2.6.2. Схематическое изображение сверху (А) и сбоку (Б) механического устройства искусственного заселения растений гусеницами чешуекрылых I возраста:

1 – место крепление бутыли со смесью крупы и гусениц; 2 – рабочее отверстие, через которое просыпается смесь из бутыли в трубу, что происходит только в момент совмещения рабочего отверстия с отверстием, просверленным в подвижной планке, при нажатии на спусковой крючок; 3 – пружина, отводящая подвижную планку в исходное положение после нажатия на спусковой крючок; 4 – подвижная планка с отверстием; 5 – путь смеси крупы и гусениц внутри корпуса "базуки", прерванный подвижной планкой, находящейся в исходном положении; 6 – спусковой крючок, перемещающий подвижную планку из исходного положения в рабочее; 7 – рукоятка; 8 – ствол "базуки", направляющий смесь крупы и гусениц в листовую воронку растения. Стрелками обозначено перемещение подвижной планки.

Лучшие результаты дает заселение растений утром или вечером, поскольку гусеницы успевают начать питание до дневной жары и не подвергаются воздействию прямых солнечных лучей. Фаза заселения — 6–7 развитых листьев. Нагрузка — в зависимости от целей опыта. При скрининге можно ограничиться 40 яйцами или гусеницами/растение. Кладки помещают в листовую воронку (средний размер кладки 25 яиц) с помощью пинцета. При этом яйца не должны

касаться поверхности листьев — это может привести их к гибели. В то же время нельзя помещать кладки близко от верхушки раструба — кладки могут быть "вынесены" быстро растущими листьями на поверхность и их унесет ветром или высушит солнце до отрождения гусениц. Кладки должны быть в стадии "черной" головки — т.е. за несколько часов до отрождения гусениц. Заселение в более ранние стадии развития яиц неблагоприятно отражается на их выживаемости. При заселении "базукой" ствол аппарата помещают в листовую воронку, затем производят "выстрел". При наличии росы ствол "базуки" может "залипнуть" — забиться крупой и порции будут неравномерными или даже часть растений вообще останется незаселенной. Поэтому следует особое внимание обращать на выход крупы из ствола, а также периодически легкими круговыми движениями производить перемешивание крупы с гусеницами внутри бутыли, укрепленной на корпусе "базуки". Последнее необходимо для поддержания одинаковой плотности гусениц в смеси (насекомые имеют тенденцию ползти вверх). Желательно процесс заселения производить дважды: например, по 40 гусениц на каждое растение с интервалом в два дня. Заселение растений удобно производить со стороны внешней дорожки.

В настоящее время предложено несколько способов оценки устойчивости кукурузы к кукурузному мотыльку. Здесь приведены лишь те, что наиболее удобны для селекционных целей.

Оценивают антибиотическую устойчивость кукурузы на стадии листовой воронки по степени поврежденности листьев. Для этого используют шкалу Гатри с соавторами (Guthrie et al., 1960), усовершенствованную В.Вильямсом и Ф.Дэвисом (Williams, Davis, 1984).

Оценку поврежденности листьев проводят через 25 дней после заселения. На устойчивых генотипах кукурузы гусеницы гибнут в I-II возрастах, в результате на листьях сохраняются лишь немногочисленные маленькие отверстия (размером с булавочный укол). На неустойчивых образцах гусеницы активно питаются и развиваются, о чем свидетельствуют многочисленные крупные отверстия, остав-

ленные гусеницами 4–5 возрастов (рис. 2.6.3).

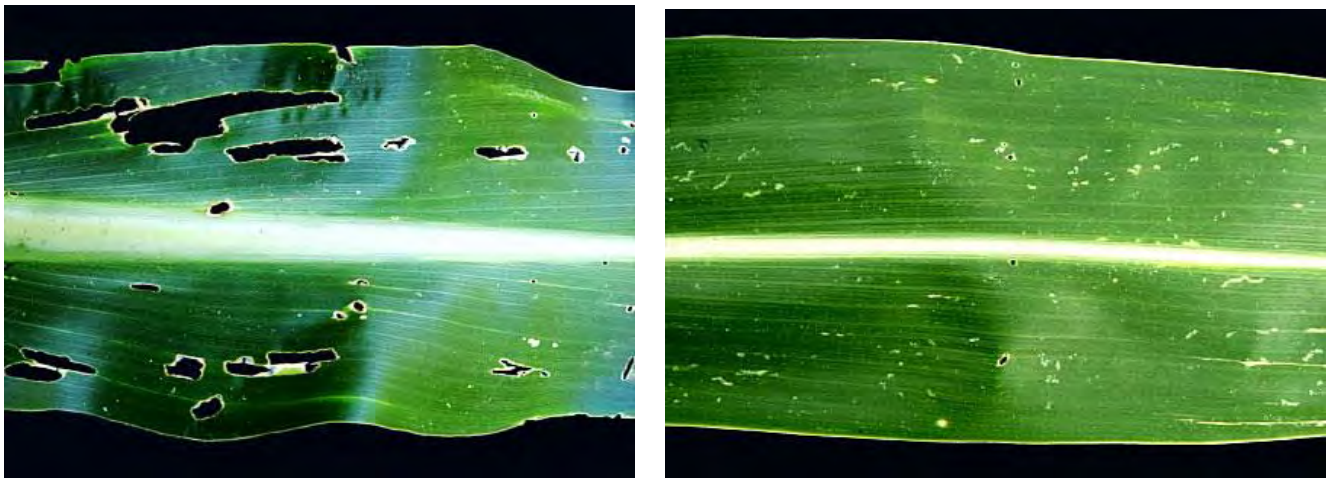


Рис. 2.6.3. Листья кукурузы, сильно (слева) и слабо (справа) поврежденные гусеницами кукурузного мотылька первого поколения.

Оценивают уровень выживаемости гусениц на растениях по 9 балльной шкале степени поврежденности листьев:

1 – небольшое количество отверстий типа булавочных проколов;

2 – небольшое количество отверстий как от дроби на отдельных листьях;

3 – повреждения как от дроби на многих листьях;

4 – помимо повреждений как от дроби, на отдельных листьях имеются более крупные удлиненной формы выгрызы;

5 – такие выгрызы имеются на большом числе листьев;

6 – помимо удлиненных выгрызов на ряде листьев имеются единичные крупные выгрызы (длиной 2.5 см и более);

7 – крупные выгрызы отмечаются на половине листьев;

8 – крупные выгрызы отмечаются на двух третях листьев;

9 – крупные выгрызы отмечаются на всех (или почти всех) листьях

По устойчивости образцы ранжируются следующим образом:

1–2 балла — устойчивые

3–4 "" — умеренно-устойчивые

5–6 "" — неустойчивые

7 баллов и выше — высоко неустойчивые.

В случае раннеспелых генотипов (ФАО 200 и ниже) образцы принято подразделять на устойчивые при повреждении 1–3 балла, промежуточные по устойчивости — 4–5 баллов и неустойчивые — 6 баллов и выше.

Следует подчеркнуть, что заселение крайне важно осуществлять в рекомендованную фазу развития (6–7 листьев). Следует учесть, что раннеспелые формы формируют немного листьев (11–12), тогда как у позднеспелых их гораздо больше (17–19 и более). Очевидно, что сравнивать по устойчивости к вредителю можно лишь генотипы с одинаковой скороспелостью.

Для более детального изучения выделенных по устойчивости форм полезно использовать дополнительные критерии, характеризующие антибиоз растений: количество червоточин, туннелей и гусениц на растении, а также суммарную длину туннелей, проделанных гусеницами в стебле. Анализ растений по этим показателям производится примерно через месяц после заселения. Все указанные показатели характеризуют жизнедеятельность гусениц старших возрастов (в основном последнего пятого возраста) и поэтому тесно коррелированы (на уровне 0,8-0,99), поэтому вполне возможно использовать любой из них. Для ускорения оценки вместо указанных выше показателей можно использовать показатель источенности стебля, измеряемый в баллах:

1 – ходов нет

3 – источено до 25% междоузлий

5 – " " 50% "

7 – " " 75% "

9 – " " 100% "

Стебель разрезается вдоль от основания до узла прикрепления початка (стебель выше початка часто обламывается, теряется и лучше эту часть стебля исключить из анализа вообще) и визуально определяется средневзвешенный по междоузлиям балл источенности. Практика показывает, что оценки степени источенности стебля высоко достоверно коррелируют с количеством червоточин, туннелей,

гусениц и суммарной длиной туннелей в растении.

Показатель источенности особенно рекомендуется применять для оценки устойчивости кукурузы (в дополнение к оценке поврежденности листьев) в зонах с развитием одного поколения кукурузного мотылька. Лёт бабочек обычно растянут, кладки яиц помещаются на растения не только в фазу листовой воронки, но и в фазы выметывания и даже цветения. Поэтому механизмы устойчивости листьев раннеспелой кукурузы способны противостоять только части популяции гусениц вредителя. В этих условиях дополнительные критерии оценки антибиоза приобретают особую ценность и актуальность. Помимо критерия источенности стебля можно воспользоваться и другими показателями (например, Guthrie, 1971; Guthrie et al., 1978.).

Наиболее детальное изучение устойчивости включает также оценку выносливости к повреждениям. Различают два вида выносливости — устойчивость к ломкости (т.е. видимым потерям урожая) и снижению продуктивности (скрытым потерям урожая). При большом количестве растений на делянке можно оценивать ломкость процентом поломанных ниже початка (включая обломы ножки початка) растений по шкале:

1 – сломов нет

2 – имеются сломы метелок, сломов стебля нет

3 – имеются отдельные сломы выше початка, ни одного слома ниже початка нет

5 – имеются сломы стебля на уровне початка

7 – 1–3 растения (из 15–20) имеют сломы стебля ниже початка (включая обломы ножки початка)

9 – число сломов стебля ниже початка (включая обломы ножки початка) более 5

Шкала рассчитана для применения на однорядковых делянках стандартного размера (площадью 4,9 м^2) при густоте стояния растений 60–80 тыс. на га (т.е. 30–40 растений на делянке). При проведении оценок на делянках большего размера

шкала может быть легко модифицирована. Учет ломкости проводят перед уборкой с учетом продолжительности перестоя. Перестой после созревания более 20 дней не рекомендуется, т.к. диагностика природы полегания стеблей (от поражения стеблевыми гнилями или повреждением кукурузным мотыльком, либо их совместного действия) затруднена.

При оценке выносливости генотипов кукурузы к повреждениям кукурузным мотыльком, вызывающим снижение продуктивности растений, обычно используется стандартная процедура, описанная в ряде методических рекомендаций. Наиболее последовательно она реализуется в испытаниях, проводимых Международной рабочей группы по кукурузному мотыльку IWGO Тестируемые образцы выращивают на однорядковых делянках в 3 рендомизированных повторениях. На делянке — 25 растений. Случайным образом выбирается по две группы растений, каждая в количестве 5 растений. Одна группа (вариант А) подвергается стандартному заселению кукурузным мотыльком (по 80 яиц/растение), другая — обрабатывается гранулированным инсектицидом как контроль (вариант В). При этом 2 краевых растения с каждой стороны делянки используются как защитные. Между вариантами А и В должно быть также по крайней мере одно защитное растение. По разнице в продуктивности растений в вариантах А и В, выраженной в процентах к контролю, судят о выносливости генотипа. Процедура уборки — стандартная, с пересчетом на 14% влажность зерна. Кроме того, перед уборкой измеряется средняя высота растений в вариантах А и В. Разницу по высоте также переводят в процент снижения высоты по отношению к контролю. Как показывают международные материалы, оба критерия высоко достоверно коррелируют между собой.

Ломкость и снижение продуктивности растений определяются как физиологическими особенностями генотипов, так и зависят от плотности гусениц на растениях. Последняя в опытах определяется в первую очередь антибиотической устойчивостью генотипов и отчасти зависит от привлекательности растений для гусениц старших возрастов. Как показывает практика, стабильность проявления антибиоза кукурузы к вредителю существенно выше, чем таковая ломкости и

снижения продуктивности под воздействием повреждения насекомым в разных условиях среды. Этот же вывод справедлив и в отношении наследуемости. Антибиотически устойчивые формы растений способны не только предотвратить большие потери урожая, но и вызывают эффект последействия: снижается вероятность массового размножения насекомого в следующих поколениях. Таким образом, антибиозу принадлежит приоритетное значение, и его оценка должна проводиться в первую очередь. Оценка на выносливость служит дополнением.

Наиболее простым способом выделения устойчивых генотипов служит использование скаттер-диаграмм (Ortega et al., 1980; Сотченко и др., 1989). Суть подхода состоит в том, что в системе координат (по оси абсцисс — степень повреждения листьев, по оси ординат — показатель выносливости — видимые или скрытые потери урожая) генотипы изображаются точками. Проводится линия регрессии, на которой восстанавливается перпендикуляр, разделяющий пополам множество точек с координатами x_i и y_i. В левом нижнем квадранте, образованном линией регрессии и перпендикуляром, локализуются генотипы, сочетающие оба механизма устойчивости.

Литература

Вилкова Н.А., Иващенко В.Г., Фролов А.Н., Чумаков М.А., Шапиро И.Д., Навроцкая Н.Б., Инглик П.В., Рабичук А.В., Хроменко А.С., Чучмий И.П. Методические рекомендации по оценке кукурузы на комплексную устойчивость к вредителям и болезням. М.: ВАСХНИЛ, 1989. 43 с.

Вилкова Н.А., Шапиро И.Д., Фролов А.Н., Чумаков М.А. Изучение устойчивости самоопыленных линий кукурузы к кукурузному мотыльку по Программе IWGO // Инф. бюлл. ВПС МОББ. 1988. № 24. С. 57-64.

Иващенко Л.С. Влияние антибиотических факторов кукурузы на метаболизм кукурузного мотылька // Инф. бюлл. ВПС МОББ. 1988. № 24. С. 35-40.

Пайнтер Р. Устойчивость растений к насекомым. М.: ИЛ, 1953. 443 с.

Переверзев Д.С. Особенности накопления жира гусеницами стеблевого мотылька *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera, Pyralidae) в зависимости от сортовой устойчивости кукурузы в зоне с двумя поколениями вредителя // Энтомол. обозр. 1986. Т. 65. Вып. 3. С. 465-469.

Переверзев Д.С. Особенности наследования признака устойчивости кукурузы к стеблевому мотыльку // Генетика. 1980. Т. 16. № 5. С. 853-858.

Переверзев Д.С. Характер проявления устойчивости диаллельных гибридов кукурузы к стеблевому мотыльку // С.-х. биол. 1978. Т. 13. № 6. С. 923-926

Сотченко В.С., Фролов А.Н., Чумаков М.А. Внутри- и межлинейная дифференциа-

ция исходного селекционного материала раннеспелой кукурузы по устойчивости к кукурузному мотыльку // Бюлл. ВИЗР. 1989. № 73. С. 43-47.

Сотченко В.С., Цаган-Манджиев Н.Л., Фролов А.Н. Диаллельный анализ степени бесплодия кукурузы как показателя устойчивости к стрессовым условиям среды // Генетика. 1989. Т. 25. № 5. С. 941-945

Фолконер Д.С. Введение в генетику количественных признаков. М.: Агропромиздат. 1985. 486 с.

Фролов А.Н., Чумаков М.А. Раннеспелые линии кукурузы, устойчивые к стеблевому мотыльку // Селекция и семеноводство. 1990. № 5. С. 29-30.

Хроменко А.С., Чучмий И.П., Фролов А.Н., Чумаков М.А. Приспособление для искусственного заселения растений кукурузы кукурузным мотыльком // Защита растений (Киев). 1988. Вып. 35. С. 26-29.

Шапиро И.Д., Васильев С.В., Переверзев Д.С., Вилкова Н.А., Кудрин А.И. Методологические принципы оценки взаимодействия в системе растение-фитофаг в целях оптимизации путей селекции сортов на устойчивость к вредным организмам (на примере изучения устойчивости кукурузы к стеблевому мотыльку *Ostrinia nubilalis* Hbn.) // Журн. общ. биол. 1979. Т. 40. № 3. С. 385-397.

Шапиро И.Д., Васильев С.В., Переверзев Д.С., Вилкова Н.А., Кудрин А.И. Анализ сложных биологических систем методами современной статистики на примере изучения устойчивости кукурузы к стеблевому мотыльку // Журн. общ. биол. 1980. Т. 41. № 1. С. 105-117.

Шапиро И.Д., Переверзев Д.С., Шура-Бура Г.Б. Методические указания по оценке полевой устойчивости кукурузы к стеблевому мотыльку. Л.: ВИЗР, 1971. 26 с.

Шапиро И.Д., Переверзов Д.С., Худон М. Возможности управления размножением стеблевого мотылька *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera, Pyralidae) в СССР и Канаде путем использования устойчивых форм кукурузы // Энтомол. обозр. 1979а. Т. 58. Вып. 1. С. 3-14.

Шапиро И.Д., Хролинский Л.Г., Фролов А.Н., Вилкова Н.А., Притула Г.И., Казымова Е.М., Остроухов М.А., Чумаков М.А., Муретова Н.Н. Методические рекомендации по оценке устойчивости картофеля и кукурузы к главнейшим вредителям. Л.: ВИЗР. 1980. 138 с.

Шмараев Г.Е. Кукуруза (филогения, классификация, селекция). М.: Колос, 1975. 304 с.

Abel C.A., Berhow M.A., Wilson R.L., Binder B.F., Hibbard B.E. Evaluation of conventional resistance to European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) and western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) in experimental maize lines developed from a backcross breeding program // J. Econ. Entomol. 2000. V. 93. № 6. P. 1814-1821.

Barry B.D., Darrah L.L., Huckla D.L., Antonio A.Q., Smith G.S., O'Day M.H. Performance of transgenic corn hybrids in Missouri for insect control and yield // J. Econ. Entomol. 2000. V. 93. № 3. P. 993-9.

Barry D., Zuber M.S., Antonio A.Q., Darrah L.L. Selection for resistance to the second generation of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) in maiae // J. Econ. Entomol. 1983. V. 76. № 2. P. 392-394.

Barry D.B. Host plant resistance: maize resistance to the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) // Proc. 1st Int. Symp. Maize Arthropods, Gödöló, Aug. 1987: Acta phytopathol. et entomol. hung. 1989. V. 24. № 1-2. P. 43-47.

Baute T.S., Sears M.K., Schaafsma A.W. Use of transgenic *Bacillus thuringiensis* Berliner

corn hybrids to determine the direct economic impact of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on field corn in eastern Canada // J. Econ. Entomol. 2002. V. 95. № 1. P. 57-64.

Beck S.D. Nutrition of the European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hübn.). IV. Feeding reactions of first instar larvae // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1956a. V. 49. № 4. P. 399-405, 510.

Beck S.D. The European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hübn.), and its principal host plant. I. Orientation and feeding behaviour of the larva on the corn plant // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1956. V. 49. № 6. P. 552-558.

Beck S.D. The European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hübn.), and its principal host plant. VI. Host plant resistance to larval establishment // J. Insect Physiol. 1957. V. 1. № 2. P. 158-177.

Beck S.D., Stauffer J.F. The European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hübn.), and its principal host plant. III. Toxic factors influencing larval establishment // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1957. V. 50. № 2. P. 166-170.

Bohn M. , Magg T., Klein D., Melchinger A.E. Breeding early maturing European dent maize (*Zea mays* L.) for improved agronomic performance and resistance against the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hb.) // Maydica. 2003. V. 48. P. 239-247.

Burkness E.C., Hutchison W.D., Bolin P.C., Bartels D.W., Warnock D.F., Davis D.W. Field efficacy of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for management of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) // J. Econ. Entomol. 2001. V. 94. № 1. P. 197-203.

Buske M.C., Witkowski J.F. Leaf feeding resistance and 1st-brood European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera, Pyralidae), larval mortality // J. Kans. Entomol. Soc. 1985. V. 58. № 3. P. 375-377.

Campos F., Arnason J.T., Philogène B.J.R, Atkinson J., Morand P., Werstiuk N.H. Toxicokinetics and metabolism of DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxybenzoxazin-3-one) and MBOA (6-methoxybenzoxazolinone) in the European corn borer *Ostrinia nubilalis* // Proc. 18 Int.Congr. Entomol., Vancouver, July 3-9, 1988: Abstr. and Author Index. Vancouver, 1988. P. 469.

Catangui M.A. Transgenic *Bacillus thuringiensis* corn hybrid performance against univoltine ecotype European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in South Dakota. // J. Econ. Entomol . 2003. V. 96. №. 3. P. 957-968.

Chiang H.C., Hodson A.C. Distribution of the first-generation egg masses of the European corn borer in corn fields // J. Econ. Entomol. 1959. V. 52. № 2. P. 295-299.

Chiang H.C., Holdaway F.G. Relative effectiveness of resistance of field corn to the European corn borer, *Pyrausta nubilalis*, in crop protection and in population control // J. Econ. Entomol. 1960. V. 53. № 5. P. 918-924.

Chiang H.C. Host variety as an ecological factor in the population dynamics of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1968. V. 61. № 6. P.1521-1523.

Coppolino F. La ricerca e la resistenza ai parassiti //Ital agr. 1979. An.116. № 4. P.279-288.

Dharmalingam S., Guthrie W.D., Jarvis J.L., Kindler D., Atkins R.E., Tseng C.T., Zhou D. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): rate of first-generation larval mortality in sorghum hybrids compared with inbred lines of maize during the whorl stage of plant development // J. Econ. Entomol. 1984. V. 77. № 4. P. 929-931.

Eberhart S.A., Russell W.A. Stability parameters for comparing varieties // Crop Sci. 1966. V. 6. № 1. P. 36-40.

Gahukar R.T. Comportement alimentaire et prise de nourriture des chenilles d'*Ostrinia nubilalis* (Lep. Pyraustidae) en présence de "DIMBOA" // Ann. Soc. entomol. France. 1979. T. 15. № 4. P. 649-657.

Griffing B. A generalised treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance // Heredity. 1956. V. 10. P. 31-50.

Griffing B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system // Austral. J. Biol. Sci. 1956a. V. 9. № 4. P. 463-493

Guthrie W.D. Breeding for insect resistance in maize // Plant Breed. Rev. 1989. V. 6. P. 209-243.

Guthrie W.D. Mass rearing of crop pests with emphasis on stem- and pod-borers // Insect Sci. and Applic. 1982. V. 3. № 2-3. p. 89-96.

Guthrie W.D. Resistance of maize to second-brood European corn borers // Proc. 26th Hybrid Corn Industry-Research Conf. 1971. P. 165-179.

Guthrie W.D., Dicke F.F. Resistance of inbred lines of dent corn to leaf feeding by 1st-brood European corn borers // Iowa State J. Sci. 1972. V. 46. № 3. P. 339-355.

Guthrie W.D., Dicke F.F., Neiswander C.R. Leaf and sheath feeding resistance to the European corn borer in eight inbred lines of dent corn // Ohio Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 1960. N 860. 38 p.

Guthrie W.D., Hawk J.A., Jarvis J.L. Performance of inbred line DE 811 in hybrid combinations: resistance to first- and second generation European corn borers (Lepidoptera: Pyralidae) // J. Econ. Entomol. 1989. V.82. № 6. P. 1804-1806.

Guthrie W.D., Huggsns J.L., Chatterji S.M. Sheath and collar feeding resistance to the second-brood European corn borer in six inbred lines of dent corn // Iowa State J. Sci. 1970. V. 44. № 3. P. 297-311.

Guthrie W.D., Russell W.A., Reed G.L., Hallauer A.R., Cox D.F. Methods of evaluating maize for sheath-collar feeding resistance to the European corn borer // Maydica. 1978. V. 23. P. 45-53.

Huber L.L. Hortality of first instar larvae of the European corn borer // Ohio Agr. Exp. Sta. Bull. 1936. № 561. 44 p.

Hudon M., Chiang M.S. Resistance and tolerance of maize germplasm to the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) and its maturity in Quebec // Maydica. 1985. V. 30. № 3. P. 329-337.

Hudon M., Chiang M.S., Chez D. Resistance and tolerance of maize inbred lines to the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) and their maturity in Quebec // Phytoprotection. 1979. V.60. № 1. P. 1-22.

Hudon M., LeRoux E.J. Biology and population dynamics of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) with special reference to sweet corn in Québec. III. Population dynamics and spatial distribution // Phytoprotection. 1986. V. 67. № 2. P. 93-115.

Klun J.A. et Cooperators. An evaluation of resistance of 41 corn inbred lines to the European corn borer by chemical analysis of the plant tissues // Rept. Int. Project *Ostrinia nubilalis*. Phase I Results 1969 and 1970. Budapest, 1973. P. 104-108.

Klun J.A., Guthrie W.D., Hallauer A.R., Russell W.A. Genetic nature of the concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of eleven maize inbreds // Crop Sci. 1970. V. 10. № 1. P. 87-90.

Klun J.A., Tipton C.L., Brindley T.A. 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to the European corn borer // J. Econ. Entomol. 1967. V. 60. № 6. P. 1529-1533.

Labatte J.M., Meusnier S., Migeon A., Piry S., Got B. Natural mortality of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae: field study and modeling // J. Econ. Entomol. 1997. V. 90. № 3. P. 773-783.

Luckmann W.H., Decker G.G. A corn plant maturity index for use in European corn borer ecological and control investigations // J. Econ. Entomol. 1952. V. 45. № 2. P. 226-232.

Manuwoto S., Scriber J.M. Neonate larval survival of European corn borers, *Ostrinia nubilalis*, on high and low DIMBOA genotypes of maize: effects of light intensity and degree of insect inbreeding //Agric. Ecosyst. and Environ. 1985. V. 14. № 3-4. P. 221-236.

Marston A.R. Recent progress in breeding borer resistant corn // Quart. Bull. Michigan Agr. Exp. Sta. 1933. № 5. P. 264-268.

Mihm J.A. Breeding for host plant resistance to maize stem-borers // Insect Sci. and Appl. 1985. V. 6. № 3. P. 369-377.

Mihm J.A., Peairs F.B., Ortega A. New procedures for efficient mass production and artificial infestation with lepidopterous pests of maize // CIMMYT Review. 1978. 138 p.

Neiswander C.R., Huber L.L. Height and silking as factors influencing European corn borer population // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1929. V. 22. № 3. P. 527-542.

Neiswander C.R., Savage J.R. Migration and dissemination of European corn borer larvae (*Pyrausta nubilalis* Hübn.) // J. Econ. Entomol. 1931. V. 24. № 2. P. 389-393.

Niemeyer H., Calcaterra N.B., Roveri O. Inhibition of energy metabolism by benzoxazolin-2-one // Comp. Biochem. and Physiol. 1987. V. 87, Ser. B. № 1. P. 35-39.

Ortega A., Vasal S.K., Mihm J., Hershey C. Breeding for insect resistance in maize. In: Breeding plants resistant to insects. Maxwell F.G., Jennings P.R., eds. 1980. N.-Y. e.a.: Wiley. P. 371-419.

Ortega A., Vasal S.K., Mihm J., Hershey C. Breeding for insect resistance in maize // Breeding plants resistant to insects. W.Y. e.a. : J. Wiley and Sons, 1980. P. 371-420.

Patch L.H. Height of corn as a factor in egg laying by the European corn borer moth in the one-generation area // J. Agr. Res. 1942. V. 64. № 9. P. 503-515.

Patch L.H. Survival, weight and location of European borers feeding on resistant and susceptible field corn // J. Agr. Res. 1943. V. 66. № 1. P. 7-19.

Penny L.H., Dicke F.F. European corn borer damage in resistant and susceptible dent corn hybrids // Agron. J. 1959. V. 51. № 6. P. 15-18.

Perez F.J., Niemeyer H.M. Effect of borate on decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1-4-benzoxazin-3-one, a hydroxamic acid from Graminae // Heterocycle. 1986. V.24. № 1. P. 13-16.

Pesho G.R., Dicke F.F., Russell W.A. Resistance of inbred lines of corn (*Zea mays* L.) to the second brood of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* /Hübner/) // Iowa St. J. Sci. 1965. V. 40. № 1. P. 85-98.

Philogène B.J.R., Arnason J.T. Phytochemical mechanisms of resistance to maize feeding insects // Proc. 18 Int. Congr. Entomol., Vancouver, July 3-9, 1988: Abstr. and Author Index. Vancouver, 1988. P. 102.

Pilcher C.D., Rice M.E., Higgins R.A., Steffey K.L., Hellmich R.L., Witkowski J., Calvin D., Ostlie K.R., Gray M. Biotechnology and the European corn borer: measuring historical farmer perceptions and adoption of transgenic Bt corn as a pest management strategy // J. Econ. Entomol. 2002. V. 95. № 5. P. 878-892.

Reed G.L., Brindley T.A., Showers W.B. Influence of resistant corn leaf tissues on the biology of the European corn borer // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1972. V. 65. № 3. P. 658-662.

Reid L., Arnason J.T., Nozzolillo C., Hamilton R. Resistance of maize germ plasm to Eu-

ropean corn borer, *Ostrinia nubilalis*, as related to geographical origin // Can. J. Bot. 1990. V. 68. № 2. P. 311-316.

Robinson J.F., Klun J.A., Brindley T.A. European corn borer: a nonpreference mechanism of leaf-feeding resistance and its relationship to 1,4-benzoxazin-3-one concentration in dent corn tissue // J. Econ. Entomol. 1978. V. 71. № 3. P. 461-465.

Robinson J.F., Klun J.A., Guthrie W.D., Brindley T.A. European corn borer leaf feeding resistance: a simplified technique for determining relative differences in concentrations of 6-methoxybenzoxazolinone (Lepidoptera: Pyralidae) // J. Kans. Entomol. 1982. V. 55. № 2. P. 297-301.

Robinson J.F., Klun J.A., Guthrie W.D., Brindley T.A. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) leaf feeding resistance: DIMBOA bioaasays // J. Kans. Entomol. 1982a. V. 55. № 2. P. 357-364.

Rojanaridpiched C., Gracen V.E., Everett H.L., Coors J.G., Pugh B.F., Bouthyette P. Multiple factor resistance in maize to European corn borer // Maydica. 1984. V. 29. № 3. P. 305-315.

Russell W.A., Guthrie W.D., Klun J.A., Grindeland R. Selection for resistance in maize to first-brood European corn borer by using leaf-feeding damage of the insect and chemical analysis for DIMBOA in the plant // J. Econ. Entomol. 1975. V.68. № 1. P. 31-34.

Smissman E.E., Lapidus J.B., Beck S.D. Isolation and synthesis of an insect resistance factor from corn plants // J. Amer. Chem. Soc. 1957. V. 79. P. 4697-4698.

Sullivan S.L., Gracen V.E., Ortega A. Resistance of exotic maize varieties to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) // Environ. Entomol. 1974. V. 3. № 4. P. 718-720.

Tseng C.T., Guthrie W. D., Russell W.A., Robbins J.C., Coats J.R., Tollefson J.-J. Evaluation of two procedures to select for resistance to the European corn borer in a synthetic cultivar of maize // Crop Sci. 1984. V. 24. № 6. P. 1129-1133.

Walker K.A., Hellmich R.L., Lewis L.C. Late-instar European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) tunneling and survival in transgenic corn hybrids // J. Econ. Entomol. 2000. V. 93. № 4. P. 1276-1285.

Williams W.P., Davis F.M. Reaction of a resistant and a susceptible corn hybrid to various southwestern corn borer infestation levels. // Agron. J. 1984. V. 76. № 5. P. 855-856.

Willmot D.B., Hibbard B.E., Darrah L.L., Pollak L M., Montgomery K., Pratt R.C., Abel C.A., Hawk J.A., Weldekidan T., Foster J.E. Effect of environment on resistance to the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in maize // J. Econ. Entomol. 2004. V. 97. № 5. P. 1745-1751.

Wilson T.A., Rice M.E., Tollefson, J.J., Pilcher, C. D. Transgenic corn for control of the European corn borer and corn rootworms: a survey of Midwestern farmers' practices and perception // J. Econ. Entomol. 2005. V. 98. № 2. P. 237-247.

Wiseman B.R., Davis F.M., Campbell J.E. Mechanical infestation device used in fall armyworm plant resistance programs // Fla Entomol. 1980. V. 63. № 4. P. 425-432.

Woodward M.D., Corcuera L.J., Helgenson J.P., Upper C.D. Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3 (4H)-one in aqueous solutions // Plant Physiol. 1978. V. 61. № 5. P. 796-802.

Zhou D.R., Ju L.L., Wei R.Y., Chen C.C., Gao Y.X., Wen L.P., He K.L., Li X.Z., Liu C.D. Utilization of maize resistance to corn borer and introduction of a resistant single-cross 2D-No.1 // Plant Prot. 1987. V. 13. № 5. P. 16-18.

Zuñiga G.E., Argandona V.M., Niemeyer H.M., Corcuera L.J. Hydroxamic acid content in wild and cultivated *Gramineae* // Phytochemistry. 1983. V. 22. № 12. P. 2665-2668.

3. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ВРЕДНЫМ ОРГАНИЗМАМ

Е.Е. Радченко, И.Г. Одинцова

3.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ВРЕДНЫМ ОРГАНИЗМАМ

Мы рассмотрим основные экспериментальные подходы, использующиеся при идентификации генов устойчивости зерновых культур к вредным организмам. Безусловно, в небольшой статье невозможно с достаточной полнотой осветить все аспекты и приемы генетического анализа. В этой связи рекомендуем ознакомиться с другими руководствами – например, М.М. Тихомировой (1990) и А.Ф. Мережко (1994). Изложенные приемы могут быть использованы для изучения олигогенно контролируемой устойчивости к вредным организмам не только зерновых, но и других сельскохозяйственных культур. С методиками, использующимися при исследовании различных систем растение-хозяин – вредный организм, читатель может ознакомиться в настоящем пособии.

Взаимодействие вредных организмов с растениями-хозяевами

Генетическая адаптация вредных организмов к кормовым растениям – широко распространенное и хорошо документированное явление. Внутривидовые формы, дифференциально взаимодействующие с генотипами растения-хозяина, принято обозначать терминами “раса”, "биотип", “фенотип вирулентности”. Расы различаются по вирулентности, то есть по способности преодолевать устойчивость хозяина.

Генетические механизмы отношений паразита и хозяина, а также их совместной эволюции стали понятны после работ Х. Флора, который изучал наследование устойчивости льна к ржавчине и генетику вирулентности возбудителя этого заболевания *Melampsora lini*. Согласно постулату Флора “ген для гена”, каждому гену устойчивости хозяина соответствует специфичный ему ген вирулентности паразита. Мутация устойчивости у паразита обусловливает потерю эф-

фективности гена устойчивости хозяина (Flor, 1956). По Флору гены устойчивости обычно доминантны, так как они эволюционно более старые, вирулентность паразита (ведомого партнера) – рецессивна. Однако доминирование устойчивости является правилом, допускающим исключения. Кроме того, доминирование устойчивости может зависеть от расы паразита и от генетической среды растения.

Простейший случай взаимодействия генов паразита и хозяина представлен в табл. 3.1.1. Устойчивость (-) наблюдается в случае взаимодействия доминантного (функционального) аллеля гена устойчивости с доминантным (нефункциональным) аллелем гена вирулентности. Чувствительная реакция (+) наблюдается в случае, если взаимодействующие аллели одного или обоих партнеров находятся в гомозиготном рецессивном состоянии.

Таблица 3.1.1. Взаимодействие двух аллелей в локусе устойчивости (R и r) и двух аллелей в локусе вирулентности (V и v)

Ген вирулентности	Ген устойчивости	
	R-	rr
V-	-	+
vv	+	+

Важным следствием постулата Флора является возможность определения генотипа растения-хозяина без гибридологического анализа, пользуясь изолятами возбудителей болезней и вредителей, маркированными определенной вирулентностью. В общем случае полагают, что данный ген устойчивости имеют сорта, поражающиеся изолятами паразита, вирулентными к этому гену, и устойчивые к авирулентным изолятам. Если изолят паразита, авирулентный к данному гену устойчивости, повреждает изучаемый сорт, это означает, что сорт не имеет функционального аллеля данного гена.

Генетический контроль устойчивости растений к вредным организмам

Различают три типа генетического контроля устойчивости: олигогенный, полигенный и цитоплазматический. Согласно широко распространенным представ-

лениям Я. Ван дер Планка (1975), устойчивость делится на вертикальную (расоспецифическую), контролируемую олигогенами, и горизонтальную (неспецифическую), которая контролируется полигенно. Вертикальная устойчивость – качественный признак, управляемый главными генами, взаимодействующими с генами вирулентности паразита согласно схеме “ген для гена”. Горизонтальная устойчивость является количественным признаком, который проявляется при взаимодействии большого числа малых генов, не имеющих по отдельности фенотипического проявления. По Ван дер Планку, отсутствие специфического взаимодействия – главная особенность горизонтальной устойчивости, следовательно, приспособление паразита к горизонтально устойчивым сортам невозможно. В то же время многочисленные исследования показывают, что длительность сохранения сортами устойчивости не связана ни с ее фенотипическим проявлением, ни с числом генов устойчивости. Сложность исследования и использования, а также возможность преодоления паразитом горизонтальной устойчивости, обуславливают постоянно высокий интерес к расоспецифической устойчивости.

В подавляющем большинстве работ выявляют расоспецифическую олигогенную устойчивость растений к вредным организмам, цитоплазматическую устойчивость обнаруживают очень редко. Реализующийся генотип растения зависит от расы вредного организма – то есть у одного и того же сорта в разных популяционных ареалах возбудителя болезни или вредителя могут проявляться и разные гены устойчивости.

Аллелизм генов устойчивости трудно отличить от тесного сцепления. В обоих случаях наблюдают контрастно различающиеся типы реакций к различным изолятам вредного организма, а у гибридов F_2 от скрещивания устойчивых форм наблюдают отсутствие в случае аллелизма или очень редкое появление в случае сцепления неустойчивых фенотипов.

Неаллельные взаимодействия могут быть типа эпистаза, комплементации или аддитивного эффекта. Нам не известны случаи хорошо продемонстрированного эпистатического взаимодействия генов устойчивости растений к вредным орга-

низмам. Обычно сообщаемые в литературе случаи эпистаза выражаются в том, что гены с низкой экспрессивностью не проявляются в присутствии высокоэкспрессивных генов. Их проявление маскируется высокой устойчивостью, зависящей от главных генов. Гены с низкой экспрессивностью обычно проявляются при утрате эффективности главными генами. Обсуждаемая в литературе комплементация может по сути не отличаться от аддитивного эффекта. Если степень экспресивности гена устойчивости ниже порога фенотипического проявления, то он может проявляться в присутствии второго гена, также не имеющего в отдельности фенотипического выражения. Взаимодействие в данном случае напоминает комплементацию, однако фактически является проявлением аддитивного эффекта генов устойчивости.

Гены устойчивости могут различаться по стабильности проявления. Показана, например, температурочувствительность ряда генов устойчивости зерновых культур к болезным и вредителям. На экспрессию генов устойчивости может влиять генетическая среда – то есть один и тот же ген при его введении в несколько сортов может проявляться по-разному. Гены устойчивости, проявляющиеся в фазе всходов (“ювенильные гены”), действуют на протяжении всей жизни растений; гены устойчивости взрослых растений проявляются только на поздних фазах онтогенеза.

Гены устойчивости обозначают буквенным символом, который отражает обычно латинское или англоязычное название вредного организма: *Lr* – для генов устойчивости пшеницы к листовой ржавчине (leaf rust), *Dn* – для генов устойчивости пшеницы к ячменной тле (*Diuraphis noxia*). Далее следует арабская цифра, обозначающая номер локуса в порядке его идентификации. Аллели генов обозначают строчными латинскими буквами также в порядке их идентификации. Так, в локусе *Sr9* известно 7 аллелей (*a*, *b*, *c*, *d*., *e*, *f*, *g*). Отличие предполагаемо нового гена от ранее известных демонстрируют по расщеплению гибридов с линиями, несущими известные гены устойчивости, а также по взаимодействию с разными изолятами вредных организмов. Для обозначения постоянным символом следует установить локализацию гена в хромосоме.

Гены устойчивости к болезням и вредителям могут быть переданы восприимчивым сортам с помощью беккроссов. Например, создана серия изогенных линий сорта Marquis, содержащая *Sr*-гены, серия линий сорта Thatcher с *Lr*-генами и ряд других. Наборы изогенных и моногенных линий используют как тестеры при гибридологическом анализе устойчивости и при определении генотипов моноспоровых изолятов патогенов.

Выделение устойчивых к вредным организмам образцов и анализ родословных

Изучение устойчивости исходного материала в полевых условиях проводят на естественном, провокационном и искусственном фонах с применением балловых шкал. Среди генофонда зерновых культур часто встречаются иммунологически неоднородные формы, которые выявляются при высокой заселенности коллекционного материала. В данном случае необходимо провести индивидуальный отбор устойчивых растений.

Устойчивость может проявляться на всех этапах онтогенеза, начиная с фазы всходов (ювенильная устойчивость), либо только у взрослых растений (возрастная устойчивость). Образцы, обладающие возрастной устойчивостью, изучают отдельно от устойчивых в фазе всходов, так как эти 2 типа устойчивости контролируют разные гены.

Наличие у выделенных образцов определенных генов устойчивости позволяет предположить изучение родословных. Пособиями для анализа родословных могут служить различные пособия – например, книга С.В. Рабинович (1972), каталоги-справочники ВИР, журнальные публикации и др.

Изучение с помощью тестирующих клонов.

На основании теории Флора генотип растения-хозяина можно предположительно определить без гибридологического анализа. Для этого используют моноспоровые изоляты (после размножения – клоны) возбудителей болезней и клоны размножающихся партеногенезом вредителей (например, тлей), маркированные

определенной вирулентностью. Если хотя бы один клон вредного организма, авирулентный к тестеру данного гена устойчивости, повреждает изучаемый сорт, это означает, что сорт не имеет функционального аллеля данного гена. Если редко встречающиеся вирулентные клоны вызывают контрастно различающиеся реакции на устойчивых сортах, это означает, что сорта имеют разные гены устойчивости.

Метод тестирующих клонов позволяет исключить у исследуемых форм гены устойчивости, эффективные лишь против части популяции вредного организма, а в случае редкой встречаемости клонов, вирулентных или авирулентных к исследуемым образцам, – постулировать гены устойчивости. Чем реже в популяции патогена встречаются клоны, вирулентные к изучаемому сорту и линии, имеющей идентифицированный ранее ген устойчивости, тем с большей вероятностью можно постулировать наличие данного гена устойчивости у изучаемого сорта.

В качестве тестеров для идентификации генов устойчивости используют изогенные линии. Использование генетически изученных сортов для этой цели может приводить к ошибкам, так как реализующийся генотип растения зависит от расы вредного организма.

Рассмотрим результаты изучения взаимодействия девяти образцов сорго с 277 клонами обыкновенной злаковой тли, выделенными из краснодарской популяции. Сорт Соргоградское и образцы к-923, к-924, к-1240, к-1362 устойчивы к популяции насекомого и, следовательно, имеют гены устойчивости, отличающиеся от генов образцов Сарваши, Deer, Shallu и KS-30, которые устойчивы только к отдельным клонам. Клоны, способные сильно повреждать образцы к-923 и к-924, в течение пяти лет выявить не удалось, тогда как для остальных устойчивых форм характерно дифференциальное взаимодействие с генотипами насекомого (табл. 3.1.2.). Частота клонов, авирулентных к изучаемым образцам, существенно различалась. Если образец к-1362 слабо повреждали 270 клонов, то лишь 6 клонов из 277 были авирулентны к сорту Deer и 3 ⊿ к образцам KS-30 и Shallu. Наиболее

типичен для изученной популяции 5-й фенотип вирулентности ⌟ 203 клона, что составляло 67 – 85% от общего числа изучавшихся ежегодно.

Таблица 3.1.2. Устойчивость образцов сорго к обыкновенной злаковой тле с различными фенотипами вирулентности

№ по каталогу ВИР	Образец	Номер фенотипа вирулентности тли									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3852	Сарваши	R*	R	R	R	S	S	S	S	R	S
6694	Deer	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
9921	Shallu	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
9922	KS-30	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
9436	Соргоградское	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S
1362	Дурра белая	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
1240	Джугара белая	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
923	«	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
924	«	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*Здесь и далее R – устойчивость образца, S – восприимчивость.

Данные табл. 3.1.2. можно интерпретировать следующим образом.

1. Для образцов к-923 и к-924 дифференциальное взаимодействие с клонами тли не обнаружено. Следовательно, их гены устойчивости отличаются от генов других образцов, представленных в таблице 3.1.2. Гибридологический анализ – единственный способ идентификации генов устойчивости к-923 и к-924.

2. Сорт Сарваши устойчив к тле с фенотипом вирулентности 9 и, следовательно, защищен генами, не тождественными генам остальных дифференциаторов. Этот вывод подкрепляет также попарное сравнение устойчивости образцов к тле с фенотипами вирулентности 2–8. Такое же сравнение указывает на то, что сорт Deer имеет гены устойчивости, отличающиеся от генов образцов Shallu, KS-30, к-9436, к-1362, к-1240.

3. Образцы Shallu и KS-30 защищены общим геном (генами) устойчивости к вредителю. Частота клонов, авирулентных одновременно к двум образцам, очень мала – 3 из 277 изученных, или примерно 1% (0,01). Распределение генов вирулентности в популяции насекомого независимо, то есть 1% клонов, авирулентных

к генам устойчивости Shallu, может случайно оказаться авирулентным и к образцу KS-30. Вероятность случайного совпадения авирулентности к двум образцам для трех клонов составляет 0,01 × 0,01 × 0,01 = 0,000001, то есть 0,0001%.

Для большей уверенности в результатах анализа следует выделить несколько клонов, авирулентных к изучаемым образцам, и показать независимость их происхождения путем анализа их вирулентности к дифференциаторам. В нашем случае авирулентные к Shallu и KS-30 клоны 1 и 6 различаются по вирулентности к сортам Сарваши и Deer.

Вывод о тождестве генов устойчивости подкрепляет также присутствие общего донора устойчивости (*S. virgatum*) в родословной обеих форм (Wood, 1971; Hackerott et al., 1972). В то же время гены устойчивости этих образцов отличаются от генов остальных форм, представленных в табл. 3.1.2.

4. Клоны, вирулентные к образцу к-1362, в течение двух лет выделить не удавалось. Лишь 7 клонов из 169 изученных за три года (3, 1 и 3 соответственно), оказались вирулентны одновременно к двум образцам – к-1362 и к-1240, причем все они – разные, так как различались по вирулентности к другим дифференциаторам (в табл. 3.1.2. представлены 2 таких клона – 9 и 10). Для оценки вероятности случайного совпадения вирулентности возьмем оценку частоты таких клонов за три года исследований (то есть примерно 0,04). Вероятность случайного совпадения вирулентности к генам устойчивости образцов к-1362 и к-1240 для семи клонов составит 4^{-14}, то есть ничтожно малую величину. Следовательно, эти образцы, скорее всего, имеют тождественные гены устойчивости.

5. Образцы к-1362 и к-9436 устойчивы к популяции вредителя. Вирулентность клонов тли к образцу к-1362 и сорту Соргоградское всегда совпадала (фенотипы вирулентности 9 и 10). В то же время 28 клонов (фенотипы вирулентности 4 и 8) сильно повреждали лишь Соргоградское, что указывает на различие генов устойчивости у обсуждаемых форм. Однако в данном случае возможно, что два образца защищены общим геном (генами) устойчивости, эффективным к популя-

ции насекомого, а образец к-1362 имеет кроме него также ген (гены), эффективный лишь к отдельным клонам.

Рассмотрим пример с постуляцией генов устойчивости пшеницы к листовой ржавчине. В результате оценки коллекционных образцов выделили 90 форм, высокоустойчивых к сборной популяции гриба. Отрезки листьев данных форм инокулировали 2-мя клонами, вирулентными к эффективному гену устойчивости *Lr*19. Семнадцать образцов – Н 462, Miana 44634, Эритроспермум-609, Hand, Эгисар 29, Пысар 29, Эритроспермум 14/83, ППГ-596, WW 17283, Kikpinar 79, Kikpinar 79, Alva, Л 503, Л 505, Юлия, Добрыня и PS 130 – проявили восприимчивый тип реакции. Частота клонов *P. recondita*, вирулентных к *Lr* 19, в данной работе составляла примерно 0,001, соответственно, вероятность ошибочной постуляции этого гена у восприимчивого к одному клону образца равна 10^{-3}. В случае вирулентности 2-х независимых клонов к изучаемому сорту вероятность ошибки постуляции гена равна произведению их частот. В данном примере она составит 10^{-3} ⌟ $10^{-3} = 10^{-6}$, то есть ничтожно мала; следовательно, у всех перечисленных образцов можно постулировать ген *Lr*19 (Тырышкин, 2007).

Гибридологический анализ

В гибридологическом анализе используют скрещивания родительских форм (P_1 и P_2) в последовательном ряду поколений – F_1, F_2 и т.д. Минимальное различие между устойчивым и неустойчивым к вредному организму образцами – по двум аллелям одного гена. Если устойчивость контролирует один ген, то в F_2 будет расщепление по фенотипу 3 устойчивых (R) : 1 неустойчивый (S). Расщепление по генотипу – 1AA : 2Aa : 1aa. Для обозначения генотипов, соответствующих определенным фенотипам, используют фенотипический радикал. Образец с моногенной доминантной устойчивостью к тле может быть двух генотипов – AA и Aa. Фенотипический радикал в данном случае – A-, где черточка обозначает присутствие нефункционального аллеля.

Таблица 3.1.3. Расщепление F_2 гибридов при различных типах неаллельного взаимодействия генов устойчивости зерновых культур к вредным организмам

Характер взаимодействия генов устойчивости	Расщепление по фенотипу R : S	Фенотипические радикалы	
		R	S
Дигибридные расщепления			
1. Два дупликатных доминантных гена	15 : 1	9A-B-, 3A-bb, 3aaB-	1aabb
2. Два дупликатных рецессивных гена	7 : 9	3A-bb, 3aaB-, 1aabb	9A-B-
3. Два дупликатных гена, доминантный и рецессивный	13 : 3	9A-B-, 3A-bb, 1aabb	3aaB-
4. Комплементация двух доминантных генов	9 : 7	9A-B-	3A-bb, 3aaB-, 1aabb
5. Комплементация двух рецессивных генов	1 : 15	1aabb	9A-B-, 3A-bb, 3aaB-
Тригибридные расщепления			
1. Три доминантных дупликатных гена	63 : 1	27A-B-C-, 9A-B-cc, 9A-bbC-, 9aaB-C-, 3A-bbcc, 3aaB-cc, 3aabbC-	1aabbcc
2. Два доминантных и один рецессивный дупликатные гены	61 : 3	27A-B-C-, 9A-B-cc, 9A-bbC-, 9aaB-C-, 3A-bbcc, 3aaB-cc, 1aabbcc	3aabbC-
3. Доминантный и два рецессивных дупликатных гена	55 : 9	27A-B-C-, 9A-B-cc, 9A-bbC-, 3A-bbcc, 3aabbC-, 3aaB-cc, 1aabbcc	9aaB-C-
4. Три рецессивных дупликатных гена	37 : 27	9A-B-cc, 9A-bbC-, 9aaB-C-, 3A-bbcc, 3aabbC-, 3aaB-cc, 1aabbcc	27A-B-C-
5. Два доминантных комплементарных и один доминантный независимый ген	57 : 7	27A-B-C-, 9A-B-cc, 9A-bbC-, 9aaB-C-, 3aabbC-	3A-bbcc, 3aaB-cc, 1aabbcc

Если устойчивость контролируется несколькими генами (n), то число генотипов в F_2 составит 3^n, число фенотипов при полном доминировании – 2^n. В табл. 3.1.3. представлены некоторые ди- и тригибридные расщепления в F_2 при различных типах неаллельного взаимодействия генов.

Для оценки степени соответствия фактического расщепления теоретически ожидаемому используют критерий χ^2, который вычисляют по формуле:

$\chi^2 = \frac{(f-F)^2}{F}$, где

f – фактические данные;

F – теоретически ожидаемые.

Предположение, что различия между фактически полученными соотношениями и теоретически ожидаемыми носит случайный характер, опровергается, если $\chi^2_{факт.}$ превышает критическое (табличное) значение $\chi^2_{st.}$ для принятого уровня значимости и числа степеней свободы. В статистике явление считается случайным, если оно встречается реже, чем 1 раз на 20 проб (0,05). При двух фенотипических классах m («устойчивый» и «неустойчивый») число степеней свободы χ = m – 1 = 1; критическое значение $\chi^2_{0,05}$ = 3,84.

В формулу χ^2 должны подставляться только частоты, а не величины, полученные измерением и т.п. В каждой теоретически рассчитанной группе должно быть не менее пяти наблюдений (при менее строгом подходе не менее трех наблюдений). Например, если ожидается расщепление 63R : 1S, необходимая выборка растений F_2 должна быть 64 × 5 = 320 или 64 × 3 = 192 растения. В случае анализа расщепления одного и того же гибрида F_2 по нескольким семьям, перед объединением результатов следует проверить однородность полученного материала с помощью критерия χ^2. При этом число степеней свободы равно (k – 1) × (m – 1), где m – число фенотипических классов, k – число повторностей (семей).

Схема скрещиваний. Анализ первого поколения гибридов.

Перед началом работы необходимо проверить гомозиготность исследуемых форм. Если образцы гетерогенны по устойчивости, следует провести жесткую

браковку в фазе всходов и высевать для скрещиваний выделенные чистые линии. Для сближения сроков цветения различающихся по скороспелости форм целесообразен посев в несколько сроков. Техника скрещиваний должна исключать возможность самоопыления или попадания на рыльца пыльцы посторонних растений. Необходимо кастрировать растения в период, когда пыльники еще совершенно зеленые. Кастрированные колосья можно опылять twell-методом (Мережко и др., 1973). Объем скрещиваний по каждой комбинации должен обеспечить получение 300–400 семян F_2, то есть скрещивают примерно по 5 колосьев на комбинацию.

Техника скрещиваний с использованием ЦМС (например, сорго) заключается в изоляции стерильных метелок до цветения и опылении устойчивой к вредному организму отцовской формой через 5–7 дней после открытия цветков на всей метелке. Желательно, чтобы скрещиваемые на основе ЦМС образцы различались по высоте растений или другим признакам, что позволяет в последующем контролировать гибридность растений F_1.

Идентификация генов устойчивости предусматривает:

- скрещивания устойчивых образцов с неустойчивым тестером для определения числа и характера взаимодействия генов устойчивости;

- диаллельные скрещивания между устойчивыми образцами для определения аллельных отношений генов устойчивости у изучаемых форм;

- скрещивания изучаемых образцов с донорами известных генов устойчивости.

Схема скрещиваний может быть сокращена за счет предварительного изучения устойчивых образцов. Обратимся к результатам исследования взаимодействия сорго и обыкновенной злаковой тли, представленным в табл. 3.1.2.

1. Образцы, устойчивые к популяции насекомого (к-9436, к-1362, к-1240, к-923, к-924), имеют эффективные гены устойчивости, заведомо отличающиеся от генов образцов, устойчивых к отдельным клонам (к-3852, к-6694, к-9921, к-9922).

Следовательно, соответствующие комбинации скрещиваний из схемы можно исключить.

2. Дифференциальное взаимодействие с клонами насекомого не выявлено лишь для образцов к-923 и к-924. Таким образом, для идентификации генов устойчивости следует скрестить эти образцы с неустойчивым тестером и между собой.

3. Можно ограничиться лишь скрещиваниями образцов Сарваши, Deer, Shallu и KS-30 с неустойчивым тестером, на что указывает взаимодействие этих форм и тли с различными фенотипами вирулентности. Образцы Shallu и KS-30 можно не скрещивать между собой: о тождестве их генов устойчивости свидетельствует общая родословная и очень редкая частота клонов, авирулентных одновременно к обеим формам.

4. Образцы к-9436, к-1362 и к-1240 необходимо скрестить с неустойчивым тестером и между собой. Ранее обсуждалось, что вероятность различия генов устойчивости образцов к-1362 и к-1240 составляет ничтожно малую величину, однако все же следует проверить правильность предположения о тождестве генов.

Таким образом, для предварительной идентификации генов устойчивости у обсуждаемых образцов достаточно лишь 13 комбинаций скрещиваний.

Реализующийся генотип растения зависит от генотипа патогена – то есть у одного и того же сорта в разных популяционных ареалах вредного организма могут проявляться и разные гены устойчивости. Известно, например, что широко использовавшийся в селекции сорт Сарваши защищен доминантным геном устойчивости к ставропольской популяции *S. graminum* (Троценко, Скляр, 1978). Однако к другим популяциям или клонам насекомого могут проявляться, кроме уже известного, и другие гены устойчивости. Более того, доминантный ген устойчивости сорта Сарваши может быть эффективен только по отношению к ставропольской популяции тли. К сожалению, гены устойчивости зерновых культур к тлям не изолированы. Отсутствие изогенных линий обуславливает необходимость

скрещивания доноров уже известных генов устойчивости с неустойчивыми тестерами при работе с различными популяциями тли.

В литературе по генетике устойчивости растений к насекомым принято вводить новые символы генов без проверки их аллельных отношений с ранее известными (Tyler, 1987). Часто это объясняется технической сложностью тестов на аллелизм в случаях, когда авирулентные к ранее известным генам устойчивости генотипы насекомых отсутствуют в распоряжении экспериментатора. В то же время гены, идентифицированные с помощью тест-клонов, могут являться новыми эффективными аллелями уже известных локусов. Поэтому для обозначения нового гена устойчивости следует проверить его аллельные отношения с генами, эффективными лишь против части популяции насекомого, в случае, если удается выделить авирулентные клоны.

Потомство каждого материнского колоса или материнской метелки высевают семьями, которым присваивают порядковые номера. Растения F_1 должны быть однородны по всем признакам. Расщепляющиеся гибридные семьи необходимо выбраковать. Убирают семьи F_1 не смешивая, то есть происхождение каждого генотипа F_2 в последующем можно легко идентифицировать.

Анализ расщепления второго поколения гибридов на интактных растениях.

Анализ расщепления F_2 гибридов по устойчивости к вредным организмам можно проводить в полевых условиях. В одном блоке необходимо высевать гибриды F_2, F_1, а также материнскую и отцовскую формы. При этом техника посева должна обеспечивать возможность наблюдения за каждым гибридным растением. В период максимального развития болезни (максимальной численности вредителя) оценивают поражение растений в баллах.

Например, анализировали расщепление по устойчивости к обыкновенной злаковой тле F_2 гибрида от скрещивания стерильной линии сорго А-278 с устойчивым образцом к-924. В одном блоке высевали 25 рядков гибрида F_2 (потомство одного растения F_1) и по два рядка – F_1, P_1 и P_2. Поврежденность оценивали по

шкале: 1 – очень слабое повреждение листьев (< 5%), 3 – слабое (5–20%), 5 – среднее (21–35%), 7 – сильное (36–50%), 9 – очень сильное (> 50%) повреждение листьев. Общий фон заселения посевов вредителем был не очень сильным: поврежденность стандартного сорта Кубанское красное 1677 равнялась преимущественно 5 баллам. Тем не менее родительские формы были достаточно четко дифференцированы: поврежденность растений образца к-924 составляла 1 балл, повреждение А-278 варьировало в пределах 3–7 баллов. Устойчивость доминировала: повреждение всех 43-х растений F_1 составляло 1 балл. В популяции F_2 поврежденность 469 растений равнялась 1 баллу, 34 – 3, 61 – 5, 17 – 7 и 2-х растений – 9 баллам. Степень повреждения исходных форм позволяет отнести к устойчивому классу растения, поврежденность которых не превышала 1 балла. Полученное соотношение фенотипов (469R : 113S) соответствует дигенному контролю признака (один доминантный ген и один рецессивный) при $\chi^2 = 0{,}169$; $P = 0{,}50$-$0{,}75$. Гипотеза о моногенном контроле отвергается ($\chi^2 = 9{,}679$; $P < 0{,}01$).

К сожалению, в поле далеко не всегда наблюдается достаточно жесткий фон заселения растений насекомым, что является существенным препятствием для проведения анализа расщепления F_2 гибридов по устойчивости к вредителю на поздних этапах органогенеза растений. Поэтому работа проводится обычно в лабораторных условиях.

Предварительно пророщенные семена высевают рядами в кюветы с почвенной смесью. В каждую кювету помещают по одному рядку P_1, P_2, F_1 и по 7–8 рядков F_2. Через 2–3 дня после появления всходов удаляют ослабленные, поздно взошедшие растения. В период появления второго листа гибриды заселяют тлей (популяцией или клоном, выделенным из нее), из расчета 4 особи на растение. Поврежденность F_2 гибридов от скрещивания устойчивых образцов с неустойчивыми тестерами оценивают в момент гибели неустойчивой родительской формы по шкале. При работе с *S. graminum* удобна следующая шкала: 0 – нет повреждений, 1 – повреждено 1–10% листовой поверхности, 2 – 11–20%, …, 10 – 91–100%, гибель растений. Растения, сходные с неустойчивой родительской формой или

неустойчивым контролем (баллы 9, 10) считают гомозиготно неустойчивыми (S). К устойчивому классу (R) относят растения, сходные по степени повреждения с устойчивой родительской формой (обычно 1–2), а также малочисленный класс, характеризующийся промежуточной устойчивостью (баллы повреждения 3–6). Появление промежуточного класса – довольно обычное явление, которое может обуславливаться семенной или почвенной инфекцией, а также действием генов-модификаторов.

Таблица 3.1.4. Расщепление по устойчивости к *S.graminum* F_2 гибридов от скрещивания устойчивых к тле образцов к-1362 и к-9436 с неустойчивыми тестерами и между собой

Комбинация скрещивания	Инвазионный материал	Соотношение фенотипов R : S		χ^2	P
		фактическое	ожидаемое		
А-10598 × к-9436	популяция	211 : 77	3 : 1	0,463	0,25-0,50
А-10598 × к-1362	«	300 : 91	«	0,621	0,25-0,50
Низкорослое81с × к-1362	«	352 : 98	«	0,757	0,25-0,50
«	клон 1	158 : 33	13 : 3	0,074	0,75-0,80
А-10598 × Сарваши	клон 2	190 : 70	3 : 1	0,513	0,25-0,50
Сарваши с × к-1362	«	356 : 18	15 : 1	1,318	0,25-0,50
			61 : 3	0,013	0,90-0,95
Сарваши с × к-9436	«	337 : 22	15 : 1	0,009	0,90-0,95
к-1362 × к-9436	популяция	197 : 0			

Рассмотрим идентификацию генов устойчивости образцов образцов сорго к-1362 и к-9436 к краснодарской популяции с *S. graminum*. В популяциях F_2 гибридов от скрещивания этих форм с неустойчивыми тестерами наблюдали расщепление по моногибридной схеме (табл. 3.1.4.). При взаимодействии образца к-1362 с некоторыми клонами тли проявлялись 2 гена устойчивости – доминантный и рецессивный. Гипотеза о моногенном контроле отвергается: $\chi^2_{3:1} = 6{,}074$; $P<0{,}025$. У широко использовавшегося в селекции сорта Сарваши выявлен доминантный ген устойчивости, эффективный к отдельным клонам (например, к тле с фенотипами вирулентности 1 – 4, табл. 3.1.2.). Результаты тестов на аллелизм подтвердили предположение об отличии генов устойчивости образцов к-1362 и к-9436 от генов сорта Сарваши, сделанное на основании работы с тест-клонами вредителя

(табл. 3.1.2.). В F_2 к-1362 × к-9436 расщепление не выявлено, то есть обе родительские формы имеют общий ген устойчивости к популяции *S. graminum.* Образец к-1362 имеет кроме него один рецессивный ген, который проявляется против части клонов природной популяции. Дифференциальное взаимодействие образцов к-1362 и к-9436 с вредителем (фенотипы вирулентности 4 и 8, табл. 3.1.2), может быть объяснено следующим образом:

Генотипы клонов тли	Предполагаемые генотипы хозяина	
	AAbb (к-1362)	AA-- (к-9436)
$v_A v_A v_b v_b$	+	+
$V_A V_A V_b V_b$	–	–
$v_A v_A V_b V_b$	–	+

A и b – доминантный и рецессивный гены образца к-1362;
$v_A v_b$ ⌟ вирулентность к генам A и b;
$V_A V_b$ ⌟ авирулентность к генам A и b;
\+ ⌟ сильная поврежденность образца;
– – устойчивость образца.

Рассмотрим также результаты гибридологического анализа устойчивости к обыкновенной злаковой тле образцов сорго к-923 и к-924. В комбинациях скрещивания этих форм с неустойчивыми тестерами наблюдали расщепление по двум генам устойчивости – доминантному и рецессивному. Так, в F_2 МСЛ-21с × к-923 соотношение фенотипов составило 216R : 42S ($⌟^2_{13:3}$ = 1,034; P = 0,25–0,50), а в F_2 МСЛ-21с × к-924 – 268R : 64S ($⌟^2_{13:3}$ = 0,061; P = 0,80–0,90). В F_2 комбинации к-924 × к-923 расщепление отсутствовало (262R : 0), то есть образцы к-923 и к-924 защищены, по крайней мере, одним общим геном устойчивости к вредителю. При заселении F_2 Сарваши С × к-923 и Сарваши С × к-924 клонами, авирулентными к сорту Сарваши, выявлено расщепление по трем генам устойчивости: 522R : 26S ($⌟^2_{61:3}$ = 0,04; P = 0,90–0,95) и 357R : 23S ($⌟^2_{61:3}$ = 1,585; P = 0,10–0,20) соответственно, то есть тесты на аллелизм подтвердили сделанный ранее вывод (табл. 3.1.2.) об отличии аллелей генов устойчивости у этих форм от аллелей генов широко использовавшегося в селекции образца. В F_2 к-924 × к-1362 также наблюдали расщепление по трем генам устойчивости – 331R : 19S ($⌟^2_{61:3}$ = 0,430; P = 0,50–0,75).

У гибридов F_2 к-1362 × к-923 наблюдали широкий спектр переходов от высокой устойчивости (баллы 1, 2) до гибели растений. Число явно неустойчивых растений (баллы 9, 10) соответствовало числу ожидаемых гомозигот по трем аллелям неустойчивости. В то же время отмечена повышенная частота растений, характеризующихся баллом 7 (балл 6 – 3 растения, 7 – 10, 8 баллов – 0). Если предположить, что эти растения – моногетерозиготы по рецессивному гену, то полученное соотношение фенотипов 301R : 15S удовлетворяет теоретически ожидаемому 61:3 (χ^2 = 0,0026; P = 0,95–0,99). Об аддитивном действии генов устойчивости в этой комбинации свидетельствовала также меньшая поврежденность растений F_1 (балл 1) по сравнению с родительскими формами (преимущественно 2 балла). В формуле тригибридного расщепления наиболее устойчивы генотипы 9A-B-cc, защищенные тремя генами устойчивости; по 2 гена имеют 33 генотипа (27A-B-C- + 3A-bbcc + 3aaB-cc), по 1 гену – 19 генотипов (9A-bbC- + 9aaB-C- + 1aabbcc); неустойчивый класс – 3aabbC- – слагается из гетерозигот по рецессивному гену устойчивости (2aabbCc) и гомозигот по трем генам неустойчивости (1aabbCC). Если предположить, что балл повреждения 1 соответствует фенотипическому проявлению трех генов устойчивости, балл 2 – двух генов, баллы 3–6 – одного гена устойчивости, 7 – моногетерозигот по рецессивному гену устойчивости и 9–10 – гомозигот по трем генам неустойчивости, то полученное соотношение фенотипов 34 : 159 : 108 : 10 : 5 соответствует ожидаемому 9 : 33 : 19 : 2 : 1 при χ^2 = 4,696 ($\chi^2_{0,05}$ для четырех степеней свободы составляет 9,488). Анализ расщепления показывает, что ген устойчивости образца к-1362 независим от обоих генов образца к-923. Все три гена устойчивости взаимодействуют аддитивно.

При анализе расщепления F_2 гибридов можно использовать показатели, характеризующие антибиоз и антиксеноз растений. Необходимо отметить, что этот способ – единственная возможность изучить генетику устойчивости растений к видам тлей, не вызывающим токсическую реакцию у растений (например, *R. padi, S. avenae*).

Рассмотрим пример изучения генетического контроля ювенильной устойчивости *Aegilops tauschii* к листовой ржавчине. В работе М.А. Колесовой (2007) выделены 8 высокоустойчивых к болезни форм: кк-79, 249, 427, 428, 624, 729, 1959 и 3299. Растения F_1, F_2 и родительских форм выращивали на смоченной водой вате. В стадии 1–2-х листьев растения инокулировали патогеном. Учет типа реакции проводили на 10-й день после инокуляции. Гибридные растения F_1 в 8 комбинациях от скрещивания устойчивых образцов *Ae. tauschii* с восприимчивыми формами устойчивы к сборной популяции гриба, что указывает на доминантный характер наследования признака. Расщепление в F_2 во всех комбинациях не противоречит теоретически ожидаемому при контроле признака одним доминантным геном (табл. 3.1.5.). Для комбинаций скрещиваний образцов к-624 и к-3299 с восприимчивыми образцами расщепление соответствовало и теоретически ожидаемому при контроле признака двумя генами – рецессивным и доминантным.

Таблица 3.1.5. Расщепление по устойчивости к сборной популяции *P. recondita* в F_2 от скрещивания устойчивых образцов *Ae. tauschii* с восприимчивыми

Комбинация скрещивания	Соотношение фенотипов R : S		χ^2	P
	ожидаемое	фактическое		
к-79 × к-285	3 : 1	66 : 27	0,81	0,25–0,50
к-249 × к-296	3 : 1	145 : 56	0,88	0,25–0,50
к-427 × к-296	3 : 1	136 : 48	0,16	0,50–0,75
к-428 × к-296	3 : 1	128 : 52	1,45	0,10–0,25
к-624 × к-414	3 : 1	157 : 45	0,78	0,25–0,50
	13 : 3	157 : 45	1,65	0,10–0,25
к-729 × к-341	3 : 1	82 : 35	1,51	0,10–0,25
к-1959 × к-296	3 : 1	75 : 31	1,01	0,25–0,50
к-3299 × к-617	3 : 1	110 : 36	0,01	> 0,75
	13 : 3	110 : 36	3,34	0,05–0,10

Для определения идентичности генов устойчивости образцы внутри видов скрещивали между собой. Отсутствие расщепление по устойчивости во всех гибридных комбинациях F_2 указывает на наличие у 8-ми изученных образцов одного идентичного эффективного гена устойчивости. Для определения того, имеют ли образцы к-624 и к-3299 дополнительно рецессивный ген устойчивости, необходим анализ третьего поколения гибридов

Анализ расщепления второго поколения гибридов с помощью отрезков листьев, помещенных в водный раствор бензимидазола

К разным популяциям или клонам вредных организмов могут проявляться и разные гены устойчивости растений. Использование при анализе расщепления F_2 гибридов отрезков листьев, помещенных в водный раствор бензимидазола, обеспечивает возможность оценить устойчивость каждого растения к любому числу клонов патогена. Например, с помощью интактных растений установлено, что устойчивость сорта к двум разным клонам контролирует один доминантный ген, то есть в F_2 наблюдали расщепление 3R : 1S. Однако устойчивость к этим клонам может зависеть от двух разных генов. Для ответа на этот вопрос необходимо оценить устойчивость отрезков листьев каждого растения F_2 к клонам вредного организма. Если пораженность всех растений двумя клонами совпадает, то устойчивость к обоим клонам контролирует один и тот же ген. Сильное поражение вторым клоном части растений, устойчивых к первому клону, будет означать, что устойчивость к этим клонам контролируют разные гены.

Исходные формы, гибриды F_1 и F_2 выращивают на смоченной водой вате или в почве (для мелкосемянных злаков). В фазу двух листьев раскладывают отрезки в небольшие кюветы, выстланные ватой, смоченной 0,004%-ным раствором бензимидазола. Первый или второй лист каждого растения F_2 разрезают на части длиной около 1 см и с помощью пинцета помещают в кюветы. Число кювет соответствует числу клонов вредного организма, используемых для анализа. Очередность операций при раскладке должна обеспечивать строгую идентичность положения

отрезка листа каждого растения во всех кюветах. Между каждыми 10 отрезками в ряду помещают контрольные отрезки обеих родительских форм и гибрида F_1. Отрезки укладывают плотно друг к другу. В итоге получают кюветы, идентичные по составу и положению отрезков. Если предварительно этикетировать растения, то отрезки можно будет легко идентифицировать с интактными растениями. Отрезки заражают клонами патогена и в период гибели отрезков листьев неустойчивой родительской формы оценивают пораженность шкале.

Анализ расщепления третьего поколения гибридов.

Устойчивость ряда образцов носит промежуточный характер и, следовательно, в гибридных популяциях F_2 границы фенотипических классов выражены нечетко. Увеличение выборки анализируемых растений не уточняет результаты опыта, так как увеличивается и число ошибок классификации фенотипов. В таких случаях необходимо довести до созревания предполагаемо неустойчивые растения и проанализировать устойчивость семей F_3. Устойчивость всех семей F_3 будет свидетельствовать об отсутствии расщепления и тождестве генов у изучаемых форм, сильная пораженность семей или ряда растений внутри семьи – о различии генов устойчивости. В ряде случаев может возникнуть необходимость анализа четвертого и последующих поколений гибридов.

При анализе расщепления рассматривавшейся выше комбинации F_2 к-1362 × к-923 удалось довести до созревания 5 растений F_2, характеризовавшихся баллом повреждения 7. Все полученные семьи F_3 расщеплялись по устойчивости. В силу малого количества полученных семян интерпретация полученных соотношений фенотипов затруднительна, однако наличие расщепления безусловно подтверждает вывод о независимости генов устойчивости образцов к-923 и к-1362.

Известны также сходные расщепления, которые трудно отличить друг от друга – например, моногибридное 3 : 1 и дигибридное 13 : 3. При четких границах фенотипических классов различить эти распределения можно при увеличении выборки анализируемых растений. При нечетких границах следует индивидуаль-

но убрать растения F_2 и проанализировать примерно 100 семей F_3 от каждой комбинации скрещивания. Более того, даже при отчетливо тестируемой устойчивости наиболее убедительным доказательством дигибридного расщепления 13 : 3 будет выделение семей F_3, расщепляющихся в соотношении 1 : 3. Например, выделение таких семей F_3 Низкорослое 81с × к-1362 явилось окончательным доказательством присутствия у образца к-1362 рецессивного гена устойчивости, эффективного против отдельных клонов обыкновенной злаковой тли.

Статистический анализ соответствия фактического расщепления теоретически ожидаемому проводят так же, как и случае анализа F_2 гибридов. При контроле устойчивости одним геном ожидаемое расщепление в F_3 – 1 устойчивая : 2 расщепляющиеся по устойчивости : 1 восприимчивая семья. Теоретические расщепления при контроле устойчивости 2-мя и 3-мя генами приведены в таблице 3.1.6.

Таблица 3.1.6. Расщепление F_3 гибридов при различных типах неаллельного взаимодействия генов устойчивости растений к вредным организмам

Число и характер взаимодействия генов устойчивости	Расщепление по фенотипу R : RS : S*
Два гена, некумулятивная полимерия	7 : 8: 1
Два гена, комплементарность	1 : 8 : 7
Три гена, некумулятивная полимерия	28 : 37 : 1
Три гена, комплементарность	1 : 37 : 28
Три гена, два комплементарных и один независимый	16 : 25 : 23

* R – устойчивые, RS – расщепляющиеся, S – восприимчивые семьи.

Рассмотрим следующий пример. При изучении генетического контроля устойчивости к ржавчине образцов *Ae. tauschii* у формы к-624 данные по расщеплению в F_2 соответсвовали теоретически ожидаемым как при контроле признака одним доминантным геном, так и 2-мя (доминантным и рецессивным). В F_3 к-624 × к-414 (восприимчивый образец) фактическое расщепление сотавило 15 R : 34 RS : 17 S, что не противоречит гипотезе о моногенном контроле ($\chi^2 = 0{,}18$), но не согласуется с гипотезой о дигенном контроле($\chi^2 = 255{,}1$).

Гибридологический анализ при неполной пенетрантности генов устойчивости

Существует немало возбудителей болезней, по отношению к которым устойчивые сорта самоопыляющихся растений или чистые линии отличаются от восприимчивых по частоте (%) пораженных растений. К таким болезням, например, относятся головневые, фузариозы, повреждение хлебных злаков мухами и пр.

Проявление устойчивости только у части растений данного сорта может зависеть от его гетерогенности по данному признаку, от условий опыта (неполнота заражения), а также от особенности проявления генов, которую называют пенентранностью. Пенетрантность – это частота или вероятность проявления гена. Она определяется по проценту особей популяции, несущих данный ген, у которых он фенотипически проявляется. Пенетрантность может быть полной, когда ген проявляется у 100% особей, и неполной, если у части особей, несущих данный ген, он не проявляется в фенотипе.

Для генетического анализа признаков, проявляющихся в форме доли пораженных индивидов, лучше всего классифицировать линии F_2, сравнивая их по проценту поражения с родительскими формами и гетерозиготами F_1.

Анализ линий F_3 даст более точные.результаты, однако его трудоемкость в сравнении с анализом растений F_2 возрастает в 20–30 раз, так как для классификации одной линии F_3 необходимо анализировать 20–30 растений. В связи с этим для генетического изучения по признакам с неполной пенетрантностыо часто прибегают к анализу популяций гибридов F_2, который в этом случае имеет ряд особенностей.

Основные отличия анализа признаков с неполной пенетрантности можно свести к следующим пунктам.

1. Прежде чем начать гибридологический анализ, необходимо убедиться в том, что поражение части растений сорта не является результатом его гетерогенности по признаку устойчивости. Если отбор не приводит к увеличению процентного содержания устойчивых растений в сорте, можно считать, что частичное по-

ражение не связано с гетерогенностью и проводить гибридологический анализ исходя из того, что признак устойчивости является неполностью пенетрантным.

2. При анализе расщепления в популяциях гибридов F_2 необходимо вводить поправку в соотношение фенотипов, ожидаемое на основании правил Менделя, исходя из пенетрантности гена (или генов), наблюдавшейся в данном опыте.

3. Поскольку пенетрантность может значительно варьировать в зависимости от условий, необходимо возможно более строгое соблюдение равенства в опыте всех факторов, кроме одного – генотипа.

Для определения числа генов, контролирующих устойчивость, сорт или выделенную из него чистую линию скрещивают с восприимчивым сортом.

Доминирование устойчивости может быть промежуточным. В этом случае появляется необходимость вводить поправку на промежуточное проявление устойчивости у гетеровигот. Для этого скрещивание с восприимчивым сортом должно быть сделано в таком объеме, чтобы 30–50 гибридных зерен F_1 можно было оставить для определения процента пораженных растений среди гетероэигот в условиях того же опыта, в котором анализируются гибриды F_1.

Рассмотрим пример изучения наследования устойчивости пшеницы к твердой головне. Успех заражения патогеном и, следовательно, процент пораженных растений во всех классах расщепляющейся гибридной популяции зависит от инфекционной нагрузки и длительности периода от посева до всходов. Следовательно, необходимо точное дозирование инфекции при заспорении семян. Длительность период посев-всходы связана с глубиной заделки семян, температурой и механическим составом почвы. Для соблюдения равенства этих факторов необходимо высевать экспериментальный материал четкими блоками, в которые входят:

- гомозиготы по факторам устойчивости (устойчивый сорт или выделенная из него чистая линия);
- гомозиготы по факторам восприимчивости (восприимчивый сорт);
- гетерозиготы (гибриды F_1);
- гибриды F_2.

Блоки нельзя разрывать ни во времени, ни в пространстве, иначе нарушится равенство всех условий для различных генотипических классов, процент поражения для них будет учтен неверно, неверно будет введена поправка в ожидаемое соотношение фенотипов в популяции F_2. Если какой-нибудь сорт повторяется в нескольких гибридных комбинациях, его необходимо высевать в каждом блоке, так как разные блоки могут попадать на "пятна" почвы с разным механическим составом или разным уклоном, что приведет к несопоставимым результатам. Для соблюдения равенства глубины заделки необходимо пользоваться посевной доской или любым другим устройством, контролирующим глубину заделки семян.

Если эти условия соблюдены, появляется возможность расчитать ожидаемые соотношения фенотипов на основании правил Менделя и наблюдавшихся соотношений здоровых и пораженных растений в каждом генотипическом классе.

И.Б. Зейналов (1989) изучал наследование устойчивости к твердой головне у сорта Trebisow TR 100-568. Этот сорт практически устойчив. В конкретных условиях опыта, который анализируется ниже, 8% растений сорта Trebisow TR100-568 были поражены, а 92% здоровы. Для определения числа генов, контролирующих устойчивость, сорт Trebisow TR 100-568 скрещивали с восприимчивым сортом Бол-Бугда, который в условиях того же опыта поражался на 100%. Гетерозиготы (растения F_1) были поражены на 100%.

Анализировали 155 растений гибридов F_2 от скрещивания Trebisow × Бол-Бугда. Полученное соотношение фенотипов 36 R : 119 S сравнивали с отношением 1:3. С учетом процента поражения различных генотипических классов ожидалось следующее отношение здоровых и больных растений:

Генотип	Поражение, %	Ожидаемое число растений: по Менделю	с поправкой	
			R	S
aa	8	38,75	35,65	3,10
Aa	100	77,50	0,0	77,50
AA	100	38,75	0,0	38,50
		Всего	35,65	119,10

Объем генотипического класса аа по Менделю составляет 38,75 (1/4 часть от 155 растений F_2), 8% растений этого класса, что составляет 3,10 растений, должны быть поражены и будут отнесены к фенотипическому классу пораженных (S) растений; 92% растений класса аа (35,65 растений) будут здоровы (R).

Гетерозиготы и гомозиготы по фактору восприимчивости должны быть поражены на 100% – как сорт Бол-Бугда и гибриды F_1. Ожидается, что весь объем этих генотипических классов будет фенотипически пораженным (S).

Ожидаемое соотношение здоровых и больных растений составит 35,65 : 119,1, что соответствует фактически наблюдавшемуся соотношению 36 : 119.

Литература

Зейналов И.Б.О. Устойчивость озимой мягкой пшеницы к твердой головне для селекции в условиях Юго-Востока Закавказья. Автореф. дис. … канд. с.-х. наук. Л.: ВИР, 1989. 21 с.

Колесова М.А Генетический контроль устойчивости образцов D-геномной группы рода Aegilops L. к листовым болезням (листовая ржавчина, септориоз, темно-бурая листовая пятнистость) Автореф. дис. … канд. биол. наук. СПб.: ВИР, 2007. 21 с.

Мережко А.Ф. Проблема доноров в селекции растений. СПб.: ВИР, 1994. 128 с.

Мережко А.Ф., Ерохин Л.М., Юдин А.Е. Эффективный метод опыления зерновых культур. (Методические указания). Л. 1973. 11с.

Рабинович С.В. Современные сорта пшеницы и их родословные. Киев: Урожай, 1972. 325с.

Тихомирова М.М. Генетический анализ. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. 280 с.

Троценко А.Г., Скляр В.И. Некоторые вопросы селекции сорговых культур на устойчивость к злаковым тлям // Селекция и семеноводство. Киев: Урожай. Вып. 40. 1978. С. 43-48.

Тырышкин Л.Г. Генетическое разнообразие пшеницы и ячменя по эффективной устойчивости к болезням и возможности его расширения. Автореф. дис. … доктора биол. наук. СПб.: ВИР, 2007. 41 с.

Flor H.H. The complementary genic system in flax and flax rust // Adv. Genet. 1956. V. 8. P. 29-54.

Hackerott H.L., Harvey T.L., Ross W.M. Registration of KS 30 sorghum germplasm // Crop Sci. 1972. V. 12. № 5. P. 719.

Tyler J.M., Webster J.A., Merkle O.G. Designations for genes in wheat germplasm conferring greenbug resistance // Crop Sci. 1987. V. 27. № 3. P. 526-527.

Van der Plank J.E. Disease resistance in plants // Academic Press, New York. 1968. 206 p.

Wood E.A.Jr. Designation and reaction of three biotypes of the greenbug cultured on resistant and susceptible species of sorghum // J. Econ. Entomol. 1971. V. 64. № 1. P.183-185.

О.В. Солодухина

3.2. ОСОБЕННОСТИ ГИБРИДОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА У РЖИ

Определение числа генов, контролирующих устойчивость ржи к ржавчине

Рожь – строго перекрестноопыляемая культура. Самоопыление растений приводит к инцухт-депрессии получаемого потомства. Получение потомства от самоопыления растений возможно в некоторых случаях, один из которых – наличие автофертильности, являющейся мутациями генов несовместимости. Учитывая это, при изучении генетического контроля признаков ржи в гибридологическом анализе можно применять метод с использованием системы автофертильности (Kuckuck, 1975; Kuckuck, Peters, 1979; Смирнов, Соснихина, 1979; 1981) либо популяционный метод (Федоров, 1961а; 1961б).

Популяционный метод. Для изучения наследования признака этим методом используют анализирующие скрещивания, подразумевающие скрещивание двух родителей, один из которых рецессивен по генам, контролирующим признак. Такие скрещивания позволяют определить число доминантных генов, по которым различаются родительские формы, и взаимодействие генов в случаи дигенного контроля признака. Популяционный метод позволяет использовать смесь пыльцы нескольких отцовских растений с одинаковым генотипом для опыления материнских форм. Генетический контроль устанавливают по расщеплению гибридов в поколении F_1. В дополнение к этому можно использовать потомства «типа F_2», полученные от переопыления растений, гетерозиготных по изучаемым генам.

В случае, когда идентифицируемые растения гетерозиготны по гену (генам), контролирующему признак, для определения их числа можно использовать простые анализирующие скрещивания. Схематично это выглядит так:

Aa ⌟ aa

AaBb ⌟ aabb

Перекрестное опыление ржи способствует тому, что сорта или доноры признака представляют собой гетерогенные популяции, состоящие, как правило, из смеси растений, гетерозиготных и гомозиготных по изучаемым генам. Поэтому

для изучения генетического контроля признака больше подходят возвратные (беккроссные) анализирующие скрещивания – BC_1. Схематично это выглядит так:

(A- ⊥ aa) ⊥ aa

(A-B- ⊥ aabb) ⊥ aabb

При доминантном моногенном контроле признака в F_1 наблюдают расщепление, достоверно не отличающееся от ожидаемого 1:1, при дигенном – 3:1. В потомстве «типа F_2» наблюдают менделевские расщепления 3:1 при контроле признака одним доминантным геном, 15:1 – при контроле двумя доминантными генами.

Таблица 3.2.1. Расщепление гибридов ржи F_1BC_1 и F_2BC_1 по устойчивости к бурой ржавчине

Комбинации скрещиваний	Поколение гибридов	Соотношение фенотипов R:S*		χ^2	P
		фактическое	ожидаемое		
(Иммунная 1 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	F_1 BC_1	90: 95	1:1	0,13	0,75-0,50
(Орловская 9-2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	177:161	1:1	0,76	0,50-0,25
(Таловская 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	192:161	1:1	2,72	0,10-0,05
(Готор 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	120:119	1:1	0,00	0,99-0,95
(Ловашпатонае 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	251:233	1:1	0,67	0,50-0,25
(Ярославна 3 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	251:269	1:1	0,62	0,50-0,25
(Дебрет 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	179: 172	1:1	0,14	0,75-0,50
(Крупнозерная 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	142: 147	1:1	0,09	0,90-0,75
(Оргиб ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	282: 255	1:1	1,36	0,25-0,10
(Элбон 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	292: 270	1:1	0,86	0,50-0,25
(Чулпан 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	«	123:126	1:1	0,14	0,75-0,50
	F_2 BC_1	114:48	3:1	1,85	0,25-0,10
(Иммунная 4 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	F_1 BC_1	517:530	1:1	0,16	0,75-0,50
	F_2 BC_1	150:48	3:1	0,16	0,75-0,50
(Грюншнитрогген 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	F_1 BC_1	287: 316	1:1	1,39	0,25-0,10
	F_2 BC_1	254: 76	3:1	0,68	0,50-0,25
(Заречанская 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	F_1 BC_1	287: 315	1:1	1,30	0,50-0,25
	F_2 BC_1	219: 71	3:1	0,04	0,90-0,75
(Новозыбковская 150-2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	F_1 BC_1	83: 73	1:1	0,64	0,50-0,25
	F_2 BC_1	149: 53	3:1	0,16	0,75-0,50
(Черниговская 3 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	F_1 BC_1	414: 451	1:1	1,58	0,25-0,10
	F_2 BC_1	205: 62	3:1	0,44	0,75-0,50
(Янтарная 2 ׀׀ Ильмень) ׀׀ Ильмень	F_1 BC_1	239: 261	1:1	0,97	0,50-0,25
	F_2 BC_1	178: 55	3:1	0,24	0,75-0,50

*Здесь и далее R – устойчивые, S – восприимчивые фенотипы

С использованием популяционного метода изучали наследование устойчивости образцов ржи к популяции возбудителя бурой ржавчины *Puccinia dispersa* Erikss. et. Henning (табл. 3.2.1.). В качестве восприимчивого родителя использовали сорт озимой ржи Ильмень. Установили, что непоражаемость болезнью большинства источников зависит от одного доминантного гена.

Образцы Авангард 2, Новозыбковская 4-2 и Державинская 2 в своих популяциях содержат растения с различным доминантным контролем признака. Обнаружены растения, как с моногенным, так и с дигенным наследованием устойчивости к бурой ржавчине (табл. 3.2.2.).

Таблица 3.2.2. Расщепление гибридов ржи F_1BC_1 по устойчивости к бурой ржавчине

Комбинации скрещиваний	Соотношение фенотипов R:S		^{2}	P
	фактическое	ожидаемое		
(Авангард 2 Ильмень) Ильмень	117:121	1:1	0,07	0,90-0,75
	118:44	3:1	0,40	0,75-0,50
(Новозыбковская 4-2 Ильмень) Ильмень	93:94	1:1	0,005	0,95-0,90
	38:16	3:1	1,24	0,50-0,25
(Державинская 2 Ильмень) Ильмень	197:199	1:1	0,01	0,95-0,90
	48:18	3:1	0,18	0,75-0,50

Изучили наследование устойчивости 8 образцов ржи к популяции возбудителя стеблевой ржавчины (*Puccinia graminis* Pers f. sp. *secale* Erikss. et Henning) (табл. 3.2.3). В большинстве случаев при изучении наследования устойчивости к стеблевой ржавчине в качестве восприимчивого родителя использовали сорт озимой ржи Восход 1, а в комбинациях скрещиваний с устойчивыми образцами Харьковская 55–2 и Россул восприимчивыми формами служили сильно поражавшиеся патогенном растения, выделенные из популяций Гетера 2 и Россул.

Результаты генанализа (табл. 3.2.3.) свидетельствуют о том, что устойчивость растений к стеблевой ржавчине образцов Харьковская 55–2, Россул, Крона 2, Бе-

та, Хемочулпан, Новозыбковская 4-2, Монзарчул и Новозыбковская многоцветковая 2 обеспечивает один доминантный ген.

Таблица 3.2.3. Расщепление по устойчивости к стеблевой ржавчине гибридов ржи F_1BC_1, F_1BC_3 и F_2 BC_3

Комбинация скрещивания	Поколение гибридов	Соотношение фенотипов R:S		χ^2	P
		фактическое	ожидаемое		
(Харьковская 55 -2 ׀׀ Гетера 2^4)	F_1BC_3	151:149	1:1	0,01	0,95-0,90
(Россул ^{4} ׀׀ Hja-6910)	F_1BC_3	171:168	1:1	0,03	0,90-0,75
	F_2 BC_3	339:110	3:1	0,06	0,90-0,75
(Крона 2 ׀׀ Восход 1) ׀׀ Восход 1	F_1BC_1	72:75	1:1	0,06	0,90-0,75
(Бета ׀׀ Восход 1) ׀׀ Восход 1	F_1BC_1	68:94	1:1	4,17	0,05-0,025
(Хемочулпан ׀׀ Восход 1) ׀׀ Восход 1	F_1BC_1	13:14	1:1	0,04	0,90-0,75
(Новозыбковская 4-2 ׀׀ Восход 1) ׀׀ Восход 1	F_1BC_1	15:23	1:1	1,68	0,25-0,10
(Монзарчул ׀׀ Восход 1) ׀׀ Восход 1	F_1BC_1	22:28	1:1	0,72	0,50-0,25
(Новозыбк. многоцв. 2 ׀׀ Восход 1) ׀׀ Восход 1	F_1BC_1	16:15	1:1	0,03	0,90-0,75

Использование систем автофертильности позволяет получать более полные сведения о генетических основах взаимоотношений растения и патогена в связи с возможностью получения и изучения расщепления нескольких поколений гибридов. Осуществимость подтверждения результатов расщепления гибридов в последующих поколениях способствует большей достоверности информации о наследовании признака. Генетическое изучение признаков ржи, обусловленных рецессивными генами, затруднено без использования автофертильности. Исследование неспецифической устойчивости к болезни допустимо только с использованием самоопыленных линий. Однако, многократное самоопыление автофертильных форм в конечном результате приводит к инцухт-депрессии потомства. При определении генетического контроля устойчивости ржи к ржавчине с применением автофертильных форм возможно изучение расщепления инбредных

потомств F_1, F_2, F_3 и последующих, полученных от анализирующего скрещивания с автофертильными формами.

В наших исследованиях с использованием автофертильных линий Л-33/7, Л-527, Л-475 изучен генетический контроль устойчивости ржи к монопустульным изолятам гриба *P. dispersa* (табл. 3.2.4.). В потомстве F_2 от анализирующих скрещиваний устойчивых к популяции гриба растений Оргиб, Новозыбковская 4-2 и Войцешицке 2 с восприимчивыми автофертильными линиями фактические соотношения R:S при заражении одними клонами достоверно не отличались от ожидаемых при доминантном моногенном контроле признака. Устойчивость растений к некоторым клонам контролировал один рецессивный ген, к другим – два гена (доминантный и рецессивный)

Однако результаты расщепления полученных гибридов не всегда соответствовали менделевским. Такое возможно в потомствах самоопыленных гибридов в случае тесного сцепления изучаемого гена с геном, контролирующим автофертильность (Войлоков и др.1994; Смирнов, Соснихина, 1984; Weber, Wricke, 1994). В данном случае расщепление 1R:1S вместо 3R:1S в F_2 указывает на доминантно моногенный контроль признака устойчивости.

Таблица 3.2.4. Расщепление по устойчивости к монопустульным изолятам *P. dispersa* F_2BC_1 гибридов от скрещиваний автостерильной и автофертильной ржи

Гибриды F_2 BC_1	Клон	Соотношение фенотипов R:S		χ^2	P	Число генов устойчивости
		фактическое	ожидаемое			
(Оргиб × Ильмень) × Л-33/7	16	0:114	–	–	-	–
	24	63:51	1:1	1,26	0,50-0,25	один доминантный
	25	66:48	1:1	2,84	0,10-0,05	« «
	30	90:24	3:1	0,95	0,50-0,25	« «
	31	87:27	3:1	0,11	0,75-0,50	« «
(Новозыбковская 4-2 × Ильмень) × Л-527	16	0:98	–	–	-	–
	24	72:29	3:1	0,74	0,50-0,25	один доминантный
	25	62:36	5:3	0,02	0,90	один доминантный × один рецессивный
	30	69:29	3:1	1,10	0,50-0,25	один доминантный
	31	69:29	3:1	1,10	0,50-0,25	« «
(Войцешицке 2 × Ильмень) × Л-475	16	35:38	1:1	0,12	0,75-0,50	один доминантный
	24	31:42	1:1	1,66	0,25-0,10	« «
	25	24:49	1:3	2,41	0,25-0,10	один рецессивный

	30	16:57	1:3	0,37	0,75-0,50	« «
	31	0:73	–	–	-	–

Более подробно различные случаи отклонения от менделевских соотношений рассмотрены у гибридов от скрещивания автостерильной и автофертильной ржи, а также у межлинейных гибридов от скрещивания двух автофертильных линий с мутациями автофертильности различных локусов несовместимости при изучении устойчивости растений ржи к различным клонам возбудителя бурой ржавчины (Баранова и др., 2002).

Расщепление 5R:3S вместо 13R:3S наблюдали у гибрида от скрещивания с Новозыбковской 4-2 при инокуляции клоном № 25. Это допустимо в случае, если признак устойчивости обусловливают два гена – один доминантный и один рецессивный, причем доминантный ген сцеплен с мутацией автофертильности. Вышесказанное возможно и в случае, когда устойчивость контролируют два рецессивных гена, один из которых сцеплен с геном автофертильности. В нашем эксперименте устойчивость донора Новозыбковская 4-2 к клону гриба № 25 детерминируют один доминантный и один рецессивный гены, так как гибриды F_1 от бекроссных скрещиваний расщепились по устойчивости к этому клону в отношении 12R:14S, свидетельствующем о доминантном моногенном контроле признака.

Идентификация генов ржи, контролирующих устойчивость к ржавчине

Популяционный метод. Для идентификации доминантных генов, монофакторно контролирующих устойчивость ржи к болезни, нами предложен популяционный метод, который основан на использовании анализирующих скрещиваний дигетерозигот по изучаемым генам (Солодухина, 1986).

Метод предполагает следующие этапы:

I – получение гетерозигот по изучаемому и тест-гену;

II – получение дигетерозигот путем попарного скрещивания гетерозигот по изучаемому и тест-гену;

III – проведение анализирующего скрещивания потомств, полученных в результате II этапа скрещиваний;

IV – изучение расщепления гибридных растений, полученных в результате III этапа анализирующих скрещиваний; результаты расщепления служат доказательством аллельности изучаемых генов (рис. 3.2.1.).

В случае отсутствия аллельности генов 2/3 потомств должны дать расщепление в отношении, близком 1R:1S, а 1/3 потомств – расщепление 3R:1S. При аллельности генов 2/3 гибридных потомств расщепятся как 1R:1S, а 1/3 потомств не даст расщепления и будет устойчива к патогену.

Использование данного метода в генетическом анализе перекрестноопыляемой культуры ржи по сравнению с применением систем автофертильности позволяет избежать инцухт-депрессии растений при многократном самоопылении автофертильных форм в случае их размножения и поддержания, а также исключить возможное влияние генов автофертильности на результаты расщепления гибридов в случае их сцепления с генами устойчивости.

Этим методом мы идентифицировали доминантные гены, контролирующие устойчивость к бурой ржавчине, у 11 доноров признака: Саним, И-125/79, Балтийская 2, Черниговская 3, Иммунная 1, Малыш 72-2, Иммунная 4, Чулпан 2, Новозыбковская 4-2, Элбон 2 и Ярославна 3, а также доминантные гены, контролирующие устойчивость к стеблевой ржавчине у 2 доноров: Хемочулпан и Монзарчул.

В качестве примера приведены результаты эксперимента по установлению аллельных отношений между генами устойчивости к бурой ржавчине доноров Черниговская 3, Иммунная 1, Чулпан 2 и тест-геном *Lr*4 донора Саним 2 (табл. 3.2.5.).

В результате III этапа анализирующих скрещиваний получены гибриды, 2/3 части потомств которых расщепились в соотношении 1R:1S, а 1/3 часть семей, не расщепились (1R:0S), то есть были устойчивы к патогену. Такой характер расщепления свидетельствует об аллельности генов у доноров Саним и Черниговская 3.

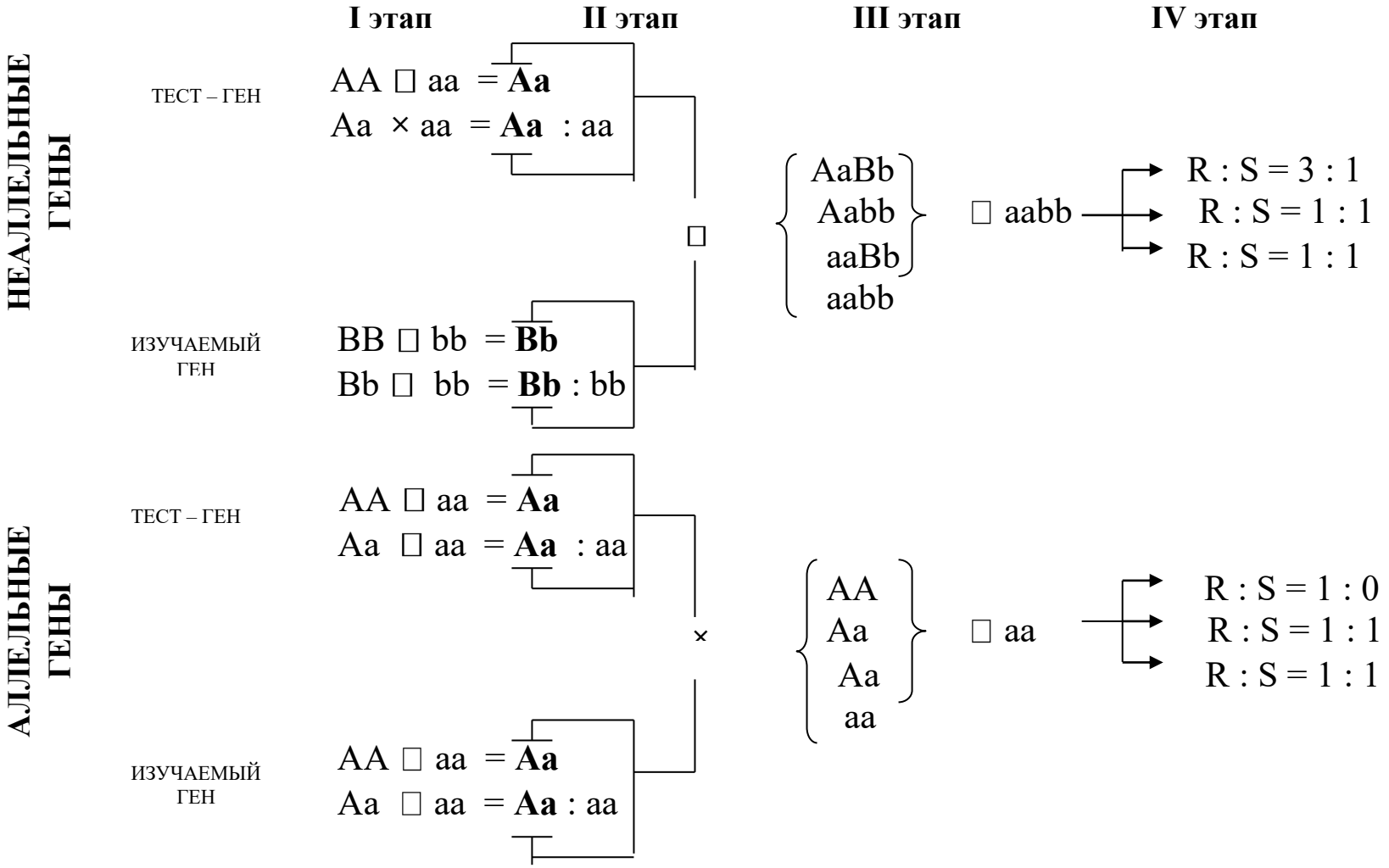


Рис. 3.2.1. Схема идентификации доминантных генов устойчивости ржи к грибным болезням.

Таблица 3.2.5. Расщепления в потомствах F_1 от анализирующих скрещиваний при установлении аллельных отношений между *Lr*-генами ржи

Номер семьи	Сопоставляемые доноры генов устойчивости								
	Саним 2 (*Lr*4) и Черниговская 3			Саним 2 (*Lr*4) и Иммунная 1			Саним 2 (*Lr*4) и Чулпан 2		
	Соотношение фенотипов R:S		χ^2	Соотношение фенотипов R:S		χ^2	Соотношение фенотипов R:S		χ^2
	фактическое	ожидаемое		фактическое	ожидаемое		фактическое	ожидаемое	
1	25 : 24	1 : 1	0,02	4 : 5	1 : 1	0,11	92 : 97	1 : 1	0,13
2	13 : 20	1 : 1	1,48	**33 : 14**	**3 : 1**	0,57	60 : 51	1 : 1	0,73
3	15 : 18	1 : 1	0,27	14 : 10	1 : 1	0,66	**66 : 24**	**3 : 1**	0,13
4	11 : 16	1 : 1	0,92	**29 : 13**	**3 : 1**	0,79	44 : 31	1 : 1	2,25
5	12 : 13	1 : 1	0,04	**17 : 6**	**3 : 1**	0,01	57 : 64	1 : 1	0,40
6	**35 : 0**	**1 : 0**	-	38 : 35	1 : 1	0,12	58 : 45	1 : 1	1,64
7	**72 : 0**	**1 : 0**	-	22 : 24	1 : 1	0,08	**87 : 27**	**3 : 1**	0,11
8	46 : 47	1 : 1	0,01	**40 : 16**	**3 : 1**	0,48	**99 : 29**	**3 : 1**	0,37
9	33 : 35	1 : 1	0,06	**40 : 15**	**3 : 1**	0,15	**202 : 83**	**3 : 1**	2,58
10	24 : 27	1 : 1	0,18	52 : 41	1 : 1	1,30	112: 118	1 : 1	0,15
11	25 : 31	1 : 1	0,64	66 : 84	1 : 1	2,16	120 : 92	1 : 1	3,70
12	**75 : 0**	**1 : 0**	-	53 : 53	1 : 1	0,00	94 : 100	1 : 1	0,18
13	16 : 18	1 : 1	0,12	28 : 36	1 : 1	1,00	105: 113	1 : 1	0,29
14	18 : 11	1 : 1	1,69	9 : 10	1 : 1	0,05	132: 174	1 : 1	5,76
15	29 : 24	1 : 1	0,47	16 : 14	1 : 1	0,13	**98 : 28**	**3 : 1**	0,52
16	16 : 15	1 : 1	0,03	41 : 39	1 : 1	0,05	38 : 31	1 : 1	0,71
17	7 : 12	1 : 1	1,30				**86 : 33**	**3 : 1**	0,47
18	11 : 16	1 : 1	0,92				77 : 97	1 : 1	2,30
19	11 : 13	1 : 1	1,17				191: 182	1 : 1	0,22
20	**20 : 0**	**1 : 0**	-				77 : 86	1 : 1	0,50
21	13 : 18	1 : 1	1,19						
22	**17 : 0**	**1 : 0**	-						
23	**23 : 0**	**1 : 0**	-						

При изучении аллельных отношений *Lr*-генов образцов Иммунная 1, Чулпан 2 и гена *Lr*4 у части потомств соотношение близкое к 1R:1S указывает на присутствие одного доминантного аллеля тест-гена или тестируемого гена. Расщепление 3R:1S выявлено у гибридов от анализирующих скрещиваний дигетерозигот, получение которых возможно при скрещивании родителей с неаллельными генами. Таким образом, устойчивость у форм Иммунная I и Чулпан 2 контролируют гены, неаллельные *Lr*4.

Использование систем автофертильности. Для идентификации генов, детерминирующих устойчивость ржи к бурой ржавчине, нами создана серия автофертильных форм с *Lr*-генами путем скрещивания источников генов

устойчивости с источниками генов автофертильности и инбридинга в течение 3–15 поколений. Использование систем автофертильности в генетическом анализе ржи позволяет применять те же методы гибридологического анализа, что и при изучении устойчивости к болезням у самоопыляемых культур.

С использованием генов автофертильности идентифицировали *Lr*-ген донора Ловашпатонае 2. Для этого провели скрещивания между автофертильными линиями с *Lr* геном у Ловашпатонае 2 и растениями с идентифицированными нами ранее генами устойчивости *Lr*4, *Lr*5, *Lr*6, *Lr*7 и *Lr*10 (табл. 3.2.6.).

Таблица 3.2.6. Расщепление по устойчивости к бурой ржавчине автофертильных потомств гибридов ржи

Гибриды	Поколение гибрида	Изучено семей	Соотношение фенотипов R:S		χ^2
			фактическое	ожидаемое	
Ловашпатонае 2 (*Sf, LrLr*) × Комбайниняй 2 (*Lr*4 *lr*4)	F_1	1	60 : 0	1 : 0	-
	F_2	20	594 : 220	3 : 1	1,79
		9	441 : 40	15 : 1	3,50
Ловашпатонае 2 (*Sf, LrLr*) × Малыш 72-2 (*Sf, Lr*5 *lr*5)	F_1	1	44 : 0	1 : 0	-
	F_2	9	472: 168	3 : 1	0,53
		10	625 : 49	15 : 1	1,20
Ловашпатонае 2 (*Sf, LrLr*) × Новозыбковская 4-2 (*Lr*7 *lr*7)	F_1	1	55: 0	1: 0	-
	F_2	4	55: 3	15: 1	0,11
		2	60: 16	3:1	0,63
	F_3	4	211: 0	1: 0	-
		4	251: 19	15: 1	0,28
		3	112: 35	3: 1	0,11
Ловашпатонае 2 (*Sf, Lrlr*) × Чулпан 2 (*Lr*6 *lr*6)	F_1	1	19 : 5	3 : 1	0,22
	F_2	1	62 : 23	3 : 1	0,19
		3	216 : 10	15 : 1	1,28
	F_3	15	407 : 146	3 : 1	0,58
		11	344 : 0	1 : 0	-
		9	314 : 26	15 : 1	1,13
Ловашпатонае 2 (*Sf, Lr lr*) × Ярославна 3 (*Lr*10 *lr*10)	F_1	1	19 : 7	3 : 1	0,05
	F_2	1	41 : 12	3 : 1	0,22
		2	150 : 8	15 : 1	0,38
	F_3	22	835 : 293	3 : 1	0,57
		6	220 : 0	1 : 0	-
		11	413 : 35	15 : 1	1,87

В экспериментах по изучению аллельности *Lr* гена у Ловашпатонае 2 по отношению к гену *Lr*4 (донор Комбайниняй 2), гену *Lr*5 (донор Малыш 72-2) и гену *Lr*7 (донор Новозыбковская 4-2) использовали гибриды F_1 и F_2 между автофертильными, гомозиготными по *Lr* гену от Ловашпатонае 2, и автостерильными растениями, гетерозиготными по генам *Lr*4, *Lr*5 и *Lr*7. Наблюдали единообразие гибридов F_1 по устойчивости. Гибриды F_2 характеризовались двумя типами расщеплений семей: 3R:1S и 15R:1S. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии аллельности между *Lr* геном Ловашпатонае 2 и генами *Lr*4, *Lr*5 и *Lr*7. Неаллельность генов устойчивости Ловашпатонае 2 и гена *Lr*7 подтвердили результаты расщепления семей в F_3.

При установлении аллельных отношений между *Lr* геном Ловашпатонае 2 и генами *Lr*6 (донор Чулпан 2), *Lr*10 (донор Ярославна 3) скрещивали растения, гетерозиготные по генам устойчивости, поэтому уже гибриды F_1 расщепились в отношении 3R:1S. Часть семей F_2 расщепились по устойчивости в соотношении, близком к 3R:1S, а часть –15R:1S. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии аллельности между *Lr* геном от Ловашпатонае 2 и генами *Lr*6 *и Lr*10. Расщепления семей в F_3 подтвердило выдвинутые предположения.

Таким образом, тест на аллелизм с использованием генов автофертильности показал, что ген, контролирующий устойчивость образца Ловашпатонае 2 к популяции *P. recondita* f. sp. *secalis*, неаллелен генам *Lr*4, *Lr*5, *Lr*6, *Lr*7 и *Lr*10. Этому гену присвоен символ *Lr*8.

Литература

Баранова О.А., Дмитриев А.П., Войлоков А.В., Солодухина О.В. Влияние мутаций автофертильности на расщепление гибридов ржи по устойчивости к бурой ржавчине // Материалы первой всерос. конф. по иммунитету растений к болезням и вредителям. СПб., 2002. С. 66-67.

Войлоков А.В., Фыонг Ф.Т., Прияткина С.Н., Салтыковская Н.А., Немова И.А., Смирнов В.Г. Идентификация и локализация мутаций автофертильности у инбредных линий ржи // Генетика. 1994. Т. 30. № 8. С. 1057-1064.

Смирнов В.Г., Соснихина С.П. Задачи и методы генетического анализа в популяциях // Популяции растений. Л., 1979. С. 28-44.

Смирнов В.Г., Соснихина С.П. Изучение гетерозиготности растений популяции сорнополевой ржи и популяции сорта Вятка // Исследования по генетике. Л., 1981. Вып. 9. С. 138-147.

Смирнов В.Г., Соснихина С.П. Генетика ржи. Л.: ЛГУ, 1984. 264с.

Солодухина О.В. Создание доноров устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе для селекции диплоидной ржи: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Л.: ВИР, 1986. 20с.

Федоров В.С. К методике генетического анализа признаков ржи // Тез. докл. межвуз. конф. по эксперим. генетике. Л., 1961. Ч. 1. С. 171-172.

Федоров В.С. Наследование признаков у гибридов ржи от свободного опыления // Тез. докл. межвуз. конф. по эксперим. генетике. Л., 1961. Ч. 1. С. 173-174.

Kuckuck H. The breeding of cleistogamous genetic stocks of *Secale cereale* // Hod. Rosl. Aklim. Nasienn. 1975. V. 19. P. 487-493.

Kuckuck H., Peters R. Induzierte Mutationen in selbstfertilen und inzuchtfesten Kulturformen aus der Kreuzung der *Secale cereale* L. *Secale vavilovii* Grossh. und ihr Verhalten in Kreuzungen mit panmiktischen Sorten und selbstfertilen Spontanmutationen // Z. Pflanzenz. 1979. Bd 82. S. 97-115.

Weber W.E., Wricke G. Genetic markers in plant breeding // Advances in Plant Breeding. Supplement 16. 1994. 106p.

Б. В. Ригин, Т. В. Лебедева, Х. О. Пеуша

3.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНЕУПЛОИДОВ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Анеуплоидными являются растения, в геноме которых произошло увеличение или уменьшение числа отдельных гомологичных хромосом. Выделяют следующие типы анеуплоидов: нуллисомики, у которых не содержится двух гомологичных хромосом, моносомики, в клетках которых отсутствует гомолог конкретной хромосомы, и трисомики с одной лишней гомологичной хромосомой. Анеуплоиды у растений могут возникать спонтанно или быть получены искусственным путем. У животных анеуплоидия за редким исключением приводит к возникновению нежизнеспособных форм.

Исследования анеуплоидных форм позволяет определить роль конкретных хромосом генома в развитии как отдельных признаков, так и целого организма.

Полные наборы анеуплоидных форм экспериментально созданы у самых различных видов растений. Так, моносомики получены у овса (*Avena sativa*, 2n = 42) и табака (*Nicotiana tabacum*, 2n = 48). Полные серии нуллисомиков, моносомиков и тетрасомиков имеются у пшеницы (*Triticum aestivum* L., 2n = 42). Экспериментально созданы полные серии трисомиков ржи (*Secale cereale* L., 2n = 14), ячменя (*Hordeum vulgare* L., 2n = 14), овса (*Avena sativa* L., 2n = 42), кукурузы (*Zea mays* L., 2n = 20), риса (*Oryza sativa* L., 2n = 24), сорго (*Sorghum bicolor* Moenh, 2n = 20), томата (*Lycopersicon esculentum* L., 2n = 24), шпината (*Spinacia oleracea* L., 2n = 12), перца (*Capsicum annuum* L., 2n = 24).

Такие формы не представляют интереса для непосредственного использования в производстве, но они являются линиями-тестерами в процессе генетического анализа. Метод анеуплоидных тестеров преимущественно используется у высших полиплоидных растений, у которых однозначные гены представлены несколькими аллелями, что способствует сохранению полной или частичной жизнеспособности растений с утратой одной гомологичной хромосомы или обоих гомологов (например, нуллисомиков). Использование нуллисомиков в генетическом анализе ввиду их низкой жизнеспособности ограничено небольшим числом видов

растений. Моносомные растения также не у всех видов достаточно жизнеспособны, чтобы их использовать в генетических экспериментах.

Трисомики впервые выделены и описаны в классических работах Блэксли и Беллинга (Belling, Blakeslee, 1922; Blakeslee, 1924; 1932) с дурманом *Datura stramonium*. Трисомные растения, как и моносомные, удается сохранить путем самоопыления и отбора. Трисомики называют первичными, если к диплоидному набору добавлена одна обычная, структурно не измененная хромосома. Вторичные трисомики имеют одну лишнюю хромосому, оба плеча которых идентичны, то есть изохромосому. Во вторичном трисомике генетический материал представлен четыре раза. Если добавочная хромосома состоит из частей двух хромосом, то такое растение называется третичным трисомиком.

Все трисомики менее жизнеспособны и плодовиты, чем эуплоидные растения. Трисомные тестеры в основном используют в генетическом анализе ограниченного числа видов высших растений. В связи с развитием методов культуры клеток и тканей растений и животных, а также методов молекулярной биологии, значение трисомного анализа возрастает.

У томата *L. esculentum* с большим трудом возможно получение моносомных растений (и то лишь по некоторым хромосомам) из-за высокой чувствительности гаметофитной стадии развития растений к утрате даже небольшой части генетического материала в виде хромосом или нехваток (deficiency). Считалось, что такие типы анеуплоидов у тамата получить невозможно. Однако впоследствии выделили моносомные растения по некоторым хромосомам с использованием γ-облучения в период после гаметогенеза, но и они в основном характеризовались слабой жизнеспособностью и практически полной стерильностью (Кириллова, Лукьяненко, 1990).

Трисомики томата получены по всем 12 хромосомам. Впервые трисомные растения томата выделены Лесли (Lesley, 1932). Любая добавочная хромосома обладает плейотропным эффектом и трисомики характеризуются определенными фенотипическими и цитологическими характеристиками. Эта особенность трисомиков способствовала сравнительной легкости локализации генов и определения

групп сцепления (Жученко, 1973). Вторичные и третичные трисомики использовали для локализации генов в определенных плечах хромосомы. У томатов число добавленных хромосом к одному генотипу не может превышать трех.

У ячменя *H. vulgare* выявлены анеуплоиды, которые характеризуются различной жизнеспособностью. Наибольшее применение для локализации вновь обнаруживаемых генов получили полные серии первичных трисомиков, созданные на основе нескольких сортов ячменя. Для локализации генов ячменя применяют также формы с избыточными телосомическими хромосомами.

У ржи *S. cereale* определение локализации генов и групп сцепления основано на использовании трисомиков как наиболее жизнеспособных анеуплоидов (Fujigaki, Tsuchiya 1988, Melz et al., 1988). Полные серии трисомиков получены по нескольким сортам ржи (Рогалинская, Борковская и др.). Трисомия по каждой хромосоме имеет специфичный комплекс морфологических признаков, несколько модифицирующийся в зависимости от исходных генотипов (Смирнов и др., 1986).

Пшеница является объектом, на котором особенно отразились успехи современной цитогенетики. Именно на этом злаке проведены классические эксперименты по расшифровке эволюционного процесса и созданы принципиально новые методы изучения наследственной структуры вида. Это связано, главным образом, с тем, что пшеница – наиболее важный продукт питания человека и, следовательно, необходимость генетических исследований как теоретической базы селекции этой культуры стоит наиболее остро.

Весьма кропотливым и точным цитогенетическим анализом показано, что род *Triticum* L. довольно легко подразделяется на три группы по числу хромосом: диплоидные, тетраплоидные и гексаплоидные виды. Виды первой группы имеют один геном А, виды второй группы – геном А и геном В от *Aegilops speltoides*, а виды третьей группы – геномы А, В и D от *Ae. squarrosa.*

В конце 40-х годов XX века центр изучения наследования признаков у мягкой пшеницы переместился из области чисто генетической в область цитогенетическую. Это стало возможным благодаря работам Сирса (Sears, 1939; 1944; 1953;

1954; 1959) по созданию серий анеуплоидных линий по каждой из 21 хромосомы яровой пшеницы Chinese Spring.

Такие линии были получены с использованием гаплоида, нуллисомика по хромосоме 3B с частичным асинапсисом, а также некоторых других форм. По мере получения нуллисомикам давали порядковые номера, обозначая римскими цифрами от I до XIV те, в которых недоставало хромосом геномов A и B, и цифрами от XV до XX1 – в которых не хватало хромосом генома D. В результате дальнейших цитогенетических экспериментов удалось отнести каждую хромосому к определенным геномам A, B, D и к одной из семи гомеологичных групп. В связи с этим была предложена новая нумерация хромосом: арабскими цифрами стали обозначать принадлежность хромосомы к гомеологичной группе, заглавной буквой – к одному из трех геномов. В литературных источниках используется новая нумерация хромосом. Хотя изредка встречается употребление старой нумерации. В табл. 3.3.1. представлены соответственно старые и новые номера хромосом мягкой пшеницы.

Таблица 3.3.1. Нумерация хромосом мягкой пшеницы

Гомеологическая группа	Геном A		Геном B		Геном D	
	новая	старая	новая	старая	новая	старая
1	1A	XIV	1B	I	1D	XVII
2	2A	II	2B	XIII	2D	XX
3	3A	XII	3B	III	3D	XVI
4	4A	IV	4B	VIII	4D	XV
5	5A	IX	5B	V	5D	XVIII
6	6A	VI	6B	X	6D	XIX
7	7A	XI	7B	VII	7D	XXI

Основные особенности анеуплоидов мягкой пшеницы.

Нуллисомики (растения, у которых отсутствует оба гомеолога одной хромосомы, 2n = 40; 20") морфологически довольно значительно различаются между собой и, соответственно, отличаются от нормального, дисомного растения. Эти различия у разных нуллисомиков могут выражаться в наличии или отсутствии

остевидных заострений (нулли-4B и нулли-6B), в размерах и окраске зерна (нулли-3D), плотности, длине или толщине колоса, опушенности чешуй (нулли-1A), в ширине и длине листовой пластинки, опушенности междоузлий, высоте, толщине стебля, продолжительности вегетационного периода и других признаках. Меньше отличий от дисомного растения наблюдается у нулли-7B и нулли-7D.

По данным Сирса (Sears, 1959) стерильность некоторых нуллисомиков (например, нуллисомиков по хромосомам 4A, 4B и 4D) выражена достаточно сильно. Эта особенность не позволяет им размножаться путем самоопыления; практически новые нуллисомики можно получить лишь путем выделения среди потомства моносомных растений. Частота появления в их потомстве растений с отсутствием пары гомологичных хромосом довольно значительна и зависит от хромосом, по которым идет расщепление и разной конкурентной способности гамет с 20 и 21 хромосомами. Так, наибольший «выход» нуллисомиков наблюдали в потомстве моносомика по хромосоме 3B (7,6%) и по хромосоме 4A (6,4%). Моносомики по хромосомам 2A, 2B, 3D и 4D имеют в потомстве от 4,4 до 5,9% нуллисомиков. В потомстве остальных моносомных растений частота нуллисомиков не поднималась выше 4 %.

Моносомики – растения, у которых отсутствует одна из двух гомологичных хромосом (2n = 41; 20" + 1'). Впервые полную серию моносомных линий создал Сирс на основе сорта мягкой пшеницы Chinese Spring. Затем моносомные серии на основе коммерческих сортов созданы другими исследователями в различных странах (Гончаров 1992, Worland 1988). Их можно успешно поддерживать путем отбора среди потомства, полученного от самоопыления моносомного растения по каждой из 21 хромосом. В потомстве моносомика при самоопылении образуется также и определенное количество дисомных и моносомных по этой хромосоме растений. Частоты возникновения этих типов зависит от степени передачи гамет с нехваткой различных хромосом, а также от степени передачи таких гамет через материнское и отцовское растение. Так, в среднем передача гамет с 21 и 20 хромосомами через яйцеклетки составляет соответственно 25 и 75%, через пыльцу –

96 и 4%. Однако эти показатели могут колебаться в довольно широких пределах (табл. 3.3.2.).

Таблица 3.3.2. Частота (%) и типы появления анеуплоидов в потомстве моносомика (по Моррису и Сирсу, 1970)

Яйцеклетки	Пыльца	
	21 хромосома, 96 (81–99)	20 хромосом, 4 (1–19)
21 хромосома, 25 (14–29)	Дисомик, 24 (11–29)	Моносомик 1 (0,1–5)
20 хромосом, 76 (61–86)	Моносомик, 72 (49–85)	Нуллисомик 3 (0,6–16)

В наших экспериментах в потомстве от самоопыления моносомных растений анеуплоиды с 2n = 41 появлялись (в среднем за 5 лет) с частотой от 33,9 до 72,3% и зависимости от передачи той или иной моносомы (табл. 3.3.3.).

Таблица 3.3.3. Количество анеуплоидов, 2n = 41, в потомстве моносомиков Chinese Spring (средние данные за 1969–1973 гг.)

Моносомик	Всего растений	Анеуплоидов	
		штук	%
Моно-1A	81	46	56,8
Моно-1B	73	41	56,2
Моно-1D	53	22	39,6
Моно-2A	55	34	61,8
Моно-2B	79	44	55,7
Моно-2D	77	34	44,2
Моно-3A	47	34	72,3
Моно-3B	106	54	50,9
Моно-3D	61	46	75,4
Моно-4A	59	20	33,9
Моно-4в	62	30	48,4
Моно-4D	69	37	53,0
Моно-5A	53	36	67,9
Моно-5B	94	49	51,6
Моно-5D	93	57	61,3
Моно-6A	53	37	69,8
Моно-6B	73	35	47,9
Моно-6D	62	31	50,0
Моно-7A	48	18	17,5
Моно-7B	48	24	50,0
Моно-7D	89	42	47,2
Всего	1436	771	53,6

Реже всего моносомные растения появляются в потомстве моносомиков четвертой и седьмой гомеологичных групп, наибольшая частота моносомиков в потомстве себе подобных третьей группы. По другим данным (Майстренко, 1971; 1974; Tsunewaki, 1964) наименьшая частота моносомиков в потомстве растений второй гомеологичной группы (особенно по моно-2А), наибольшая – у анеуплоидов первой, третьей и шестой групп.

На степень передачи гамет с нехваткой хромосом влияют отсутствие определенной хромосомы и условия произрастания растений.

На основе Chinese Spring получено 16 изогенных линий, маркированных морфологичесскими признаками (Tsujimoto, 2001), которые могут быть использованы в качестве маркеров при тестировании моносомных и дисомных растений. В некоторых случаях это может упростить моносомный анализ за счет уменьшения цитологической работы (Гончаров, 1981).

При размножении моносомиков приходится сталкиваться с нежелательной их особенностью – сменой унивалентов. Это явление связано с тем, что в анеуплоидном организме, ввиду отсутствия одной из хромомосом, наблюдается частичный десинапсис или преждевременное расхождение гомологов и как следствие – несколько большее число унивалентов. Таким образом, в растении, где произошла смена унивалентов, может отсутствовать гомолог идентичной хромосомы исходной линии. Такое явление более часто наблюдается у гибридов с моносомиками, но оно происходит с определенной частотой и в моносомных линиях при самоопылении. Помимо смены унивалентов может происходить и спонтанный обмен участками между негомологичными хромосомами генома (это опять-таки более вероятно у гибридных форм).

Контроль за сохранением идентичности хромосом в процессе размножения моносомиков может быть осуществлен либо цитологически – путем изучения морфологии хромосом (соотношение плеч, наличие спутника), либо путем наблюдения за фенотипическими маркерными признаками, которые контролируют гены этой хромосомы. Однако из-за особенностей цитологической и генетической конституции пшеницы это не всегда возможно. Поэтому самым результа-

тивным методом определения смены унивалентов является использование серии линий с дителосомическими хромосомами, где каждая линия имеет одну известную хромосому, оба гомолога которой являются дителосомическими (то есть хромосомами, у которых практически отсутствует одно из плеч).

Для проверки смены унивалентов производят скрещивание моносомных растений по каждой хромосоме в качестве материнской формы с дителосомиком по соответствующей хромосоме и изучают мейоз в F_1. Если смены унивалентов не имеется, то в метафазе первого деления должно наблюдаться у одних растений 20 нормальных бивалентов и 1 гетероморфный бивалент, состоящий из нормальной двуплечей хромосомы и телосомика (20" + 1t'), у других растений – 20 нормальных бивалентов и 1 телосомический унивалент (20" + t').

Если произошла смена унивалентов, то новая моносома будет не гомологична дителоцентрической хромосоме дителосомика-тестера, и поэтому в метафазе F_1 будет наблюдаться у одних растений (так же как и в первом случае) 20 нормальных бивалентов и один гетероморфный бивалент (20" + 1t"), но зато у других – 19 нормальных бивалентов, 1 гетероморфный бивалент и 1 унивалент (19" + 1t" + 1').

Использование анеуплоидов для локализации генов в хромосомах

В зависимости от цели исследования ген, ответственный за реализацию признака, можно локализовать вообще в определенной хромосоме без указания конкретного места его расположения. Кроме того, ген можно привязать к определенному плечу и локусу хромосомы с вычислением расстояния его до центромеры, выраженного в единицах кроссинговера (Driscoll, Sears 1965; Sears 1962). В последнем случае используют дителоцентрические хромосомы.

Для локализации гена в хромосоме применяют в основном следующие методы: нуллисомный, моносомный, метод замещения, трисомный, телосомный.

Нуллисомный анализ основан на различии в эффектах генов, присутствующих в 6- или 4-кратной дозах. Таким образом, некоторые доминантные гены могут быть локализованы довольно просто: путем анализа фенотипов нуллисомных растений по изучаемым признакам и сравнении их с дисомными, нормальными

растениями. Такими признаками могут быть окраска колоса, остистость (доминантные ингибиторы образования остей и гены-супрессоры, уменьшающие длину остей).

Естественно, этот метод имеет довольно ограниченную область применения и сопряжен с трудностями выделения нуллисомных растений. Анализ нуллисомиков может дать результаты, если изучаются доминантные гены (они проявлены у дисомика и отсутствуют у нуллисомика по той хромосоме, в которой они локализованы) и те рецессивные гены, которые в нулевой дозе не проявляются (Уильямс, 1968; Sears, 1944).

Моносомный анализ получил большое распространение и является одним из основных методов генетического анализа. Этим методом определяют хромосомы, в которых локализованы доминантные гены, а также рецессивные, не эспрессирующиеся в гемизиготном состоянии. В основе его лежит классический метод факториального анализа, разработанный Г. Менделем.

Для моносомного анализа, также как и для факториального анализа, следует подбирать сорта или мутанты, фенотипически хорошо различающиеся между собой (в случае применения моносомного анализа – достаточно отличающиеся от моносомной серии).

Схема моносомного анализа следующая.

1. Подбор и получение исходного материала:

- подбор сортов или мутантов, контрастных по изучаемому признаку по отношению к моносомной серии;

- выделение путем подсчета хромосом растений, моносомных или нуллисомных по каждой хромосоме.

2. Скрещивание выделенных моносомных растений по каждой хромосоме в качестве материнского растения с выбранным для анализа сортом, имеющим альтернативный признак по отношению к моносомной серии и гомозиготный по всем аллелям изучаемого гена (пыльцевой родитель). Материнские моносомные растения должны выращиваться в условиях, способствующих максимальной кустистости и продуктивности. «Лишние» колосья моносомных растений могут быть ис-

пользованы для поддержания и размножения моносомной серии (при строгом самоопылении), а также для увеличения объемов скрещиваний.

3. Подсчет числа хромосом в гибридных зерновках (пункт 2) и выделение моносомиков по каждой хромосоме.

4. Выращивание гибридных моносомиков на фоне, обеспечивающем максимальную продуктивность и проявление изучаемого признака. Наряду с этим выращивают и F_1 гибридов, полученных на дисомном уровне, то есть комбинации дисомика Chinese Spring с дисомиком исследуемого сорта, если моносомная серия получена на основе Chinese Spring. Изучение F_1 гибридов.

5. Путем самоопыления гибридов первого поколения получение гибридов F_2 и изучение их.

6. При необходимости получение и изучение F_3 гибридов. Необходимое количество выделенных моносомиков (пункт 1), число гибридных зерновок (пункт 2) и число растений в F_1 и F_2 (пункты 3-5) по каждой комбинации скрещивания моносомной линии с исследуемым сортом можно подсчитать, исходя из сложности генетического контроля изучаемого признака и возможной продуктивности моносомного родителя и гибридных растений. Генетический контроль изучаемого признака определяется на основании рекогносцировочного анализа на дисомном уровне.

Для определения хромосом, в которых локализованы гены, контролирующие изучаемый признак, исследуют фенотипы растений в F_1 и расщепление по изучаемому признаку в F_2 и F_3 по каждой комбинации моносомика с дисомным родителем. Во всех комбинациях соотношение фенотипических классов по исследуемому признаку не будет достоверно отличаться от соотношения их в комбинации на дисомном уровне за исключением в комбинации с теми моносомиками, у которых отсутствует гомолог хромосомы, несущей интересуемый нас ген. Это так называемое «критическое скрещивание».

При проведении моносомного анализа может существовать две возможности: дисомный родитель несет рецессивный ген или гены, а моносомная серия соот-

ветственно доминантные; дисомный родитель имеет ген или гены в доминантном состоянии, моносомная серия – в рецессивном.

В первом случае, то есть когда дисомный родитель имеет рецессивный ген или гены, локализацию при помощи моносомиков можно провести по F_1, где они проявляются в потомстве тех моносомных линий, в которых несущая рецессивные гены хромосома находится в виде унивалента.

Правда, это возможно лишь в тех случаях, когда рецессивный аллель проявляется в унивалентной хромосоме (представлен в одной дозе), то есть в гемизиготном состоянии. Тогда в критических скрещиваниях в F_1 будет наблюдаться расщепление: растения с рецессивным признаком будут моносомные, растения с доминантными – дисомные, так как у них, в отличие от первых, будет присутствовать хромосома моносомной серии с доминантным геном.

Если же рецессивный ген в гемизиготном состоянии не активен, то локализацию гена в F_1 осуществить невозможно. Требуется изучение F_2.

Необходимость изучения второго поколения возникает и в том случае, когда доминантный родитель имеет изучаемый ген или гены в доминантном состоянии.

Как было сказано выше, в критических скрещиваниях, то есть в таких, где хромосома, несущая исследуемый ген, находится в унивалентном состоянии, наблюдается расщепление по сравнению с другими комбинациями (не критические скрещивания). В последних случаях хромосомы, несущие эти аллели, будут представлены в дисомном состоянии.

В критических скрещиваниях одной из причин нарушения соотношения фенотипов при расщеплении в F_2 будет различная конкурентная способность гамет с 20 и 21 хромосомами при самоопылении растений первого поколения. Это, в частности, может привести к резкому снижению числа растений с рецессивными признаками. Если дисомный родитель имеет доминантные аллели, то в F_2 рецессивные растения будут только нуллисомиками. Таким образом, доказательством локализации доминантного гена в определенной хромосоме может быть нетипичность соотношения в F_2 (мало число рецессивов) и то, что эти рецессивы являются нуллисомиками.

Существует теоретический расчет возможных соотношений в F_1 и F_2 в случаях различного взаимодействия генов (Kuspira, Unrau, 1959).

Необходимость изучения F_3 появляется в тех случаях, когда по какой-то причине не изучалось расщепление в F_2, а также не было возможности локализовать рецессивные аллели, не активные в гемизиготном состоянии. Для этого необходимо проанализировать расщепление в потомствах небольшого числа (не менее 4) дисомных растений F_2 каждой комбинации (Sears, 1953). Если эти потомства будут гомозиготны по изучаемым генам, то такая комбинация будет критической.

Проиллюстрируем использование анеуплоидных тестеров в генетическом эксперименте на примере локализации гена, контролирующего устойчивость к мучнистой росе интрогрессивной линии мягкой пшеницы ИЛ1 (Лебедева, 1982).

Как показал гибридологический анализ, невосприимчивость к популяции и к тест-клонам гриба *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal. растений ИЛ1 в фазе проростков контролируется доминантным геном. Растения моносомной серии Chinese Spring (21 линия) были восприимчивы к грибу на всех фазах онтогенеза.

Для моносомного анализа цитологически были выделены по 3–4 моносомные растения ($2n = 41$) каждой моносомной линии Chinese Spring, этикетированы и высажены в почву. Условия роста моносомных растений должны быть оптимальными для кущения, поэтому их высадили на хорошо удобренном выровненном по плодородию и механическому составу участке с соблюдением всех агротехнических требований; в течение вегетации подкармливали минеральными удобрениями и поливали. Это способствует развитию дополнительных генеративных побегов и некоторому удлинению периода вегетации. При изучении наследования устойчивости к болезням в условиях искусственного заражения расстояние между растениями должно создавать равновероятные условия для заражения всех растений исходных форм и гибридов.

Моносомные растения при скрещивании чаще используют в качестве материнского компонента, а тестируемый образец – как отцовскую форму. Для совпадения родителей по времени колошение-цветение отцовский компонент подгоняют по времени развития к сорту Chinese Spring: отцовский компонент по необхо-

димости яровизируют или сеют в несколько сроков, чтобы не было проблемы с опылителем.

Исходные родительские формы должны иметь признаки с четким проявлением и гомозиготны по изучаемым признакам. В скрещиваниях следует использовать конкретные растения. Весь процесс опыления с указанием конкретных скрещиваемых растений должен фиксироваться на изоляторе или этикетке, повешенной под колосом, и в специальном журнале.

Выделенные в нашем опыте моносомные растения серии Chinese Spring были опылены испытуемой устойчивой к болезни линии ИЛ1. Если моносомные растения Chinese Spring хорошо раскустились во время вегетации и после гибридизации остались не опыленные колосья, их изолировали для самоопыления с целью дальнейшего размножения.

Посев гибридов F_1 провели с соблюдением тех же условий, что и при посеве родительских компонентов, были созданы необходимые условия для получения оптимального количества семян с каждого растения. Также обеспечили строгое самоопыление растений F_1. Зерновки от самоопыленных моносомных по отдельным хромосомам растений не смешивают а сохраняют их индивидуальность в дальнейших экспериментах.

Анализ устойчивости к мучнистой росе гибридов F_1 выявил доминирование высокой устойчивости.

Следующий этап моносомного анализа – выделение моносомных растений среди гибридных популяций F_1 по каждой хромосоме. Выделенные таким образом F_1 гибридов от скрещивания моносомиков серии Chinese Spring (♀) с устойчивым дисомиком ИЛ1 (♂) выращивают в условиях, обеспечивающих высокую продуктивность растений и максимальное кущение. Мономные гибриды самоопылили и получили потомство для проведения фитопатологических экспериментов. На этом этапе работы также сохраняли индивидуальность растений.

Ранее нами было показано, что устойчивость к мучнистой росе ИЛ1 контролируется одним доминантным геном. Это было подтверждено анализом расщепления F_2 от скрещивания дисомных растений Chinese Spring с ИЛ1: из 518 про-

анализированных растений 387 были устойчивыми и 131 восприимчивыми, что достоверно не отличается от теоретического 3 : 1 ($\chi^2 = 0,02$) (табл. 3.3.4.).

Локализацию этого гена изучили на основании анализа расщеплений по устойчивости к мучнистой росе в потомстве моносомного растения F_1 по каждой хромосоме, сравнивая его с расщеплением в потомстве дисомного растения. При самоопылении растений F_1 в случае моногенного наследования ожидается F_2 соотношение устойчивых и восприимчивых классов статистически не отличающееся от 3 : 1. Соотношения, отличающиеся от теоретически ожидаемого 3 : 1, должны наблюдаться в потомстве растений F_1, моносомных по той хромосоме, в которой локализован ген устойчивости (то есть, по критической хромосоме).

Таблица 3.3.4. Расщепление по устойчивости к мучнистой росе в F_2 тестерных линий Chinese Spring с устойчивой линией ИЛ1 (инокулюм – изолят 28)

Растения F_1	Изучено растений	Соотношение фенотипов R : S	χ^2 (3 : 1)
Дисомные	518	387 : 131	0,02
Моносомные:			
1A	428	328 : 100	0,60
2A	168	122 : 46	0,47
3A	324	251 : 73	1,05
4A	69	57 : 12	2,11
5A	341	271 : 70	3,62
6A	340	250 : 90	0,38
7A	316	231 : 85	0,60
1B	161	117 : 44	0,46
2B	450	441 : 9	125,29*
3B	314	231 : 83	0,33
4B	372	281 : 91	0,05
5B	349	275 : 74	2,68
6B	862	636 : 226	0,68
7B	215	162 : 53	0,01
1D	214	158 : 56	0,20
2D	458	360 : 98	3,16
3D	164	130 : 34	1,58
4D	218	169 : 49	0,73
5D	321	240 : 81	0,01
6D	421	314 : 107	0,04
7D	381	297 : 84	1,76
Всего без 2B	6954	5267 : 1687	2,02

*недостоверно при P > 0,05

В нашем эксперименте расщепление F_2 моно-2В × ИЛ1 на устойчивые и восприимчивые растения не соответствовало теоретически ожидаемому 3 : 1. В этой комбинации из 450 проанализированных гибридных растений оказалось всего 9 пораженных на балл 3, остальные 441 растение тестированы как устойчивые (табл. 3.3.4.), то есть, по сравнению с теоретическим 3 : 1, в этой комбинации наблюдалось резкое уменьшение количества восприимчивых растений (χ^2 = 125,29). Такое значительное отклонение в сторону нехватки восприимчивых растений является показателем «критической хромосомы» при анализе доминантного гена (Kuspira, Unrau, 1959).

В табл. 3.3.5. представлены результаты расщепления по степени поражения грибом растений в потомствах F_1 6 моносомных растений критической комбинации моно-2В × ИЛ1. В данном случае в группу устойчивых растений входят дисомики (гомо- и гетерозиготы по гену устойчивости) и моносомики (гомозиготы по гену устойчивости). Группа восприимчивых растений представлена нуллисомиками, что соответствует теоретическим представлениям.

Как мы отмечали выше, при самоопылении моносомного растения образуется в среднем 24% дисомиков, 73% моносомиков и 3% нуллисомиков (Sears, 1953). По данным Сирса (Sears, 1954), частота возникновения нуллисомных растений в потомстве моносомиков по разным хромосомам колеблется от 0,9% до 7,6%. В частности, в потомстве от самоопыления моно-2В наблюдается в среднем 2,4% нуллисомных растений. В нашем эксперименте процент нуллисомиков (восприимчивых растений) был равен 2,0, что совпадает с данными Э. Р. Сирса.

Таблица 3.3.5. Расщепление в критической комбинации F_2 гибридов моно-2В × ИЛ1 по устойчивости к мучнистой росе

Моносомное растение F_1	Изучено растений F_2	Распределение растений по баллам поражения			
		0	1	2	3
1	129	93	26	10	0
2	106	68	25	9	4
3	56	33	11	11	1
4	51	31	14	6	0
5	42	22	15	4	1
6	66	26	26	11	3
Всего	450	273	117	51	9

Таким образом, мы сделали заключение о том, что ген, контролирующий устойчивость интрогрессивной линии ИЛ1 к мучнистой росе, локализован в хромосоме 2В.

В некоторых опытах наблюдается определенной отклонение от теоретического соотношения 3 : 1 в сторону увеличения восприимчивых растений (Родионова, 1977). Такое отклонение в некритических семьях может указывать на присутствие в хромосомах генов-модификаторов, повышающих устойчивость растений и тем самым понижающих число восприимчивых генотипов. Сложность определения критических скрещиваний может быть следствием смены унивалентов, особенно если исходный моносомик серии Chinese Spring или моносомное растение F_1 с нарушенной конфигурацией хромосом в метафазе 1 мейоза: 19" + 3', 18" + 5' и т. п. вместо 20" + 1', или встречаются слипания хромосом (McIntosh et al., 1965). Иногда фактическое соотношение классов с доминантными и рецессивными признакам в «критических» семьях не отличается от тех, которые наблюдаются в потомстве дисомных растений F_1. Причиной этого может быть выращивание цитологически идентифицированных моносомиков F_1 без изоляции и образования с небольшой частотой спонтанных гибридов. Поэтому контролируемое самоопыление моносомных растений необходимо.

Для того, что избежать случайностей, следует проводить гибридологический анализ потомств нескольких растений F_1.

В случаях, когда анализируемый признак контролируется двумя генами, локализованными в разных хромосомах, резкое уменьшение количества восприимчивых растений при анализе F_2 будет в двух «критических» семьях. Если эти гены сцеплены, будет одна «критическая» семья с резко уменьшенным количеством восприимчивых растений.

Телосомный анализ. Серия линий (монотелосомиков с 2n = 40 + t' и дителосомиков с 2n = 40 + t") с телосомными хромосомами создана на базе сортов пшеницы Chinese Spring, Giza 144, Диамант и Саратовская 29. Телосомные хромосомы можно использовать как тестерные признаки при определении локализации

генов в конкретном плече хромосомы. При этом методический подход аналогичен нуллисомному и нулли-тетрасомному анализам (Гончаров, 2002). С применением этих цитологических тестеров возможно определение расстояния между геном и центромерой на генетической карте (Sears, 1962; Driscoll, Sears, 1965), а также для анализа и идентификации реципрокных транслокаций.

В основе такого эксперимента лежит комбинирование в растениях F_1 нормальной хромосомы, несущей один доминантный или рецессивный аллель изучаемого гена и телосомной хромосомы с противоположным аллелем. Такая гетерозигота F_1 с гетероморфным бивалентом скрещивается в качестве отцовского компонента с линией, несущей нормальные (целые) хромосомы.

Межсортовое замещение хромосом. Линии с замещением отдельных хромосом в генотипе (например, восприимчивого к болезни сорта) соответствующими хромосомами устойчивого сорта можно получить в ряду последовательных беккроссов с участием анеуплоидов по определенным хромосомам (нуллисомиков, моносомиков, монотелосомиков или моноизосомиков). Такие анеуплоиды в качестве женского родителя скрещивают с донором устойчивости, в F_1 отбирают моносомные растения и беккроссируют 6–7 раз исходным анеуплоидом (Unrau et al., 1956; Цитогенетика пшеницы, 1971).

Однако трудность создания линий с межсортовым замещением хромосом заключается в необходимости предварительного создания моносомных и монотелосомных линий по сорту-реципиенту (Майстренко, 1973).

Ожидалось получить информацию о генетической детерминации селекционно ценных признаков путем анализа эффектов отдельных хромосом на одном постоянном генетическом фоне, так как в этом случае единицей наследственности служит не ген, а хромосома, что открывает благоприятные условия для изучения наследования количественных признаков (Майстренко и др., 1988).

Была надежда использовать эти знания для улучшения коммерческих сортов пшеницы путем введения в их генотип хромосом с нужными генами. В нескольких странах создан ряд серий замещенных линий на основе коммерческих сортов

пшеницы. Однако, по мнению Н.П. Гончарова (1992, 2002), информация о генетике как количественных, так и качественных признаков, полученная этим методом, должна рассматриваться только как предварительная и проверена другими методами генетического анализа, в том числе анеуплоидного анализа.

Чужеродные дополнения и замещения хромосом. Более перспективным направлением является создание и анализ линий с добавлением или замещением пары хромосом пшеницы чужеродными хромосомами. Этим путем удалось получить ценную информацию о локализации генов устойчивости к различным болезням в хромосомах видов – сородичей пшеницы, исследовать сравнительную генетику пшеницы и филогенетически близких видов, трансгрессировать селекционно ценные чужеродные гены устойчивости в генотипы коммерческих сортов.

Трисомный анализ. Трисомные растения (2n + 1) имеют лишнюю хромосому. С использованием такого типа анеуплоидов определяют, к какой хромосоме относится анализируемый ген с установлением критической хромосомы для того или иного признака. Идеология проведения и интерпретации трисомного анализа аналогична моносомному анализу.

Основные этапы трисомного анализа следующие.

1. Среди отдельных линий трисомной серии путем подсчета числа хромосом выделяют по 2-3 растений-трисомиков, 2n + 1, по каждой хромосоме.

2. Трисомик по каждой хромосоме в качестве маиеринской формы скрещивают с нормальным диплоидным сортом, несущим анализируемый признак.

3. В потомстве F_1 трисомика (дающий анеуплоидные гаметы) с диплоидным сортом цитологически выделяют гибридные трисомные растения.

4. Изучают потомства F_1 от скрещивания представителей трисомной серии с диплоидным сортом, несущим анализируемый признак. Если признак контролируется рецессивным геном, то в F_2 у всех гибридных потомств трисомиков, кроме критической, будет наблюдаться обычное расщепление 3 : 1. В скрещивании по критической хромосоме расщепление будет резко отличаться от теоретического 3

: 1, в котором класс рецессивных растений будет составлять меньше четверти. В последнем случае на соотношении альтернативных классов анализируемого признака влияет факт слабого функционирования или не функционирования пыльцевых зерен с лишней хромосомой (n + 1), и относительно жизнеспособных женских гаметах. Следуя логике (Захаров, 1979), скрещивания гомозиготной по рецессивной аллели формы с набором трисомиков дикого типа дадут нормальное (3 : 1) расщепление во всех случаях, кроме одного – когда у трисомика утроена именно та хромосома, в которой локализуется изучаемый ген. Ожидаемые типы гамет у трисомика генотипа Ааа – 1АА : 2Аа : 2А : 1а. Дисомные женские гаметы у растений образуются и функционируют более или менее нормально. Если бы также обстояло дело и с мужскими гаметами, то в F_2 наблюдалось бы расщепление по фенотипу в отношении 35А - : 1аа. Если же, как это обычно и имеет место у растений, мужские дисомные гаметы не прорастают либо оказываются неконкурентноспособными, то ожидается расщепление 17А - : 1аа.

Цитологическое обеспечение анеуплоидного анализа

Моносомный анализ представляет собой единство ряда генетических и цитологических методов. Приводимые ниже методики подсчета числа хромосом в метафазе митоза модифицированы и многократно апробированы в отделе генетики и отделе цитологии и анатомии ВИР. Порядок изложения методик соответствует последовательности в приготовлении временных препаратов из давленой меристематической и спорогенной ткани пшеницы.

Определение числа хромосом в меристеме корня пшеницы

Эффективные основные и широко распространенные способы анализа числа хромосом основаны на методах изготовления цитологических препаратов из давленой ткани. Такие препараты должны удовлетворять следующим требования:

- максимальное прокрашивание хромосом на фоне бесцветной цитоплазмы;

- хромосомный комплекс должен располагаться в одной плоскости, без наложения хромосом друг на друга;

- целостность клеточной оболочки, что исключает потерю хромосом;

- отсутствие артефактов (Немцева, 1970).

Ниже перечислены основные процессы приготовления давленых препаратов: подготовка анализируемого материала, его фиксация, мацерация, окрашивание и монтирование препаратов. Временные препараты при необходимости можно перевести в постоянные (Тарасенко, 1974; Ригин, Гуляева, 1976; Абрамова и др., 1981; Абрамова, 1986).

Проращивание зерновок. В лабораторных условиях зерновки раскладывают в чашки Петри на фильтровальную бумагу (2–3 слоя). В одну чашку помещают от 4 до 8 зерновок. К каждой зерновке кладут по две этикетки из плотной бумаги с одинаковыми номерами. В дальнейшем при фиксации одна этикетка помещается в склянку с корешками, другая остается около соответствующей зерновки до посадки в вазоны.

Проращивание зерновок производится при переменной температуре: 27ºС ночью (с 16 ч 30 мин до 9 ч) и 0–2ºС днем (с 9 ч до 16 ч 30 мин). Такой режим выдерживают в течение всего периода проращивания и фиксации. Через трое суток приблизительно у половины или трети зерновок корешки достигают размера 5–10 мм, а еще через сутки, как правило, все зерновки (кроме невсхожих) образуют корешки 8–12 мм. Прежде чем взять для анализа корешки, растения выращивают в мелко сеянной рыхлой почве в оптимальных для роста условиях температуры и влажности. Корешки берут через две – три недели после посева семян в благоприятных для роста условиях: лучше в утренние часы и не жаркую погоду.

Взятие корешков и их предфиксационная обработка. От корешков размером 8–12 мм (в крайнем случае, 15 мм) отрезают пинцетом кончик в 3–4 мм с зоной деления. Корешки от каждой зерновки помещают в отдельную склянку с раствором вещества, способного вызывать укорочение хромосом. В эту же склянку опускают этикетку с номером, который дан соответствующей зерновке. Корешки

для фиксации берут обычно утром с 9 до 10 ч. От каждой зерновки берут корешки 2–3 раза в разные дни.

В качестве веществ, способных вызывать укорочение и более редкое расположение хромосом на метафазной пластинке, чаще используют колхицин, α-монобромнафталин($C_{10}H_7Br$), эскулин, 8-оксихинолин и парадихлорбензол. Эти вещества изменяют физические свойства цитоплазмы и хромосом и нормальные свойства формирования веретена и этим самым способствуют укорочению хромосом, их разбрасыванию в плоскости клетки и накоплению метафаз в меристеме (Абрамова, 1986).

Колхицин блокирует митотические центры, подавляет развитие веретена и влияет на спирализация хромосом. Замечено, что после обработки колхицином значительно увеличивается число метафазных клеток. Концентрация колхицина для пшеницы – 0,1 %, время воздействия 5 ч при комнатной температуре.

Хорошая спирализация хромосом происходит под действием холода. С этой целью корешки пшеницы помещают в отдельный флакон с водой, закрывают пробкой, обкладывают снегом или льдом и ставят в холодильник при температуре тающего льда на 1–2 суток.

Фиксация. Задача этого этапа работы – быстро прервать жизнь растительного объекта без нарушения тонких структур его клеток и сделать его способным воспринимать краситель.

Материал после предфиксационной обработки промывают 96%-ным спиртом и перекладывают в фиксатор. Состав некоторых фиксаторов следующий (Абрамова, 1986).

1. Спирто-уксусный фиксатор (3 : 1): 96%-ный спирт – три части, ледяная уксусная кислота – одна часть.

2. Фиксатор Карнуа (6 : 3 : 1): 96%-ный спирт – шесть частей, хлороформ – три части, ледяная уксусная кислота – одна часть.

3. Фиксатор Баталья (5 : 1 : 1 : 1): 96%-ный спирт – шесть частей, формалин 40%-ный от продажного – одна часть, хлороформ – одна часть, ледяная уксусная кислота – одна часть.

4. Фиксатор Баталья (5 : 5 : 1 : 1): 96%-ный спирт – пять частей, хлороформ – пять частей, ледяная уксусная кислота – одна часть формалин 40%-ный от продажного – одна часть.

После фиксации производится промывка корешков (2–3 раза) в 70%-ном спирте, в котором их оставляют на хранение. Склянки плотно закрывают пробками. Существует несколько способов обработки фиксированного временно приготовленного материала для многолетнего его изучения (Абрамова, 1986). Более подробное описание фиксаторов и их использование можно найти в специальной литературе (Sharma, 1956; Абрамова и др., 1981).

Окрашивание можно производить по Фёльгину с использованием в качестве красителя реактив Шиффа с холодным и горячим гидролизом (Абрамова, 1986). Окрашивание по Фёльгину с холодным гидролизом состоит в следующем. Корешки из 70%-ного спирта помещают на 20 мин для промывки в 1N HCl (82,5 $см^3$ HCl с удельным весом 1,19 растворить в 1 л дистиллированной воды), после чего переносят для гидролиза в 50%-ную HCl (на 25–30 мин при комнатной температуре). Затем корешки переносят пинцетом в склянку с реактивом Шиффа не менее чем на 20–30 мин при комнатной температуре. Корешки могут находится в реактиве Шиффа 2–3 суток при температуре 0–2ºС (в холодильнике). У хорошо окрашенных корешков меристематическая часть темно-вишневого цвета.

Причины плохой окраски хромосом:

- недостаточное или излишнее время гидролиза;
- нарушение концентрации соляной кислоты в результате длительного ее использования;
- качество и температура реактива Шиффа; в момент погружения корешков и окраски (20–30 мин после погружения) реактив Шиффа должен иметь температуру не ниже 15–20ºС.

Реактив Шиффа готовится следующим образом (Абрамова, 1986). 0,5 г основного фуксина, используемого для приготовления фуксинсернистой кислоты, растворить в 90 мл кипящей дистиллированной воды (сначала засыпать в сосуд фуксин, а затем залить его водой). Раствор остудить до 50ºС и профильтровать в

посуду, в которой оставить на хранение. Лучше, если это будет узкогорлая бутыль или колба с притертой пробкой, равная по объему приготовленного раствора. Охлаждение до 50ºС необходимо для предупреждения улетучивания кислоты. В раствор добавляют 2 мл концентрированной кислоты.

Отдельно в 10 мл холодной дистиллированной воды растворить 2 г безводного Na_2SO_3 или 4 г кристаллического сульфита натрия ($Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$) или калия. Можно использовать безводный бисульфит натрия или калия ($NaHSO_3$ или $KHSO_3$) – 0,5 г или метабисульфит натрия или калия ($Na_2S_2O_5$ или $K_2S_2O_5$) – 1 г. Полученный раствор сульфита прилить в основной раствор, охлажденный после добавления соляной кислоты до 25ºС. Сосуд закрыть пробкой и поставить в холодильник для обесцвечивания и хранения. Хранить в темноте. Для улучшения качества красителя можно добавить 0,25 г активированного угля и тщательно встряхивать сосуд с жидкостью примерно в течение 1 мин. Затем быстро профильтровать через грубый бумажный фильтр. Через 24 ч фуксин превращается в бесцветную или желтоватую фуксинсернистую кислоту. Реактив должен издавать резкий запах сернистого газа. Появление розовой окраски говорит о непригодности его для использования.

Приготовление препаратов и подсчет числа хромосом. Для приготовления временных препаратов корешок (после фиксации) из реактива Шиффа переносят пинцетом на чистой предметное стекло, под которое кладется белая бумага для контрастного фона.

От окрашенной меристематической ткани корешка отрезают треть или четверть. Если взять полностью меристематическую часть корешка, то под покровным стеклом летки будут лежать плотным слоем, что затруднит работу. После этого наносят 2–3 капли 45%-ной уксусной кислоты для промывки отрезанной части корешка. Затем кислоту удаляют фильтровальной бумагой и наносят 1 каплю своей 45%-ной уксусной кислоты. После этого кончик корешка разрезают (глазным скальпелем, лезвием бритвы или препаровальной иглой) на мельчайшие части, которые на предметном стекле хорошо видны под ручной лупой. В капе кислоты препаровальной иглой материал равномерно распределяют и накрывают

покровным стеклом. Для лучшего дробления меристематической части корешка можно слегка постучать по покровному стеклу спичкой. Избыток кислоты удаляют фильтровальной бумагой.

Для поиска метафазных пластинок просмотр препаратов рекомендуется вести при малом увеличении (7 × 10 или 15 × 19). Сплошной охват препарата обеспечивается применением челночного способа при осмотре. Просмотр можно начинать с нижнего правого угла препарата, передвигать его по вертикали до верхней кромки покровного стекла, затем горизонтально на диаметр поля зрения, потом опять просматривать по вертикали до нижней кромки покровного стекла и т. д.

После нахождения метафазной пластинки необходимо рассмотреть ее при среднем увеличении (10 × 20 или 10 × 40). Для подсчета хромосом надо брать метафазные пластинки хорошего качества (протопласт должен быть целым, хромосомы хорошо окрашены и равномерно распределены по клетке). Такая пластинка почти сразу готова для подсчета хромосом. Если хромосомы распределены не совсем удачно, то можно частично исправить положение. Это достигается легким надавливанием или горизонтальным движением препаровальной иглы по покровному стлу, что может привести к более равномерному распределению хромосом. Такие манипуляции следует производить при малом увеличении (объектив × 10), при этом пластинку надо все время держать в центре поля зрения и следить, чтобы не произошло разрывов цитоплазмы и хромосом, отделения хромосом от пластинки и потери их. Метафазную пластинку надо стараться брать вдали от скоплений клеток, тогда пластинка и хромосомы в ней расправляются легче. Иглу нужно опускать на покровное стекло под углом; чем меньше давления необходимо произвести, тем меньшим должен быть этот угол.

После того, как пластинка и хромосомы в ней расправлены, следует произвести предварительный подсчет хромосом при среднем увеличении.

Окончательный подсчет хромосом в корешках моносомных растений с телоцентрической хромосомой, наличие или отсутствие последней нужно определить только при большом увеличении с масляной иммерсией (объективы ×90 или ×100). Заключение о числе хромосом одного растения основывается на их подсче-

те у 5–7 хороших метафазных пластинках на одном препарате, причем число хромосом в каждой из них должно быть одинаковым.

Наряду с изложенным, существуют и другие методы определения числа хромосом (Раджабли, Рудь, 1972; Паушева, 1970; Mettin, 1972; Waninge, 1965; Абрамова, 1986).

Исследование мейотических хромосом в микроспорогенезе злаков

Основные этапы изучения мейотических хромосом нами излагается согласно методическим указаниям сотрудников отдела цитологии и анатомии ВИР (Абрамова и др., 1981).

Фиксация. Материал следует фиксировать рано утром, до наступления жаркого периода суток. Растения выбирают в фазе выхода в трубку. Для определения нужной стадии мейоза следует освободить колос из трубки и извлечь пыльник из колоска середины колоса. Пыльник окрашивают, нагревая его 3–4 раза почти до кипения в капле ацетокармина на предметном стекле, раздавливают, предварительно накрыв его покровным стеклом, и просматривают. Обнаружив нужную стадию мейоза, в фиксирующую жидкость опускают весь колос или фиксируют только по 2–3 срединных колоска с каждой стороны колоса, аккуратно обламывая их пинцетом с уступов колосового стержня. Для более быстрого и успешного проникновения фиксирующей жидкости ости с верхними краями колосковых чешуй лучше всего срезать ножницами. Следует иметь в виду, что в колосках, сидящих выше или ниже срединной части колоса, пыльники несколько отстают по стадиям мейоза от пыльников срединных колосков.

Обычно материал фиксируют в смеси Карнуа (3 : 1) в течение нескольких (3–5) часов, затем переносят в 70%-ный спирт на сутки, после чего помещают в новую порцию 70º-ного спирта и оставляют в нем до момента исследования.

Лучший результат дает фиксация по Ньюкомеру, который состоит из следующих реактивов:

изопропилового спирта – 6 частей;

пропиловой кислоты – 3 части;

диоксана – 1 часть;

ацетона – 1 часть;

петролейного эфира – 1 часть.

В фиксаторе материал оставляют на сутки, после чего его заменяют новой порцией фиксатора и хранят в холодильнике при температуре + 2-4ºС до исследования. С фиксатором следует обращаться осторожно (диоксан – яд!), необходимо работать в резиновых перчатках и в вытяжном шкафу. Эти предосторожности необходимо соблюдать и при приготовлении фиксатора. Хранящийся в фиксаторе Ньюкомера материал годен для исследования только в течение 6–7 месяцев (при условии хранения его в холодильнике). Перенос зафиксированного материала в 70º-ный спирт удваивает срок его годности.

Окрашивание. При необходимости исследовать большое количество материала удобнее окрашивать пыльники ацетокармином. Препараты лучшего качества получаются на материале, зафиксированного по Ньюкомеру, так как при фиксации легче добиться равномерного уплощения протопласта клетки, а, следовательно, наилучшего распределения хромосомных конфигураций в метафазной пластинке.

Освобожденные от колосковых и цветочных чешуй зафиксированные пыльники помещают в фарфоровый тигель с несколькими каплями ацетокармина. Тигель нагревают последовательно 5–7 раз над спиртовкой, не доводя ацетокармин до кипения и полного испарения. Накрывают тигель часовым стеклом и оставляют в нем материал не менее чем на сутки при комнатной температуре. Окрашенный материал можно оставлять в тигле под часовым стеклом в течение двух недель, добавляя при частичном испарении несколько капель ацетокармина. Качество окраски при этом не ухудшается.

Для детального исследования конфигураций мейотических хромосом пыльники лучше окрашивать по Фёльгтну. Освобожденные от чешуй пыльники переносят из фиксатора в дистиллированную воду, затем их ополаскивают в 1-нормальной соляной кислоте и помещают в 50%-ную соляную кислоту (от продажной) на 20 мин для гидролиза. После этого пыльники помещают в реактив

Шиффа на 1–2 ч. Окрашенные хромосомы приобретают интенсивный фиолетовый цвет, а цитоплазма клетки остается бесцветной или с едва заметным розовым оттенком. Хромосомы кукурузы хорошо окрашивать только по Фёльгину.

Приготовление препарата. После окрашивания пыльников ацетокармином каждый из них промывают на предметном стекле последовательно в 2–3 каплях 45%-ой уксусной кислоты, оттягивая загрязненную осадком ацетокармина уксусную кислоту полоской фильтровальной бумаги. Окрашенный по Фёльгину пыльник сразу переносят в каплю 45%-ой уксусной кислоты на предметное стекло и выдавливают материнские клетки пыльцы из гнезд пыльника. Для этого, придерживая один конец пыльника пинцетом, отрезают лезвием безопасной бритвы другой его конец. Продолжая удерживать пыльник пинцетом, проводят тонкой упругой иглой в направлении от пинцета к отрезанному концу пыльника, выдавливая таким образом материнские клетки пыльцы. Чтобы распределить материнские клетки пыльцы равномерно, содержимое капли слегка размешивают иглой. Покрывают каплю покровным стеклом, на которое кладут полоску фильтровальной бумаги, и очень легко надавливают на него, не допуская скользящего движения покровного стекла по предметному. Просматривают препарат. При недостаточном уплощении клеток легкое надавливание на покровное стекло повторяют.

Для работы с временным препаратом в течение 1–2 дней можно окантовать покровное стекло расплавленным парафином. Следует тщательно удалить уксусную кислоту вокруг него фильтровальной бумагой, а затем, окунув конец шпателя в расплавленный парафин, легко провести им по граням покровного стекла. При работе с таким препаратом необходимо следить за сохранностью парафиновой окантовки. Можно изготовить постоянные препараты (Абрамова и др., 1981).

Все стадии мейотического деления в пыльниках проходят синхронно. Характер конъюгации хромосом и их число исследуют в метафазе 1 мейоза, хотя можно это сделать и на последней стадии профазы – в диакинезе. При правильном течении мейоза в гомологичных хромосомах родительских форм наблюдаются лишь биваленты. Наличие открытых бивалентов, унивалентных хромосом указывает на снижение степени гомологии или ее отсутствие.

Литература

Абрамова Л.И. Определение числа хромосом и описание их морфологии в меристеме и пыльцевых зернах культурных растений. Л.: ВИР, 1986. 61 с.

Абрамова Л.И., Орлова И.Н., Вишнякова М.А., Константинова Л.Н., Орел Л.И., Огородникова В.Ф. Методические указания по цитологической и цитоэмбриологической технике (для исследования культурных растений). Л.: ВИР, 1981. 119 с.

Гончаров Н.П. Генетический контроль опушения узлов стебля у некоторых сортов и гибридов мягкой пшеницы // Студент и научно-техничекский прогресс. Материалы X1X ВНСК. Биология. Новосибирск.1981. С. 10-14.

Гончаров Н.П. Локализация генов у мягкой пшеницы. Новосибирск. ИциГ СО РАН. 1992. 150 с.

Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск. Сибирское университетское издательство. 2002. 251 с.

Жученко А. А. Генетика томатов. Кишинев: Штиница. 1973. 661 с.

Захаров И. А. Генетические карты высших растений // Л.: Наука, 1979. 157 с.

Кириллова Г. А. , Лукьяненко А. Н. Генетика томата // Генетика культурных растений: Зернобобовые, овощные, бахчевые. Под. ред. Т.С. Фадеевой и В. И. Буренина. Л.: Агропромиздат. 1990. С. 164-214.

Лебедева Т. В. Локализация гена устойчивости к мучнистой росе интрогрессивной линии мягкой пшеницы ИЛ1 // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1982. Т. 71. Вып. 3 С. 48-53.

Майстренко О.И. Создание серий моносомных линий у мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и их использование в генетических исследованиях // Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. М.: Наука, 1971. С. 57-93.

Майстренко О.И. Состояние и задачи исследований по созданию новых серий анеуплоидов пшеницы // Цитогенетические исследования анеуплоидов мягкой пшеницы .Новосибирск. СО АНСССР. ИциГ. 1973. С. 9-27.

Майстренко О.И. Методы получения серий моносомных линий и межсортового замещения хромосом у мягкой пшеницы //Генетические методы в селекции растений. М.: Колос, 1974. С. 87-105.

Майстренко О.И., Лайкова Л.И., Храброва М.А. и др. Цикл работ: создание и использование наборов линий анеуплоидов для изучения генетического эффекта отдельных хромосом мягкой пшеницы (реферат) // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1988. Т. 20. вып. 3. С. 128-133.

Моррис Е.Р., Сирс Э.Р. Цитогенетика пшеницы и родственных форм // Пшеница и ее улучшение М.: Колос, 1970. С. 33-110.

Немцева Л.С. Метафазный метод учета перестроек хромосом (методическое руководство). М.: Наука, 1970. 128 с.

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат. 1988, 271 с.

Раджабли Е.П., Рудь В.Д. Получение и использование полиплоидных форм у растений. Новосибирск: Наука, 1972. 132 с.

Ригин Б.В., Гуляева З.Б. Использование анеуплоидов в генетике пшеницы. Моносомный анализ (методические указания). Л.: ВИР, 1976. 24 с.

Родионова Н.М. Методы анализа анеуплоидов и линий с замещенными хромосомами при изучении устойчивости мягкой пшеницы к ржавчине // Генетические основы устойчивости растений к болезням Л.: Колос, 1977. С. 191-211.

Смирнов В.Г., Абрамова Л.И., Кудрякова Н.В. Изменчивость признаков ржи // Генетика культурных растений. Зерновые культуры. Л.: Агропромиздат, 1986. С. 176-183.

Тарасенко Н.Д. Получение частично синхронизированных делений клеток у проростков растений // Генетические методы в селекции растений. М.: Колос, 1974. С. 195-197.

Уильямс У. Генетические основы и селекция растений. М.: Колос, 1968. 448 с.

Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. Под ред. П.М. Жуковского и В.В. Хвостовой. М: Наука, 1971. 287 с.

Belling J., Blakeslee A.F. The assortment of chromosomes in triploid Daturas // American Naturalist. 1922. V. 56. P. 339-346.

Blakeslee A.F. Distinction between primary and secondary chromosomall mutants in *Datura* // P. National Acad. Sci. 1924. V. 10. № 3. P. 109-116.

Blakeslee A.F. The species problem in *Datura* //Proceed. Intern. Congress of Genetic., Itaca. 1932. V. 1. P. 104-120.

Driscoll C.J., Sears E.R. Mapping of a wheat-rye translocations // Genetics. 1965. V. 51. P. 439-443.

Fujigaki J., Tsuchiya T. Establishment of a complete set of primery trisomics in an inbred rye line, *Secale cereale* L.//Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge, 1988. V.1. P. 271-274.

Kuspira J., Unrau J. Theoretical ratios and tables to facilitate genetic studies with aneuploids // Can. J. Genet. Cytol. 1959. № 1. P. 267-312.

Lesley J.W. Trisomic types of the tomato and their relation to the genes // Genetics. 1932. V. 13. P. 1-43.

McIntosh R.A., Baker E.P., Driscoll C.I. Cytogenetical studies in wheat. 1. Monosomic analysis of leaf rust resistance in the cultivars Ureguay and Transfer // Austral. J. Biol. Sci. 1965. V. 18. P. 971-977.

Melz G., Schlegel R., Sybenga J. Identification of the chromosomes in the “Esto” set of rye trisomics // Plant Breeding. 1988. V. 100. № 3. P. 169-172.

Mettin D. Untersuchungen über der Winter-Weizen “Poros” // Biob. Zbl. 1972. Bd. 91. H. 2. S. 193-208.

Sears E.R. Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. 1. Chromosomal aberration in the progeny of a haploid of *Triticum vulgare* // Genetics. 1939. V. 24. P. 509-523

Sears E.R. Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. 11. Additional chromosomal aberrations in *Triticum vulgare* // Genetics. 1944. V. 29. P. 232-246

Sears E.R. Nullisomic analysis common wheat //Amer. Nat. 1953. V. 87. P. 245-252.

Sears E.R. The aneuploids of common wheat // Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 1954. P. 572-659.

Sears E.R. The systematics, cytology and genetics of wheat // In: Handbuch der Pflanzenzüchtung. Bd 2. Hamburg. 1959. P. 164

Sears E.R. The use of telocentric chromosomes in linkage mapping. (Abstr.) // Genetics. 1962. V. 47. P. 983.

Sharma A.K. Fixation of plant chromosomes // Bot. Rev. 1956. V. 22. № 10. P. 665-695.

Tsujimoto H. Production of near-isogenic lines and marked monosomic lines in common wheat (*Triticum aestivum*) cv. Chinese Spring // J. Hered. 2001. V. 93. № 3. P. 254-259.

Tsunewaki K. The transmission of the monosomic candition in a wheat variety Chinese spring. 11. A critical analyse of mine year records // Jap. J. Genetics. 1964. V. 38. P. 270-281.

Unrau J., Person C., Kuspira J. Chromosome substitution in hexaploid wheat // Canad. J. Bot. 1956. V. 34. P. 629-640.

Waninge J. A modified method of counting chromosomes in root tip cells of wheat // Euphytica. 1965. V. 14. № 3. P. 249-250.

Worland A.J. Catalogue of monosomic series // Proceed. 7th Intern. Wheat Genet. Symp. Cambridge, 1988. V. 2. P. 1399-1403.

О.Ю. Антонова, Е.И. Гультяева

3.4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Методология молекулярных маркеров использует в основном такие свойства молекулы ДНК как способность к гибридизации по принципу комплементарности и возможность избирательного гидролиза ДНК ферментами рестрикции. Многообразные типы ДНК-маркеров можно разделить на 2 основные группы: полученные на основе гибридизации со специфичными пробами и полученные при помощи полимеразной цепной реакции. Число различных типов амплификационных маркеров все время возрастает, что связано с доступностью методов ПЦР.

Использование фрагментов ДНК в качестве маркеров для идентификации генов устойчивости возможно только в том случае, если размеры этих фрагментов у устойчивых и чувствительных форм отличаются друг от друга. Поэтому все технологии создания ДНК-маркеров направлены на выявление полиморфизма последовательностей ДНК.

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ или RFLP)

ПДРФ-маркеры основаны на работе рестриктаз – ферментов, обладающих эндонуклеазной активностью. Эти ферменты узнают на молекуле ДНК определенные участки их 4-6 нуклеотидов (сайты рестрикции), и затем расщепляют молекулу в самом сайте или непосредственно рядом с ним. Последовательность нуклеотидов сайта специфична для каждой рестриктазы, следовательно, специфичен и характер расщепления ДНК каждым таким ферментом. Гидролиз ДНК вызывает распад молекулы на рестрикционные фрагменты, число и размер которых зависят от частоты встречаемости сайтов в исследуемой последовательности ДНК.

Разделение полученных фрагментов осуществляют электрофорезом в агарозных гелях. При этом в геле формируется спектр фрагментов различной длины,

расположенных в порядке убывания их молекулярного веса. Каждая последовательность ДНК может быть охарактеризована по специфичному расположению компонентов этого спектра, т.е. по полиморфизму длин ее рестрикционных фрагментов.

Замены нуклеотидов в сайтах-мишенях (или их метилирование) приводят к неспособности фермента распознавать и атаковать измененные сайты. Это вызывает изменения спектра рестрикционных фрагментов, так как два соседних фрагмента оказываются слитыми в один, обладающий бóльшим молекулярным весом. Также причиной изменений размеров компонентов может быть вставка или делеция значительных участков ДНК между сайтами. Таким образом, изменение размеров рестрикционных фрагментов является отражением мутационных изменений в исследуемой последовательности ДНК. ПДРФ не дает информации о последовательности нуклеотидов какого-либо участка ДНК, но позволяет судить о степени дивергенции этого участка у разных организмов, в том числе у взятых в анализ родительских форм

Определение расположения фрагментов непосредственно в геле возможно только для организмов с небольшими геномами (вирусов, бактериофагов и клеточных органелл). Геномная ДНК эукариотических клеток содержит очень много сайтов для каждой рестриктазы, поэтому образующиеся фрагменты при электрофорезе сливаются. Для изучения ПДРФ у высших организмов необходимо сочетание рестрикционного анализа и метода блот - гибридизации. Блот - гибридизация позволяет включить в анализ лишь несколько фрагментов из всего пула рестриктов, выделив их по принципу комплементарности одной и той же последовательности-зонду. В качестве таковой может выступать как идентифицированная последовательность (индивидуальный ген или повторяющаяся ДНК), так и анонимный клон. Молекула зонда метится радиоактивными изотопами или флуоресцирующими красителями и гибридизуется с рестрикционными фрагментами, перенесенными и иммобилизованными на специальных мембранах. Картина распределения выявляемых таким образом фрагментов будет зависеть как от типа

рестриктазы, так и от последовательности и размеров применяемого зонда. Поэтому вероятность обнаружения различий между родительскими формами возрастает при испытании нескольких рестриктаз и нескольких проб-зондов разных размеров.

Таким образом, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов включает в себя следующие этапы:

❖ выделение геномной ДНК из исследуемых образцов;

❖ выделение плазмидной ДНК, содержащей последовательность зонда;

❖ расщепление геномной ДНК одной или несколькими рестриктазами;

❖ электрофоретическое разделение полученных рестрикционных фрагментов в агарозных гелях;

❖ перенос фрагментов из геля на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану;

❖ введение в молекулу зонда радиоактивной, флуоресцентной или иной метки;

❖ гибридизация меченого зонда с рестрикционными фрагментами, иммобилизованными на мембране;

❖ визуализация результатов путем авторадиографии (при использовании радиоактивного мечения), лазерной детекцией или путем окрашивания.

Амплификационные маркеры на основе метода полимеразной цепной реакции.

Полимеразная цепная реакция.

Полимеразная цепная реакция, или ПЦР – это осуществляемая в условиях *in vitro* специфическая амплификация участков нуклеиновых кислот, инициируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами. Цикл ПЦР состоит из следующих этапов:

❖ Тепловая денатурация ДНК (нагрев до 93–95□С). Под действием высокой температуры нити молекулы ДНК освобождаются друг от друга и становятся способны связывать праймеры.

❖ Отжиг ДНК с праймерами. При понижении температуры начинается ренатурация ДНК, при этом молекулы олигонуклеотидов прикрепляются к нитям ДНК по принципу компелементарности. Чаще всего используется пара праймеров, один из которых комплементарен прямой цепи ДНК, а другой – обратной. Их называют прямой и обратный праймеры (в англоязычной литературе F и R соответственно). Температура отжига может составлять от 29□C до 70□C, она специфична для каждой пары праймеров и зависит от их длины и нуклеотидного состава.

❖ Удлинение цепи (элонгация) осуществляется ферментом Taq-полимеразой, оптимум работы которого 72□C. Синтез второй цепи молекулы ДНК начинается со связанного праймера и идет в направлении 5’ □ 3’.Для успешного прохождения ПЦР необходимо, чтобы за время элонгации новая цепь достигла места связывания второго праймера и продолжилась дальше. Поэтому праймеры не могут располагаться слишком далеко друг от друга, и размер ПЦР-фрагментов редко превышает 4000 п.н..

Смена этапов происходит в результате простого изменения температур. Число копий нуклеотидных последовательностей растет экспоненциально, соответственно, через несколько циклов ПЦР будет воспроизводиться исключительно участок ДНК между местами связывания праймеров. По окончании реакции этот участок будет получен в препаративных количествах.

На основе метода ПЦР разработано большое количество разнообразных ДНК-маркеров, наиболее привлекательным качеством которых является быстрота и относительная дешевизна проводимых анализов.

1) RAPD-маркеры (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RAPD-маркеры, или случайно амплифицированные полиморфные участки ДНК, являются продуктом амплификации с короткими, чаще всего десятичленными, праймерами. Малый размер нуклеотидной последовательности увеличивает вероятность нахождения комплементарного ей участка в обеих нитях ДНК, поэтому один и тот же праймер используется и в качестве прямого, и в качестве об-

ратного праймера. RAPD- маркеры не связаны с определенными последовательностями генома, поэтому такой анализ не требует предварительной информации о структуре изучаемых последовательностей. Проведение RAPD-анализа осуществляется в 3 этапа:

- ❖ выделение ДНК из исследуемых образцов;
- ❖ амплификация ДНК при помощи случайного праймера размером 8–10 п.н.;
- ❖ электрофоретическое разделение полученных фрагментов

Преимуществом данного типа маркеров является простота выполнения анализа и дешевизна праймеров (цена синтеза олигонуклеотидов зависит от их длины). Однако этот метод имеет значительные недостатки, прежде всего плохую воспроизводимость результатов, которая объясняется низкой специфичностью связывания праймеров. Кроме того, RAPD-анализ не позволяет различать гомо- и гетерозиготы, и при анализе расщеплений наблюдаются не все классы генотипов. Поэтому в настоящее время на смену RAPD-маркерам приходят другие типы маркеров, в частности, SCAR-маркеры, разработанные на основе информации о последовательностях фрагментов, амплифицированных со случайными праймерами.

2) Микросателлитные или SSR- маркеры (Simple Sequence Repeat).

Микросателлитные или SSR последовательности — это участки генома, состоящие из очень коротких (2–6 пар нуклеотидов) тандемно повторяющихся последовательностей. Встречаются и повторы, состоящие из одного нуклеотида, например, $(T)_n$. Количество единиц внутри повторяющегося участка сильно варьирует на уровне популяций, сортов и даже отдельных особей одного вида, поэтому вероятность обнаружения полиморфизма родительских форм весьма значительна. Для амплификации микросателлитных локусов последовательности праймеров выбирают не в самом тандемном повторе, а во фланкирующих его уникальных участках. Протяженность таких праймеров должна быть достаточно высока (20 – 25 п.н.), что снижает риск неспецифического связывания и обеспечивает высокую воспроизводимость результатов.

Преимуществом данного типа маркеров является высокий уровень регистрируемого полиморфизма, хорошая воспроизводимость результатов и техническая простота экспериментов. Многие микросателлиты ассоциированы с конкретными генами, или картированы на хромосомах, что облегчает подбор праймеров для картирования определенных областей генома.

Анализ состоит из 3 этапов:

❖ выделение ДНК из исследуемых образцов,

❖ амплификация ДНК при помощи пары микросателлитных праймеров,

❖ электрофоретическое разделение полученных фрагментов. Этот этап выявляет главный недостаток SSR- маркеров: очень часто различия между аллелями составляют несколько нуклеотидов, поэтому для разделения фрагментов требуется применение трудоемких полиакриламидных гелей.

3) ISSR – маркеры (Inter-Simple-Sequence-Repeats).

Данные маркеры также регистрируют полиморфизм микросателлитных локусов, однако праймеры выбирают не во фланкирующих районах, а внутри самой микросателлитной последовательности, точнее на границе уникального участка и микросателлитного повтора. Такие праймеры содержат несколько нуклеотидов (обычно два) из фланкирующего уникального участка и несколько повторяющихся нуклеотидов. Наличие небольшого уникального участка не дает праймеру возможности располагаться в любом месте микросателлитного повтора и обеспечивает его однозначное позиционирование на последовательности точность связывания.

При работе с ISSR маркерами можно использовать агарозные гели, что значительно упрощает и удешевляет анализ..

Анализ состоит из 3 этапов:

❖ выделение ДНК из исследуемых образцов,

❖ амплификация ДНК при помощи пары микросателлитных праймеров,

электрофоретическое разделение полученных фрагментов

4) STS-маркеры (Sequence Tagged Site)

Данный метод является дальнейшим развитием ПДРФ- и AFLP- анализов. После определения положения этих маркеров на хромосомах картированные фрагменты часто секвенируют. Знание полной нуклеотидной последовательности фрагмента дает возможность разработки специфичных праймеров, что, в свою очередь, позволяет выявлять данный фрагмент не трудоемким методом блот-гибридизации, а просто при помощи ПЦР. При этом для образующихся фрагментов уже известна их хромосомная локализация.

Анализ крайне прост и состоит из следующих этапов:

- ❖ выделение ДНК из исследуемых образцов,
- ❖ амплификация ДНК при помощи пары специфичных праймеров,
- ❖ электрофоретическое разделение полученных фрагментов.

5) SCAR- маркеры (Sequence-Characterized Amplified Regions)

Эти маркеры разрабатывают на основе полиморфных фрагментов, обнаруживаемых при RAPD-анализе. Последовательность таких фрагментов определяют путем секвенирования и затем разрабатывают комплементарные специфичные праймеры.

Анализ состоит из тех же самых этапов:

- ❖ выделение ДНК из исследуемых образцов,
- ❖ амплификация ДНК при помощи пары специфичных праймеров,
- ❖ электрофоретическое разделение полученных фрагментов.

6) CAPS- маркеры (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Данный тип маркеров основан на сочетании методов амплификации и рестрикции. В том случае, если при использовании STS- или SCAR- маркеров размер амплифицированных фрагментов у родительских форм оказался одинаков, существует вероятность обнаружить полиморфизм путем обработки этих фрагментов рестриктазами. Поэтому анализ состоит из 4 этапов:

- ❖ выделение ДНК из исследуемых образцов,
- ❖ амплификация ДНК при помощи пары специфичных праймеров,
- ❖ расщепление образующихся продуктов ПЦР одной или несколькими рестриктазами,
- ❖ электрофоретическое разделение полученных фрагментов.

В принципе, рестриктазы можно подобрать экспериментальным путем. Однако чаще всего создание CAPS-маркеров проводят на основе уже клонированных и секвенированных участков ДНК с известной хромосомной локализацией. Поэтому сайты для различных рестриктаз определяют путем анализа уже известной последовательности ДНК при помощи специальных программ (например, Primer3).

7) AFLP-маркеры (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Данный подход по сути противоположен предыдущему. Если при CAPS-анализе ДНК сначала амплифицируют, а потом подвергают рестрикции, то AFLP-маркеры связаны с амплификацией фрагментов рестрикции, т.е. ДНК сначала обрабатывают рестриктазами, а затем амплифицируют. Праймеры для AFLP-анализа содержат участки, гомологичные рестрикционным сайтам.

AFLP-маркеры крайне полиморфны. При использовании одной пары праймеров на геле можно обнаружить несколько десятков различных фрагментов. Выявить аллельные варианты среди такого количества полос удается крайне редко. Поэтому при до AFLP- анализе в основном регистрируется наличие или отсутствие каждого компонента, то есть они, по сути, являются доминантными, как и RAPD-маркеры. Однако AFLP-маркеры все-таки позволяют отличать доминантные гомозиготы от гетерозигот по интенсивности компонентов спектра: в случае гомозигот наличие двух доминантных аллелей обеспечивает сигнал большей интенсивности по сравнению с гетерозиготами (имеющими одну дозу данного аллеля).

Преимуществом метода AFLP является высокая степень регистрируемого полиморфизма. Кроме того, для картирования при помощи этого метода не требу-

ется предварительной информации о нуклеотидных последовательностях изучаемых локусов. Крупным недостатком AFLP- анализа является его сложность и дороговизна. Для проведения анализа требуется электрофорез в денатурирующих акриламидных гелях большой длины.

Анализ проводится в 6 этапов:

❖ выделение ДНК из исследуемых образцов;

❖ рестрикция ДНК двумя рестриктазами: одной крупнощепящей и одной мелкощепящей;

❖ лигирование полученных фрагментов с адапторами;

❖ амплификация ДНК. AFLP- праймеры содержат участки, комплементарные сайтам рестрикции и адапторам. Кроме того, на 3'конце праймеры содержат дополнительные 1-4 нуклеотида, что уменьшает общее число фрагментов при амплификации;

❖ электрофоретическое разделение полученных фрагментов в денатурирующем полиакриламидном геле. Такой гель обладает высокой разрешающей способностью

❖ визуализация результатов может производиться различными путями: окраской фрагментов серебром, лазерной детекции, авторадиографией. Для проведения лазерной детекции и авторадиографии праймеры должны содержать флуоресцентную или радиоактивную метку.

Существуют и другие типы молекулярных маркеров: детектирующие замены одного нуклеотида SNP-маркеры (Single Nucleotide Polymorphism), маркеры dCAPS (derived CAPS), выявляющие единичные замены в сайтах рестрикции, semi-RAPD-маркеры, у которых случайные праймеры содержат также несколько нуклеотидов, комплементарных экзоно-интронным границам.

В данном руководстве приводятся методы, позволяющие работать с наименее трудоемкими и не требующими дорогостоящего оборудования ISSR, SCAR, STS CAPS маркерами.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНИТИФИКАЦИИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ ПШЕНИЦЫ

К настоящему времени идентифицировано свыше 50 генов устойчивости к бурой ржавчине (*Lr*-гены), некоторые из которых широко распространены в сортах пшеницы. Известно, что генетическая однородность возделываемых сортов ускоряет отбор патогена по генам вирулентности. Так, широкое возделывание в Северной Америке сортов, защищенных высоко эффективными генами *Lr*9 и *Lr*24, привело к быстрому появлению вирулентных рас (McIntosh et al., 1995). Аналогичная ситуация произошла в России, в Поволжье, с сортами, несущими ген *Lr*19. Причиной этого послужило распространение в производстве сортов яровой мягкой пшеницы, имеющих ген *Lr*19 – Л503, Добрыня (Маркелова, 2007).

До недавнего времени традиционными методами идентификации генов устойчивости являлись гибридологический анализ и фитопатологический тест. В начале 90-х годов XX века данные методы были дополнены молекулярными. Для идентификации ряда генов устойчивости и их картирования использовали RFLP и RAPD – маркеры. Для удобства в практическом использовании RFLP и RAPD - маркеры, сцепленные с генами устойчивости, были конвертированы в специфичные STS, CAPS, SCAR - маркеры (табл. 3.4.1.) (Chelkowski J., Stepien L., 2001).

Первый STS-маркер создан Schachermayr и соавторами (1994) для идентификации гена *Lr*9, переданного мягкой пшенице от *Aegilops umbellulata* (Sears, 1956). Молекулярный маркер гена *Lr*9 разработан на основе RAPD-фрагмента почти изогенных линий, несущих ген *Lr*9: при проведении ПЦР с разработанными на основе последовательности этого фрагмента праймерами у образцов пшеницы, имеющих ген *Lr*9, обнаруживается фрагмент амплификации размером 1100 п.о. (рис. 3.4.1.). Маркер находится на расстоянии около 8сМ от гена (Schachermayr et al., 1994). Высокая специфичность этого маркера при идентификации гена *Lr*9 у широкого набора сортов показана многими исследователями (Schachermayr et al., 1994; Blaszczyk L., et al., 2004; Тырышкин и др., 2006; Урбанович и др., 2006).

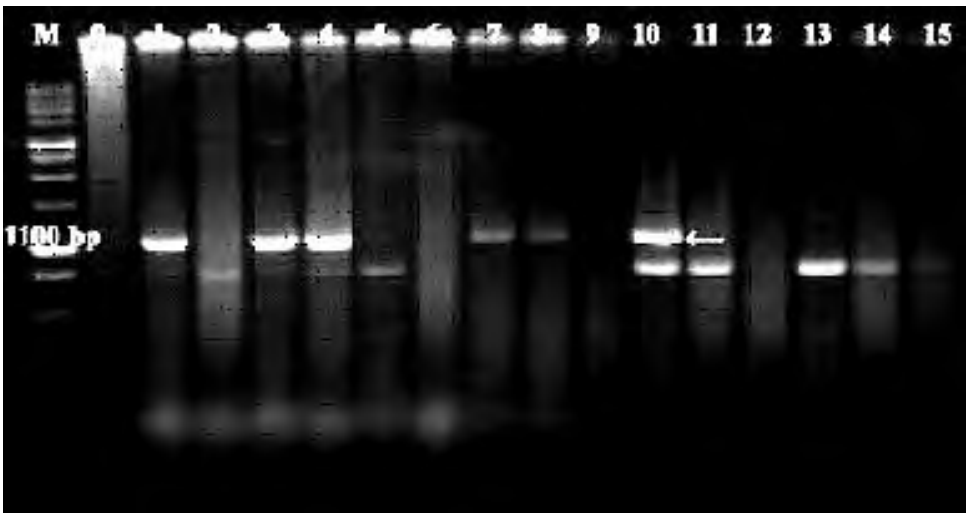


Рис. 3.4.1. Использование STS-маркера J13 для идентификации гена *Lr*9 у сортов пшеницы:

М – маркер, 1Kb, 0 – нулевая проба (без ДНК), 1 – Удача, 2 – Тулайковская золотистая, 3 – Челяба 2, 4 – Памяти Рюба, 5 – Ершовская 33, 6 – Фаворит, 7 – Сплав, 8 – Немчиновская 24, 9 – Лавина, 10–15 – линии серии Thatcher с генами устойчивости *Lr*9, *Lr*19, *Lr*24, *Lr*25, *Lr*29, *Lr*41 соответственно.

STS, SCAR и CAPS-маркеры генов *Lr*9, *Lr*10, *Lr*19, *Lr*24, *Lr*26 и *Lr*37 широко применяют для идентификации этих генов в ряде европейских стран (Slikova et al., 2004; Blaszczyk et al., 2004; Landjeva et al., 2006).

Мы изучили несколько STS-маркеров для идентификации *Lr*-генов у сортов пшеницы. С помощью трех пар праймеров J13, Gb и J9, специфичных к сайтам ДНК – маркерам эффективных генов устойчивости пшеницы *Lr*9, *Lrl9*, провели скрининг образцов *T. aestivum,* имеющих по результатам гибридологического анализа и/или фитопатологического геста гены *Lr*9, *Lr*19 либо *Lr*24 (Тырышкин и др., 2006). Специфические продукты амплификации обнаружили у всех образцов, для которых предполагали наличие гена *Lr*9, у 9 из 10 образцов, защищенных геном *Lr*19, и у 13 из 30 образцов, выделенных как имеющие ген *Lr*24. Таким образом, значительные расхождения результатов молекулярного анализа и фитопатологического теста были выявлены только для гена *Lr*24. Ген *Lr*24 передан в геном мягкой пшеницы от *Agropyron elongatum* двумя путями: естественной транслокацией в межвидовом гибриде (Smith et al., 1968) и индукцией гомеологического спаривания (Sears, 1973). В первом случае был транслоцирован более длинный

Таблица 3.4.1. Маркеры генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине

Lr-ген	Источник гена	Маркеры	Локализация	Литературный источник
1	2	3	4	5
*Lr*1	*Triticum aestivum*	RFLP, STS	5DL	Feuillet et al., 1995
		SNP		Turka et al, 2004
*Lr*3	*T. aestivum*	RFLP	6BL	Parker et al., 1998
		ISSR		Khan et al., 2005
*Lr*9	*Aegilops umbellulata*	RAPD, STS	6BL	Schachermayr et al., 1994
		RAPD-SCAR		Gupta et al., 2005
		RFLP		Autrique et al., 1995
*Lr*10	*T. aestivum*	RFLP, STS	1 AS	Schachermayr et al., 1997
*Lr*13	*T. aestivum*	RFLP	2 BS	Seyfarth et al., 1998
		SSR		Seyfarth et al., 2000
*Lr*16	*T. aestivum*	SSR	2 BS	McCartney et al., 2005
*Lr*18	*T. timopheevii*	N-band	5BL	Yamamori, 1994
*Lr*19	*Agropyron elongatum*	RFLP	7DL	Autrique et al., 1995
		Isozyme		Winzeler et al., 1995
		AFLP, STS		Prins et al., 2001
		SCAR		Cherukuri et al., 2003
*Lr*20	*T. aestivum*	RFLP	5 AL	Parker et al., 1998
		RAPD, STS		New et al., 2002
*Lr*21	*Ae. tauschii*	RFLP, PCR-based marker	1DL	Huang, Gill, 2001
		STS		Fritz A. http://maswheat.ucdavis.edu/
*Lr*23	*T. turgidum*	RFLP	2BS	Nelson et al., 1997
*Lr*24	*A. elongatum*	RFLP	3DL	Autrique et al., 1995
		RAPD, STS		Schachermayr et al., 1995
		RAPD, SCAR		Dedryver et al., 1996
*Lr*25	*Secale cereale*	RAPD SCAR	4BL	Procunier et al., 1995 Procunier J.D. http://maswheat.ucdavis.edu/
*Lr*26	*Secale cereale*	RFLP, RGA, AFLP, SCAR	1BL/1Rs trans.	Mago et al., 2002
		STS		Mohler et al., 2001
*Lr*27	*T. aestivum*	RFLP	3BS	Nelson et al., 1997
*Lr*28	*Ae. speltoides*	RAPD, STS	4 AL	Naik et al., 1998
		RAPD, TPSCAR		Cherukuri et al., 2005
*Lr*29	*Ag. elongatum*	RAPD, SCAR	7DS	Procunier et al., 1995
*Lr*31	-	RFLP	4BL	Nelson et al., 1997

1	2	3	4	5
*Lr*32	*Ae. tauschii*	RFLP	3DS	Autrique et al., 1995
		RAPD		Prabhu et al., 2003
*Lr*34	*T. aestivum*	RFLP	7DS	Nelson et al., 1997
		RFLP, SSR		Suenaga et al., 2003
		SSR		Schnurbusch et al., 2004
*Lr*35	*A. speltoides*.	RFLP, STS	2B	Seyfarth et al., 1999
*Lr*37	*A. ventricosa*	RAPD, SCAR	2AS	Robert et al., 1999
		CAPS		Helguera et al., 2003 http://maswheat.ucdavis.edu/
		STS, SCAR ^{Pst1}AFLP, SCAR		Blaszczyk et al., 2004 ; Blaszczyk et al., 2005
*Lr*39	*Ae. tauschii*	SSR	2DS	Raupp et al., 2001 Brown-Guedira, Singh: http://maswheat.ucdavis.edu/
*Lr*46	*T. aestivum*	AFLP	1BL	William et al., 2003
		SSR		Suenaga et al., 2003 http://maswheat.ucdavis.edu/
*Lr*47	*A. speltoides*.	CAPS	7AS	Helguera et al, 2000
		RFLP, PCR-specific primers for the *T. speltoides* S genome allele of *Xabc465* Alternative codominant PCR marker		Dubcovsky et al., 1998 http://maswheat.ucdavis.edu/
*Lr*50	*T. timopheevii ssp. armeniacum*	SSR	2BL	Brown-Guedira et al., 2003 http://maswheat.ucdavis.edu/
*Lr*51	*A. speltoides*.	CAPS	1BL	Helguera et al.2005 http://maswheat.ucdavis.edu/
QTL	*T. aestivum*	RAPD, RFLP	7BL, 1BS, 1DS	William et al., 1997

фрагмент хромосомы (Sears, 1973). По данным Schachermayr et al. (1994), J09 является маркером гена устойчивости, локализованного в транслокации первого типа, и, соответственно, образцы, выделенные с использованием данного маркера, также относятся к этой группе.

В настоящее времени описаны молекулярные маркеры для 27 генов устойчивости к бурой ржавчине (табл. 3.4.1.), однако эффективность большинства из них

ограничена из-за низкой специфичности. Интерес для практического использования представляют маркеры генов устойчивости взрослых растений, трудные для идентификации традиционными методами, а также маркеры эффективных генов, идентификация которых с помощью тест-клонов пока невозможна из-за отсутствия в популяции вирулентных клонов.

ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ДНК ЗЛАКОВ

Существующие методы выделения позволяют получать как суммарную ДНК клетки, так и ДНК из субклеточных фракций: ядер, митохондрий и пластид. При использовании специфических ядерных зондов и праймеров, которые не имеют гомологии с последовательностями геномов органелл, наличие в препаратах примесей хлоропластной и митохондриальной ДНК не сказывается на результатах блот – гибридизации и ПЦР. Поэтому для работы с ядерными маркерами достаточно выделять тотальную ДНК клетки. Понизить количество примесей хл- и мтДНК в получаемых препаратах позволяет использование этиолированного растительного материала, а также быстрое формирование осадка нуклеиновых кислот (см. далее). Для выделения ДНК используют различные органы взрослых растений, а также зародыши, проростки и ткани каллуса. Выбор метода зависит от задач, стоящих перед экспериментатором, и, в определенной степени, от количества материала (выделение ДНК из зародышей и проростков требует большого количества семян).

При подборе метода выделения ДНК нужно руководствоваться несколькими критериями. Важнейшим из них является степень очистки ДНК – она должна быть достаточной для нормальной работы рестриктаз и Taq-полимеразы. Все эти ферменты чувствительны к примесям белков, пигментов и полисахаридов. Наличие в препаратах значительного количества РНК для блот-гибридизации нежелательно, а для проведения ПЦР у большинства культур не имеет особенного значения. Очистку препаратов лучше свести к разумному минимуму, поскольку каждый ее этап уменьшает выход и снижает молекулярный вес получаемой ДНК. При

выделении очень важно сохранить полимерность молекул ДНК, которые чувствительны к гидравлическим ударам и могут повреждаться нуклеазами. Поэтому используют стерильные пробирки, наконечники и растворы, а все операции проводят только в резиновых перчатках. Для работы с растворами ДНК используют обрезанные наконечники пипеток. Перенося раствор ДНК в пробирку, нужно давать ему стекать по стенке, набирать растворы в пипетку также нужно достаточно медленно. Высокая полимерность молекул ДНК особенно важна для проведения RFLP-анализа, т.к. использование деградированной низкомолекулярной ДНК в блот–гибридизации может привести к появлению артефактов. Считается нормальным, если фрагменты выделяемой ДНК сравнимы по величине с геномом фага □.

Препараты ДНК, выделенные по любой методике, в принципе, годятся и для блот-гибридизации, и для амплификации, то есть одну и ту же пробу ДНК можно использовать для получения всех типов ДНК-маркеров. Однако в случае блот-гибридизации на один анализ требуется в 50-100 раз больше ДНК, чем для проведения ПЦР. Поэтому при работе с RFLP-маркерами выделение ДНК должно проводиться в препаративных количествах из большого количества растительного материала (примерно 5 – 20 г листовой ткани). Для других типов маркеров достаточно микроколичеств растительного материала (0,1 – 0,5 г).

Рассмотрим несколько методов, позволяющих получать препараты ДНК хорошего качества как из больших, так и из малых количеств растительного материала.

1) Выделение геномной ДНК при помощи CTAB (Лихтенштейн, Дрейпер, 1988).

Метод основан на способности нуклеиновых кислот образовывать растворимые комплексы с детергентом CTAB (цетилтриэтилбромид аммония) в условиях высокой концентрации соли. Снижение концентрации соли вызывает преципитацию этих комплексов. При этом ДНК очищается от пигментов и полисахаридов, остающихся в растворе. Удаление РНК производится при помощи обработки препаратов РНКазами.

Исходно метод разработан для лиофилизированного (т.е. высушенного в замороженном состоянии) растительного материала. Использование такого материала позволяет проводить выделение ДНК в любое время, вне зависимости от выращивания образцов. Кроме того, негидратированная ДНК меньше повреждается при растирании и практически недоступна для нуклеолитических ферментов.

Метод можно применять и для выделения из свежих тканей. В этом случае используется двукратный буфер, то есть предполагается, что добавление жидкости из тканей растения превратит буфер в однократный и создаст нужные концентрации солей. К сожалению, часто содержание воды в свежем материале оказывается или слишком велико, или недостаточно. В первом случае комплекс CTAB-ДНК выпадает в осадок преждевременно и при обработке хлороформом оказывается в составе интерфазы. Во втором случае концентрация соли оказывается слишком велика, и осадка ДНК-CTAB не образуется. Поэтому при выделении ДНК из свежего материала использующие CTAB методики не всегда дают стабильные результаты.

Оборудование: общее лабораторное оборудование, центрифуга с бакет-ротором (частота вращения до 4000 об/мин), автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл, фарфоровые ступки и пестики.

Реактивы: трис, соляная кислота, хлорид натрия, ацетат натрия, ЭДТА, CTAB, □-меркаптоэтанол, 96 % -ный этанол, окись алюминия или жидкий азот.

Приготовление растворов:

I) **Экстракционный буфер** (50 мМ трис - HCl , pH 8,0; 0,7 М NaC1; 10 мМ ЭДТА; I % CTAB (по весу); I % □-меркаптоэтанол (по объему) – объем 200 мл:

I М трис - HCl , pH 8,0	10 мл,
5 М NaC1	28 мл,
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	4 мл,
CTAB	2 г,
b-меркаптоэтанол	2 мл
	H_2Oдо 200 мл.

Соедините все компоненты буфера, кроме меркаптоэтанола, прогрейте его на водяной бане до растворения CTAB и простерилизуйте автоклавированием. Охладите до комнатной температуры и затем добавьте необходимое количество меркаптоэтанола.

2) **10 % -ный раствор CTAB** в 0,7 M NaCl – объем 25 мл:

CTAB	2,5 г,
5 M NaCl	3,5 мл
	H_2O до 25 мл

3) **Буфер для осаждения** (50 мМ трис - HCl, pH 8,0; 10 мМ ЭДТА; 1% (по весу) CTAB) – объем 50 мл:

I M трис - HC1 , pH 8,0	2,5 мл,
0,5 M ЭДТА, pH 8,0	I мл,
CTAB	0,5 г
	H_2O до 50 мл

Соедините все компоненты буфера, прогрейте его на водяной бане до растворения CTAB и простерилизуйте автоклавированием.

4) **Смесь хлороформ:изоамиловый** спирт (24:1) – объем 500 мл:

Изоамиловый спирт 20 мл
Хлороформ 480 мл

Смесь стабильна при комнатной температуре в течение длительного времени. Ее нужно хранить в вытяжном шкафу при комнатной температуре в плотно закрытой посуде с темными стенками.

5) **70%-ный этанол** – объем 500 мл:
365 мл 96%-ного этанола доведите водой до объема 500 мл.

6) **70%-ный этанол с 0,2 М ацетатом натрия** – объем 500 мл:

96 % этанол	365 мл
3 M ацетат натрия, pH 5,2	33,3 мл
	H_2O до 500 мл

1 вариант – Выделение ДНК в препаративных количествах из лиофилизированного материала.

Лиофилизация материала: Срезанные листья или проростки промойте в 70 % -ном этаноле, затем ополосните дистиллированной водой и обсушите фильтровальной бумагой. Поместите растительный материал в жидкий азот. Разбив пестиком крупные куски, быстро разотрите ткань в мелкий порошок. Фарфоровой лопаточкой перенесите порошок в термостойкие стеклянные бюксы с жидким азотом. Не допуская оттаивания порошка, закройте бюксы тремя слоями капрона и поместите их в лиофилизатор до полного высыхания ткани (от 24 до 48 часов). После лиофилизации бюксы, закрытые крышками, хранят при низкой температуре в эксикаторах в присутствии влагоотнимающего вещества, например, хлорида кальция.

Ход работы:

- Поместите I г лиофилизированного материала в небольшую фарфоровую ступку. Добавьте 4 г окиси алюминия, разотрите в очень тонкий порошок. Вместо окиси алюминия можно использовать жидкий азот, однако выход ДНК при этом будет более низким. Перенесите порошок в полипропиленовую центрифужную пробирку объемом 50 мл, содержащую 15 мл экстракционного буфера комнатной температуры.
- Перемешайте стеклянной палочкой до гомогенного состояния. Пробирку плотно закройте и инкубируйте на водяной бане при 65□С в течение 20 минут. Время от времени покачивайте пробирку, перемешивая содержимое, и приоткрывайте крышку, чтобы сбросить избыточное давление.
- Охладите смесь до комнатной температуры. Следите за тем, чтобы температура не опустилась ниже 15□С, так как CTAB может выпасть в осадок. Добавьте к буферу равный объем смеси хлороформ/ изоамиловый спирт (24:I) . Перемешивайте в течение 20 минут, наклоняя пробирку так, чтобы водная и органическая фазы образовывали однородную эмульсию. При этом происходит денатурация белков под действием хлороформа. Перемешивание нужно проводить

ритмично, избегая резких и энергичных движений, т.к. молекулы ДНК разрушаются под действием гидродинамических ударов.

- Разделите водную и органическую фазу центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 10 минут при температуре 20□С. При этом клеточные обломки осядут на дно, а денатурированные белки расположатся на границе двух фаз, образуя так называемую интерфазу.
- Используя автоматическую пипетку, перенесите верхнюю водную фазу в чистую центрифужную пробирку (у съемного наконечника пипетки предварительно отрежьте ножницами кончик). Следите за тем, чтобы не захватить частиц интерфазы.
- Добавьте 1/10 объема 10 % -ного раствора CTAB в 0,7 M NaCl и затем 15 мл смеси хлороформ / изоамиловый спирт. Повторите процедуру депротеинизации.
- Водную фазу отберите в чистый широкий стакан. Добавьте равный объем буфера для осаждения, осторожно перемешайте стеклянной палочкой. Оставьте на 30 минут при комнатной температуре.
- Сформировавшийся осадок соберите загнутым на конце стеклянным капилляром. Удалите избыток жидкости, слегка касаясь капилляром стенок стакана. Иногда сделать это не удается, т.к. раствор CTAB очень мылкий и осадок соскальзывает. В этом случае его можно собрать центрифугированием при 10000 об/мин. Затем промойте осадок в 70 % -ном этаноле с 0,2 M ацетатом натрия в течение 3 часов. На этой стадии его можно оставить на ночь при + 4°С. Промывание спиртом позволяет освободиться от CTAB и делает ДНК пригодной для обработки рестриктазами.
- Удалите избыток спирта, касаясь палочкой стенок стакана. На 5 минут поместите осадок в 96 % -ный этанол, подсушите на воздухе и растворите в 3,5 мл буфера ТЕ, pH 8,0. Для улучшения растворения можно при помощи автоматической пипетки несколько раз пропустить раствор через наконечник со срезанным кончиком, или прогреть его в течение 1–2 ч при 37□С. Если ДНК плохо растворя-

ется в буфере, ее можно оставить на ночь при +4□С.

- Добавьте к раствору ДНК 1/10 объема 3 М ацетата натрия (т.е. 350 мкл) и 2 объема холодного 96 % -ного этанола (7 мл). Сформируйте осадок при -20□С в течение как минимум 30 минут (можно оставить на ночь). Медузу преципитировавшей ДНК соберите на стерильную стеклянную палочку или стеклянный капилляр. Промойте осадок в течение 3 часов в 70 % -ном этаноле с 0,2 М ацетатом натрия, затем 30 минут в 70 % -ном этаноле и 5 минут в 96%-ном этаноле. Высушите осадок при комнатной температуре и растворите его в небольшом объеме буфера ТЕ, pH 8,0 (500 - 1500 мкл).

2 вариант – Выделение ДНК из небольшого количества лиофилизированного материала.

Процедуру выделения с использованием CTAB можно применять и для небольших количеств растительного материала. В этом случае все объемы должны быть соответственно уменьшены (на 70 мг лиофилизированных листьев или проростков нужно взять 600 мкл экстракционного буфера). Все этапы выделения проводятся в пробирках от настольной микроцентрифуги Eppendorf. Поскольку микроколичества ДНК невозможно захватить стеклянной палочкой или капилляром, осадок ДНК собирается центрифугированием (настольная центрифуга Eppendorf, 10 000 об/мин, 15 мин, при 20℃). Для окончательного растворения ДНК требуется около 85 мкл буфера ТЕ, pH 7,6.

Ход работы:

- Поместите 70 мг лиофилизированного материала в пробирку от настольной микроцентрифуги Eppendorf объемом 2 мл. Добавьте 140 г окиси алюминия и разотрите в очень тонкий порошок. Осторожно прилейте 600 мкл экстракционного буфера комнатной температуры.
- Инвертируя пробирку, перемешайте содержимое до гомогенного состояния. Пробирку плотно закройте и инкубируйте на водяной бане при 65□С 20 минут. Время от времени покачивайте пробирку, перемешивая содержимое.

- Охладите смесь до комнатной температуры. Следите за тем, чтобы температура не опустилась ниже 15□C, так как CTAB может выпасть в осадок. Добавьте к буферу 600 мкл смеси хлороформ/ изоамиловый спирт (24:I) . Перемешивайте в течение 20 минут, наклоняя пробирку так, чтобы водная и органическая фазы образовывали однородную эмульсию.
- Разделите водную и органическую фазу центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 10 минут при температуре 20□C. При этом клеточные обломки осядут на дно, а денатурированные белки расположатся на границе двух фаз, образуя так называемую интерфазу.
- Используя автоматическую пипетку, перенесите верхнюю водную фазу в чистую центрифужную пробирку (у съемного наконечника пипетки предварительно отрежьте ножницами кончик). Следите за тем, чтобы не захватить частиц интерфазы.
- Добавьте 1/10 объема (60 мкл) 10 % -ного раствора CTAB в 0,7 M NaCl и затем 600 мкл смеси хлороформ / изоамиловый спирт. Повторите процедуру депротеинизации.
- Водную фазу отберите в чистую пробирку. Добавьте равный объем (600 мкл) буфера для осаждения, осторожно перемешайте стеклянной палочкой. Оставьте на 30 минут при комнатной температуре.
- Сформировавшийся осадок соберите центрифугированием при 10000 об/мин. Затем промойте осадок в 70 % -ном этаноле с 0,2 M ацетатом натрия в течение 3 часов. На этой стадии его можно оставить на ночь при + 4°C. Промывание спиртом позволяет освободиться от CTAB и делает ДНК пригодной для обработки рестриктазами.
- Соберите осадок центрифугированием при 10000 об/мин. Слейте надосадочную жидкость. На 5 минут поместите осадок в 70% -ный этанол, соберите центрифугированием, подсушите на воздухе и растворите в 100 мкл буфера ТЕ, pH 8,0. Для улучшения растворения можно при помощи автоматической пипетки несколько раз пропустить раствор через наконечник со срезанным кончи-

ком, или прогреть его в течение 1-2 часов при 37□С. Если ДНК плохо растворяется в буфере, ее можно оставить на ночь при +4□С.

- Добавьте к раствору ДНК 1/10 объема 3 М ацетата натрия (т.е. 10 мкл) и 2 объема холодного 96 % -ного этанола (200 мл). Сформируйте осадок при -20□С в течение как минимум 30 минут (можно оставить на ночь). Медузу преципитировавшей ДНК соберите центрифугированием. Промойте осадок в течение 3 часов в 70 % -ном этаноле с 0,2 М ацетатом натрия, затем 2 раза по 30 минут в 70 % -ном этаноле (каждый раз осадок собирается центрифугированием, а надосадочная жидкость удаляется). Высушите осадок при комнатной температуре и растворите его в небольшом объеме буфера ТЕ, pH 8,0 (60-80 мкл).

3 вариант – Выделение ДНК из свежего листового материала.

Экстракционный буфер (х 2) :

I М трис - HCl, pH 8,0	25 мл
5 М NaCl	70 мл
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	I0 мл
CTAB	5 г
	H_2O до 250 мл.

Ход работы:

- Промойте срезанные листья или проростки в 70 % -ном этаноле, ополосните дистиллированной водой и обсушите фильтровальной бумагой. Быстро заморозьте 10 г ткани в жидком азоте. Поместите замороженную ткань в предварительно охлажденную ступку, разбейте крупные куски пестиком и разотрите в тонкий порошок, не допуская оттаивания.

- Перенесите порошок в центрифужный стакан на 50 мл с завинчивающейся крышкой. Добавьте 10 мл двукратного буфера для экстракции, предварительно нагретого до 95□С, и затем – 0,2 мл □ - меркаптоэтанола. Перемешайте стеклянной палочкой и инкубируйте закрытый стакан на водяной бане при 65□С в течение часа. Далее следуйте методике для лиофилизированного материала.

В том случае, если при добавлении осаждающего раствора ДНК в осадок не выпадет, добавьте к раствору равный объем изопропанола и оставьте на ночь при комнатной температуре. Затем соберите осадок на стеклянную палочку (или центрифугированием) и работайте с ним, как обычно.

2) Выделение микроколичеств тотальной ДНК злаков при помощи додецилсульфата натрия (SDS) (по Дорохов, Клоке, 1997)

Метод основан на том, что при 0□С примеси белков и полисахаридов в экстрактах образуют комплексы с додецилсульфатом калия и выпадают в осадок. ДНК при этом остается в растворе.

Оборудование: общее лабораторное оборудование, водяная баня, центрифуга Эппендорф для микропробирок, автоматические пипетки на 20 и 200 мкл.

Приготовление растворов:

I) **Экстракционный буфер** (200 мМ трис - HCl, pH 7,5; 250 мМ NaCl; 25 мМ ЭДТА, 0,5 % SDS) – объем 100 мл:

I М трис - HC1, pH 7,5	20 мл;
5 М NaCl	5 мл;
0,5 М ЭДТА.	5 мл;
10 % SDS	5 мл
	H_2O до 100 мл

2) **65%-ный этанол** – объем 200 мл:

96 % этанол	135 мл
	H_2O до 200 мл

3) **5М раствор ацетата калия**

49,1 г CH_3COOK растворите в воде и доведите объем до 100 мл.

Ход работы:

- Нарежьте листья кусочками примерно по 5 мм и поместите 3 отрезка в пробирку типа Eppendorf. Заморозьте пробирку в жидком азоте и разотрите предварительно охлажденным микропестиком.

- Добавьте 400 мкл экстракционного буфера. После оттаивания тщательно перемешайте в течение 5 минут.
- Поместите пробирки на водяную баню с температурой воды 65□С. Инкубируйте в течение 15 минут, периодически перемешивая.
- Добавьте 200 мкл 5М ацетата калия и перемешайте, несколько раз инвертируя пробирку.
- Выдержите пробирки на льду в течение 10 минут. При необходимости пробирки можно заморозить в морозильнике и оставить на ночь (и даже на несколько дней).
- Отцентрифугируйте в течение 20 минут при 14000 об/мин.
- Отберите водную фазу (примерный объем 500 мкл) и перенесите ее в чистые пробирки (каждую пробу отдельным наконечником).
- Добавьте равный объем изопропанола (500 мкл). Сформируйте осадок на льду в течение 20-30 минут. Осадите ДНК центрифугированием при 14000 об/мин в течение 10 минут.
- Слейте надосадочную жидкость, промокните пробирки фильтровальной бумагой (следите, чтобы пробирки на бумаге касались только чистого места). Добавьте 1 мл охлажденного 65% этанола.
- Встряхивая пробирки, промойте осадок 5-10 минут в этаноле и вновь отцентрифугируйте при 14000 об/мин в течение 20 минут.
- Удалите спирт, подсушите на воздухе и растворите в 100 мкл деионизированной воды при комнатной температуре (примерно в течение часа).

Выделенной ДНК достаточно для проведения 40-50 ПЦР.

3) Выделение препаративных количеств тотальной ДНК фенольно-детергентным методом с последующим переосаждением CTAB (по Wienand, Feix, 1980, с небольшими модификациями).

Метод является модификацией стандартной фенольно-детергентной процедуры. Он позволяет получать ДНК, в значительной степени свободную от белков и полисахаридов. Для очистки препаратов от высокомолекулярной РНК исполь-

зуется ее способность преципитировать при высокой концентрации соли (2 М NaC1). Это позволяет избежать ферментативной обработки РНКазой. Дополнительное переосаждение ДНК с детергентом CTAB освобождает ее от пигментов и полисахаридов.

Оборудование: общее лабораторное оборудование, центрифуга с бакет-ротором (частота вращения до 4000 об/мин), автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл, фарфоровые ступки и пестики.

Реактивы: трис, соляная кислота, хлорид натрия, лаурилсаркозил натрия, ацетат натрия, уксусная кислота, ЭДТА, фенол, хлороформ, изоамиловый спирт, 8 - оксихинолин, □-меркаптоэтанол (два последние - не обязательно), гидрооксид натрия, CTAB, изопропанол, этанол, жидкий азот.

Приготовление растворов:

I) **Экстракционный буфер** (50 мМ трис - HCl, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 50 мМ ЭДТА, 0,5 %-ный лаурилсаркозил) - объем 150 мл:

I М трис - HC1, pH 8,0	7,5 мл,
5 М NaCl	3 мл,
0,5 М ЭДТА.	15 мл,
35 % лаурилсаркозил натрия	2,14 мл,
	H_2O до 150 мл

2) **70%-ный этанол с 0,2 М ацетатом натрия** – объем 500 мл:

96 % этанол	365 мл
3 М ацетат натрия, pH 5,2	33,3 мл
	H_2O до 500 мл

3) **12 %-ный раствор метабисульфита натрия** – объем 50 мл.

Навеску 6 г $Na_2S_2O_5$ растворите в 40 мл воды и доведите объем до 50 мл.

4) Приготовление фенола, насыщенного буфером:

Во всех методиках работы с ДНК под словом "фенол" понимают водонасыщенный фенол, уравновешенный буфером. К нему часто добавляют □-меркаптоэтанол и 8-оксихинолин, которые обладают антиоксидантными свойствами. При длительном хранении, особенно на свету, происходит окисление фе-

нола, за счет чего он приобретает желтую или красноватую окраску. Такой реактив к работе непригоден, поскольку окисленные молекулы фенола в процессе выделения повреждают ДНК. Для избавления от примесей фенол следует перегнать при 160□С. Фенол, имеющий белый цвет, можно использовать без очистки. Перегнанный фенол должен храниться в холодильнике в посуде с толстыми светонепроницаемыми стенками (тонкостенную посуду может разорвать под тяжестью фенола). Перед употреблением фенол достают из холодильника и плавят на водяной бане при 65□С. Расплавленный фенол насыщают буфером трис-HCl, pH 8,0 (на каждые 8 мл расплавленного фенола добавьте 2 мл I М буфера трис-HCl, pH 8,0). Существуют готовые растворы фенола с 8-оксихинолином. Их можно хранить в темноте при +4□С в течение месяца. Однако раствор фенола без антиоксидантов лучше использовать в день приготовления.

5) Приготовление смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1):

В мерный стакан внесите 10 мл изоамилового спирта и доведите объем хлороформом до 250 мл. В полученной смеси отношение хлороформа к изоамиловому спирту будет 24 к I. Смесь стабильна и может храниться при комнатной температуре в закрытой посуде с темными стенками в течение длительного времени.

6) Приготовление смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25 : 24 : I):

В колбе на 250 мл слейте 80 мл фенола, уравновешенного буфером и 80 мл смеси хлороформ : изоамиловый спирт. Смесь лучше использовать в день приготовления.

При выделении ДНК раствор фенола и обе смеси используют охлажденными до +4□С.

Ход работы:

- Срежьте семидневные этиолированные проростки, взвесьте их. Промойте растительный материал в 70 % -ном этаноле, затем сполосните дистиллированной водой. Возраст проростков можно варьировать от 6 до 14 дней. Двухнедельные проростки используют в случае медленного прорастания семян, например, у риса.

- Поместите 5 г проростков в предварительно охлажденную фарфоровую ступку и быстро заморозьте их в жидком азоте. Не допуская оттаивания, разотрите пестиком в тонкий порошок. Для растирания можно также использовать пластмассовые шарики диаметром 5-6 мм. В этом случае 3-5 шариков вместе с проростками помещают в центрифужный стакан на 50 мл, плотно закрывают крышкой и помещают стакан в жидкий азот. Затем пинцетом достают стакан и перемешивают его содержимое на вортексе (придерживая стакан через несколько слоев ткани или в теплых перчатках). При этом нельзя допускать оттаивания. Пластмассовые шарики, подпрыгивая в стакане, через 2-3 минуты превращают содержимое стакана в порошок. Преимущество этого способа состоит в отсутствии необходимости переносить порошок из ступки в стакан.
- Лопаточкой перенесите полученный порошок в центрифужный стакан на 50 мл, содержащий 20 мл охлажденного экстракционного буфера (если Вы использовали пластмассовые шарики, залейте буфером содержимое стакана). Соотношение веса проростков и объема буфера может изменяться в зависимости от размера генома используемого вида. Для диплоидных видов с небольшими геномами объем буфера может быть равен весу проростков. При выделении ДНК из тетраплоидных и гексаплоидных видов объем буфера, приходящийся на один грамм проростков, должен быть увеличен; в данном случае на каждый грамм проростков приходится 4 мл буфера.
- Периодически помешивая, инкубируйте стакан при комнатной температуре как минимум 1,5 - 2 часа. Можно проводить инкубацию в течение ночи при +4□С.
- Добавьте равный объем холодной смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25:24:1). В течение 40 – 60 минут инвертируйте стакан, добиваясь образования однородной эмульсии.
- Разделите водную и органическую фазы при 3000 об/ мин в течение 15 мин. при +4□С. Для центрифугирования лучше использовать бакетный ротор.

- Верхнюю водную фазу отберите в чистый центрифужный стакан. Добавьте равный объем смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24:1) и 6 мл (¼ объема) 6 %-ного раствора метабисульфита натрия (конечная концентрация метабисульфита натрия в таком растворе будет 1,4 %). Добавление метабисульфита натрия позволяет улучшить образование эмульсии (без фенола хлороформ очень плохо смешивается с водной фазой). Кроме того, метабисульфит натрия, обладая восстановительными свойствами, очищает ДНК от окисленных молекул и, в частности, от полифенольных соединений. Следует, правда, отметить, что при выделении ДНК из злаков очистка от полифенолов не требуется, и метабисульфит натрия добавляется именно для улучшения смешивания. Повторите процедуру депротеинизации и центрифугирование.
- Снова отберите водную фазу в чистый центрифужный стакан. Старайтесь не захватывать частицы интерфазы. Точно замерьте объем перенесенного раствора. Добавьте I/10 объема 3 М ацетата натрия и равный объем холодного изопропилового спирта. Сформируйте осадок в течение часа при -20□С (можно оставить на ночь).
- Выпавшую в осадок ДНК соберите на стеклянную палочку. Удалите излишек жидкости, касаясь палочкой стенок стакана. Промойте осадок в 70 % -ном этаноле с 0,2 М ацетатом натрия в течение 3 часов или более. При необходимости на этой стадии его можно оставить на ночь при - 20□С.
- Извлеките стеклянную палочку с намотанной медузой ДНК из 70 % -ного этанола. Удалите избыток спирта, слегка касаясь палочкой стенок стакана, и высушите осадок на воздухе. Растворите ДНК в I мл буфера ТЕ, pH=8,0 (10 мМ трис-HCl, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА). При растворении избегайте резких и быстрых движений. Можно оставить ДНК в буфере на ночь при + 4°С. Если объем буфера недостаточен для полного растворения ДНК, добавляйте буфер ТЕ небольшими порциями (примерно по 500 мкл), каждый раз пытаясь растворить ДНК до конца. В зависимости от вида злака и от эффективности первого этапа выделения окон-

чательный объем буфера будет варьировать. Для ДНК, выделенной из 5 г проростков гексаплоидной пшеницы требуется 1,5 – 2 мл буфера.

Примечание: Если ДНК будет растворена не полностью, на следующем этапе она выпадет в осадок вместе с высокомолекулярной РНК и будет потеряна. С другой: стороны, объем буфера должен быть минимальным, чтобы концентрация ДНК при последующих разведениях не снизилась до того критического уровня, когда она теряет способность преципитироватъ. Для растворения ДНК на этом этапе лучше не использовать полиэтиленовые и полиалломерные пробирки, непрозрачные стенки которых затрудняют контроль за процессом.

- Точно измерьте объем полученного раствора ДНК, и добавьте к нему 2/3 объема 5 М NaCl. Осторожно перемешайте содержимое пробирки и оставьте ее на ночь при +4□С. Конечная концентрация соли составит 2М. При этих условиях выпадет в осадок высокомолекулярная РНК.
- Соберите осадок РНК центрифугированием при 8 000 об/мин в течение 20 минут. Супернатант перенесите в стеклянный стакан (или центрифужную пробирку) и разбавьте в 4 раза буфером ТЕ комнатной температуры. Конечная концентрация NaCl составит 0,5 М. К полученному раствору добавьте 1/10 часть 2 %-ного раствора СТАВ. Перемешайте содержимое, мягко инвертируя стакан. Выпавший осадок ДНК соберите стеклянной палочкой и слегка отожмите, касаясь палочкой стенок стакана.
- Промойте осадок в течение часа в 70 % -ном этаноле с 0,2 М ацетатом натрия, затем 3 часа в 70 % -ном этаноле без ацетата натрия и 5 минут в 96 % -ном этаноле.
- Окончательно растворите ДНК в буфере ТЕ, pH 8,0. В случае, если полученные препараты будут использованы для блот-гибридизации, объем буфера должен быть минимален. Начните с 500 мкл и добавляйте буфер ТЕ порциями по 100 мкл, каждый раз пытаясь полностью растворить ДНК.

4) Можно также выделять ДНК при помощи специальных наборов. В основе этих наборов лежит принцип адсорбции ДНК при определенных условиях на колонках или на магнитных частицах. При изменении условий ДНК в очищенном виде переходит в раствор. Единственным недостатком такого выделения является его дороговизна.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И КАЧЕСТВА ДНК В ПОЛУЧЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Спектрофотометрический метод определения нуклеиновых кислот основан на избирательном поглощении нуклеотидами УФ -излучения с длиной волны 260 нм. При этом оптическая плотность А = I примерно соответствует концентрации 50 мкг/мл для двунитевой ДНК или 40 мкг/мл для однонитевой ДНК.

Оборудование: Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длине волны 260 нм, кварцевые кюветы объемом 4 мл или микрокюветы.

Ход работы:

50 мкл раствора ДНК разведите в 80 раз, добавив 3950 мкл дистиллированной воды. После замера оптического поглощения на спектрофотометре определите концентрацию ДНК по формуле:

$$C = \frac{A_{260} \times разведение}{20}$$, где

С – концентрация ДНК в исходном растворе;

А260 – оптическая плотность разведенного раствора, измеренная при длине волны 260 нм.

Например, при разведении в 80 раз:

$$C = \frac{A_{260} \times 80}{20}$$ (мкг/мкл)

Если препарат полностью свободен от РНК (обработан РНКазой или очищен в градиенте плотности CsC1), то определенное спектрофотометрическим способом значение соответствует истинной концентрации ДНК. В противном случае

истинная концентрация будет меньше. Точное определение количества ДНК требует применения других методов. Однако в целом ряде случаев (рестрикционный анализ, блот - гибридизация и т.д.) этими различиями можно пренебречь. Спектрофотометрический метод позволяет также контролировать степень очистки препаратов от белков. Для этого нужно при том же разведении раствора ДНК измерить его оптическую плотность в областях с длиной волны 230 и 280 нм (A_{230} и A_{280}) и найти отношение величины A_{260} к полученным значениям (т.е. A_{260}/A_{230} и A_{260}/A_{280}). Считается достаточным, если отношение A_{260}/A_{230} превышает 1,8. Отношение A_{260}/A_{280} должно быть не ниже 2,0. Низкое значение отношения A_{260}/A_{280} может указывать на наличие в препарате примесей белков или полифенольных соединений.

После определения концентрации препараты ДНК разводят до концентрации 50 – 100 нг/мкл.

ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

1) Постановка ПЦР

Полимеразная цепная реакция проводится в специальных приборах – амплификаторах или термоциклерах. Обычно амплификатор снабжен термостатируемой крышкой, которая препятствует испарению проб при нагревании до высоких температур. При отсутствии крышки для предотвращения испарения используют минеральное масло, которое наслаивают на каждую пробу.

Для проведения ПЦР используют пробирки (чаще всего объемом 200 мкл) или планшеты. Пробирки должны иметь тонкие стенки, что обеспечивает хороший контакт с лунками амплификатора. Кроме того, они должны иметь хорошо закрывающиеся крышки, в противном случае содержимое пробирки может испариться. Планшеты для ПЦР заклеиваются специальными термостойкими пленками. Можно использовать планшеты без пленок, в этом случае для предотвращения испарения используют минеральное масло.

Реакционная смесь для проведения ПЦР должна содержать геномную ДНК, реакционный буфер, смесь дезоксинуклеотидов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, их смесь обозначают dNTP's), прямой и обратный праймеры и фермент Taq-полимеразу. В отличие от рестрикционного анализа, проведение ПЦР требует очень небольшого количества ДНК: от 50 до 200 нг на реакцию.

Реакционный буфер обычно содержит буфер трис-HCl, KCl, $MgCl_2$, детергент тритон X-100, но может также содержать и некоторые другие компоненты, например, желатин. Состав буфера определяется фирмой-производителем полимеразы. У многих фирм ПЦР-буферы не содержат $MgCl_2$, и его приходится отдельно добавлять в реакционную среду. При работе же с буферами других фирм этого не требуется. Некоторые фирмы поставляют фермент одновременно с двумя реакционными буферами: содержащим и не содержащим $MgCl_2$.

Лучше использовать фермент и dNTP's от одного производителя, потому что в некоторых случаях Taq-полимераза одного производителя не может работать с нуклеотидами другого.

ПЦР проводится в очень маленьких реакционных объемах: от 10 до 100 мкл. Наиболее часто используется объем 20 мкл.

Все компоненты реакционной смеси, кроме ДНК, предварительно смешиваются в отдельной пробирке (приготовление так называемого премикса) и затем распределяются по пробиркам или лункам планшета.

ПЦР – это очень чувствительный метод. Для успешной амплификации достаточно самых небольших количеств ДНК. При постоянной работе с одними и теми же праймерами происходит накопление в воздухе лаборатории ПЦР-продуктов, которые могут попасть в пробы и дать положительную реакцию. Поэтому смешивание растворов важно проводить или в особой комнате, или в специальной камере. Кроме того, нужно использовать наконечники с бумажными фильтрами для предотвращения заноса ДНК из пипеток (лучше использовать отдельные пипетки). Для контроля используют также нулевые пробы, содержащие все компоненты реакционной смеси, кроме ДНК.

Стандартная ПЦР включает в себя следующие этапы:

Предварительная денатурация ДНК:

прогревание пробы при 93□ – 95□С в течение 3–5 минут;

Циклическая программа:

денатурация 93□ – 95□ С в течение 30 сек. – 1 мин.

отжиг T□m в течение 1 – 2 мин.

элонгация (синтез второй нити) 72□ С в течение 1 – 2 мин.

Количество циклов может варьировать от 29 до 37

Заключительный этап: 72□ С в течение 5 – 10 мин.

Оборудование: амплификатор, автоматические пипетки на 10, 100, 1000 мкл, камера для предотвращения контаминации (желательно)

Ход работы:

- Определите конечный объем реакционной смеси.
- Рассчитайте необходимое количество компонентов реакционной смеси. На каждые 10-15 пробирок необходимо добавлять одну лишнюю (при использовании 96-луночного планшета удобно делать премикс для 100 проб). Ниже представлен пример составления премикса для конечного объема 25 мкл:

Компонент смеси	На каждую пробу (мкл)	Число проб	Итого (мкл)
Буфер (10х)	2,5	15 (14 + 1)	37,5
dNTP’s (5 мМ)	1	15	15
Прямой праймер (5 пкМ/мкл)	2	15	30
Обратный праймер (5 пкМ/мкл)	2	15	30
Фермент (5 ед/мкл)	0,15	15	2,25
Вода	15,35	15	230
Премикс	23	15	344,75

- Тщательно перемешайте премикс, осадите капли центрифугированием. Распределите по пробиркам – по 23 мкл в каждую пробирку.
- Добавьте в каждую пробирку по 2 мкл раствора ДНК (50 нг/мкл). Конечный объем составит 25 мкл.
- Перемешайте, осадите капли центрифугированием. Плотно закройте пробирки, подпишите их, поместите в амплификатор, тщательно закройте крышку и запустите реакцию.
- После окончания реакции поместите пробирки в морозильник, или добавьте ¼ объема буфера для остановки реакции (одновременно является буфером нанесения нанесения). В этом случае пробирки можно хранить при +4□C.

2) Оптимизация условий реакции:

Праймеры для работ по идентификации генов чаще всего подбирают по литературным источникам. Там же должны быть указаны условия реакции и, в частности, температура отжига (T□m) для каждой пары праймеров.

Если такая температура не приводится, ее можно рассчитать по формуле:

(Число A=T пар □ 2 + число G□C пар □ 4) – 5

Например, для праймера CCTTAATCCAGGGAACTCTCAG

температура равна:

число a+t пар 11 □2 = 22
число g+c пар 11□4 = 44
сумма 66 – 5 = 61□C.

При использовании 2-х праймеров с разными температурами нужно использовать меньшую. Однако температуры отжига праймеров не должны сильно различаться друг от друга.

При работе с известными праймерами начинают с тех условий реакции, которые указаны в литературных источниках. Если результат отличается от описанного в литературе и не является удовлетворительным, то можно попытаться варьировать состав реакционной смеси и условия протекания реакции.

При отсутствии продуктов реакции можно попробовать понизить температуру отжига, а также увеличить время отжига и/или время синтеза второй нити. При наличии большого количества неспецифичных компонентов, нужно, наоборот, повысить температуру отжига и варьировать концентрацию $MgCl_2$. Уменьшить неспецифическое связывание праймеров помогают программы с градиентом температуры: температура отжига в первом цикле задается на 2–3 градуса выше, и в течение 5–10 циклов опускается до необходимой T□m.

ОБРАБОТКА ДНК РЕСТРИКТАЗАМИ (ДЛЯ CAPS – АНАЛИЗА)

Обработка ДНК рестриктазами проводится в условиях, рекомендованных заводом - изготовителем. К каждой партии фермента прилагается паспорт, в котором указаны его концентрация, срок годности, состав реакционной смеси и необходимая температура инкубации.

Рестрикция продуктов амплификации

Для обработки рестриктазами продукты ПЦР не требуется специально очищать от компонентов амплификационной смеси. Нужно просто добавить к ним рестриктазу и соответствующий буфер. В отличие от блот-гибридизации, при работе с CAPS- маркерами требуется небольшое количество фермента – достаточно 1 единицы на пробу.

Реакцию проводят в небольшом объеме (10-15 мкл реакционной смеси).

Оборудование: автоматические пипетки на 10, 20, 200 и 1000 мкл, термостат.

Ход работы:

- Приготовьте премикс (раствор, содержащий все компоненты реакционной смеси, кроме ДНК). При расчете на каждые 10 пробирок добавляется одна лишняя для компенсации возможных неточностей при распределении смеси по

пробиркам.

Пусть требуется обработать 20 проб. Расчет на одну пробу:

ПЦР – продукты в амплификационной смеси	Вода	Реакц. буфер (10 х)	Фермент (20 ед/мкл)	Конечный объем
5 мкл	4	1 мкл	0,05 мкл (по 1 ед на пробу)	10 мкл

Составление премикса на 22 пробы (20 проб + 2 добавочных):

Компонент реакционной смеси	На каждую пробу (мкл)	Число проб	Итого (мкл)
Вода	4	22 (20 + 2)	88
Буфер	1	22	22
Фермент	0,05	22	1,1 (1,5)*
Премикс	5	22	111,5

* Примечание: нет необходимости вносить точно 1,1 мкл рестриктазы. Лучше округлить значение в большую сторону.

- Тщательно перемешайте смесь, осадите капли центрифугированием и распределите по пробиркам (по 5 мкл). Добавьте по 5 мкл продуктов ПЦР (каждую пробу – отдельным наконечником).
- Инкубируйте 2–4 ч при температуре, указанной в паспорте фермента.
- Остановите реакцию, прогрев пробирки 60□С в течение 15 минут, или добавив по 3 мкл буфера нанесения, содержащего ЭДТА (см. следующий раздел).

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ГОРИЗОНТАЛЬНЫХ АГАРОЗНЫХ ГЕЛЯХ

Под действием электрического тока фрагменты ДНК продвигаются в геле от катода к аноду ("от минуса к плюсу"), скорость их движения при этом обратно пропорциональна размерам (мелкие фрагменты проходе больший путь). Положение фрагментов в геле определяют по флуоресценции бромида этидия - интеркалирующего агента, встраивающегося между двумя цепями молекулы ДНК.

Оборудование: электрофоретическая камера, столик для заливки геля, источник постоянного тока (до 500 В), трансиллюминатор, фотокамера, оранжевый фильтр.

Реактивы: трис, борная кислота, ЭДТА, агароза, бромфеноловый синий, ксилолцианол, сахароза, бромид этидия.

Агароза для работы с ДНК должна быть очищена от примесей сульфатов, которые вызывают сдвиг фрагментов ДНК к катоду и даже могут исказить порядок их следования. О степени очистки агарозы судят по величине эндоосмоса (- mr), значение которого не должно превышать 0,15 (оно обычно указано на этикетке).

Приготовление растворов:

I) **Трис – боратный буфер** (0,089 М трис, 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЭДТА)

Пятикратный буфер TBE (5 х) – объем 1 л

трис	54 г;
борная кислота	27,5 г;
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	20 мл.
	H_2O до I л.

Непосредственно для работы используют однократный или 0,5-кратный буфер. Соответственно концентрированный раствор разводят в 5 или 10 раз. Буфер TBE можно использовать многократно.

К рабочему раствору можно добавить 0,5 мкг/мл бромида этидия (на 1 л буфера TBE – 50 мкл матричного раствора бромида этидия (10 мг/мл)). Такой раствор TBE лучше хранить в темноте, поскольку бромид этидия на свету разлагается; при этом окраска буфера из розовой превращается в желтую. Можно также проводить разделение фрагментов в буфере без ЭБ и окрашивать гели после завершения электрофореза. Кроме того, бромистый этидий можно добавлять непосредственно в расплавленную агарозу перед заливкой геля.

2) **Трис – ацетатный буфер** (TAE) (0.04 М трис-ацетат; 0,002 М ЭДТА)

Концентрированный (50□) TAE – объем 1 л:

Трис	242 г
Ледяная уксусная кислота	57 мл
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	100 мл
	H_2O до 1 л

3) **Буфер (6х) для нанесения проб** (40 % сахарозы (вес/объем); 0,25 % бромфенолового синего; 0,25 % ксилолцианола) – конечный объем 20 мл:

сахароза	8 г
бромфеноловый синий	50 мг
ксилолцианол	50 м г
	H_2O до 20 мл.

Другой вариант **буфера для нанесения** проб (5х), который одновременно может служить для остановки реакции рестрикции (12,5% фикол; 0,0625 ЭДТА; 0,5 % SDS; 5□ буфер TAE; 0,05 % бромфенолового синего; 0,05 % ксилолцианола)

фикол	12,5 г;
0,5 М ЭДТА	12,5 мл;
10% SDS	5 мл;
50□ TAE	10 мл;
бромфеноловый синий	50 мг;
ксилолцианол	50 мг
	H_2O до 100 мл.

Приготовление гелей:

Концентрация агарозы в гелях может составлять от 0,3 % до 3,5%, при выборе концентрации геля следует учитывать размеры анализируемых фрагментов и цели работы.

- Определите концентрацию и объем будущего геля. Взвесьте необходимое количество агарозы. Навеску поместите в коническую термостойкую колбу с плоским дном и добавьте буфер TBE (1х) до требуемого объема. Конечный объем раствора должен быть не более ½ объема колбы, иначе при закипании сильно пенящаяся агароза выльется.
- Поместите колбу в микроволновую печь и нагрейте ее до закипания раствора. Осторожно перемешайте (попадая на раскаленные стенки колбы, раствор может сильно вскипеть). Вскипятите раствор еще раз и дайте ему остыть до температуры 55□С. Вместо микроволновой печи можно использовать кипящую

водяную баню или магнитную мешалку с подогревом.

- Поместите ванночку для заливки гелей на столик с винтовыми опорами. Используя уровень, приведите форму для геля в строго горизонтальное положение. Перпендикулярно форме установите гребенку. Между зубцами гребенки и дном ванночки должен оставаться зазор 0,5–1 мм, так чтобы дном формируемых лунок служил тонкий слой геля. Если специальные формы отсутствуют, то гель можно залить на стеклянной пластине, приклеив по ее краям липкую ленту или пластырь так, чтобы образовалась форма. По краям пластины пастеровской пипеткой наносят небольшое количество раствора агарозы. Затвердевая, агароза герметизирует места соединения липкой ленты и стекла. В подготовленной таким образом форме устанавливают гребенку и заливают гель. Липкую ленту перед проведением электрофореза удаляют. Вместо стеклянной пластины для заливки гелей можно использовать поверхность столика электрофоретической камеры.
- Вылейте в приготовленную форму раствор агарозы и оставьте для полимеризации при комнатной температуре на 45 минут.
- По окончании полимеризации покройте гель слоем буфера ТВЕ и осторожно выньте гребенку.

Примечание: После окончания полимеризации агарозный гель некоторое время сжимается, выталкивая из себя воду. Поэтому рекомендуется выдерживать гели в течение ночи при комнатной температуре или в холодильнике. При этом гели не должны оставаться сухими – они помещаются во влажную камеру или покрываются слоем буфера ТВЕ. Однако эта процедура не является обязательной.

Нанесение проб и электрофорез :

- В электрофоретическую камеру с буфером ТВЕ поместите готовый гель. Буфер должен покрывать гель слоем не менее I - 2 мм.
- Смешайте пробы с буфером нанесения: на каждые 10 мкл пробы добавьте 2 мкл буфера. Внесите смесь в лунки геля под покрывающий его буфер.
- Подсоедините электроды к источнику постоянного тока, при этом ближайший к лункам электрод должен быть заряжен отрицательно. Установите

необходимое напряжение (примерно 5 В на каждый см длины геля). Проводите электрофорез до тех пор, пока лидирующий краситель - бромфеноловый синий - не подойдет к противоположному концу геля на 1,5 - 2 см.

- Поместите гель в кювету с буфером ТВЕ, содержащим бромид этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. Инкубируйте 10-15 минут при комнатной температуре, периодически помешивая. Этот этап опускается, если ЭБ был добавлен непосредственно в электрофоретический буфер.
- Поместите гель на стекло трансиллюминатора и сфотографируйте фрагменты ДНК в проходящем УФ - свете. Фотографировать можно как цифровой камерой, так и обычным фотоаппаратом (в последнем случае нужно использовать негативную пленку типа Ilford 200). Фотографирование проводят в темной комнате через оранжевый фильтр. Существуют также специальные системы для фотографирования и документирования гелей, которые сразу дают изображение геля в виде файла в форматах .TIF или .JPG.

Электрофорез для контроля качества и определения концентрации выделяемой ДНК

Большие молекулы геномной ДНК невозможно выделить в интактном состоянии. Они повреждаются и фрагментируются под влиянием различных повреждающих факторов, в основном, гидродинамических ударов. Степень полимерности ДНК в получаемых препаратах можно проконтролировать путем электрофореза в 0,3 % - 0,5%-ных агарозных гелях.

Низкая плотность геля позволяет эффективно разделять фрагменты большого молекулярного веса. В качестве маркера обычно используют ДНК фага □ (примерно 50 т.п.н.). Если при этом внести в лунки геля определенные количества ДНК фага, то одновременно можно определить концентрацию ДНК в препаратах.

Ход работы:

- Приготовьте 0,5 – 0,8 %-ный агарозный гель с лунками объемом 20 - 25 мкл. Поместите его в электрофоретическую камеру с буфером ТВЕ, содержащим

бромид этидия.

Примечание: для приготовления гелей с низкой концентрацией пригодны не все марки агарозы.

- В пробирки на 200 мкл или в планшет для ПЦР внесите по 2 мкл буфера нанесения. На каждый анализируемый препарат ДНК приготовьте по две пробирки с буфером.
- В первую пробирку внесите 1 мкл анализируемого препарата, а во вторую – 5 мкл. Стерильной водой доведите объем отобранных аликвот до 10 мкл, перемешайте и осадите капли со стенок центрифугированием.
- Внесите все пробы в лунки геля. Посередине нанесите несколько разных разведений ДНК фага □: например, 64, 128, 256 и 512 мкг. Для этого необходимо иметь фирменный набор стандартов концентрации ДНК. На крайнюю дорожку нанесите также маркеры молекулярного веса размером до 10 т.п.н.. Проводите электрофорез при средней силе тока до тех пор, пока лидирующий краситель (бромфеноловый синий) не начнет выходить из геля.
- Сфотографируйте гель в проходящем УФ-свете. Используя дорожки с меньшим количеством внесенной ДНК (1 мкл пробы), сравните положение полос в геле. Фрагменты выделенной ДНК и фрагменты ДНК фага должны пройти примерно одинаковое расстояние. Если же геномная ДНК значительно опережает ДНК фага □, то ее размеры можно определить по маркерам молекулярного веса. Однако низкомолекулярную ДНК для блот - гибридизации лучше не использовать.
- На дорожках, содержащих большее количество ДНК (по 5 мкл пробы), перед основной полосой должен быть виден длинный "хвост", образованный низкомолекулярными фрагментами. Если количество таких низкомолекулярных ДНК сравнимо с количеством ДНК основной полосы, то препарат также не пригоден для работы.
- Среди различных разведений ДНК фага найдите полосу, соответствующую по интенсивности пробам исследуемого препарата, и определите концентра-

цию ДНК.

Литература

Дорохов Д. Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Молекулярная генетика. 1997. Т. 3. № 4. С. 443-450.

Лихтенштейн К., Дрейпер Д. Генетическая инженерия растений // Клонирование ДНК. Методы. Москва. «Мир». 1988. С. 315-380.

Маркелова Т. С. Иммунологические основы и методы создания исходного материала пшеницы для селекции на устойчивость к болезням в Поволжье // Автореф. дис. на соиск. уч. степени д. с-х наук. Саратов. 2007.

Тырышкин Л. Г., Гультяева Е. И., Алпатьева Н. В., Крамер И. Идентификация эффективных генов устойчивости пшеницы *Triticum aestivum* к бурой ржавчине с помощью STS маркеров // Генетика. Т. 42. № 6. 2006. С. 812-817.

Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. Определение генов устойчивотси к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров // Генетика. Т. 42. № 5. 2006. С. 675-683.

Auttrique E., Singh R. P., Tanksley S. D., Sorrells M. E. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives // Genome. 1995. V. 38. P. 75-83.

Blaszczyk L., Chelkowski J., Korzun V., et al.Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories // Cellular and Molecular Biology Letters. 2004. V. 9. P. 805-817. http://www.cmbl.org.pl

Blaszczyk L., Goueu H., Huang H. et al. Identifying leaf rust resistance genes and mapping gene *Lr*37 on the microsatellite map of wheat // Cellular and Molecular Biology Letters. 2004. V. 9. P. 869-878. http://www.cmbl.org.pl

Blaszczyk L., Tyrka M., Chelkowski J. ^{Pst1}AFLP based markers for leaf rust resistance genes in common wheat // J. Appl. Genet. 2005. V. 46. №4. P.357-364.

Brown-Guedira G., Singh S. Disease resistance. Leaf rust. *Lr*39 // http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr39/index.htm

Brown-Guedira G.L, Singh S., Fritz A.K. Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* ssp. *armeniacum* // Phytopathology. 2003. V. 93. P. 784-789.

Cherukuri D. P., Gupta S. K., Charpe A., Koul S. et al. Identification of a molecular marker linked to a *Agropiron elongatum*-derived gene *Lr*19 for leaf rust resistance in wheat // Plant Breeding. 2003. V. 122. P. 204-208.

Cherukuri D. P., Gupta S. K., Charpe A., Koul S. et al. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr*28 in wheat // Euphytica. 2005. V. 143. P. 19-26.

Chelkowski J., Stepien L. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat // J. Appl. Genet. 2001. V. 42. № 2. P. 117-126.

Dedryver F., Jubier, M-F., Thouvenin, J., Goyeau H. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr*24 in different wheat cultivars // Genome. 1996. V.39. P. 830-835.

Disease resistance. Leaf and stripe rust resistance. *Lr*37-*Yr17*-*Sr38* // http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr37/index.htm

Disease resistance. Leaf rust. *Lr*47 // http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr47/index.htm

Dubcovsky J., Lukaszewski A. J., Echaide M.et al. Molecular characterization of two *Triticum speltoides* interstitial translocations carrying leaf rust and greenbug resistance genes // Crop Science. 1998. V. 38 (6). P.1655-1660.

Gupta S. K., Charpe A., Koul S. et al. Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*–derived leafrust-resistance gene, *Lr*9, for marker-assisted selection in bread wheat // Genome. 2005. V. 48. P. 823-830.

Fritz A. Disease resistance. Leaf rust. *Lr*21 // http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr21/index.htm

Huang, L., Gill, B. S. An RGA-like marker detects all known *Lr*21 leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103 P. 1007-1013.

Helguera M., Khan I.A., Kolmer J. et al. PCR assays for the *Lr*37-*Yr17*-*Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines // Crop Science. 2003. V43. P.1839-1847.

Helguera M., Khan I.A., Dubcovsky J. Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene *Lr*47 // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. P. 1137-1143.

Helguera M., Vanzetti L., Soria M. et al. PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr*51 and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Science. 2005. V. 45. P. 728-735.

Khan R. R.. Bariana H. S., Dholakia B. B. et al. Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 111. P. 846-850.

Landjeva S., Korzun V., Tsanev T. et al. Distribution of the wheat–rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria // Plant Breeding. 2006. V. 125. P.102 -104.

Mago R., Spielmeyer W., Lawrence G. J. et al. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 1317–1324.

McCartney C. A., Somers D. J. , McCallum B. D. et al. Microsatellite tagging of the leaf rust resistance gene *Lr*16 on wheat chromosome 2BSc // Mol. Breeding. 2005. V. 15. P. 329-337.

McIntosh R.A., Welling C.R., Park R.F. Wheat rusts: an atlas of resistance genes // CSIRO, Australia and Kluwer Academic Publishers. Dortrecht. 1995.

Mohler V., Hsam L.K., Zeller F. J., Wenzler G. An STS marker distinguishing the rye-derived powdery mildew resistance alleles at the *Pm8/Pm17* locus of common wheat // Plant Breeding. 2001. V. 120. P. 448-450.

Naik S., Gil K.S., Prakasa R.V.S. et al. Identification of a STS marker linked to the *Aegilops speltoides*–derived leaf rust resistance gene *Lr*28 in wheat // Theor. Appl. Genet. 1998. V. 97. P. 535-540.

Nelson J.C., Singh R.P., Autrique J.E., Sorrells M.E. Mapping genes conferring and suppressing leaf rust resistance in wheat // Crop Sci. 1997. V.37. P. 1928-1935.

Neu C.H., Stein N., Keller B. Genetic mapping of the *Lr*20-*Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat // Genome. 2002. V. 45. P. 737-744.

Parker G.D., Chalmers K.J., Rathjen A.J., Langridge P. Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.*)* // Theor. Appl. Genet. 1998. V. 97. P. 238-245.

Prabhu K. V., Gupta S. K., Charpe A. et al. Molecular marker detect redundancy and miss-identity in genetic stock with alien leaf rust resistance gene *Lr*32 and *Lr*28 in bread wheat // J. Plant Biochemistry and Biotechnology. 2003. V. 12. P.123-129.

Prins R., Groenewald J., Marais G. et al. AFLP and STS tagging of *Lr*19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. P. 618-624.

Procunier J.D. Disease resistance. Leaf rust resistance. *Lr*29-*Lr*25 // http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr29/index.htm

Procunier J. D., Townley-Smith T. F., Prashar S. et al. PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr* 29 and *Lr*25 in wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Genet. Breed. 1995. V. 49. P. 8792.

Raupp W. J.; Singh S.; Brown-Guedira G. L.; Gill B. S. Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr*39 in wheat // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 102. P. 347-352.

Robert O., Abelard C., Dedrryver F. Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene *Yr17* in wheat // Mol. Breeding. 1999. V. 5. P. 167-175.

Schachermayr G., Messmer M. M., Feuillet C. et al. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr* 24 in wheat // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 982-990.

Schachermayr G., Siedler H., Gale M. D. et al. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr*9 leaf rustresistance gene of wheat // Theor. Appl. Genet. 1994. V.88. P. 110-115.

Schachermayr, G., Feuillet, C., Keller, B. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr*10 in diverse genetic backgrounds // Mol. Breed. 1997. V. 3. P. 65-74.

Schnurbusch T, Bossolini E, Messmer B, Keller B. Tagging and validation of a major quantitative trait locus for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in winter wheat cultivar Forno // Phytopathology. 2004. V. 94. P. 1036-1041.

Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayr G., Winzeler M., Keller B. Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr*35 in wheat // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 99 P. 554-560.

Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayr G. et al. Molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene *Lr*13 in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Journal of Genetics and Breeding. 2000. V. 54. № 3. P. 193-198.

Sears E.R. Identification of the wheat chromosome carrying leaf rut from *Aegilops umbellulata* // Wheat Inf. Serv. 1961. V. 12. P. 12-13.

Seyfarth R., Feuillet C., Keller B. Development and characterization of molecular markers for the adult leaf rust resistance genes *Lr*13 and *Lr*35 in wheat // In A.E. Slinkard (ed.) Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symp. Saskatoon, Saskatchewan. Canada. 2-7 Aug. 1998. V.3. P. 154-155.

Stepien L., Golka L., Chelkowski J. Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources // J. Appl. Genet. 2003. V. 44. № 2. P. 139-149.

Slikova S., Gregova E., Bartos P. et al. Development of wheat genotypes possessing a combination of leaf rust resistance genes *Lr*19 and *Lr*24 // Plant Soil Environ. 2004. V.50. №10. P. 434-438.

Suenaga K., Singh R. P., Huerta-Espino J., William H. M. Microsatellite markers for genes *Lr*34*/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat // Phytopath. 2003. V. 93. P. 881-890.

Talbert, L. E.; Blake, N. K.; Chee, P.W. al. Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat // Theoretical and Applied Genetics. 1994. V. 87. P. 789-794.

Tyrka M., Blaszczyk L., Chelkovski J. et al. Development of the single nucleotide polimorphism marker of the wheat *Lr*1 leaf rust resistance gene // Cellular and Molecular Biology Letters. 2004. V. 9. P. 879-889.

Wienand U., Feix G. Zein specific restriction enzyme fragments of maize DNA // FEBS Letters. 1980. V. 116. P. 14-16.

William H. M., Hoisington D., Singh R. P., González-de-León D. Detection of quantitative trait loci associated with leaf rust resistance in bread wheat // Genome. 1997. V. 40. P. 253-260.

William M., Singh R. P., Huerta-Espino J. et al. Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr*46 and its association with stripe rust resistance gene *Yr29* in wheat // Phytopathology. 2003. V. 93. № 2. P. 153-159.

Winzeler, M., Winzeler, H., Keller, B. Endopeptidase polymorphism and linkage of the Ep-Dlc null allele with the *Lr*19 leaf rust resistance gene in hexaploid wheat // Plant Breed. 1995. V. 114. P. 24-28.

Yamamori M. An N-band marker for gene *Lr*18 for resistance to leaf rust in wheat // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 89. P. 643-646.

П Р И Л О Ж Е Н И Е

а

б

в

г

д

е

Ржавчинные болезни зерновых культур:

а – стеблевая ржавчина ржи;
б – желтая ржавчина пшеницы;
в – бурая ржавчина ржи;
г – корончатая ржавчина овса;
д – оценка устойчивости сортов пшеницы к бурой ржавчине с использованием отрезков листьев, помещенных в раствор бензимидазола;
е – размножение возбудителя бурой ржавчины на отрезках листьев.

а

б

в

г

Головневые болезни зерновых:

а – здоровые (справа) и пораженные *T. caries* колосья пшеницы;
б – симптомы поражения пшеницы *U. tritici*;
в – симптомы поражения ячменя *U. nuda*;
г – симптомы поражения *U. zeae*.

а б

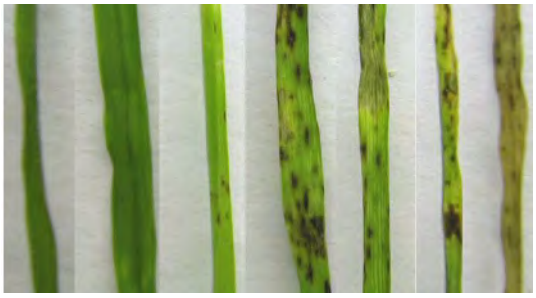
в

0 1 2 3 4

г

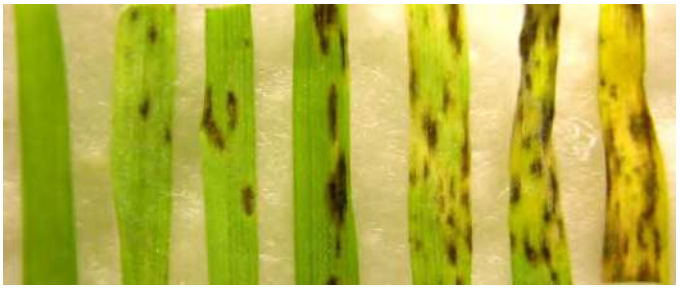
Мучнистая роса:

а – поражение растений пшеницы в поле;
б – пустулы гриба с клейстотециями;
в – шкала учета поражения проростков;
г – мучнистая роса на проростках ячменя.



0 1 2 3 4 5 6

а

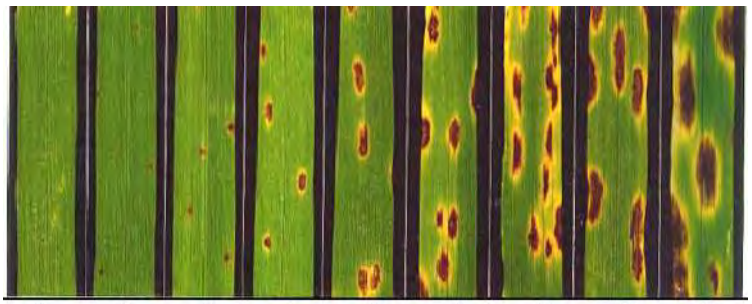


0 1 2 3 4 5 6

б

1 2 4 6

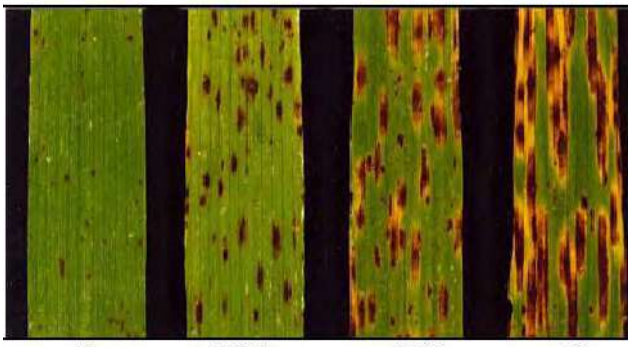
в



1 2 3 4 5 6 7 8 9

г

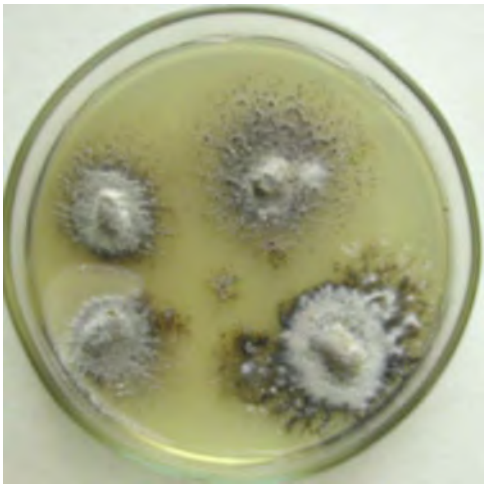
д



R MR MS S

Темно-бурая листовая пятнистость

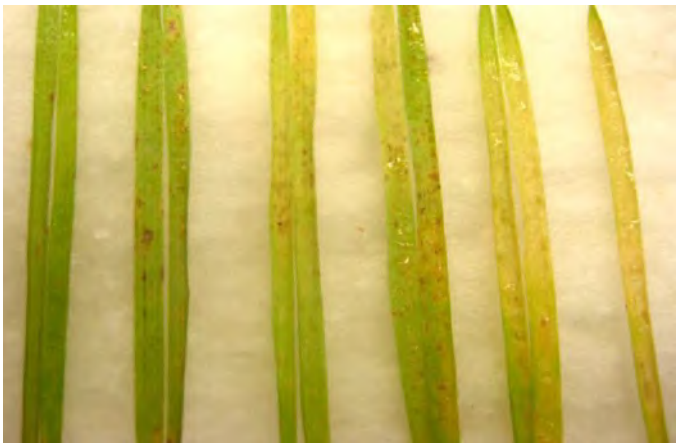
Шкалы учета поражения *B. sorokiniana*:
а – интактных ювенильных растений;
б – отрезков листьев ювенильных растений;
в – флаг-листьев;
в – листьев ювенильных растений ячменя (по Fetch, Steffenson, 1997);
г – флаг-листьев растений ячменя (по Fetch, Steffenson, 1997).



а

б

в



1 2 3 4 5 6

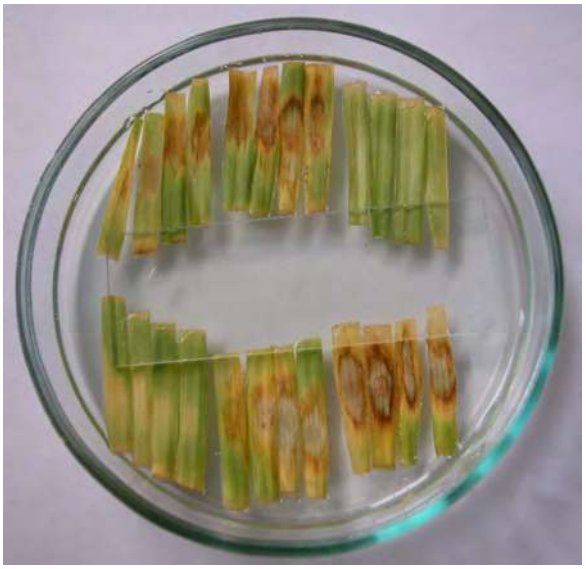
г

д

Септориоз:

а – рост *S. nodorum* на искусственной питательной среде КДА;
б – размножение *S. nodorum* на сыпучем субстрате (перловая крупа);
в – шкала учета поражения интактных ювенильных растений пшеницы;
г – поражение септориозом отсеченных колосьев пшеницы и эгилопса;
д – массовая оценка устойчивости образцов пшеницы при инокуляции отрезков листьев.

а



б

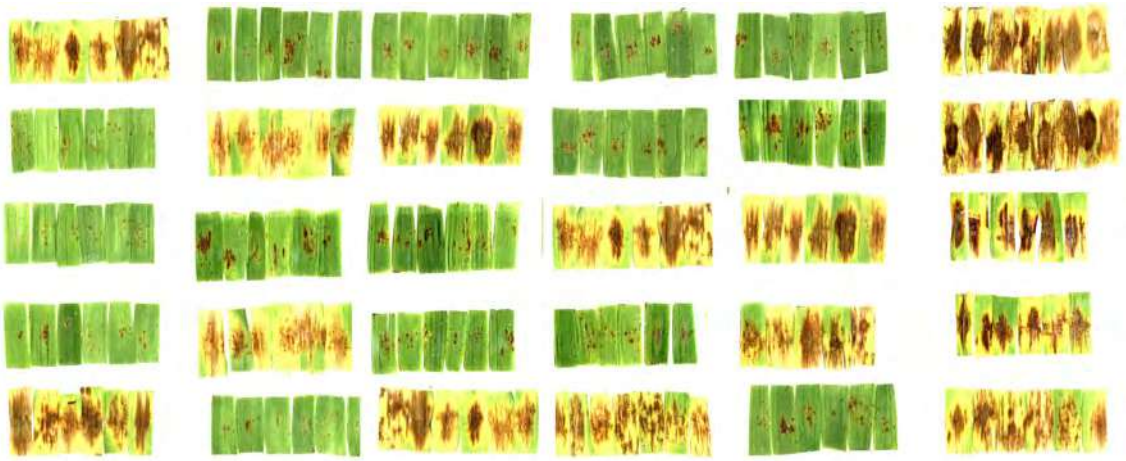
в

г

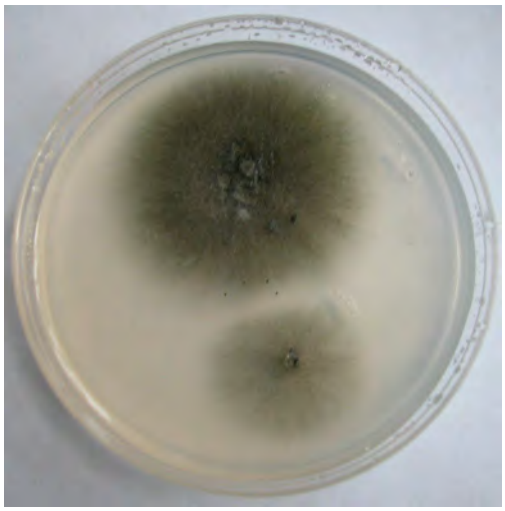
Ринхоспориоз ячменя:

а – симптомы поражения растений в поле;
б – типы реакций на внедрение *R. secalis* у образцов ячменя, различающихся по устойчивости к патогену;
в – черный и палевый изоляты *R. secalis*;
г – клоны, выделенные из черного изолята *R. secalis*.

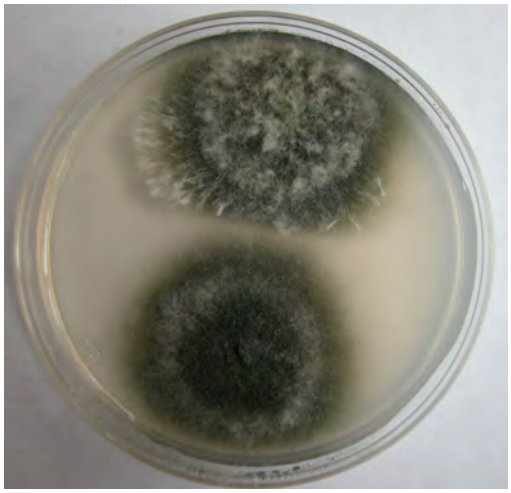
а



б



в



г

д

Сетчатая пятнистость ячменя:

а – типы реакций на внедрение *D. teres* у образцов ячменя, различающихся по устойчивости к патогену;

б – изолят *D. teres* с гладким черным мицелием;

в – изолят *D. teres* со снопообразными выростами мицелия;

г – клоны, выделенные из изолята *D. teres* со снопообразными выростами мицелия;

д – симптомы болезни формы “net” (слева) и “spot” (справа).

а

б

в

Листовые пятнистости овса:

а – септориоз;
б – палевая некротическая пятнистость;
в – красно-бурая пятнистость.

а б в

г д е ж

з

Фузариоз колоса:

а – симптомы заболевания на пшенице;
б – симптомы заболевания на ячмене;
в – симптомы заболевания на ржи;
г – симптомы заболевания на тритикале;
д – симптомы заболевания на овсе;
е – *Gebberella zeae* (перитеции);
ж – нетипичные симптомы заболевания;
з – здоровые и пораженные семена ржи.

а

1 2 3 4 5 6

б

в

Обыкновенная корневая гниль:

а – шкала учета поражения ювенильных растений;
б – поражение колеоптиле ячменя (по Mathre et al., 2003);
в – поражение корневой системы взрослых растений пшеницы (по Mathre et al., 2003)

а

б

в

г

1 3 5 7 9

д

е

Злаковые тли:

а – большая злаковая толя *Sitobion avenae*;
б – ячменная (Русская пшеничная) тля *Diuraphis noxia*;
в – обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum*;
г – шкала повреждения (1–9 баллов) листьев сорго *S. graminum*;
д – большая злаковая тля на пшенице;
е – колония кукурузной тли *Rhopalosiphum maidis*.

а

б

в

г

д

е

Кукурузный мотылек *Ostrinia nubilalis*:

а – самка;
б – самец;
в – кладка яиц;
г – гусеница 5 возраста;
д – куколка;
е – стебель кукурузы, поврежденный кукурузным мотыльком.

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Введение……..……..……..……..……..3

1. Изучение устойчивости зерновых культур к грибным болезням……...5

1.1. Методы изучения устойчивости зерновых культур к болезням, вызываемым облигатными паразитами…….……..……5

Ржавчинные болезни зерновых культура (Гультяева Е.И., Солодухина О.В.).5

Головневые болезни зерновых культур (Кривченко В.И., Хохлова А.П.)…32

Мучнистая роса злаков (Кривченко В.И., Лебедева Т.В., Пеуша Х.О.)……86

1.2. Методы изучения устойчивости зерновых культур к болезням, вызываемым гемибиотрофными грибами……..……106

1.2.1. Методы работы с чистыми культурами грибов (Коновалова Г.С., Тырышкин Л.Г.) ……..……..…106

1.2.2. Листовые пятнистости……..……..……..112

Темно-бурая листовая пятнистость (Тырышкин Л.Г.) ……112

Септориоз листьев (Тырышкин Л.Г., Колесова М.А.) ……..121

Ринхоспориоз (Коновалова Г.С.) ……..……..…...129

Сетчатая пятнистость ячменя (Коновалова Г.С.).……..…...136

Пятнистости овса (Лоскутов И.Г.)……..……..…...142

1.2.3. Болезни колоса……..……..……..…….151

Фузариоз колоса (Ковалева М.М., Гагкаева Т.Ю.)…….151

Септориоз колоса (Тырышкин Л.Г., Колесова М.А)…….185

1.2.4. Корневые гнили (Тырышкин Л.Г., Колесова М.А.) ……..….187

2. Методы изучения устойчивости зерновых культур к насекомым…….196

2.1. Злаковые мухи (Семенова А.Г.)……...196

2.2. Злаковые тли (Радченко Е.Е.)……..214

2.3. Хлебные клопы (Вилкова Н.А., Нефедова Л.И.)……258

2.4. Стеблевые хлебные пилильщики (Вилкова Н.А., Нефедова Л.И.)……..270

2.5. Красногрудая пьявица (Вилкова Н.А., Нефедова Л.И.)……276

2.6. Кукурузный мотылек (Фролов А.Н.)……..282

3. Изучение генетического контроля устойчивости зерновых культур к вредным организмам ……..……..……..……...306

3.1. Идентификация генов устойчивости зерновых культур к вредным организмам (Радченко Е.Е., Одинцова И.Г.) ……306

3.2. Особенности гибридологического анализа у ржи (Солодухина О.В.)……332

3.3. Использование анеуплоидов в генетическом анализе (Ригин Б.В., Лебедева Т.В., Пеуша Х.О.)……..…344

3.4. Молекулярная идентификация генов устойчивости (Антонова О.Ю., Гультяева Е.И.) ……..……..……..373

Приложение……..……..……..……..…….417

Сдано в набор 12.11.07 г. Формат 60 ×84/16 Объем 26 п.л.
Тираж 500 экз. Заказ №

Типография Россельхозакадемии
115598, Москва, ул. Ягодная, 12