

К ВОПРОСУ О МЕТОДАХ ИСКУССТВЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ВОЗБУДИТЕЛЕМ ФОМОЗА *PHOMA MACDONALDII* BOER. В ТЕПЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Саукова С.Л., канд. биол. наук, Антонова Т.С., д-р биол. наук,
Арасланова Н.М., канд. с.-х. наук, Ивебор М.В., канд. с.-х. наук

ФГБНУ «Федеральный научный центр
«Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур
имени В.С. Пустовойта», Российская Федерация, г. Краснодар

Аннотация. При испытании двух методов искусственного заражения растений подсолнечника в фазе первой пары настоящих листьев в основание листового черешка наиболее агрессивными изолятами *Phoma macdonaldii* в условиях теплицы выявлены разные типы иммунитета. Полученные результаты показали, что желательно использовать оба метода заражения и путём сопоставления результатов по баллам поражения отбирать генотипы, проявляющие сопротивление как внешних, так и внутренних тканей.

Ключевые слова. Подсолнечник, фомоз, *Phoma macdonaldii*, мицелий, пикнида, пикноспоры, искусственная инокуляция.

ON THE METHODS OF ARTIFICIAL INFECTION OF SUNFLOWER PLANTS WITH PHOMA ROT AGENT *PHOMA MACDONALDII* BOER. IN GREENHOUSE CONDITIONS

Saukova S.L., Cand. Sc. (Biol.), Antonova T.S., Dr. Sc. (Biol.),
Araslanova N.M., Cand. Sc. (Agric.), Iwebor M.V., Cand. Sc. (Agric.)

FSBSI «Federal scientific center «All-Russian Research Institute of Oil crops
by V.S. Pustovoi», Russian Federation, Krasnodar

Abstract. Different types of immunity were revealed during testing of two methods of artificial infection of sunflower plants in the base of the leaf stalk with the most aggressive isolates of *Phoma macdonaldii* at the stage of the first pair of true leaves in greenhouse conditions. The obtained results showed that it is preferable to use both methods of infection and, by comparing the results on affection scores, to select genotypes that show resistance of both external and internal tissues.

Keywords. Sunflower, Phoma rot, *Phoma macdonaldii*, mycelium, pycnidium, pycnosporos, artificial inoculation.

Фомоз, или черная стеблевая пятнистость (возбудитель *Phoma macdonaldii* Boerema) входит в число наиболее распространенных болезней подсолнечника во всем мире [1, 2]. Инфицированию подвержены все органы растения подсолнечника всех фенологических стадий [3, 4]. В благоприятные для развития болезни годы потери урожая составляли от 30 % в Европе [5] и до 70 % в США [6]. В Краснодарском крае распространённость фомоза на подсол-

нечнике отмечалась ежегодно и за период 1992-2004 гг. колебалась от 3 до 44 % [7]. Частота встречаемости в партиях семян подсолнечника Волгоградской области возбудителя фомоза в 2016-2017 гг. составила 0,33 и 0,17 % соответственно [8]. Это свидетельствует, что происходит накопление инфекции на растительных остатках и падалице семян, что в дальнейшем приводит к увеличению распространенности фомоза. Решением данной проблемы может стать рациональная селекция подсолнечника на устойчивость к фомозу. Главная цель селекционных отборов (все равно, связаны ли они с искусственным заражением или проводятся в естественных условиях) заключается в обнаружении различий между устойчивыми и восприимчивыми растениями. Изыскание тепличных методов оценки устойчивости растений подсолнечника к фомозу вызвано необходимостью ускорения селекционной работы по созданию резистентных к этой болезни отечественных гибридов.

Целью нашей работы являлась апробация известных методов заражения растений подсолнечника, для выбора наиболее подходящего при инокуляции возбудителем фомоза в условиях теплицы.

В качестве инфекционного начала использовали изоляты возбудителя болезни *Phoma macdonaldii* выделенные с пораженных фомозом фрагментов стеблей подсолнечника, собранных в селекционном питомнике ВНИИМК и Красногвардейском районе Ставропольского края. Идентификацию видовой принадлежности проводили по систематике Воегема *et. al.*, 2004 [9]. Агрессивность изолятов определяли по ранее описанной методике [10].

Опыты по искусственному заражению растений подсолнечника закладывали в зимний период в условиях теплицы. Посев семян подсолнечника осуществляли в металлические короба, наполненные смесью песка и чернозема в соотношении 1:2. Схема опыта включала сорт ВНИИМК 8883, линию ВК-653 и гибрид Альтаир, с трёхкратной повторностью по 40 растений в каждой. Растения подсолнечника выращивали при температуре 25⁰ С и 16-часовом фотопериоде. Мицелий гриба *P. macdonaldii* выращивали в чашках Петри в течение двух недель на среде ОА (овсяный агар).

Растения подсолнечника, находящиеся в фазе второй пары настоящих листьев инокулировали двумя методами. Первый – в основание листового черешка первой пары настоящих листьев вводили уколom шприца 0,2 мл суспензии гриба *P. macdonaldii*, которую получали путем смыва кисточкой в стерильную воду мицелия и пикнид с пикноспорами, выращенных на среде ОА в чашках Петри. Концентрация суспензии составляла 1×10⁶ спор/мл. Контрольные растения получали инъекцию стерильной воды.

Второй метод состоял в прикладывании в пазухи листовых черешков первой пары настоящих листьев (без их травмирования), одинаковых по размеру агаровых высевок колоний гриба с мицелием, пикнидами и пикноспорами (1×1 см). В контрольном варианте прикладывали высежки стерильной среды ОА.

В обоих вариантах участок инокуляции покрывали влажной ватой, а сверху – фольгой. Вату смачивали ежедневно в течение одной недели. Учет проводили на 30-й день после заражения.

Процент пораженных стеблей и степень их поражения учитывали по разработанной нами 5-ти балльной шкале:

- 0 балл – нет некроза на стебле, зеленый лист;
- 1 балл – некроз на стебле до 0,3 см, лист засох, но оставался висеть на стебле;
- 2 балл – некроз на стебле (длина до 1 см);
- 3 балл – некроз на стебле до 2 см и появление кольцевого некроза;
- 4 балл – некроз на стебле более 2 см и перелом его.

Наиболее агрессивные изоляты гриба (№ 19 и 20) использовали для искусственного заражения растений подсолнечника в условиях теплицы.

При заражении путём инъекции первые симптомы болезни появились на 4-ый день от момента внесения инфекции. Патоген, проникая в ткани подсолнечника, вызывал некроз вокруг поранения, т.е. некротроф прежде чем оккупировать какой-либо участок растения, выделял в ткань хозяина токсические продукты (фитотоксины), которые убивали клетки, расширяя некроз – плацдарм существования паразита, таким образом, он питался содержимым мертвых клеток. Появившееся некротическое пятно распространялось на черешок и лист, который со временем засыхал, но оставался висеть на стебле. В дальнейшем на отдельных растениях пятна неправильной формы черного цвета распространялись вдоль стебля (рисунок – слева), достигали 4,0 см и иногда окольцовывали его.

При втором методе заражения – путём прикладывания высечек питательной среды ОА с мицелием гриба, пикнидами и пикноспорами (без травмирования), первые симптомы болезни появились позже – на 5-й день, и не на всех растениях каждого генотипа. Проникновение факультативного сапрофита через кутикулу растения требует затраты большой энергии патогена.



Рисунок. Поражение стебля подсолнечника гибрида Альтаир (указано стрелкой) на 20-й день после искусственного заражения грибом *Phoma macdonaldii* Воег. в пазуху черешка первой пары настоящих листьев в условиях теплицы (слева) и его продольный разрез (справа) (ориг.)

По литературным данным известно, что фитопатогенные грибы обладают большим набором ферментов, разрушающих углеводные полимеры, из которых

построены клеточные стенки растений. Гриб, проникая в клетку, колонизует ткань, что приводит к появлению внешних симптомов болезни. При продольном разрезе пораженных стеблей подсолнечника было видно, что мицелий гриба заселял поверхностные ткани (рисунок – справа), либо проникал в более глубокие слои до сердцевины, вызывая перелом растений. Признаки поражения растений подсолнечника разными изолятами *P. macdonaldii* были сходны при обоих методах заражения.

При заражении каждым методом учитывали процент растений подсолнечника со степенью поражения 2-4 балла. Стебли подсолнечника гибрида Альтаир, заражённые двумя разными изолятами поразились на 63-80 % при первом методе, а при втором – на 6-20 % соответственно (таблицы 1, 2). У сорта ВНИИМК 8883, процент пораженных растений при первом методе составил 48 и 60 %, а при втором – 7 и 10 %, соответственно.

Таблица 1

Поражение растений подсолнечника (%) на 30-й день после заражения инфекционным началом *Phoma macdonaldii* уколом в пазуху черешка первого настоящего листа

г. Краснодар, ВНИИМК, 2017 г.

Изолят возбудителя фомоза, №	Инокулированный генотип	Баллы поражения				
		0	1	2	3	4
20	ВНИИМК-8883	0	52	44	4	0
	Альтаир	0	37	56	3*	4
	ВК-653	0	66	21	7(3*)	6(3*)
19	ВНИИМК-8883	0	40	42	11	7*
	Альтаир	0	20	60	14(7*)	6(3*)
	ВК-653	0	44	33	13(3*)	10(3**)
Контроль (стерильная вода)	ВНИИМК-8883	100	0	0	0	0
	Альтаир	100	0	0	0	0
	ВК-653	100	0	0	0	0

Примечание: в скобках –* - кольцевой некроз на стебле; ** - перелом стебля.

Таблица 2

Поражение растений подсолнечника (%) на 30-й день после заражения, прикладыванием инфекционного начала изолятов *Phoma macdonaldii* в пазуху черешка первого настоящего листа

г. Краснодар, ВНИИМК, 2017 г.

Изолят возбудителя фомоза, №	Инокулированный генотип	Баллы поражения				
		0	1	2	3	4
20	ВНИИМК-8883	40	53	7	0	0
	Альтаир	40	40	0	17	3*
	ВК-653	29	42	12	13(8*)	4*
19	ВНИИМК-8883	50	40	3	7*	0
	Альтаир	37	57	0	3	3**
	ВК-653	0	50	17	12*	21(19*+2**)
контроль (овсяный агар)	ВНИИМК-8883	100	0	0	0	0
	Альтаир	100	0	0	0	0
	ВК-653	100	0	0	0	0

Примечание: в скобках – * - кольцевой некроз на стебле; ** - перелом стебля.

Следует отметить, что линия ВК-653 поразилась сильнее, чем сорт и гибрид. Об этом можно судить по наибольшему количеству пораженных растений по каждому изоляту при обоих методах заражения. Так, в первом варианте при заражении изолятом № 20 количество пораженных растений составило 34 %, а изолятом № 19 – 56 %, а во втором варианте – 29 и 50 % соответственно. Причем, при заражении каждым методом изолят № 19 вызывал перелом стебля.

Значительный процент растений имеет нулевую и первую степень поражения при прикладывании кусочка агара с мицелием, пикнидами и пикноспорами в пазуху черешка подсолнечника. Это свидетельствует о том, что в этом случае выявляются толерантные растения, покровные ткани которых сопротивляются проникновению возбудителя болезни, то есть этот метод может использоваться для дифференцирования селекционного материала. Инъекция инфекционного начала гриба уколom травмирует покровные ткани черешка, тем самым способствует быстрому развитию болезни, то есть игнорирует важную ступень защиты и при селекции на устойчивость такие растения не обязательно попадут в отбор.

Таким образом, при заражении описанными методами можно выявить разные типы иммунитета растений подсолнечника к фомозу: устойчивость покровных тканей листового черешка к проникновению возбудителя и устойчивость тканей листового узла и стебля к действию его токсинов. В селекции на долговременную устойчивость растений к болезням важно сочетать в одном генотипе разные типы иммунитета. Поэтому при оценке устойчивости к фомозу селекционных образцов подсолнечника желательно использовать оба метода заражения.

Литература

1. Hua Z., Ma G. A review of sunflower disease research in China // Proceedings of the Fourteenth International Sunflower Conference 2. Beijing, China. 10-12 June. 1996. P. 754-759.
2. McDonald W.C. *Phoma* black stem of sunflower // *Phytopathology*. 54. 1964. P. 492-493.
3. Алексеева С.П. Изучение видового состава и биологических особенностей возбудителей болезней подсолнечника в условиях Краснодарского края: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 1969. 24 с.
4. Арасланова Н.М., Саукова С.Л., Антонова Т.С. К вопросу о вредоносности *Phoma macdonaldii* Boerema на подсолнечнике // Науч.-техн. бюл. ВНИИМК. Вып. 3 (175). 2018. С. 117-123.
5. Maric A., Camprag D., Masirevic S. La tache noire du tournesol (*Phoma macdonaldii* Boerema; synonymes *Phoma oleraceae* var. *helianthi tuberosi* Sacc. Stad tenninal; *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi), (in Serbo Croatian), Bolesti I stetocine suncokretai njihovo suzbijanje. 1987. P. 37-45.

6. Smolik J. D., Walgenbach D. D., and Carson M. L. Initial evaluations of early dying of sunflower in South Dakota // Proc. Sunflower Res. Workshop, Fargo. 1983. P. 24-25.
7. Саукова С.Л., Арасланова Н.М., Антонова Т.С., Ивебор М.В. Фомоз (*Phoma macdonaldii* Boerema) в семенах подсолнечника // Науч.-техн. бюл. ВНИИМК. Вып. 2 (174). 2018. С. 107-111.
8. Бородин С.Г., Котлярова И.А. Грибные болезни подсолнечника в Краснодарском крае // Болезни и вредители масличных культур (сборник научных работ). 2006. С. 3-10.
9. Boerema G.H., De Gruyter J., Noordeloos M.E. and Hamers M.E.C. *Phoma* identification manual. In: *G Phoma* sect. *Plenodomus*, CABI Publishing, UK. P. 364-366.
10. Арасланова Н.М., Саукова С.Л., Антонова Т.С. Патогенность изолятов возбудителя фомоза для растений подсолнечника // В сб.: Инновационные исследования и разработки для научного обеспечения производства и хранения экологически безопасной сельскохозяйственной и пищевой продукции. Материалы Международной научно-практической конференции (6–26 апреля) ФГБНУ ВНИИТТИ. Краснодар, 2015. С. 71-74.