

Научная статья

УДК 633.854.78:575:631.52

DOI: 10.25230/2412-608X-2021-3-187-58-64

**К искусственному
заражению растений
подсолнечника современными
патотипами возбудителя
ржавчины для использования
в селекции на иммунитет**

**Нина Михайловна Арасланова
Татьяна Сергеевна Антонова
Светлана Леонидовна Саукова
Мария Вячеславовна Ивебор
Юлия Владимировна Питинова**

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 275-86-53

araslanova-nina@mail.ru

Ключевые слова: подсолнечник, ржавчина, *Puccinia helianthi*, урединии, урединиоспоры, прорастание, искусственное заражение, температурный режим

Для цитирования: Арасланова Н.М., Антонова Т.С., Саукова С.Л., Ивебор М.В., Питинова Ю.В. К искусственному заражению растений подсолнечника современными патотипами возбудителя ржавчины для использования в селекции на иммунитет // Масличные культуры. 2021. Вып. 3 (187). С. 58–64.

Аннотация. В условиях глобального потепления последнего десятилетия наблюдается интенсивное распространение ржавчины на полях подсолнечника в РФ, обусловленное появлением новых рас возбудителя. Очевидна необходимость селекции подсолнечника на устойчивость к новым патотипам и коррекции методики искусственного заражения растений применительно к ним. Селекция подсолнечника на устойчивость к ржавчине не проводилась с 80-х годов прошлого века. Цель исследования: определить оптимальный температурный диапазон для искусственного заражения листьев подсолнечника современными патотипами (300 и 700) возбудителя ржавчины. Работа вы-

полнена в лаборатории иммунитета ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК в период 2020–2021 гг. с использованием монопустульных изолятов *Puccinia helianthi* с кодами вирулентности 300 и 700. Изучали прорастание зрелых урединиоспор, продолжительность инкубационного периода и степень поражения растений подсолнечника при разных температурных режимах. Показано, что инкубационный период патотипов 300 и 700 *P. helianthi* при температурном режиме 26–28 °С сокращается на 2–3 дня, что имеет существенное значение как для быстрой идентификации расовой принадлежности изолятов возбудителя, так и для сокращения срока оценки генотипов подсолнечника при селекции на иммунитет. Для ускорения этой работы заражение растений подсолнечника осуществлять в фазе первой пары настоящих листьев при температуре 22 °С с последующим 24-часовым пребыванием их во влажной камере при 20 °С и дальнейшим увеличением температурного режима выращивания до 26–28 °С.

UDC 633.854.78:575:631.52

To artificial inoculation of sunflower plants with modern pathotypes of rust for breeding on immunity.

N.M. Araslanova, PhD in agriculture

T.S. Antonova, head of the lab., doctor of biology

S.L. Saukova, PhD in biology

M.V. Ivebor, PhD in agriculture

Yu.V. Pitinova, analyst

V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 275-86-53

araslanova-nina@mail.ru

Key words: sunflower, rust, *Puccinia helianthi*, uredinium, urediniospores, germination, artificial inoculation, temperature regime

Abstract. Under global warming of the last decade, there is observed an intensive spread of rust in sunflower fields in the Russian Federation, due to the emergence of new races of the pathogen. It is obvious that there is a need to breed sunflower for resistance to new pathotypes and to correct the technique of artificial inoculation of plants in relation to them. Sunflower breeding for rust resistance has not been carried out since the 1980s. Objective of the study is determining the optimal temperature range for artificial inoculation of sunflower leaves with modern pathotypes (300 and 700) of the rust pathogen. The work was performed in the laboratory of immunity of

the V.S. Pustovoi All-Russian Research Institute of Oil Crops in 2020–2021 using monopustular isolates of *Puccinia helianthi* with virulence codes 300 and 700. The germination of mature urediniospores, the duration of the incubation period and the degree of damage to sunflower plants at different temperatures were studied. The incubation period of pathotypes 300 and 700 of *P. helianthi* at a temperature of 26–28 °C is reduced by 2–3 days, which is essential both for the rapid identification of the racial identity of the pathogen isolates and for shortening the period for assessing sunflower genotypes when breeding for immunity. To speed up this work, the infection of sunflower plants should be carried out in the phase of the first pair of true leaves at a temperature of 22 °C, followed by a 24-hour stay in a humid chamber at 20 °C and a further increase in the growing temperature to 26–28 °C.

Введение. В последние годы происходит интенсивное распространение ржавчины на подсолнечнике в России. В некоторых регионах периодически возникают эпифитотии [1; 2]. Связано это с расширением посевных площадей подсолнечника, нарушениями севооборотов и появлением новых рас возбудителя. Проведённая нами идентификация расовой принадлежности возбудителя ржавчины из некоторых регионов возделывания подсолнечника в РФ позволила выявить новые патотипы, среди которых чаще встречался обозначенный кодовым номером 700, наравне со старой расой 300, существовавшей ещё в 80-х годах прошлого века [3]. Действенным и экологически безопасным методом контроля ржавчины является селекция на устойчивость. Для успешной селекции необходим надёжный метод искусственного заражения растений. В 80-е годы прошлого века был разработан и успешно применялся метод оценки устойчивости растений подсолнечника при искусственном заражении возбудителем ржавчины [4]. При этом были определены оптимальные климатические режимы для инокуляции и выращивания растений. Известно, что ржавчинные грибы требовательны к температуре, и для прорастания спор разных видов возбудителя, паразитирующих да-

же лишь на одной культуре, необходимы разные температурные режимы [5]. Основным источником распространения ржавчины на растениях подсолнечника в период их вегетации являются урединиоспоры. При сложившихся для патогена благоприятных условиях за период вегетации возбудитель может производить огромное количество этих спор, что способствует нарастанию степени поражения. Инфекционный процесс начинается с прорастания урединиоспор и продолжается до образования на листьях новых урединий. Успех этого процесса определяется тем, насколько близка температура окружающей среды к оптимальной для патогена. Многие авторы отмечали приуроченность возбудителя ржавчины к относительно прохладной погоде с повышенной влажностью и считали оптимальной температуру 18–21 °C [6; 7]. Однако все исследования по биологии возбудителя ржавчины подсолнечника в РФ относятся к 40, 60, 80-м годам прошлого века, когда самой распространённой расой была раса 1 (по современной номенклатуре 100). За последние 30 лет погодные условия в регионах возделывания подсолнечника в РФ характеризуются повышенной температурой по сравнению со средней многолетней. Так, например, в Тамбовской области распространение ржавчины до 100 % при интенсивности поражения до 80 % наблюдалось в 2010 и 2015 гг., когда средняя температура в июле составляла 28,2 °C [8]. Правильно подобранный температурный режим при искусственном заражении растений подсолнечника возбудителем ржавчины – один из главных факторов успеха селекционной работы при выявлении устойчивых генотипов.

Цель данного исследования: уточнить влияние относительно пониженных температур на *Puccinia helianthi* – возбудителя ржавчины подсолнечника в РФ, и определить оптимальный температурный диапазон для искусственного заражения листьев подсолнечника современными

патотипами возбудителя ржавчины в лабораторных условиях.

Материалы и методы. Исследования проведены в лаборатории иммунитета отдела биологических исследований ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК в 2020–2021 гг. Объектом исследования служили монопустульные изоляты *P. helianthi* с кодами вирулентности 300 и 700, которые выделяли и размножали на восприимчивом сорте подсолнечника ВНИИМК 8883.

Изучали прорастание при разных температурах зрелых урединиоспор, которые легко высыпались из пустул (урединий) (рис. 1).



Рисунок 1 – Споры (показаны стрелкой) патотипа *Puccinia helianthi* Schwein с кодом вирулентности 300, высыпавшиеся из урединий (у), обозначенных белыми стрелками

Свежесобранные и хранившиеся в морозильной камере при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение одного и двух месяцев урединиоспоры помещали в чашки Петри диаметром 9 см с 10 мл стерильной воды. В один из вариантов добавляли фрагмент зелёного листа подсолнечника размером $1,5\text{--}2\text{ см}^2$. Чашки выдерживали при разных температурных режимах: 18, 20, 22, 25 $^{\circ}\text{C}$. Через 1 и 4 часа подсчитывали в 10 полях зрения количество проросших и непроросших спор с помощью микроскопа (Motic VA 310) при увеличении 10х. Фотографии урединиоспор делали при увеличении 40х (рис. 2). Определяли процентное соотношение количества про-

росших спор к их общему количеству в поле зрения.

Заражали суспензией урединиоспор предварительно выращенные растения подсолнечника в фазе одной и двух пар настоящих листьев. Семена восприимчивого к ржавчине сорта ВНИИМК 8883 по 10 штук высевали в двухкилограммовые пластиковые горшки, наполненные смесью почвы и песка в соотношении 2 : 1.

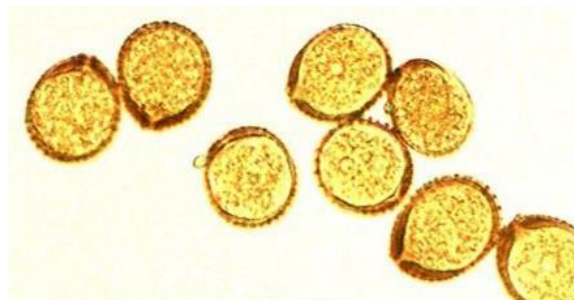


Рисунок 2 – Урединиоспоры *Puccinia helianthi* Schwein при увеличении 40х (ориг.)

Растения выращивали в камере «Биотрон-5» при оптимальных для подсолнечника режимах освещённости и температуры. В каждом варианте было по 20 учётных растений. Заражение растений проводили путём опрыскивания суспензиями урединиоспор монопустульных изолятов рас 300 и 700 возбудителя ржавчины. Концентрация каждой суспензии составляла 110 тысяч урединиоспор в 1 мл воды. После инокуляции через 40–60 мин растения помещали на 24 ч во влажную камеру при температуре 20 $^{\circ}\text{C}$. Далее размещали их при температурных режимах 22, 24, 26 и 28 $^{\circ}\text{C}$. Учитывали продолжительность латентного (инкубационного) периода в зависимости от температуры после заражения, возраста растений и кода вирулентности возбудителя. Количество образовавшихся урединий на одном семядольном и одном настоящем листе каждого учётного растения подсчитывали на 9-й день после заражения. Экспериментальные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа [9].

Результаты и обсуждение. В результате исследований установлено, что поражаемость листьев подсолнечника и особенно степень поражения находятся в прямой зависимости от величины инфекционной нагрузки и жизнеспособности урединиоспор.

Далеко не все урединиоспоры могут быть жизнеспособными и вызывать поражение даже при наличии оптимальных для этого условий. В этой связи у облигатных паразитов количество спор, необходимое для искусственного заражения, исчисляется сотнями в 1 мл суспензии. Так, например, возбудителю ржавчины пшеницы для того чтобы образовалась одна или несколько пустул требуется более ста урединиоспор [5]. Поэтому имеет значение проверка способности к прорастанию спор, используемых в приготовлении суспензии для инокулирования листьев подсолнечника.

Урединиоспора *P. helianthi* Schwein имеет две диаметрально расположенные поры, через которые осуществляется её прорастание появлением ростковой трубки (рис. 3).

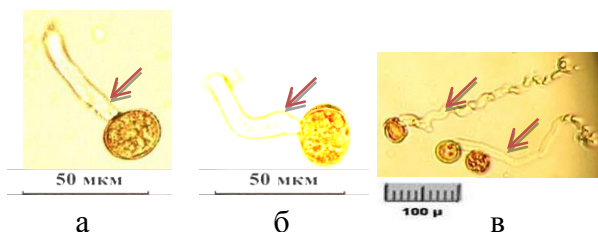


Рисунок 3 – Проросшие в воде урединиоспоры *Puccinia helianthi* Schwein, стрелками обозначены ростковые трубки (увеличение: а, б – 40х; в – 10х) (ориг.)

Процесс образования ростковых трубок в большой степени зависит от условий хранения и зрелости урединиоспор, а также от температуры окружающей среды и наличия влаги. По нашим наблюдениям, зрелые, только что собранные урединиоспоры начинали прорастать через час их пребывания в контакте с водой при температуре 25 °С. Любой срок хранения в морозильной камере замедлял прорастание спор на 2–3 часа.

При температуре 18 °С количество проросших спор было минимальным независимо от кода вирулентности и присутствия фрагмента листа подсолнечника. При 20, 22 и 25 °С присутствие зелёного листа стимулировало прорастание спор. У обеих рас наибольший процент проросших спор (56 и 49 %) был при 20 и 25 °С (52 и 47 %) (табл. 1). При этом у патотипа 300 количество проросших спор всегда было больше при всех изученных температурных режимах и одинаковых условиях хранения спор до инокуляции. Мы полагаем, это может быть связано с тем, что эта старая раса в эволюционном плане более совершенна и пластична, чем появившаяся в РФ сравнительно недавно раса 700. Как известно, у облигатных паразитов интенсивно развиваются и совершенствуются в первую очередь свойства, обеспечивающие завоевание плацдарма, с которого пойдёт его дальнейшее развитие в растении-хозяине.

Таблица 1

Количество проросших урединиоспор *Puccinia helianthi* Schwein патотипов 300 и 700 (%) через 4 часа пребывания в воде в зависимости от температурных условий и наличия фрагмента зелёного листа подсолнечника

ВНИИМК, 2020–2021 гг.

Вирулентный код	Количество проросших урединиоспор (%) при температуре, °С							
	18		20		22		25	
	*1	**2	1	2	1	2	1	2
300	3	5	41	56	32	45	34	52
700	2	4	28	49	29	38	28	47

Прорастание: *1 – в воде;

**2 – в воде с фрагментом листа

В селекционной практике при искусственном заражении растений подсолнечника определение жизнеспособности урединиоспор перед инокуляцией является необходимым элементом в коррекции инфекционной нагрузки. Данные таблицы 1 свидетельствуют о том, что для определения жизнеспособности урединиоспор при использовании в приготовлении инокулята достаточно проращивать их при 20–25 °С в присутствии фрагмента листа подсолнечника.

Процесс заражения листа подсолнечника начинается с проникновения ростковой трубки споры возбудителя ржавчины в устьице. Ему способствуют наличие воды и оптимальные температурные условия.

Наиболее интенсивный рост и спорообразование гриба были отмечены при температурах 26 и 28 °С на всех инфицированных растениях. Первый симптом успешного заражения – бледно-зелёные точечные пятна на настоящих листьях – появлялся на 5–6-й день после заражения (рис. 4).



Рисунок 4 – Первый симптом (точечная бледно-зелёная пятнистость) поражения возбудителем ржавчины *Puccinia helianthi* Schwein листа подсолнечника при температуре 26 °С (ориг.)

Первые урединии на семядольных и настоящих листьях при такой температуре появлялись на 6–7-й день, тогда как при других режимах – на 8–9-й день. Степень поражения – среднее количество урединий, сформировавшихся в дальнейшем на одном листе, всегда превышала минимальное значение (5 урединий), описанное в работе Yang с соавторами [10], при заражении как первой, так и второй пар настоящих листьев обоими патотипами при всех изученных температурных режимах (рис. 5).

Наивысшая степень поражения учётных растений расой 300 была отмечена при температуре 22 °С и существенно на 5%-ном уровне значимости превосходила таковую при других температурных режимах. Как сказано выше, раса 300 уже имела на полях РФ в 80-х годах прошлого века, когда средние суточные температуры воздуха были ниже, чем в настоящее время.



Рисунок 5 – Урединии на семядольном (слева) и первом листе (справа) растений подсолнечника, зараженных в фазе первой пары настоящих листьев патотипом 300 *Puccinia helianthi* Schwein, при температуре 22 °С (ориг.)

Наши данные показывают, что эта раса адаптирована к более низким температурам, хотя она проявила себя достаточно пластичной и способной успешно развиваться в широком диапазоне температур при наличии других необходимых для её жизнедеятельности факторов.

При температурах 26 и 28 °С количество урединий расы 300 на учётных листьях через 9 дней после заражения растений разного возраста (фазы 1-й и 2-й пар настоящих листьев) не имело существенных различий и было достаточно высоким для дифференциации восприимчивых генотипов подсолнечника (табл. 2).

Таблица 2

Среднее количество урединий, образовавшихся при искусственном заражении расой 300 возбудителя ржавчины растений подсолнечника сорта ВНИИМК 8883 разного возраста при разных температурах, через 9 дней после заражения

ВНИИМК, 2020–2021 гг.

Учётный лист	Количество урединий (шт./лист) при температуре, °С				
	22	24	26	28	НСР ₀₅
Фаза развития растений: первая пара настоящих листьев					
Семядольный	21,6	25,1	12,7	13,8	6,84
Настоящий	81,7	31,5	50,1	39,7	19,3
Фаза развития растений: вторая пара настоящих листьев					
Семядольный	36,2	18,9	10,4	16,0	8,9
Настоящий	101,4	97,4	45,9	47,0	17,9

Инфекционный процесс у растений, заражённых расой 700 в условиях изу-

ченного диапазона температур, проходил с образованием меньшего количества урединий (рис. 6).



Рисунок 6 – Урединии *Puccinia helianthi* Schwein расы 700 на семядольном (слева) и настоящем (справа) листьях подсолнечника при температуре 28 °С (ориг.)

Возраст растений в момент заражения повлиял на количество урединий. На растениях, имевших вторую пару настоящих листьев, количество образовавшихся пустул расы 700 почти в два раза превышало таковое у инфицированных в стадии первой пары. Однако в диапазоне изученных температур, достоверных на 5%-ном уровне значимости, различий по среднему количеству урединий выявлено не было (табл. 3).

Количество пустул, образовавшихся при заражении как первой пары настоящих листьев, так и второй, было достаточным для идентификации восприимчивых генотипов подсолнечника.

Таблица 3

Среднее количество урединий, образовавшихся при искусственном заражении расой 700 возбудителя ржавчины растений подсолнечника сорта ВНИИМК 8883 разного возраста при разных температурах

ВНИИМК, 2020–2021 гг.

Учётный лист	Количество урединий (шт./лист) при температуре, °С				
	22	24	26	28	НСР ₀₅
Фаза развития растений: первая пара настоящих листьев					
Семядольный	7,9	7,3	3,9	4,2	2,3
Настоящий	29,6	28,1	24,0	22,6	6,7
Фаза развития растений: вторая пара настоящих листьев					
Семядольный	10,4	7,6	9,0	8,0	3,7
Настоящий	45,6	42,0	32,7	41,2	11,0

Выводы. Для определения жизнеспособности можно использовать как свежесобранные, так и замороженные урединиоспоры *Puccinia helianthi* Schwein. Хранение в замороженном состоянии замедляет процесс прорастания спор на 2–3 часа по сравнению со свежесобранными. Присутствие фрагмента зелёного листа подсолнечника в воде, используемого для прорастания, увеличивает процент проросших спор.

Инкубационный период патотипов 300 и 700 *P. helianthi* при температурном режиме 26–28 °С сокращается на 2–3 дня, что имеет существенное значение как для быстрой идентификации расовой принадлежности изолятов возбудителя, так и для ускорения срока оценки генотипов подсолнечника при селекции на иммунитет. Существенное значение для ускорения этой работы имеет также заражение растений подсолнечника в фазе первой пары настоящих листьев при температуре 22 °С с последующим 24-часовым пребыванием их во влажной камере при 20 °С и дальнейшим увеличением температурного режима выращивания до 26–28 °С.

Список литературы

1. Децына А.А., Терещенко Г.А., Илларионова И.В. Распространённость ржавчины на сортах подсолнечника в условиях Краснодарского края // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2018. – Вып. 2 (174). – С. 101–106.
2. Выприцкая А.А., Кузнецов А.А. Ржавчина на посевах подсолнечника в Тамбовской области // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2020. – № 3 (62). – С. 26–29.
3. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Ивёбор М.В., Саукова С.Л., Путинова Ю.В. Новые расы *Puccinia helianthi* Schwein – возбудителя ржавчины подсолнечника в Российской Федерации // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2020. – № 5. – С. 23–26.

4. Слюсарь Э.Л. Метод искусственного заражения подсолнечника ржавчиной // Селекция и семеноводство масличных культур. – Краснодар, 1980. – С. 18–21.

5. Степанов К.М., Чумаков А.Е. Прогноз болезней сельскохозяйственных растений. – Л.: Колос, 1972. – 271 с.

6. Sackston W.E. Studies on sunflower rust. III. Occurrence, distribution, and significance of races *Puccinia helianthi* // Can. J. Bot. – 1962. – No 40. – P. 1449–1458.

7. Выприцкая А.А., Кузнецов А.А., Пучнин А.М. Базидиальные грибы – патогены подсолнечника в Тамбовской области // Вестник ТГУ. – 2014. – Т. 19. – Вып. 6. – С. 2013–2017.

8. Выприцкая, А.А. Микобиота подсолнечника в Тамбовской области: монография. – Тамбов: Принт-Сервис, 2005. – 144 с.

9. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

10. Yang S.-M., Antonell E.F., Luciano A., Lucian N.D. Reactions of Argentine and Australian sunflower rust differentials to four North American cultures of *Puccinia helianthi* from North Dakota // Plant Disease. – 1986. – 70. – P. 883–886.

References

1. Detsyna A.A., Tereshchenko G.A., Illarionova I.V. Rasprostranennost' rzhavchiny na sortakh podsolnechnika v usloviyakh Krasnodarskogo kraya // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – 2018. – Вып. 2 (174). – S. 101–106.

2. Vypritskaya A.A., Kuznetsov A.A. Rzhavchina na posevakh podsolnechnika v Tambovskoy oblasti // Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2020. – № 3 (62). – S. 26–29.

3. Antonova T.S., Araslanova N.M., Ivebor M.V., Saukova S.L., Pitinova Yu.V. Novye rasy *Puccinia helianthi* Schwein – vozбудitelya rzhavchiny podsolnechnika v Rossiyskoy Federatsii // Vestnik rossiyskoy

sel'skokhozyaystvennoy nauki. – 2020. – № 5. – S. 23–26.

4. Slyusar' E.L. Metod iskusstvennogo zarazheniya podsolnechnika rzhavchiny // Seleksiya i semenovodstvo maslichnykh kul'tur. – Krasnodar, 1980. – S. 18–21.

5. Stepanov K.M., Chumakov A.E. Prognoz bolezney sel'skokhozyaystvennykh rasteniy. – L.: Kolos, 1972. – 271 s.

6. Sackston W.E. Studies on sunflower rust. III. Occurrence, distribution, and significance of races *Puccinia helianthi* // Can. J. Bot. – 1962. – No 40. – P. 1449–1458.

7. Vypritskaya A.A., Kuznetsov A.A., Puchnin A.M. Bazidial'nye griby – patogeny podsolnechnika v Tambovskoy oblasti // Vestnik TGU. – 2014. – Т. 19. – Вып. 6. – S. 2013–2017.

8. Vypritskaya, A.A. Mikobiota podsolnechnika v Tambovskoy oblasti: monografiya. – Tambov: Print-Servis, 2005. – 144 s.

9. Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

10. Yang S.-M., Antonell E.F., Luciano A., Lucian N.D. Reactions of Argentine and Australian sunflower rust differentials to four North American cultures of *Puccinia helianthi* from North Dakota // Plant Disease. – 1986. – 70. – P. 883–886.

Сведения об авторах

Н.М. Арасланова, вед. науч. сотр., канд. с.-х. наук

Т.С. Антонова, зав. лаб. иммунитета, гл. науч. сотр., д-р биол. наук

С.Л. Саукова, ст. науч. сотр., канд. биол. наук

М.В. Ивебор, вед. науч. сотр., канд. с.-х. наук

Ю.В. Питинова, аналитик

Получено/Received

31.08.2021

Получено после рецензии/Manuscript peer-reviewed

06.09.2021

Получено после доработки/Manuscript revised

08.09.2021

Принято/Accepted

15.10.2021

Manuscript on-line