

ЖЕЛТАЯ ПЯТНИСТОСТЬ ПШЕНИЦЫ *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS* В БЕЛАРУСИ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

М.В. Подорский, мл. научный сотрудник, **Ю.К. Шашко**, канд. с.-х. наук,

М.Н. Шашко, научный сотрудник

Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию

(Поступила 12.02.2016 г.)

Аннотация. В статье изложены результаты исследований по изучению возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis*. Проведена идентификация болезни в полевых условиях, отработаны методы выделения возбудителя в чистую культуру. Также были изучены питательные среды с различным составом с целью выявления среды для оптимального роста и спороношения. Изучен различный вид структурных компонентов колоний в зависимости от среды. В результате проведенных исследований было выявлено, что оптимальными средами для стабильного получения высококачественного инокулюма возбудителя *Pyrenophora tritici-repentis* являются овсяный и соломенный агар.

Возбудителем желтой пятнистости пшеницы является аскомицет *Pyrenophora tritici-repentis* с несовершенной стадией *Drechslera tritici-repentis*. Он относится к классу *Ascomycetes*, подкласс *Dothideomycetidae*, порядок *Pleosporales*, семейство *Pleosporaceae*. Желтая пятнистость озимой пшеницы была впервые описана в 1823 г. (*Sphaeriatrichostoma* Fr., Syst. mycol. (Lundae)) и обнаружена в Европе, США и Японии в начале 1900-х годов [8]. Данная болезнь является одной из наиболее вредоносных грибных заболеваний на пшенице.

По данным различных исследователей, пиренофороз был отмечен и в таких странах, как Австралия, Аргентина, Бельгия, Бразилия, Боливия, Канада, Колумбия, Чешская Республика, Дания, Эквадор, Франция, Венгрия, Кения, Пакистан, Парагвай, Перу, Соединенные Штаты Америки, Польша, Россия и Казахстан [3, 4, 6, 7, 10].

Желтая пятнистость озимой пшеницы, или пиренофороз – новое и опасное заболевание для Республики Беларусь. Впервые у нас оно было описано в книге С.Ф. Буга «Теоретические и практические основы химической защиты зерновых культур от болезней в Беларуси» в 2013 г. [1]. Средние потери урожая достигают 10-25%, в условиях эпифитотий – 40-60% [5]. В связи с этим встает вопрос о целенаправленном изучении биологии возбудителя, его выделении и создании искусственных инфекционных фонов с целью отбора сортообразцов пшеницы с устойчивостью к *Pyrenophora tritici-repentis*.

Цель исследований: выделить патоген в чистую культуру и подобрать оптимальные условия культивирования для получения высококачественного инокулюма.

Объекты и методы исследования. Инфекционный материал собирался в 2015 г. на пожнивных остатках пшеницы, выращиваемой на опытных полях РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

С целью получения среды для оптимального роста и спороношения *Pyrenophora tritici-repentis* нами были изучены питательные среды со следующим составом: **V-4** (150 мл смеси соков четырех овощей: свеклы, сельдерея, моркови и томата в соотношении 4:3:2:1 соответственно, 850 мл воды, 1,5 г СаСО₃, 20 грамм агара на 1 литр воды) [4]; **КГА** (отвар 200 г картофеля, 20 г глюкозы, 20 г агара на 1 литр воды) [2]; **соломенный агар** (отвар 50 г пшеничной соломы, 20 г глюкозы, 20 г агара на 1 литр воды); **овсяный агар** (отвар 125 г овсяных хлопьев Экстра №3, 20 г агара на 1 литр воды).

Среды автоклавировались в автоклаве LabTech 5040S в стандартном режиме, в течение 30 минут при 1,5 атм.

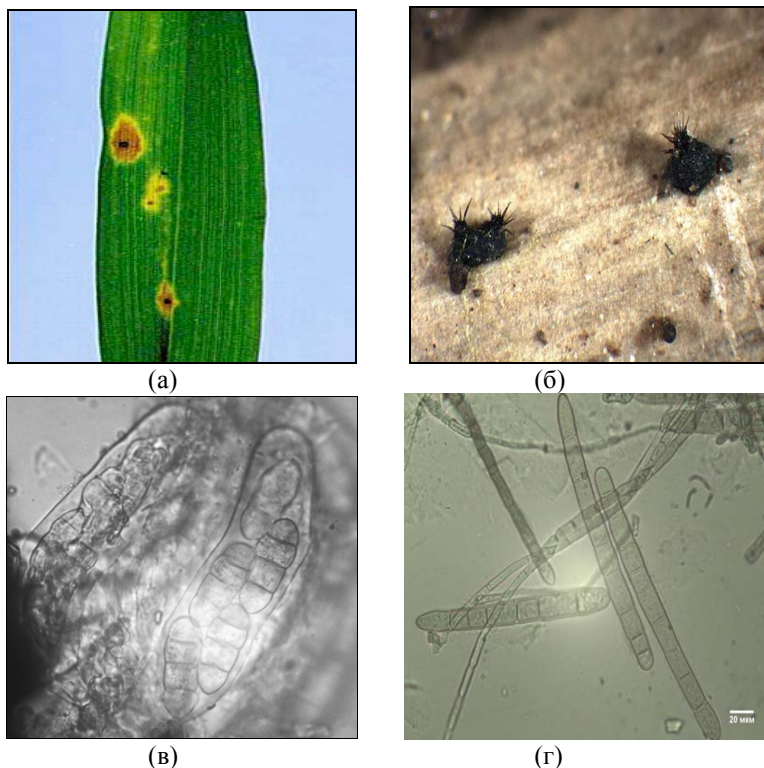
Для определения оптимальной среды проводился учет скорости радиального роста мицелия, наличия спороношения и количества спор в единице объема. Скорость роста определялась путем измерения диаметра колоний через равный период времени.

Суспензию для подсчета конидий готовили путем измельчения и перемешивания 5 высечек с поверхности колонии в 3 мл воды. Число конидий подсчитывали в капле суспензии объемом 0,02 мл. Площадь высечки составляла 1,5 см².

Результаты исследований и обсуждение. Известно, что возникают большие трудности с идентификацией пиренофороза в полевых условиях. В большинстве случаев это связано с тем, что на начальных этапах симптомы поражения во многом схожи с септориозом листьев (желто-коричневые пятна, которые со временем увеличиваются). На более поздних этапах поражения у пятен пиренофороза в центре проявляется черное пятно (рисунок 1а), а у септориоза – пикниды. В тоже время у желтой пятнистости существует ряд патотипов и штаммов, которые могут вызывать только хлороз, только некроз, либо некроз-хлороз. На характер проявления и выраженности поражения также может влиять и определенная устойчивость сорта. Поэтому более точно идентифицировать пиренофороз можно только в лабораторных условиях.

На пожнивных остатках обнаруживаются псевдотеции (рисунок 1в), содержащие в себе аски с аскоспорами (рисунок 1б). Весной, когда температура возрастает, псевдотеции созревают и «выстреливают» аски вверх на растение, тем самым происходит заражение.

Конидии прозрачные, цилиндрической формы, число перегородок колеблется от 4 до 10, размеры варьируют – 40-245 × 10-20 мкм (рисунок 1г). Одним из главных диагностических признаков *Pyrenophora tritici-repentis* является форма базальной клетки конидии, которая имеет форму «змеиной головы».



**Рисунок 1 – *Pyrenophora tritici-repentis*: классические симптомы поражения (а), псевдотеции (б), аски с аскоспорами (в), конидии (г).
(фото а – автор McMullen M., б – автор Wiese M.V., фото в, г – автора)**

Однако при долгом культивировании в *in vitro* могут происходить некоторые изменения конидий, например, изменение формы базальной клетки на округлую или сосочковидную, удлинение конидий. В природных условиях конидии чаще всего обнаруживаются на крупных пятнах повреждения.

Выделение возбудителя в чистую культуру с применением методики моноконидиальных изолятов может быть затруднено тем, что на листе, кроме пиренофороза, могут присутствовать возбудители других заболеваний.

Поэтому в нашем случае выделение проходило с помощью методики, основанной на получении моноспоровых изолятов из псевдотеций. Псевдотеции (плодовые тела) *Pyrenophora tritici-repentis* были обнаружены на пожнивных остатках (стеблях) восприимчивого к болезни сорта пшеницы. Отрезки стебля переносились на предметное стекло, которое помещали на перевернутую верхнюю часть чашки Петри и приливали небольшое количество воды (3-4 мл). На нижнюю часть наливали слой водного 2%-го агара и накрывали ею верхнюю часть с подготовленным предметным стеклом.

Затем чашки выдерживали на свету при температуре 20-24 °С. Созревая, псевдотеции «выстреливают» аскоспоры вверх на поверхность с агаром. Проросшие одиночные аскоспоры переносились на свежую питательную среду для получения моноспоровых изолятов.

Ламари и Берньер обнаружили, что образование конидионосцев стимулирует ультрафиолет, а образование конидий – понижение температуры до 10-12 °С. Оптимальной же температурой для роста гриба считается 22-25 °С [9]. На основании этого чашки Петри, засеянные мицелием, помещались под светоустановку ЛЭ-30 (310-320 нм) и выдерживались в течение 10 суток с соблюдением оптимальной температуры для роста. Затем чашки помещались на 2 суток в термостат при 12 °С для индукции образования конидиоспор.

Согласно литературным данным [4], наилучшей средой для культивирования *Pyrenophora tritici-repentis* является V-4, однако в наших исследованиях это не подтвердилось. Радиальная скорость роста мицелия составила $2,1 \pm 0,5$ мм/сут. Скорее всего, это связано или с качеством растительного материала, или условиями культивации – pH, режим освещения, температуры и т.д. Данные факторы будут изучены в дальнейшем.

Радиальная скорость роста отличалась на остальных средах: на соломенном агаре – $3,2 \pm 0,7$ мм/сут, тогда как на овсяном агаре и КГА – $4,1 \pm 0,5$ мм/сут. и $4,5 \pm 0,5$ мм/сут. соответственно. На 10 сутки учет был остановлен, так как на среде КГА колония возбудителя покрыла всю площадь чашки Петри (таблица).

Таблица – Учет основных показателей мицелия *Pyrenophora tritici-repentis* на различных средах

Среда	Скорость радиального роста, мм/сут.	Диаметр колонии, см	Площадь колонии, см ² /10 сут.	Кол-во спор/колонию, шт.×10 ³
КГА	4,5±0,5	9,0±0,5	63,6	-
V-4	2,1±0,5	4,2±0,5	13,7	3,4
Соломенный агар	3,2±0,7	6,4±0,7	32,6	25,4
Овсяный агар	4,1±0,5	8,2±0,5	53,3	53,3

Был отмечен различный вид структурных компонентов мицелия колоний. На КГА (рисунок 2а) наблюдался преимущественно стерильный, белый и плотный мицелий, по краям колонии наблюдался сероокрашенный и рыхлый мицелий, строма темно-серая. На среде V-4 (рисунок 2г) в центре образовывался плотный, светлый с оттенком желтого мицелий, строма темная. На соломенном агаре (рисунок 2в) наблюдался рыхлый и светлый мицелий в центре, паутинистый по краям, строма от темно-серого до черного. В тоже время на овсяном агаре (рисунок 2б) отмечался бархатистый, темно-серый мицелий, строма от черного до темно-серого цвета.

Несмотря на то, что максимальное спороношение было получено на овсяном агаре, с практической стороны проще использовать соломенный агар, так как при работе с овсяным агаром мы зависим от стабильности качества и

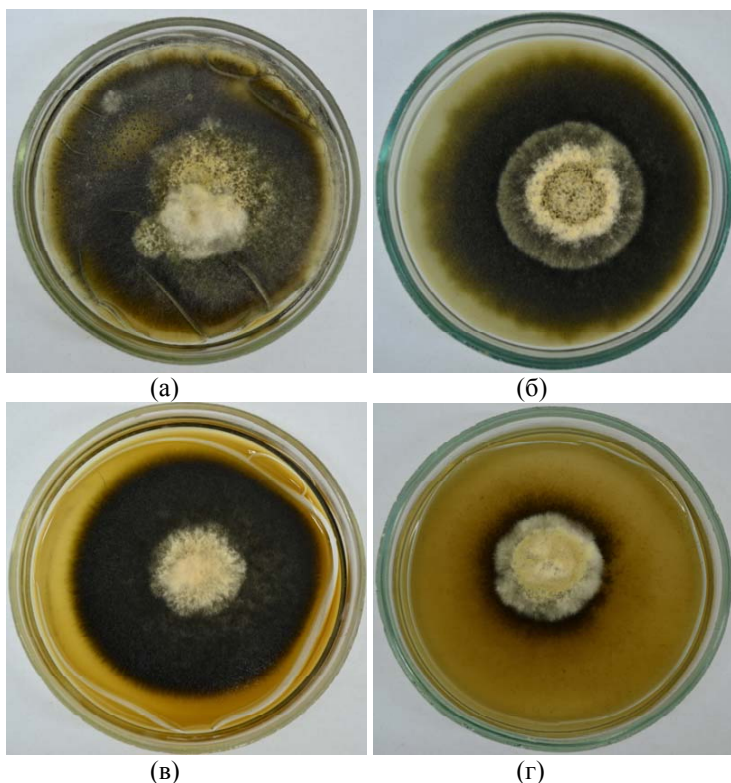


Рисунок 2 – Культура гриба *Pyrenophora tritici-repentis* на различных питательных средах: а) КГА, б) овсяный агар, в) соломенный агар, г) V–4 (фото автора)

невозможности контроля исходного сырья. В случае с пшеничной соломой мы можем контролировать весь процесс заготовки, консервации и хранения растительного материала.

Выводы

1. Отработана методика получения моноспоровых изолятов, основанная на выделении спор из псевдотеций.
2. В чистую культуру выделено 7 моноспоровых изолятов возбудителя, которые переданы в коллекцию чистых культур фитопатогенов лаборатории иммунитета.
3. Оптимальными средами для стабильного получения высококачественного инокулюма возбудителя *Pyrenophora tritici-repentis* является овсяный и соломенный агар.

Литература

1. Буга, С.Ф. Теоретические и практические основы химической защиты зерновых культур от болезней в Беларуси: [монография] / С.Ф. Буга. – Несвиж, 2013. – 239 с.

2. Диагностика основных грибных болезней хлебных злаков / Т.Л. Ишкова [и др.]. – СПб: ВИЗР, 2002. – 76 с.
3. Желтая пятнистость листьев пшеницы на Северном Кавказе / О.Ю. Кремнева [и др.] // Защита и карантин растений. – 2011. – №10. – С. 37-39.
4. Михайлова, Л.А. Желтая пятнистость пшеницы : метод. указания / Л.А. Михайлова [и др.]. – СПб: ВИЗР, 2012. – 56 с.
5. Пиренофороз – опасное заболевание пшеницы / О.Ю. Кремнева [и др.] // Защита и карантин растений. – 2007. – №6. – С. 45-46.
6. Ali, S. Recovery of *Pyrenophora tritici-repentis* from barley and reaction of 12 cultivars to five races and two host-selective toxins / S.Ali & L.J. Franci // Plant Disease 85, 2001. – P. 580-584.
7. Annone, J.G. Presencia de la mancha tostada del trigo (*Helminthosporium tritici-repentis*) // Carpeta de Producción Vegetal. TRIGO. TOMO VII. Informe №88. Estación Experimental Agropecuaria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires: Argentina, 1985.
8. Ciuffetti, L.M. Advances in the Characterization of the *Pyrenophora tritici-repentis* / L.M. Ciuffetti, R.P. Tuori // Wheat Interaction. Phytopathology 89 (6), 1999. – P. 444-449.
9. Lamari, L. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* / L. Lamari, C.C. Bernier // Phytopathology. – 1991. – 81. – P. 1092-1095.
10. Sim, T. Kansas wheat disease losses / T. Sim & W.G. Willis // Kansas State University, Manhattan, USA, 1982.

PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS OF WHEAT IN BELARUS: IDENTIFICATION, ISOLATION AND CULTIVATION IN ARTIFICIAL NUTRIENT MEDIA

M.V. Podorsky, Y.K. Shashko, M.N. Shashko

*The research results on the study of *Pyrenophora tritici-repentis* causative agent are presented in the article. The identification of the disease under field conditions was done. Methods of agent isolation in pure culture were developed. Nutrient media of different composition were studied in order to find the media for the best growth and sporulation. Different kinds of colony structure components depending on the media were studied. As result of the researches conducted, it was revealed that oat and straw agars were the best media for the stable obtaining of high quality inoculum of *Pyrenophora tritici-repentis* agent.*

УДК [633.179 + 633.12]:631.811.98 (476)

**АГРОЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ПРЕПАРАТА ИЗ РАПСОВОГО ШРОТА ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ
ПАЙЗЫ И ГРЕЧИХИ**

О.С. Корзун¹, кандидат с.-х. наук, **Г.В. Наумова²**, доктор тех. наук

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

²ГНУ «Институт природопользования НАНБ»

(Поступила в печать 9.12.2015 г.)

Аннотация. В статье представлены результаты исследований, проведенных в почвенно-климатических условиях Гродненской области, по изучению особенностей роста, развития и формирования урожайности пайзы и гречихи в зависимости от обработки растений препаратом из рапсового шрота. Ус-