

ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА И НАПРАВЛЕНИЯ МИКРОЭВОЛЮЦИИ

BIPOLARIS SOROKINIANA (SACCARDO IN SOROKIN) SCHOEMAKER

Акулов А.Ю.

Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

Микроскопический анаморфный гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoem. — широко распространенный и опасный паразит хлебных злаков, ежегодно наносящий значительный вред сельскому хозяйству. Этот патоген может развиваться на над- и подземных органах растения-хозяина, вызывая ряд заболеваний: корневую гниль, темно-бурую пятнистость листьев, загнивание всходов и так называемый «черный зародыш» семян [1; 15].

Начиная с 1920-х гг. многочисленными исследователями из различных стран мира были опубликованы десятки научных работ, в которых отмечалось широкое варьирование ключевых морфолого-культуральных, физиолого-биохимических и паразитических признаков у различных изолятов *B. sorokiniana* [6;10;12;14;16; 17;18;19]. Однако, несмотря на выявленное этими авторами существенное разнообразие изучаемых признаков, они были склонны считать, что *B. sorokiniana* это цельный, хотя и весьма полиморфный вид. Основной причиной для такого вывода был факт, что для *B. sorokiniana* не характерна органотропная специализация и любой вирулентный изолят, независимо от того их какой части растения он был выделен, способен вызывать корневую гниль, пятнистость листьев, а также поражать семена [2].

Ещё в первой половине XIX в. было известно, что часть жизненного цикла *B. sorokiniana* проходит под землёй (корневая гниль), а часть – над землёй (тёмно-бурая пятнистость листьев и «чёрный зародыш» семян). Однако, лишь в конце 1980-х гг. российские исследователи Л.В. Молодых и М.В. Рочев впервые обратили внимание на различие свойств над- и подземных изолятов гриба. На основании проведенных ими экспериментов был сделан вывод о существовании в пределах

вида *B. sorokiniana* двух форм, одна из которых более приспособлена к развитию на корнях (корневая или подземная форма), а другая - на листьях (листовая или надземная форма) [2; 5].

По мнению Л.В. Молодых и М.В. Рочева в составе любой популяции *B. sorokiniana* постоянно присутствует смесь над- и подземной форм гриба, при этом все вирулентные представители обеих форм могут инфицировать как надземные, так и подземные части растения. Однако, представители подземной формы более приспособлены к развитию на корнях, а представители надземной – на листьях. Авторы установили, что споры подземных изолятов гриба характеризуются несколько меньшими размерами, по сравнению с надземными [5; 7; 8; 9].

Концепция Л.В. Молодых и М.В. Рочева нашла отражение в последующих публикациях, посвященных *B. sorokiniana*. Так, согласно последней монографической обработке российских ученых Л.Л. Великанова и Б.А.Хасанова 2003 г. издания «в настоящее время в пределах вида *Bipolaris sorokiniana* выделяют корневые и листовые формы» [1].

Важно отметить, что, несмотря на значительный прогресс в области изучения внутривидовой структуры *B. sorokiniana* многие вопросы до сих пор остаются крайне слабо изученными. Так, корневые и листовые формы гриба до сих пор не охарактеризованы количественно, поэтому отсутствуют четкие критерии их распознавания. Кроме того закономерности проявления тех или иных признаков у изолятов из листьев и корней до сих пор либо не установлены вовсе, либо фрагментарны и противоречивы.

В связи с выделением корневых и листовых форм также возник целый ряд вопросов, касающихся жизненного цикла фитопатогена. К примеру, хорошо известно, что главным источником возобновления гельминтоспориозной корневой гнили во многих регионах Земного Шара являются больные семена [13]. В связи с отсутствием надежных критериев для идентификации форм возбудителя до сих пор

остаётся неясным, какая из них развивается на инфицированных семенах и, соответственно, какова роль семян в возобновлении корневой гнили и темно-бурой пятнистости листьев [11].

Для решения вышеназванных вопросов в 2001-2003 гг. нами была проведена серия экспериментов по изучению варьирования ключевых морфолого-культуральных и паразитических признаков 60 корневых, листовых и семенных изолятов *B. sorokiniana* (по 20 каждого типа). На первом этапе исследования нами изучалось варьирование морфологических параметров спор, сформировавшихся на естественно инфицированных грибом листьях, семенах и подземных частях ярового ячменя (корнях и подземной части стебля). В ходе исследования нами учитывались длина спор, их ширина и количество септ, а также рассчитывались интегральные показатели: объем спор и соотношение длины спор к их ширине (коэффициент Q).

В результате изучения морфологических особенностей спор изолятов *B. sorokiniana* различного происхождения нами было установлено, что средняя длина зрелых спор сформировавшихся на листьях составляла 74,2 м, на семенах – 72,2 м в то время как на корнях – всего 66,4 м. Тем самым, усредненная длина спор, образовавшихся на надземных частях растений, достоверно больше длины спор с подземных частей, что подтверждено данными дисперсионного анализа. Ширина спор в сформировавшихся на листьях, семенах и подземных частях растений достоверно не отличалась и составляла 19,6 м; 19,7 м и 19,8 м, соответственно. То же касалось и усредненного количества септ в спорах, значения которых составили 6,9; 6,6 и 6,7 штук в конидии [11].

Формально полученные результаты могут быть интерпретированы как подтверждение выводов Л.В.Молодых и М.В.Рочева о наличии различий между надземными и подземными изолятами. Тем не менее, анализ соотношений длины спор к их ширине показал, что в соответствии с этим критерием в пределах местной популяции *B. sorokiniana* можно выделить две обособленные группы. В составе первой группы Q колеблется в пределах 2,8 – 3,4, а второй – 3,7 – 4,1. Коэффициенты корреляции свидетельствуют о том,

что коэффициент Q формируется преимущественно за счет длины спор (0,86). В связи с этим, первая группа изолятов была названа нами «короткоспоровыми», а вторая «длинноспоровыми». Благодаря тому, что диапазоны варьирования Q для длинно-, и короткоспоровых изолятов не перекрываются, он может использоваться как надежный критерий для разграничения обеих групп. Относительно объема цитоплазмы конидий нами было установлено, что этот показатель непригоден для определения принадлежности изолята к длинно- или короткоспоровой группе [11].

Хорошо известно, что морфолого-культуральные признаки *B. sorokiniana* очень переменчивы и могут значительно отличаться на средах различного состава. При этом одним из наиболее изменчивых признаков является размер конидий [4]. Чтобы установить, не связаны ли морфологические выявленные нами отличия листовых, семенных и подземных изолятов с различной питательной ценностью соответствующих частей растения, нами был произведен анализ особенностей спор этих же изолятов, сформировавшихся на стандартной питательной среде Чапека-Докса.

В ходе экспериментов по выращиванию вышеописанных изолятов на стандартной аксеничной среде Чапека-Докса было установлено, что в условиях чистой культуры образуются несколько меньшие споры, чем на естественных субстратах, что вполне соответствует литературным данным [4]. При этом, усредненная длина спор для листовых изолятов составляет 52,9 μ , для семенных – 52,4 μ , а для подземных – 48,1 μ . Ширина спор в пределах изучаемых групп изолятов составляет 18,4; 19,1 и 19,8 μ , а усредненное количество септ в спорах для всех групп изолятов составляет 5,2 шт. Из всех приведенных показателей достоверно отличается лишь длина спор у изолятов из надземной и подземной частей растений. У изолятов, выросших на среде Чапека-Докса в сравнении с изолятами, спороносящими на естественных субстратах, наблюдается уменьшение длины спор и количества септ, в то время как ширина спор достоверно не изменяется [11].

Варьирование соотношения длины спор к их ширине на искусственной питательной

среде в пределах группы короткоспоровых изолятов составило 1,9 – 2,5, а длинноспоровых – 2,6 – 3,4. Отчетливо видно, что изоляты, проявлявшие себя как длинноспоровые на естественных субстратах, сохранили признак длинноспоровости и на стандартной аксенической среде. На основании полученных данных можно сделать вывод, что длинно- и короткоспоровость не является результатом модификационной изменчивости, а детерминирована генетически [11].

Нами установлено, что распределение длинно- и короткоспоровых изолятов в пределах групп, изолированных из листьев, семян и подземных частей ячменя крайне неравномерное. Так, на надземных органах растения преобладают длинноспоровые, а на подземных — короткоспоровые изоляты. Удельная доля длинноспоровых изолятов на листьях составляет 85%, на семенах – 65%, а на корнях и основаниях стеблей — всего 25%. Из 60 проанализированных нами природных изолятов 35 оказались длинноспоровыми и 25 — короткоспоровыми.

Опираясь на полученные данные, мы можем сделать вывод, что различие надземных и подземных изолятов, описанное Л.В. Молодых и М.В. Рочевым, не может свидетельствовать о генетическом единстве в пределах этих формальных групп. Эта тенденция обусловлена лишь количественным преобладанием длинноспоровых изолятов на листьях и семенах, а короткоспоровых — на корнях и основаниях стеблей. Таким образом, термины «надземные» и «подземные» изоляты, предложенные Л.В. Молодых и М.В. Рочевым охватывают сборные искусственные группы в пределах вида и поэтому не вполне удачны. На наш взгляд, выделение групп в пределах *B.sorokiniana* следует производить не на основании сведений об органе растения, из которого они были выделены, а на основании данных об усредненном соотношении их длины к ширине.

Ключевыми фитопатологическими показателями, которые позволяют охарактеризовать паразитические свойства исследуемых изолятов, являются интенсивность некротизации ими тканей растения хозяина, а также активность их

спорообразования в условиях паразитизма. Первый из вышеназванных показателей характеризует интенсивность поражения растения-хозяина конкретным изолятом возбудителя. Вторым показателем характеризует активность накопления патогеном эффективного инокулюма и его способность вызывать эпифитотию. Несмотря на то, что один показатель характеризует паразитические свойства патогена на организменном уровне, а второй — на популяционном, для их наименования традиционно используется единое обобщающее название — агрессивность. Оба показателя принято изучать не на одном случайно выбранном сорте растения-хозяина, а на наборе сортов-дифференциаторов, отличающихся степенью устойчивости к исследуемому заболеванию [3]. В нашем исследовании нами были использованы 9 сортов-дифференциаторов: Сложный гибрид 6729 (Мексика), Темп (Россия), Одесский 115 (Украина), Tregal CI6359 (США), SV 89300 (Швеция), Краај 71-509 (Нидерланды), Вауег С15599 (Дания), Excel (США) и Line TR-226 (Канада), любезно предоставленные Отделом иммунитета растений Института растениеводства им. В.Я. Юрьева (г. Харьков, Украина). Заражение отрезков листьев проводили в условиях влажной камеры суспензией спор патогена с титром 2500 шт./мл.

Обобщенные данные об агрессивности 60 исследованных изолятов представлены в таблице 1 (ячейки таблицы, соответствующие короткоспоровым изолятам оттенены). Как видно из таблицы, изученные изоляты характеризуются существенным варьированием агрессивности. Так, активность спорообразования изолятов на отрезках листьев варьирует в пределах 10750 — 81300 спор на одно некротическое пятно, а активность некрозообразования в пределах 1,4 — 3,4 балла по 4-х бальной шкале. Усредненная активность спорообразования изолятов из листьев составила 21805, из семян — 28700, а из корней и околоземной части стебля — 35138 спор на одно некротическое пятно. Усредненная степень развития некроза, вызванного листовыми изолятами, составила 2,9; семенными — 2,6 и корневыми — 2,5 балла соответственно.

В то же время, из таблицы отчетливо видно, что агрессивность каждого исследованного нами изолята строго связана с его принадлежностью к длинно- или короткоспоровой группе. Так, длинноспоровые изоляты характеризуются относительно низкой активностью спорообразования, которая составляет в среднем 18549 штук на одно некротическое пятно. При этом, усредненная активность спорообразования короткоспоровых изолятов в 2,5 раза выше и составляет 46946 штук на одно некротическое пятно. Что касается активности некрозообразования, то для длинноспоровых изолятов она составляет 3,0 балла, в то время как для короткоспоровых всего 2,2 балла.

Суммируя результаты проведенных исследований, Можно сделать выводы, что в пределах исследованной популяции *Bipolaris sorokoniana* присутствуют две четко обособляемые по морфологическим и паразитическим признакам группы, названные нами «длинноспоровая» и «короткоспоровая». Принадлежность того или иного изолята к одной из двух групп может быть определена по усредненному соотношению длин их спор к ширинам, по активности спорообразования изолятов на отрезках листьев ячменя, либо по интенсивности некротизации тканей растения-хозяина при их искусственном заражении суспензией спор патогена. Описанные Л.В.Молодых и М.В.Рочевым надземная и подземная формы *B.sorokoniana* представляют собой смесь длинно- и короткоспоровых изолятов, с преобладанием длинноспоровых на надземной части растения и короткоспоровых — на подземной. Свойства изолята определяются не тем, из какой части растения-хозяина он был выделен, а его принадлежностью к длинно- или короткоспоровой группе.

Опираясь на полученные данные, мы смеем предположить, что настоящее время имеет место разделение некогда единого вида *B.sorokoniana* на два самостоятельных, один из которых более приспособлен к паразитированию на листьях, а второй — на корнях. Главным источником сохранения обоих групп патогена и возобновления заболевания в следующем вегетационном сезоне являются больные семена, где в значительной степени присутствуют и длинно-, и короткоспоровые изоляты.

Таблица 1.

Агрессивность изолятов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Schoem. различного происхождения

ЛИСТОВЫЕ ИЗОЛЯТЫ				СЕМЕННЫЕ ИЗОЛЯТЫ				КОРНЕВЫЕ ИЗОЛЯТЫ			
НАЗВАНИЕ ИЗОЛЯТА	ТИП ИЗОЛЯТА	КОЛ-ВО СПОР, ШТ.	СТЕПЕНЬ РАЗВИТИЯ НЕКРОЗА, БАЛЛЫ	НАЗВАНИЕ ИЗОЛЯТА	ТИП ИЗОЛЯТА	КОЛ-ВО СПОР, ШТ.	СТЕПЕНЬ РАЗВИТИЯ НЕКРОЗА, БАЛЛЫ	НАЗВАНИЕ ИЗОЛЯТА	ТИП ИЗОЛЯТА	КОЛ-ВО СПОР, ШТ.	СТЕПЕНЬ РАЗВИТИЯ НЕКРОЗА, БАЛЛЫ
Л1	I	18600	3,4	С1	I	21600	2,9	К1	II	34050	2,6
Л2	I	23000	3,1	С2	II	61800	2,3	К2	II	50950	2,4
Л3	I	18325	2,9	С3	II	47250	2,5	К3	II	81300	1,4
Л4	I	16550	3,1	С4	I	15050	2,9	К4	I	25375	3,3
Л5	I	16475	2,7	С5	I	15600	2,9	К5	II	63300	2,2
Л6	I	15850	2,9	С6	II	31200	2,0	К6	I	10750	3,3
Л7	II	34750	2,6	С7	I	26400	2,6	К7	I	11450	2,9
Л8	I	19950	2,8	С8	I	28650	2,9	К8	II	52600	1,5
Л9	II	37450	2,3	С9	II	34500	2,4	К9	II	34200	2,4
Л10	I	17100	3,1	С10	I	16450	2,7	К10	I	16700	2,8
В СРЕДНЕМ		21805	2,9	В СРЕДНЕМ		28700	2,6	В СРЕДНЕМ		35138	2,5

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Великанов Л.Л., Хасанов Б.А. Таксономия формальных родов *Helminthosporium*, *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum* и *Curvularia* / В кн. Новое в систематике и номенклатуре грибов (под. ред. Ю.Т.Дьякова и Ю.В.Сергеева). – Москва: Национальная академия микологии, 2003. – С. 304-341.
2. Дьяков Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов. – М.: Муравей, 1998. – 384 с.
3. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология (Учебное пособие). – М: изд-во Об-ва фитопатологов. – 2001. – 302с.
4. Лекомцева С.Н., Зименкова Л.П. Об изменчивости гриба *Helminthosporium sativum* P., K. et B. // Научные доклады высшей школы (Биологические науки). – 1966, №4. – С. 129-132.
5. Молодых Л.В., Рочев М.В. Дивергенция популяции *Bipolaris sorokiniana* Shoem. в условиях паразитирования на листьях и корнях ячменя // Защита растений от вредителей и болезней в условиях Нечерноземья. – 1988, №12. – С. 63-65.
6. Пидопличко В.Н., Зражевская Т.Г. К вопросу о гетерогенности популяции гриба *Helminthosporium sativum* P., K. et B. – возбудителя корневой гнили озимой пшеницы / В кн. Систематика, экология и физиология почвенных грибов. – К.: Наукова Думка, 1975. – С. 138-139.
7. Рочев М.В., Бирюкова В.Н. Адаптивные особенности конидиального аппарата возбудителя тёмно-бурой пятнистости ячменя // Тезисы докладов 9-го Всесоюзного совещания по иммунитету растений к болезням и вредителям. – Минск, 1991, Т.2. – С.172-173.
8. Рочев М.В. Органотропная специализация *Bipolaris sorokiniana* Shoem. // Микология и фитопатология. – 1987. – Т.2, Вып. 2. – С. 190-191.
9. Рочев М.В. Поражаемость *Bipolaris sorokiniana* Shoem. листьев и корней ячменя //

- Интегрированная защита растений от вредителей и болезней.- Л.: Наука. – 1985.
– С.59-60.
- 10.Щекочихина Р.И. Географическая изменчивость популяций *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke // Микология и фитопатология. – 1977. – Т.11, №5. – С. 433-438.
 - 11.Akulov A.Yu. Intraspecific structure of *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In Sorokin) Shoemaker // Proc. of XIV– Congress of European Mycologists (Yalta). – 2003. – P. 65-66.
 - 12.Christensen J.J., Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum* // Phytopathology. – 1925. – Vol.15. – P. 785-795.
 - 13.Grzelak K. Porazenie ziarna jeczmienia jarego *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. a zdolnosc kielkowania i zdrowotnosc siewek // Ochr. rosl. – 1989, N10-11. – S. 23-26.
 - 14.Koech R., Stack R.W. Host specialization in *Cochliobolus sativus*, a fungus causing root rot of wheat and barley // Proc. N.D. Acad. Sci. – 1991. – Vol. 45. – P.40.
 - 15.Kumar J., Schäfer P., Hückehoven R., Langen G. et al. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control // Molecular Plant Pathology. – 2003. – Vol.3, N4. – P. 185-195.
 - 16.Mehta Y.R. Identification of races of *Helminthosporium sativum* of wheat in Brasil // Pesqui. Agropec. Bras. – 1981. – Vol.16, N3. – P. 331-336.
 - 17.Oliveira de A.M.R., Matsumura A.T.S., Prestes A.M. Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random-amplified polymorphic DNA (RAPD) // Genet. Mol. Res. – 2002. – Vol.1, N4. – P. 350-358.
 - 18.Stevens F.L., The *Helminthosporium* foot-rot of wheat, with observation on the morphology of *Helminthosporium* and on the occurrence of saltation in the genus // Illinios Nat. Hist. Survey Bull. –1922. –Vol.14. – P.193-198.
 - 19.Wood L.S. Relation of variation in *Helminthosporium sativum* to seedling blight of small grains // Phytopathology. – 1962. – Vol.52. – P. 493-497.