

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. В.Н.КАРАЗИНА

На правах рукописи

Акулов Александр Юрьевич

УДК 582.288+663.421:581.2 (477.54)

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *BIPOLARIS SOROKINIANA* (SACC. IN
SOROKIN) SHOEMAKER И ДИФФЕРЕНЦИРОВАННАЯ ДИАГНОСТИКА
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ И ЧЕРНОГО ЗАРОДЫША
ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ**

Специальность 06.00.11 – фитопатология

диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
профессор,
Глущенко Василий Иванович

Харьков – 2006

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 История исследования и современное состояние изученности фитопатогенного гриба <i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc. in Sorokin) Shoemaker.....	10
1.1. Морфолого-таксономическая характеристика <i>B. sorokiniana</i>	10
1.1.1. История описания вида и этапы его классифицирования	10
1.1.2. Морфологические особенности бесполого спороношения <i>B. sorokiniana</i>	14
1.1.3. Условия формирования и морфология сумчатого спороношения <i>B. sorokiniana</i>	15
1.2. Болезни растений, вызываемые <i>B. sorokiniana</i>	17
1.2.1. Гельминтоспориозная корневая гниль	17
1.2.2. Темно-бурая пятнистость листьев	19
1.2.3. Черный зародыш семян	21
1.3. Особенности сапротрофного развития <i>B. sorokiniana</i>	26
1.3.1. Сапротрофное развитие <i>B. sorokiniana</i> in vivo.....	26
1.3.2. Сапротрофное развитие <i>B. sorokiniana</i> in vitro	29
1.4. Физиолого-биохимические и генетические особенности <i>B. sorokiniana</i>	32
1.4.1. Пигменты <i>B. sorokiniana</i> и их функции	32
1.4.2. Вторичные экзометаболиты <i>B. sorokiniana</i> и их функции	33
1.4.3. Генетические особенности <i>B. sorokiniana</i>	38
ГЛАВА 2. Объект и методы исследований.....	43
ГЛАВА 3. Биологические особенности <i>Bipolaris sorokiniana</i> в связи с паразитизмом на различных органах ярового ячменя	51
3.1. Современные представления об органотропной специализации у <i>B. sorokiniana</i>	51
3.2. Морфолого-культуральные особенности <i>B. sorokiniana</i>	53
3.2.1. Морфология конидий <i>B. sorokiniana</i> на природных субстратах.....	53
3.2.2. Морфология конидий <i>B. sorokiniana</i> в условиях чистой культуры.....	67

3.3. Физиолого-биохимические свойства длинно- и короткоспоровых изолятов <i>B. sorokiniana</i>	74
3.3.1. Целлюлозолитическая и пектолитическая активность <i>B. sorokiniana</i>	74
3.3.2. Токсигенные особенности <i>B. sorokiniana</i>	81
3.4. Особенности паразитизма длинноспоровых и короткоспоровых изолятов <i>B. sorokiniana</i>	93
ГЛАВА 4. Развитие возбудителей обыкновенной корневой гнили ячменя и их дифференцированная диагностика на растениях ярового ячменя	114
4.1. Возбудители обыкновенной корневой гнили ячменя	114
4.2. Особенности паразитизма <i>B. sorokiniana</i> и <i>F. graminearum</i> на подземных и околоземных частях растений ярового ячменя.....	123
4.3. Дифференцированная диагностика возбудителей обыкновенной корневой гнили ярового ячменя	133
ГЛАВА 5. Методы дифференцированной диагностики <i>Bipolaris sorokiniana</i> в семенах ярового ячменя	144
5.1. Проблема диагностики черного зародыша семян	144
5.2. Визуальный метод диагностики	145
5.3. Метод влажной камеры	151
5.4. Микробиологический метод диагностики	165
5.5. Рулонный метод диагностики.....	175
ВЫВОДЫ.....	187
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	190
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	Ошибка! Закладка не определена.
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.	Ошибка! Закладка не определена.
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	Ошибка! Закладка не определена.
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.	Ошибка! Закладка не определена.

ВВЕДЕНИЕ

Фитопатогенный гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoemaker, известный до недавнего времени как *Helminthosporium sativum* Pammel, C.J. King et Bakke, является повсеместно распространенным и вредоносным возбудителем болезней хлебных злаков. Он способен инфицировать все надземные и подземные органы растения-хозяина и вызывает темно-бурую пятнистость листьев, гельминтоспориозную корневую гниль и черный зародыш семян [33; 40; 107; 273; 362; 367; 392]. Эпифитотии, вызванные этим патогеном, регулярно регистрируются в Европе [192; 332; 345; 366; 407; 465], Азии [322; 481], Африке [401; 460], Австралии [353], Северной Америке [398; 420; 422; 445; 454] и Южной Америке [456]. Наиболее поражаемой этим грибом культурой является ячмень, потери урожая которого в отдельные годы достигают 30% для пятнистости листьев и 50% и более для корневой гнили [21; 65; 183; 210; 242; 302; 398; 466; 468].

На протяжении более ста лет, прошедших со времени первоописания *B. sorokiniana*, этот гриб неоднократно привлекал внимание фитопатологов, таксономистов, биохимиков, генетиков и молекулярных биологов. *B. sorokiniana* относится к числу хорошо исследованных видов, но несмотря на это, многие аспекты его биологии остаются мало изученными или противоречивыми.

Согласно традиционной точке зрения, *B. sorokiniana* это цельный, хотя и весьма полиморфный вид, не обладающий органо-тканевой специализацией [107; 203; 271; 362; 428]. Однако в последние годы эта позиция вызывает все большие сомнения [30; 33; 37; 88; 195; 215; 268; 348; 386; 415; 472; 485]. На основе проведенных исследований рядом авторов было высказано мнение, что в пределах вида *B. sorokiniana* существуют как минимум две формы: листовая, вызывающая темно-бурую пятнистость листьев и корневая, вызывающая гельминтоспориозную корневую гниль [33; 55; 96; 119; 120]. В то же время, на сегодняшний день существование этих форм остается скорее предположением, чем общепризнанным научным фактом.

К сожалению, до сих пор формы *B. sorokiniana* не охарактеризованы количественно и отсутствуют четкие критерии их распознавания. Наряду с этим остается неясным, что представляет собой жизненный цикл патогена; каковы источники инфекции каждой из форм; какова их роль в возникновении заболеваний семян; отличаются ли формы по агрессивности и физиолого-биохимическим свойствам. Поэтому, всестороннее исследование биологических особенностей *B. sorokiniana* в связи с паразитизмом на надземных и подземных органах ячменя является актуальной научной задачей.

В пораженных органах растений ярового ячменя обычно развивается не только *B. sorokiniana*, а целый комплекс сопутствующих инфекций. Для прогноза развития заболевания и возможных потерь урожая, разработки защитных мероприятий, селекции устойчивых сортов, а также понимания механизмов функционирования защитных систем растения в целом, важно дифференцировать вклад каждого из патогенов в развитие заболевания. В связи с этим существует потребность в точных и не очень трудоемких методах количественной диагностики *B. sorokiniana* на фоне развития сопутствующих фитопатогенов с помощью научно-обоснованных и воспроизводимых методик.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа является частью госбюджетной научной темы № 16/16/03 «Исследование и поддержка биоразнообразия природных систем Левобережной Украины» (№ госрегистрации 0103U004271), разрабатываемой на кафедре микологии и фитоиммунологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина.

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучение биологических особенностей *B. sorokiniana* в связи с паразитизмом на надземных и подземных органах растений ярового ячменя и усовершенствование методов дифференцированной диагностики возбудителей при корневой гнили и черном зародыше семян.

Исходя из указанной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Изучить морфологические особенности *B. sorokiniana* при паразитизме на надземных и подземных органах ярового ячменя, а также в чистой культуре;

2. Изучить токсигенные свойства, а также активности целлюлозолитических и пектолитических ферментов моноконидиальных изолятов *B. sorokiniana* из листьев, семян и корней ярового ячменя;
3. Изучить агрессивность (некрогенную и спорогенную активности) моноспоровых изолятов *B. sorokiniana* из различных органов растений ячменя;
4. Количественно охарактеризовать формы *B. sorokiniana* и определить их роль в возникновении темно-бурой пятнистости листьев, гельминтоспориозной корневой гнили и черного зародыша семян;
5. Изучить видовой состав фитопатогенных грибов при поражении корней и семян ярового ячменя в условиях Харьковской области;
6. Исследовать закономерности развития *B. sorokiniana* в подземных и околоземных частях растений ярового ячменя и усовершенствовать метод дифференцированной диагностики гельминтоспориозной корневой гнили;
7. Провести сравнительный анализ основных методов диагностики черного зародыша семян ячменя и усовершенствовать метод дифференцированной диагностики *B. sorokiniana* на фоне развития сопутствующих патогенов.

Научная новизна полученных результатов. Впервые проведено комплексное сравнительное исследование морфолого-культуральных, физиолого-биохимических и паразитических особенностей изолятов *B. sorokiniana* из листьев, семян и корней ярового ячменя. Выявлены и количественно охарактеризованы две формы возбудителя, названные нами длинноспоровая и короткоспоровая. Разработаны критерии распознавания длинноспоровой и короткоспоровой форм *B. sorokiniana* при паразитизме, а также в чистой культуре. Установлено, что первая форма более приспособлена к развитию на надземных органах растения, а вторая – на подземных. Показано, что свойства любого изолята *B. sorokiniana* определяются не органом растения, из которого он был выделен, а его принадлежностью к одной из форм.

Уточнен видовой состав возбудителей корневой гнили ярового ячменя в условиях Харьковской области. Исследованы закономерности развития *B. sorokiniana* и видов рода *Fusarium* на подземных и околоземных органах

ярового ячменя и предложен метод дифференцированной оценки степеней развития гельминтоспориозной и фузариозной корневых гнилей.

На 38 сортах и гибридах ярового ячменя в одних и тех же стационарных условиях впервые был проведен сравнительный анализ четырех наиболее распространенных методов диагностики черного зародыша. Охарактеризованы преимущества и недостатки каждого из исследованных методов. Разработаны рекомендации по количественной диагностике *B. sorokiniana* в семенах ярового ячменя на фоне развития сопутствующих патогенов.

Практическое значение полученных результатов. Результаты работы вошли в отчет по госбюджетной научной теме № 16/16/03 «Исследование и поддержка биоразнообразия природных систем Левобережной Украины», а также были использованы при проведении научно-исследовательской работы в рамках договора № 27-05/CG 255-05 КІ «Фитопатологическая экспертиза семян ячменя», выполненной по заказу украино-французской компании «Malteurop Ukraine» Ltd. Полученные данные могут быть использованы в сельскохозяйственной практике при поиске сортов – доноров устойчивости к гельминтоспориозу, а также при разработке защитных мероприятий. Разработанные методы используются в учебном процессе при проведении больших практикумов к курсам «Сельскохозяйственная фитопатология» и «Метод чистых культур» в Харьковском Национальном университете им. В.Н. Каразина.

Личный вклад соискателя. Работа является самостоятельным исследованием. Планирование и проведение экспериментов, обработка, анализ и обобщение результатов, а также подготовка материалов диссертации к печати осуществлена непосредственно автором.

Апробация результатов диссертации. Основные результаты работы были представлены на 14-м Конгрессе европейских микологов (Ялта, 2003); 10-м Съезде Украинского ботанического общества (Полтава, 1997); 1-м Съезде микологов России (Москва, 2002); конференциях молодых ученых-ботаников Украины «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (Одесса, 2003; Канев, 2004; Умань, 2005); 8-й Молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге

(Санкт-Петербург, 2004), Международной Пушкинской школы-конференции (Пушино, 2002); Международной научно-практической конференции «Генетические ресурсы культурных растений» (Санкт-Петербург, 2001); Международной конференции молодых ученых «Рослина і середовище» (Харьков, 2001); 2-й Международной конференции «Методологические основы познания биологических особенностей грибов продуцентов физиологически-активных соединений и пищевых продуктов» (Донецк, 2002); Всеукраинской конференции «Еколого-біологічні дослідження на природних та антропогенно-зміненіх територіях» (Кривой Рог, 2002). Доклад на тему «Популяционная структура и направления микроэволюции *Bipolaris sorokiniana* (Saccardo in Sorokin) Shoemaker» занял первое место на Всероссийском конкурсе научных работ, проводимом в рамках Конференции молодых ученых «Экологические механизмы динамики и устойчивости биоты», организованной Уральским отделением РАН (Екатеринбург, 2004). Доклад на тему «Внутривидовая структура *Bipolaris sorokiniana* в связи с паразитизмом на над- и подземных частях растения-хозяина» был заслушан на расширенном заседании кафедры ботаники Киевского национального университета им. Тараса Шевченко (протокол № 4/02 от 16.11.2003).

Публикации. По результатам работы опубликовано 17 научных работ, из них три статьи в журнале «Вестник Харьковского университета» и одна в сборнике «Й.К. Пачоський та сучасна ботаніка» (Херсонский государственный университет и Институт ботаники им. Н.Г. Холодного, 2004 г.). Четырнадцать работ являются тезисами докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация общим объемом 265 страниц состоит из введения, 5 разделов, выводов, списка литературы (485 источников) и приложений. Основная часть работы занимает 216 страниц, иллюстрирована 11 таблицами и 38 рисунками. Работа сопровождается четырьмя приложениями (Приложение А «Характеристика исследованных сортов и гибридов ячменя», приложение Б «Почвенно-климатическая характеристика Опытного хозяйства «Элитное» в период проведения исследований», приложение В «Таблицы

исходных цифровых данных», Приложение Г «Протоколы апробации работы»).
Приложения занимают 30 страниц.

ГЛАВА 1

ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BIPOLARIS* *SOROKINIANA* (SACC. IN SOROKIN) SHOEMAKER

1.1. Морфолого-таксономическая характеристика *B. sorokiniana*

1.1.1. История описания вида и этапы его классифицирования

Фитопатогенный гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoemaker относится к числу космополитных видов и широко распространен на всех континентах Земного шара за исключением Антарктиды. Вплоть до начала 1960-х годов этот вид рассматривался в составе формального рода *Helminthosporium* Link ex Fries [33; 165; 189; 362; 418].

На протяжении многих лет применительно к виду *B. sorokiniana* широко использовались два альтернативных названия: *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. in Sorokin, опубликованное в 1890 г., и *Helminthosporium sativum* Pammel, C.J. King et Bakke, опубликованное в 1910 г. Несмотря на то, что первое из перечисленных названий является приоритетным, в научной литературе длительное время было более распространено название *H. sativum* Pammel, C.J. King et Bakke [190; 417].

Типовой образец вида *H. sorokinianum* был собран выпускником Харьковского университета Н.В. Сорокиным на колосьях пшеницы и ржи во время экспедиции по Южно-Уссурийскому Краю. Образец был выслан для проверки итальянскому микологу П.А. Саккардо (P.A. Saccardo), который отнес его к роду *Helminthosporium* и назвал в честь автора находки – *H. sorokinianum*. Диагноз вида *H. sorokinianum* и его типовой рисунок были впервые опубликованы в статье Н.В. Сорокина «О некоторых болезнях культурных растений Южно-Уссурийского Края» в «Трудах Казанского Общества Естествоиспытателей» в 1890 г. [134]. Двумя годами позже диагноз *H. sorokinianum* был повторно опубликован П.А. Саккардо в 10 томе его 25-томного труда «*Sylloge Fungorum...*» (Собрание грибов). Соответственно, правильная номенклатурная

цитата этого вида выглядит как *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. in Sorokin [134; 255; 409].

После смерти Н.В. Сорокина весь его гербарий, включая голотип вида *H. sorokinianum*, был перемещен в гербарий А.А. Ячевского (ныне гербарий ВИЗР, г. Пушкин, Ленинградская обл., Россия – LEP) [134; 255]. К сожалению, в настоящее время голотип *H. sorokinianum* утерян и его судьба не известна.

В 1910 г. американскими учеными Л.Г. Паммелом, Ч.Дж. Кингом и А.Л. Бакке (L.H. Pammel, C.J. King, A.L. Bakke) независимо от П.А. Саккардо был описан вид *Helminthosporium sativum* Pammel, C.J. King et Bakke. Голотип этого вида был помещен в гербарий университета штата Айова (США) – IA, где хранится вплоть до настоящего времени [388; 255; 410].

На протяжении немногим более чем 10 лет после опубликования вышеупомянутой работы Л.Г. Паммела и соавторов считалось, что *H. sorokinianum* и *H. sativum* это два самостоятельных вида. В 1923 г. Ч.Е. Дрехслер (C.E. Drechsler) высказал предположение о том, что это один и тот же вид [259]. Годом позже ту же идею высказал и К.Е. Мурашинский [98]. В 1955 г. американским микологом Э.С. Латтреллом (E.S. Luttrell) было проведено сравнение голотипов *H. sorokinianum* и *H. sativum* и доказано, что это образцы одного вида [255; 362].

Глубокое реформирование рода *Helminthosporium* связано с введением в таксономическую практику нового диагностического признака – особенностей сумчатых стадий жизненного цикла этих грибов. При скрещивании в лабораторных условиях конидиальных форм (анаморф) различных изолятов гельминтоспориев удалось получить половые формы (телеоморфы) этих грибов [418; 419]. В итоге, большинство представителей формального рода *Helminthosporium* были вынесены в самостоятельные роды: *Drechslera* S. Ito (1930), *Bipolaris* Shoemaker (1959) и *Exserohilum* K.J. Leonard et Suggs (1974), с телеоморфами *Pyrenophora* Fr. (1823), *Cochliobolus* Drechsler (1934) и *Setosphaeria* K.J. Leonard et Suggs (1974), соответственно. При этом название *Helminthosporium* не исчезло из употребления и продолжает использоваться для наименования

некоторых видов, к примеру, *H. velutinum* Link ex Fr. (телеоморфа *Splanchnonema* Corda in Sturm) [33; 188; 190; 364; 365; 363; 419].

Сумчатое спороношение гриба *H. sativum* было впервые получено в 1929 г. японскими учёными С. Ито (S. Ito) и К. Курибаяши (K. Kuribayashi). Оно было отнесено к роду *Ophiobolus* Riess (1854) и названо *Ophiobolus sativus* Ito et Kuribaiaschi [329; 330; 343].

В 1934 г. Ч.Е. Дрехслер провел таксономическую реформу рода *Ophiobolus* и выделил ряд представителей этого таксона в самостоятельный род – *Cochliobolus* Drechsler [258]. Несколькими годами позже, в 1942 г. индийский миколог Дж.Ф. Дастур (J.F. Dastur), опираясь на наработки Ч.Е. Дрехслера, пересмотрел систематическое положение *Ophiobolus sativus* Ito et Kuribaiaschi и перенес этот вид в род *Cochliobolus*, назвав, соответственно, *Cochliobolus sativus* (Ito et Kuribayashi) Drechsler ex Dastur [250; 327; 443].

В 1959 г. канадский миколог Р.А. Шумакер (R.A. Shoemaker) выделил всех представителей формального рода *Helminthosporium*, телеоморфой которых является *Cochliobolus*, в самостоятельный род *Bipolaris* Shoemaker. К этому времени уже была доказана синонимичность названий *H. sorokinianum* и *H. sativum*. Соответственно, вид *H. sorokinianum* Sacc. in Sorokin был переименован в *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoemaker [418]. В настоящее время обособленность рода *Bipolaris* подтверждена молекулярно-генетическими методами [212; 416], а название *Bipolaris sorokiniana* является общепризнанным и широко употребляемым применительно к рассматриваемому виду [33; 157; 203; 418; 451].

В связи с тем, что на различных этапах изучения, применительно к виду *B. sorokiniana* использовалось несколько альтернативных названий, полная номенклатурная характеристика этого вида выглядит следующим образом:

Bipolaris sorokiniana (Sacc. in Sorokin) Shoemaker, Can. J. Bot. 37(5): 884 (1959).

= *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. in Sorokin, Тр. Казанск. Об-ва Естествоиспыт., 22(3): 1-32 (1890).

= *Helminthosporium sativum* Pammel, C.J.King et Bakke, Bulletin of Iowa State College 116: 180 (1910).

= *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. et B.L. Jain, Curr. Sci. 35: 354 (1966).

Сумчатая стадия: *Cochliobolus sativus* (S.Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur, Indian Journal of Agricultural Research 12: 733 (1942).

= *Ophiobolus sativus* S.Ito et Kurib., Trans. Sapp. Nat. Hist. Soc. 10: 138 (1929).

Согласно системе, принятой в 9-м издании «Ainsworth and Bisby`s Dictionary of the fungi» анаморфный гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoemaker, равно как и его сумчатая стадия *Cochliobolus sativus* (S.Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur, относятся к отделу Ascomycota R.H. Whittaker (1959), классу Ascomycetes G. Winter (1881), подклассу Dothideomycetidae Arx et E.Müll. (1954), порядку Pleosporales Luttrell (1955) ex Barr (1983), семейству Pleosporaceae Wint. (1885), роду *Cochliobolus* Drechsler (1934) [186].

Согласно альтернативной молекулярной системе О.Е. Эрикссона (O.E. Eriksson) и Д.Л. Хоксворта (D.L. Hawksworth), опубликованной в 2004 г., изучаемый гриб относится к отделу Ascomycota R.H. Whittaker (1959), подотделу Pezizomycotina О.Е. Erikss. et Winka (1997), классу Dothideomycetes О.Е. Erikss. et Winka (1997), порядку Pleosporales Luttrell ex M.E. Barr (1987), семейству Pleosporaceae Wint. (1885), роду *Cochliobolus* Drechsler (1934) [275].

Согласно традиционной системе анаморфных грибов, *Bipolaris sorokiniana* относится к формальному отделу Deuteromycota R.T. Moore (1971), подотделу Deuteromycotina Kendrick (1989), классу Hyphomycetes Fr. (1821) sensu Sutton (1980), порядку Hyphomycetales Sacc. (1886), семейству Dematiaceae Sacc. (1899), роду *Bipolaris* Shoemaker (1959) [428].

В настоящее время установлено, что *B. sorokiniana* может инфицировать примерно 200 видов культурных и дикорастущих злаков. Среди культурных злаков этим грибом в наибольшей степени поражается ячмень, а в наименьшей – овёс, а из многолетних злаковых трав этот вид наиболее опасен для пырея, костреца, мятлика, овсяницы и плевела [33; 102; 147; 232; 440]. Имеется несколько сообщений об обнаружении *B. sorokiniana* на бобах [33; 291; 292; 307].

1.1.2. Морфологические особенности бесполого спороношения *B. sorokiniana*

Согласно типовому описанию, вид *Bipolaris sorokiniana* характеризуется образованием коричневатых дерновинок, состоящих из удлинённых коричневых конидиеносцев. Конидии яйцевидно-веретеновидные продолговатые, несколько заостренные с одной стороны, $80-100 \times 30 \text{ }\mu\text{m}$, с 5-10 септами, слегка перетянутые, прямые или согнутые [134; 409].

В 50-60-е годы XX в. с *B. sorokiniana* работала целая плеяда талантливых ученых из различных стран мира, в результате чего диагноз этого вида постоянно дополнялся [164; 320; 321; 364; 365; 422; 429; 430]. Наибольший интерес представляют работы Э.С. Латтрелла, так как этот исследователь работал не только с вновь собранными образцами *B. sorokiniana*, но и с утраченным ныне голотипом. Согласно описанию Э.С. Латтрелла *B. sorokiniana* имеет простые, цилиндрические, темно-коричневые конидиеносцы, $72-308 \times 5-7 \text{ }\mu\text{m}$ длиной, с базальными клетками $12-14 \text{ }\mu\text{m}$ в диаметре, с 3-13 септами. Конидии этого гриба веретеновидные, темно-коричневые, толстостенные, $43-109 \times 19-25 \text{ }\mu\text{m}$, с 6-10 септами. Они формируются между эпидермальными клетками или же прорастают непосредственно сквозь внешние стенки эпидермальных клеток хозяина [362; 365].

Исследования онтогенеза конидий *B. sorokiniana* показали: гриб образует конидии бластического типа, формирующиеся через пору в наружном слое клеточной стенки конидиогенной клетки, т.е. пороконоидии. Все споры этого типа достигают окончательного размера и формы до отделения септой от конидиеносца. На первом этапе дифференцировки созревающей споры ее протопласт окружается второй внутренней клеточной стенкой. Затем эта клеточная стенка образует несколько септ, в результате чего вся спора оказывается разделенной на несколько сферических ячеек [271; 320; 321; 364; 365]. Ультраструктура клеток, строение клеточных стенок и характер септированности мицелия и спор *B. sorokiniana* является типичным для аскококулярных грибов [200; 238; 316].

Последней обобщающей работой, посвященной роду *Bipolaris*, является обзорная статья Л.Л. Великанова и Б.А. Хасанова. Они указывают, что для *B. sorokiniana* характерно образование крайне изменчивых конидий – цилиндрических, яйцевидных, веретеновидных, эллипсоидальных, обратно-булавовидных, обычно изогнутых, иногда неправильной формы, темно-оливково-коричневых до почти черных, с (1) 4-10 (12) хорошо видимыми дистосептами, длиной (20) 50-100 (135) μm , шириной – (14) 17-26 (34) μm . На природном материале конидии обычно более вытянутые, крупные и темные; в культуре же они более широкие, мелкие и светлоокрашенные. Рубчик на конидиях слегка выступающий, 2-6 μm диаметром. Конидиеносцы расположены одиночно, реже собраны в небольшие группы, нередко коленчато-изогнутые, 20-200 $\times$ 8-10 μm , пигментированные [33].

1.1.3. Условия формирования и морфология сумчатого спороношения *B. sorokiniana*

Сумчатое спороношение *B. sorokiniana*, известное под названием *Cochliobolus sativus*, достаточно легко формируется при скрещивании изолятов различного типа спаривания в лабораторных условиях [89; 363; 443]. Глубокое изучение биологических особенностей *C. sativus* было проведено в конце 40-х начале 50-х годов XX в. канадским микологом Р.Д. Тинлайном (R.D. Tinline) и его коллегами с Канадской станции сельскохозяйственных исследований. При скрещивании моноспоровых изолятов *B. sorokiniana* на различных питательных средах в различных условиях культивирования им удалось изучить закономерности скрещиваемости изолятов, а также онтогенез плодовых тел и условия их формирования [443; 446].

В частности, Р.Д. Тинлайном было показано, что для *C. sativus* характерен биполярный гетероталлизм, когда генетическая совместимость талломов контролируется одной парой аллельных генов. Было доказано, что, несмотря на то, что мужские и женские половые структуры у рассматриваемого вида образуются на одном и том же мицелии, самооплодотворение не происходит [331; 443].

Плодовые тела *C. sativus* – псевдотеции, т.е. образуются по асколокулярному типу. При развитии такого плодового тела вначале закладывается стерильная строма, а уже затем в ней формируются сумки, которые по мере своего развития разрыхляют ее внутреннюю часть. В итоге зрелый псевдотеций *C. sativus* внешне напоминает перитеций. Все этапы полового процесса у *C. sativus* (плазмогамия, формирование стенок плодового тела, кариогамия, мейоз и формирование сумок) аналогичны таковым у других родов асколокулярных грибов [443; 446].

Плодовые тела *C. sativus* могут формироваться на питательных средах различного состава: на агаре из отрубей, кукурузном агаре, картофельно-декстрозном агаре, питательном агаре Сэха независимо от присутствия или отсутствия в них витаминов. Хорошей средой для полового спороношения *C. sativus* оказались простерилизованные или обработанные кипятком зёрна злаков, частично погружённые в агар Сэха [126; 193; 443].

Псевдотеции *C. sativus* начинают появляться на 4-10-й день после плазмогамии. Вначале они имеют вид белых или желтовато-бурых пучков или мицелиальных плёнок и состоят из прозрачных псевдопаренхиматических клеток. Затем они постепенно увеличиваются в размерах и темнеют, в результате чего по прошествии 4-5 недель их цвет становится черно-бурым. Высота зрелых псевдотециев *C. sativus* варьирует в диапазоне 310-530 μm , ширина – 270-470 μm . Сумки этого гриба обычно восьмиспоровые (реже одно-, четырех- или шестиспоровые), толстостенные, цилиндрические или булавовидные, прямые или слегка искривленные, несколько расширенные посередине, с короткой ножкой и закругленной верхушкой, 110-255 $\times$ 27-45 μm . В каждом плодовом теле содержится до 60 сумок. Сумкоспоры нитевидные, вначале гиалиновые, затем становящиеся оливковыми, с гранулярным содержимым, с суженными концами, вначале одноклеточные, затем многоклеточные с 6-14 септами, 160-360 $\times$ 5-10 μm . Нередко зрелые сумкоспоры распадаются на фрагменты, причем каждый фрагмент способен прорасти ростовой трубкой [193; 315; 316; 363; 443].

В культуре *B. sorokiniana* часто образуются светлоокрашенные компактные сплетения стерильных гиф. Р.Д. Тинлайну удалось установить, что эти структуры,

названные им прототециями, являются стерильными зачатками плодовых тел. Прототеции часто формируются даже при выращивании моноспоровых изолятов или несовместимых пар изолятов. Они имеют высокую степень дифференциации стромы, но лишены дикариотических гиф [331; 443; 446].

1.2. Болезни растений, вызываемые *B. sorokiniana*

1.2.1. Гельминтоспориозная корневая гниль

Корневая гниль, вызываемая грибом *Bipolaris sorokiniana* традиционно известна под названием «гельминтоспориозная корневая гниль». Это заболевание относится к числу малозаметных, но вместе с тем очень вредоносных болезней хлебных злаков. Гельминтоспориозную корневую гниль часто называют «болезнью современных систем земледелия», так как ее вредоносность возрастает по мере специализации и концентрации зернового хозяйства [21, 76; 108; 171; 273]. Начиная с 1950-х годов, эпифитотии гельминтоспориозной корневой гнили регулярно фиксируются в различных регионах Земного шара [171; 322; 407; 460; 353; 456]. Ежегодные потери урожая зерновых культур вследствие развития корневой гнили составляют 7-15%, достигая в отдельные годы 50% и более [21; 65; 242; 302; 398].

Вредоносность корневой гнили начинает проявляться на самых ранних этапах онтогенеза растений, поскольку это заболевание приводит к загниванию и ослаблению проростков. В дальнейшем у растения угнетается развитие корневой системы, снижается площадь листовой поверхности, снижается прочность механических тканей, уменьшается продуктивная кустистость, число зерен в колосе и масса семян [21; 171; 322; 407]. Некоторые авторы склонны разделять поражение взрослых растений и проростков, выделяя поражение молодых растений в самостоятельное заболевание – загнивание всходов или seedling blight [297; 357; 359; 398; 423; 471].

Термин «корневая гниль» имеет широкое значение и охватывает заболевания не только корней, но также и основания стеблей в прикорневой зоне [19; 66; 107]. Среди хлебных злаков самой восприимчивой к гельминтоспориозной корневой гнили культурой является ячмень [48; 127; 243]. Степень развития этого

заболевания на яровом ячмене в отдельных случаях может достигать 85% [49].

Прямой корреляции между степенью развития корневой гнили на различных сортах ячменя и их урожайностью получено не было, однако достоверно установлено, что по мере увеличения развития корневой гнили наблюдается тенденция уменьшения урожая [174; 458]. Поражение растений гельминтоспориозной корневой гнилью в значительной степени видоизменяет метаболизм больного растения [59]. Развитие корневой гнили приводит к уменьшению количества репродуктивных стеблей [262], снижению массы семян и уменьшению их размеров [352; 458]. Одновременно ухудшаются технологические и посевные качества зерна [25; 49; 60; 107]. Загнивание нижних узлов соломины при поражении злаков *B. sorokiniana* приводит к их размягчению, что нередко становится причиной высокой полегаемости растений [107; 138].

Корневые гнили обычно оказываются наиболее вредоносными в условиях, неблагоприятных для развития растений [107; 392]. Так, устойчивость к корневой гнили резко снижается при нарушении агротехники, несбалансированном увлажнении, резких перепадах температур, механических повреждениях растений и других неблагоприятных воздействиях [138; 147; 154; 392]. Поражённость подземной части стебля гельминтоспориозной корневой гнилью заметно увеличивается при заглублённом посеве семян [46]. Определяющее значение для развития гельминтоспориозной корневой гнили имеют почвенные условия и состояние растения в первую половину его вегетации [7; 17; 130; 197].

Инфицирование растений грибом *B. sorokiniana* сильно зависит от условий минерального питания. Наибольшее вредоносное воздействие *B. sorokiniana* оказывает на больные и ослабленные растения, страдающие от недостатка питательных веществ, а также на растения, получившие избыточное количество азотных удобрений [78; 211; 242; 345].

Из числа метеорологических факторов, оказывающих влияние на развитие гельминтоспориозной корневой гнили, наиболее значимыми являются температура и влажность. Эти факторы тесно связаны между собой, и достаточно сложно вычленить какой из них является ключевым. Так, высокая влажность

почвы необходима для успешного заражения растений спорами возбудителя, однако, она практически не оказывает влияния при развитии семенной инфекции. Когда инфицирование уже состоялось и влажность не является лимитирующим фактором, на первый план выходит температура почвы и воздуха. При этом высокая температура, вредящая нормальному развитию растения, стимулирует развитие на корнях *B. sorokiniana* [209]. Несмотря на то, что гельминтоспориозная корневая гниль интенсивно развивается в годы с засушливым летом, прямой коррелятивной зависимости между степенью устойчивости сортов к засухе и к обыкновенной корневой гнили не установлено [392].

Развитию гельминтоспориозной корневой гнили может способствовать поражение растений другими видами фитопатогенов [66; 138]. Вредоносность этого заболевания также может заметно усиливаться под действием насекомых-вредителей и нематод [2; 138].

1.2.2. Темно-бурая пятнистость листьев

Темно-бурая пятнистость листьев (далее ТБП), вызываемая *Bipolaris sorokiniana*, относится к числу наиболее вредоносных заболеваний хлебных злаков. Заболевание проявляется в виде удлиненных темно-коричневых некротических пятен, обычно вытянутых вдоль жилок листа, на и вокруг которых формируется конидиальное спороношение патогена. Наибольшее развитие этого заболевания отмечено в странах с теплым и влажным климатом [114; 121; 153; 207; 210; 273]. Наиболее поражаемой данным заболеванием зерновой культурой является яровая ячмень [107; 139; 286; 347]. Ежегодное поражение ячменя ТБП обычно составляет 30% и выше, а потери урожая могут достигать 16% – 30% [156; 183; 210; 468].

ТБП является полициклическим заболеванием, т.е. успевает пройти несколько циклов развития за период вегетации растения-хозяина. Это часто приводит к многократному усилению развития заболевания и возникновению эпифитотии. При благоприятных условиях окружающей среды цикл спороношения патогена занимает 7-10 дней [121; 367]. Главным источником первичного инокулюма *B. sorokiniana* служат заражённые семена, инфицированные растительные остатки,

почва, содержащая конидии гриба, а также инфицированные дикорастущие злаки. Вторичный инокулюм возникает из первичного в результате множественных циклов размножения патогена в течение вегетационного сезона [97; 367].

На развитие ТБП оказывают влияние очень многие факторы: наличие, количество и патогенность инокулюма, температура, влажность, густота посевов, устойчивость возделываемого сорта и т.п. [95; 194; 340; 367]. Ключевым фактором, который сдерживает развитие эпифитотии при благоприятных для её развития условиях, является степень устойчивости сорта растений к заболеванию [155; 195].

Основными абиотическими факторами, которые влияют на степень развития ТБП, являются температура и влажность. Отмечено, что развитие заболевания значительно усиливается при повышении температуры воздуха. Так, наименьший инкубационный период (при высокой влажности воздуха) наблюдается при температуре 26-30⁰С и увеличивается по мере снижения температуры. Высокая температура воздуха в большей степени необходима для быстрого инфицирования растения и в меньшей – для последующего развития возбудителя в тканях [153; 155].

К усилению развития ТБП приводит недостаток азота в почве, причём развитие заболевания усиливается при минимальной вспашке и повышенной влажности воздуха в период инфицирования [277; 339].

Меры борьбы с ТБП основаны на сокращении количества эффективного инокулюма и достигаются целым рядом мероприятий: соблюдением севооборота (для быстрой минерализации растительных остатков и элиминации инокулюма возбудителя в почве); использованием здорового посевного материала; уничтожением сорных растений – источников инфекции; применением фунгицидов и возделыванием высокоустойчивых сортов. Для ограничения развития ТБП требуется соблюдение условий посева, ухода за растениями и уборки урожая, своевременное и сбалансированное внесение удобрений, а также своевременное принятие защитных мер [205; 403; 467].

Доказано, что использование севооборота, при котором злаки выращиваются

на одном и том же поле один год из трёх минимизирует запас эффективного инокулюма *B. sorokiniana* в почве и приводит к значительному уменьшению поражённости посевов тёмно-бурой пятнистостью и черным зародышем [208; 265; 277; 467]. Введение же в севооборот после ячменя широколиственных злаков (культур, не поражаемых *B. sorokiniana*) не рекомендуется, так как приводит к усилению фузариоза [210].

Важно отметить, что для подавления развития ТБП фунгициды используются крайне редко и лишь для предотвращения вспышки развития заболевания при угрозе возникновения эпифитотии. Считается экономически более оправданным сдерживать развитие ТБП путём возделывания устойчивых к данному заболеванию сортов растения-хозяина. Поэтому изучение закономерностей наследования устойчивости злаков к ТБП, выведение устойчивых к данному заболеванию сортов является одной из первоочередных задач [210; 311; 340; 387; 411].

1.2.3. Черный зародыш семян

Основным источником инфекции для возобновления темно-бурой пятнистости и гельминтоспориозной корневой гнили являются больные семена [60; 92; 93; 101; 107; 125; 128; 247; 295; 312; 420; 460]. Поражение семян грибом *Bipolaris sorokiniana* обычно сопровождается побурением покровов зерновки в зоне зародыша, из-за чего заболевание принято называть «черный зародыш» (далее ЧЗ) [25; 45; 107; 180]. В наибольшей степени заболеванию черным зародышем подвержен яровой ячмень [139; 151]. Многолетнее изучение состояния семян хлебных злаков, проведенное в странах Восточной Европы, показало их значительное поражение ЧЗ [29; 124; 139; 180].

В чернозародышевых семенах мицелий *B. sorokiniana* развивается преимущественно в покровах зерновки, хотя иногда гифы возбудителя могут быть обнаружены в эндосперме, плёнке, плодовой оболочке и основании семяножки [45; 107; 142; 280; 308]. Изредка отмечается очень глубокое проникновение инфекции вплоть до зародыша [28; 124; 236]. При благоприятных условиях

(низкой температуре и влажности) мицелий *B. sorokiniana* может сохраняться в зерне до 5 – 7 лет [45; 137; 151; 152; 308].

Глубина распространения патогена внутри семян существенно зависит от времени их инфицирования. Наиболее опасным для растений является раннее инфицирование – в стадии молочной спелости зерна. При позднем же заражении, в стадии восковой или полной спелости, мицелий развивается преимущественно в покровах семян, что практически не отражается на жизнеспособности последних [107; 113; 128; 151; 280]. Локализация инфекционного начала в семенах существенно зависит от особенностей сорта растения-хозяина [124; 236; 345].

Степень развития ЧЗ сильно зависит от погодных условий во второй половине вегетации растений. Так, высокая температура и относительная влажность воздуха (95 – 97%) в период налива зерна способствует интенсивному поражению семян *B. sorokiniana*. В засушливые же сезоны инфицирование семян этим грибом происходит в незначительной степени [107; 124; 180].

По мнению ряда авторов, семена злаков инфицируются от больного растения или иного источника инфекции снаружи (аэрогенно), а не изнутри (диффузно), как в случае генеративной передачи инфекции. Они указывают, что основным источником инфекции ЧЗ являются конидии, сформировавшиеся на листьях и основании стеблей растения-хозяина или дикорастущих злаков [41; 42; 45; 97]. Некоторые авторы отмечают возможность диффузного инфицирования семян – от основания стебля к колосу [29].

Заражение возможно в течение всего периода созревания семян [113]. Споры возбудителя могут разноситься ветром на очень большие расстояния и встречаются на высоте до 3 км. Максимальное их количество отмечается в воздухе в полдень, минимальное рано утром. Наиболее интенсивное осаждение спор происходит в июне – сентябре, с максимумом в августе [42; 151].

Существует прямая зависимость между развитием ЧЗ и сроками уборки урожая. Так, при поздней уборке процент больных семян всегда больше. Принято считать, что перестой созревшего ячменя на корню приводит к пролонгации периода инфицирования семян, что и способствует их более массовому

заражению [42; 52]. Помимо этого, усиление развития ЧЗ в перестойных колосьях может быть обусловлено более интенсивным развитием в них мицелия возбудителя. Так, под действием атмосферных осадков, покровы семян периодически увлажняются, что способствует разрастанию в них мицелия *B. sorokiniana* [107; 128].

В литературе можно встретить данные, что масса 1000 семян, пораженных ЧЗ, достоверно выше, чем здоровых. Этот, на первый взгляд, странный факт имеет рациональное объяснение. Так, для того, чтобы ЧЗ проявился в значительной степени и был замечен невооруженным взглядом, требуется интенсивное развитие мицелия возбудителя в покровах зерновки. Как уже отмечалось выше, это возможно лишь при достаточной влажности семян. Поэтому в колосе наиболее подвержены поражению ЧЗ нижние и средние зёрна – наиболее крупные, содержащие больше влаги и медленнее созревающие [128; 151; 196]. Кроме того, при формировании крупного зерна колосковые чешуи раздвигаются в большей степени, что обеспечивает большую доступность таких семян спорам возбудителя из воздуха. Поэтому, все мероприятия, приводящие к повышению размеров семян, обычно приводят к усилению развития ЧЗ [125].

Важнейшей чертой ЧЗ является то, что даже интенсивное поражение семян возбудителем редко приводит к ощутимому снижению урожая зерна и качества изготавливаемой из него муки. Однако это не может свидетельствовать о том, что данное заболевание имеет низкую вредоносность. Подобно ряду других семенных инфекций, к примеру, пыльной головне, вредоносность ЧЗ проявляется лишь на следующий вегетационный сезон, после посева больных семян в почву. Семенная инфекция оказывает большое влияние на энергию прорастания, силу роста, всхожесть семян и жизнеспособность проростков [52; 107; 124; 128; 151; 295].

Главным фактором вредоносности ЧЗ является то, что семена, зараженные грибом *B. sorokiniana*, являются источником возобновления гельминтоспориозной корневой гнили и темно-бурой пятнистости листьев. Как уже отмечалось выше, существует два основных источника инокулюма *B. sorokiniana* в новом вегетационном сезоне: почвенная инфекция и семенная инфекция [42; 45; 58; 107;

295]. Роль этих источников в различных климатических зонах Земного шара неодинакова. Так, в районах Казахстана, Поволжья и юга Украины в возобновлении гельминтоспориозов принимает активное участие преимущественно почвенная инфекция. В большинстве районов Украины, Беларуси, Центрально-Чернозёмной зоне России и Сибири главным источником возобновления *B. sorokiniana* являются инфицированные семена [28; 151; 169].

Вредоносность ЧЗ определяется локализацией и степенью развития мицелия *B. sorokiniana* в семенах, индивидуальными свойствами растения-хозяина, структурой популяции возбудителя, а также почвенными и климатическими условиями [128; 151, 280; 295; 346]. При развитии мицелия в покровах зерновки всхожесть семян остается высокой, и, формально, инфицированные семена могут отвечать требованиям 1-го класса посевного стандарта. При глубоком поражении, особенно когда инфекционное начало достигает зародыша, посевные качества семян резко ухудшаются, вплоть до полной утраты ими способности прорасти [28; 135; 295].

Рядом авторов показано, что в полевых условиях часть проростков, выросших из чернозародышевых семян, гибнет в почве ещё до выхода на поверхность, часть даёт ослабленные проростки с признаками корневой гнили, а часть может вырасти в нормальные растения [151; 295]. В то же время, показано, что в полевых условиях выживаемость проростков, развившихся их семян, инфицированных *B. sorokiniana*, обычно несколько выше, чем при лабораторном тестировании [28; 60; 346].

Важно отметить, что симптомы почернения покровов зерновки не являются специфичными признаками развития *B. sorokiniana* и могут проявляться при развитии грибов *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl. (= *Alternaria tenuis* Nees.) [63; 124; 191; 375; 483], *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link [52; 483], а также некоторых бактерий [100; 144].

Черный бактериоз или «блэк-чaff» (от англ. black-chaff) вызывается некротрофной бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (Jones, Johnson et Reddy) Dye (= *Xanthomonas translucens* Dowson). Заболевание может проявляться

на всех надземных частях растения и распространяется при перехлесте здоровых и больных растений ветром, а также насекомыми. Пораженные семена, как правило, полностью утрачивают всхожесть и при проращивании на них проявляются типичные симптомы мокрой гнили. Поэтому выявление этого возбудителя в лаборатории не вызывает затруднений [100; 144].

Иногда колосковые чешуи и зерновка злаков могут окрашиваться в черный или бурый цвет вследствие проявления ранее скрытого пигмента. Такое явление не имеет инфекционной природы и известно под названием «псевдо-блэк-чаф» (pseudo-black-chaff). Таким образом, почернение покровов семян злаков может иметь физиологическую, а не инфекционную природу [221]. В ряде случаев поражение семян возбудителями черного зародыша не сопровождается существенным потемнением их покровов, тем самым заболевание может иметь скрытый характер [26; 41; 42; 328].

Наиболее распространенным грибом, который сопутствует развитию *B. sorokiniana* в семенах является *A. alternata* [26; 42; 63; 124; 239; 295]. Доля *B. sorokiniana* и *A. alternata* в итоговом развитии черного зародыша варьирует в различные годы в различных регионах Земного шара. Так, в Польше и Беларуси обычно доминирует *B. sorokiniana*, а в Канаде – *A. alternata* [26; 42; 239; 295].

Очевидно, что чернозародышевость семян имеет сложную природу, поэтому количественная диагностика *B. sorokiniana* в больных семенах является непростой методической задачей.

1.3. Особенности сапротрофного развития *B. sorokiniana*

1.3.1. Сапротрофное развитие *B. sorokiniana* in vivo

Жизненный цикл *Bipolaris sorokiniana* тесно ассоциирован с питающим растением. Вне живого растения мицелий гриба развивается исключительно в неминерализованных растительных остатках. Несмотря на то, что в условиях чистой культуры *B. sorokiniana* не требователен к составу питательной среды, в природе возможности его сапротрофного развития очень ограничены. Доказано, что мицелий гриба не приспособлен к длительному сапротрофному развитию в почве и быстро вытесняется почвенными микроорганизмами [105; 138; 289; 385; 406; 448].

Основной формой выживания *B. sorokiniana* вне тканей растения-хозяина являются конидии [5; 19; 20; 225; 265; 284; 406] и хламидоспоры [33; 371]. Эти структуры являются одним из важнейших источников возобновления гельминтоспориозов в новом вегетационном сезоне [6; 21; 171; 337].

Накопление конидий *B. sorokiniana* начинается на отмерших частях ещё живого растения, продолжается на стерне и завершается на растительных остатках после их запахивания в почву [20; 170; 197; 264]. Наибольшее количество спор гриба (около 60%) образуется в области корневой шейки, несколько менее - на участке стебля ниже корневой шейки и лишь малая часть - на корнях [263; 469]. Активность образования спор сильно зависит от количества растительных остатков и изначальной степени инфицированности растений [170; 233; 266; 448].

Динамика образования спор *B. sorokiniana* на растительных остатках зависит в первую очередь от температуры и влажности почвы. Массовое спороношение гриба развивается при положительных температурах (8 – 20⁰С) и благоприятной влажности почвы (50 – 80% от полной влагоёмкости) [19; 263]. Наиболее обильны 1-я и 2-я генерации конидиального спороношения (15 и 30 суток, соответственно). Каждая последующая генерация спор оказывается заметно слабее предыдущей, и через 2-2,5 месяца после уборки урожая образование спор практически прекращается [20; 265].

При быстром наступлении осенних холодов или при недостаточной влажности почвы мицелий гриба как бы «консервируется» в растительных остатках до наступления благоприятных условий в следующем вегетационном сезоне и способность гриба формировать конидии растягивается во времени [8; 20; 264; 406]. Минерализация растительных остатков практически прекращается при водном потенциале меньше чем $-0,1\text{МПа}$ и температуре ниже 10°C [20]. Поэтому роль растительных остатков в сохранении инфекционного начала *B. sorokiniana* и динамика спорообразования в различных регионах Земного шара неодинакова [20; 171; 205; 207; 244; 326; 405].

Главная роль в подавлении жизнеспособности мицелия и регулировании прорастания спор *B. sorokiniana* вне растения-хозяина принадлежит токсическим экзометаболизмам почвенных микроорганизмов. Суммарное взаимодействие этих веществ приводит к возникновению явления почвенного фунгистазиса [62; 202; 229; 257; 294; 361].

Благодаря почвенному фунгистазису происходит подавление прорастания конидий *B. sorokiniana* и они могут сохраняться непроросшими на протяжении нескольких лет [227; 256; 260; 306]. Выход спор из состояния покоя происходит благодаря стимулирующему воздействию экзометаболизмов растений-хозяев [13; 39; 229; 356; 380; 461; 479]. Вышеназванное явление получило название «ризосферного эффекта» [381].

Воздействие почвенных токсинов на *B. sorokiniana* не ограничивается регулированием прорастания спор. Эти вещества оказывают и прямое токсическое воздействие на мицелий и споры гриба. Доказано, что *B. sorokiniana* относится к числу видов с высокой чувствительностью к действию токсинов почвенных микроорганизмов, при этом споры отличаются меньшей чувствительностью к токсинам, чем мицелий. Поэтому конидии могут переносить действие токсинов на протяжении нескольких лет, в то время как мицелий гриба погибает в течение нескольких недель. В растительных остатках мицелий гриба некоторое время защищен от воздействия токсинов почвенных грибов и бактерий. По мере колонизации растительных остатков почвенными сапротрофами

наблюдается постепенное подавление развития в них *B. sorokiniana* [4; 229; 256; 349; 424].

В случае, если спора *B. sorokiniana* прорастает в почве, но не находит растения-хозяина, обычно происходит лизис ростовой трубки [4; 130; 202; 227]. В то же время, было отмечено, что у *B. sorokiniana* в почве может происходить так называемое «скороспелое» прорастание спор, когда на верхушке проросшей споры, не нашедшей растения-хозяина, образуются вторичные конидии [217].

На выживаемость *B. sorokiniana* в условиях сапротрофного развития *in vivo* большое влияние оказывают способ обработки почвы [20; 130; 145; 146; 166; 195; 244; 264; 265; 280; 360; 406; 408], соблюдение севооборота [69; 76; 91; 103; 122; 241; 242; 248; 276; 351] и внесение удобрений [7; 168; 169; 173; 211; 216; 226; 251; 282; 450; 457].

Проявление почвами фунгистатических свойств в значительной степени зависит от их кислотности. Так, на кислых почвах *B. sorokiniana* сохраняет жизнеспособность значительно дольше, чем на нейтральных [75].

Наибольшая интенсивность гибели мицелия и спор *B. sorokiniana* наблюдается в почвах с высокой активностью почвенных микроорганизмов [4; 79; 105; 310; 335; 457], а также во влажных почвах, когда токсины находятся в растворённом виде и приобретают возможность взаимодействовать со спорами гриба [457]. Показано, что в простерилизованной почве сохраняемость конидий *B. sorokiniana* в три и более раз выше, чем в нативной [7].

Почвенные микроорганизмы влияют на выживаемость *B. sorokiniana* как опосредованно – путём выделения токсинов, так и непосредственно. Многочисленные обитатели почв могут использовать мицелий и споры *B. sorokiniana* в качестве питательного субстрата [167; 261; 427; 459]. Благодаря слабой приспособленности *B. sorokiniana* к сапротрофному развитию в условиях *in vivo*, показано, что биологический метод контроля численности этого патогена особо эффективен [245; 261; 269; 461].

1.3.2. Сапротрофное развитие *B. sorokiniana* in vitro

Bipolaris sorokiniana легко культивируется в условиях in vitro на питательных средах различного состава, а также на различных растительных субстратах [36; 117; 126; 162; 264]. На агаризованных средах изоляты гриба обычно формируют очень разнообразные колонии, отличающиеся габитусом, окраской, скоростью роста, активностью спорообразования и морфологией спор. Причем, различные среды позволяют в различной степени выявить морфологическое разнообразие изолятов *B. sorokiniana* и могут быть разделены на среды-дифференциаторы и среды-стабилизаторы [36; 73; 117; 126].

Эталонной средой для выращивания чистых культур *B. sorokiniana* при выполнении научных экспериментов является синтетическая среда Чапека. Преимуществом этой среды является простота и точность ее приготовления, так как все компоненты ее состава количественно определены [104; 117; 452]. Для получения массового спороношения *B. sorokiniana* в культуре рекомендуется использовать сахарозно-аспарагиновый агар с дрожжевым экстрактом [126].

На агаризованных средах *B. sorokiniana* обычно формирует бархатистые, реже войлочные, темноокрашенные, темно-коричневые, иногда почти черные колонии, нередко с секторами белого цвета или концентрическими кругами по краям. Реверзум колоний, как правило, черный или темно-коричневый, иногда с розоватым оттенком (в случае выращивания культур на ярком свете). Гриб имеет хорошо ветвящийся септированный мицелий и нередко образует переплетенные пучки гиф, напоминающие коремии. Иногда на гифах и спорах *B. sorokiniana* появляются терминальные или интеркалярные хламидоспоры [33; 371].

Отмечено, что при температуре культивирования в диапазоне 18 – 27⁰С между различными изолятами *B. sorokiniana* сохраняются отчетливые различия, в то время как при температуре 12⁰С и ниже изоляты внешне не отличаются друг от друга [36].

B. sorokiniana способен активно развиваться на средах, содержащих различные источники углерода. Среди простых углеводов гриб предпочитает фруктозу, сахарозу, мальтозу, маннозу и глюкозу, и несколько хуже развивается

на средах с лактозой и галактозой. Среди полисахаридов крахмал усваивается грибом несколько лучше, чем целлюлоза [12; 74; 162; 299].

B. sorokiniana также нетребователен к источникам азотного питания. По данным многочисленных авторов гриб отдает предпочтение органическим формам азота (аспарагин и мочевины). Из сред с минеральными азотсодержащими соединениями он лучше развивается на тех, которые содержат аммонийный, а не нитратный азот [12; 47; 74; 391]. В то же время, было отмечено, что на средах, содержащих сульфат аммония, происходит подавление роста колоний по сравнению со средами, содержащими нитратный азот [117; 162; 235; 298; 431].

В связи с тем, что *B. sorokiniana* способен использовать в качестве источников питания лактозу и мочевины – вещества, трудно усваиваемые многими другими видами грибов, для выделения чистых культур этого вида разработана селективная среда – модифицированная среда Чапека с лактозой и мочевиной [14; 404].

Отмечено, что введение в агаризованную среду поверхностно-активных веществ, снижающих поверхностное натяжение, например, Тритон X100, Твин 80, в концентрации до 1 объемного процента, существенно влияет на морфологические особенности колоний и спор грибов. При этом значительно усиливается ветвление гиф в колониях и повышается частота септирования гиф и конидий [432]. Добавление поверхностно-активных веществ также позволяет ограничить рост колоний быстрорастущих видов грибов и активно используется при выделении изолятов *B. sorokiniana* из различных субстратов [18; 93; 230; 281].

Значительное влияние на частоту ветвления гиф в культуре оказывает концентрация минеральных солей в питательной среде. Так, в условиях осмотического стресса, отмечено существенное усиление ветвления гиф *B. sorokiniana* [432].

B. sorokiniana способен вегетировать в достаточно широком диапазоне температур. Наиболее интенсивный рост колоний гриба наблюдается при 20-26⁰С, заметно ослабляется при температуре ниже 15-17⁰С и выше 30⁰С и прекращается при температуре ниже 5-6⁰С и выше 35-36⁰С [181]. Сходная температурная

зависимость отмечена и для прорастания спор этого вида [65; 147; 154; 477].

B. sorokiniana способен вегетировать и активно спорулировать при значениях pH питательной среды в диапазоне от 4 до 9 и при концентрациях сахарозы в диапазоне от 1 до 30 г/л. При этом, по мере увеличения pH в рамках вышеуказанного диапазона, длина спор и число септ в спорах несколько уменьшаются. При увеличении содержания сахарозы в среде культивирования в диапазоне от 1 до 30 г/л, уменьшаются и длина спор, и ширина, и среднее количество септ в спорах. Максимальные рост и спороношение *B. sorokiniana* отмечено при pH=7 и концентрации сахарозы 1г/л [299].

B. sorokiniana способен формировать споры как на свету, так и в полной темноте, однако массовое спороношение гриба наблюдается лишь на свету. При этом даже краткосрочное ультрафиолетовое облучение колоний приводит к значительному повышению активности спорообразования [84; 201; 224; 350; 449].

Условия формирования псевдотеций и прототеций *Cochliobolus sativus* были детально изучены Р.Д. Тинлайном. Установлено, что прототеции могут формироваться в широком диапазоне температур – от 9 до 24⁰С, а псевдотеции лишь при комнатной температуре. Важнейшим условием для образования плодовых тел является высокая влажность воздуха, в то время как наличие, интенсивность и спектральные характеристики света не имеют значения [443].

1.4. Физиолого-биохимические и генетические особенности *B. sorokiniana*

1.4.1. Пигменты *B. sorokiniana* и их функции

Основными пигментами мицелия *B. sorokiniana* являются меланины, благодаря которым гриб приобретает тёмную окраску. В мицелии *B. sorokiniana* они сосредоточены преимущественно в наружном слое клеточной стенки и на её поверхности. При созревании конидий вещества-предшественники меланинов экскретируются и формируют кольцевую структуру [77; 449].

Грибные меланины бывают четырех типов: β -3,4-дигидроксифенилаланиновый (DOPA) меланин – производное тирозина, γ -глутаминил-3,4-дигидроксibenzenовый (GDHB) меланин – производное γ -глутаминил-4-гидроксibenзена (GHB), катехоловый меланин – производное катехола и дигидроксинафталеновый (DHN) меланин – производное пентакетиды [377]. Синтез меланинов у *B. sorokiniana* осуществляется по дигидроксинафталеновому метаболическому пути [435].

Основные функции грибных меланинов – защита от излучений и упрочнение клеточной стенки для лучшего поддержания конидиеносцем созревающих спор [374; 449]. Кроме того, меланины играют важную роль в проникновении ряда патогенных грибов в ткани растения-хозяина [462]. К примеру, это один из главных факторов вирулентности у гриба *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (анаморфа *Pyricularia oryzae* Cava), бесцветные мутанты которого не способны инфицировать растения. Меланины стабилизируют осмотические свойства основания аппрессория путём удержания глицерола и необходимы для образования инфекционной гифы [313; 374].

Для *B. sorokiniana* доказано, что отсутствие меланинов не приводит к существенному нарушению его паразитических свойств. Безмеланиновые мутанты гриба способны вызывать корневую гниль, загнивание всходов, пятнистость листьев и черный зародыш семян в той же степени, что и материнские тёмноокрашенные изоляты, т.е. окраска спор не связана с патогенностью [131; 292; 303; 393; 439]. Сходные результаты были получены в ходе исследования воздействия на *B. sorokiniana* высокоспецифичных

фунгицидов – ингибиторов биосинтеза меланинов [270; 341; 436]. Доказано, что независимо от наличия или отсутствия меланинов, после прикрепления к поверхности растения *B. sorokiniana* разрушает его клетки в месте проникновения с помощью литических ферментов [199; 396; 412; 473]. Кроме того, гриб способен обнаруживать устьица и проникать в межклеточное пространство растения непосредственно через них [214; 341].

Помимо меланинов, мицелий *B. sorokiniana* содержит дополнительный розовый пигмент. В норме он замаскирован меланином и незаметен, однако при нарушении синтеза последнего легко обнаруживается. Розовый пигмент наиболее интенсивно синтезируется на свету, поэтому, при выращивании меланин дефицитных изолятов *B. sorokiniana* в темноте или при слабом освещении, мицелий остаётся белым, а на ярком свету он приобретает розовую окраску. Розовые секторы часто появляются в колониях *B. sorokiniana* при выращивании культур *in vitro* [447]. Относительно названия и природы розового пигмента *B. sorokiniana* в литературе нет единого мнения. Так, по одним данным это вещество сативин полигидроксиксантоновой природы [447], а по другим это гельминтоспорин – производное антрахинона [274]. Физиологическая роль этого пигмента до сих пор не выяснена [274].

1.4.2. Вторичные экзометаболиты *B. sorokiniana* и их функции

В середине XX в. было обнаружено, что жидкие питательные среды, в которых культивируется *B. sorokiniana*, приобретают ярко выраженные токсические свойства. При предпосевном замачивании семян различных растений в культуральную жидкость наблюдалось резкое снижение их всхожести. Токсическое воздействие оказалось неспецифичным, и в одинаковой степени проявлялось на всходах пшеницы, ячменя, проса, овса, а также ряда незлаковых растений. При воздействии на взрослые растения культуральная жидкость вызывала хлороз и некротизацию ткани [285; 309; 358; 389].

В 1960-е гг. было высказано предположение, что *B. sorokiniana* способен экскретировать в окружающую среду токсины, которые являются основным

фактором патогенности этого гриба и играют ключевую роль в развитии вызываемых им заболеваний. Подразумевалось, что с помощью этих токсинов гриб подавляет защитные реакции растения, и, таким образом, использует стратегию некротрофного паразитизма [249; 285; 358].

В эти же годы П. де Майо (P. De Mayo) с соавторами выделили и характеризовали токсические экзометаболиты *B. sorokiniana*, получившие тривиальные названия гельминтоспораль и гельминтоспорол. Было показано, что по химической природе они являются сесквитерпенами и отличаются друг от друга лишь одним радикалом, альдегидным у первого соединения и спиртовым у второго. Помимо этого, были охарактеризованы возможные предшественники гельминтоспоралья и гельминтоспорола: прегельминтоспорал и прегельминтоспорол, а также их окисленные модификации: гельминтоспоровая и гельминтоспоральная кислоты [252-254].

В последующие годы были усовершенствованы методы экстракции, разделения и очистки экзометаболитов *B. sorokiniana*, изучены спектры поглощения и многие другие физико-химические свойства полученных веществ, что способствовало интенсификации исследований роли этих веществ в жизнедеятельности гриба [421; 474-475]. В 1982 г. было установлено, что гельминтоспорол и гельминтоспораль являются веществами-артефактами. *B. sorokiniana* не экскретирует эти соединения, и они появляются в культуральной жидкости в результате окисления кислородом воздуха веществ-предшественников: прегельминтоспоралья и прегельминтоспорола [246].

Уже в конце 1960-х гг. было обнаружено, что эффект, который оказывают терпеноидные экзометаболиты *B. sorokiniana* на растение, принципиально зависит от их концентрации. Так, концентрированные растворы гельминтоспорола токсичны, а разбавленные способны активизировать рост растений, подобно фитогормону гиббереллину [333; 434] и способствуют мобилизации сахаров в прорастающих семенах путём активации в них ферментов-амилаз [219; 383; 434; 463; 464]. Итогом этих работ стало предположение о гормональной функции терпеноидных экзометаболитов *B. sorokiniana* [53; 182; 246; 304; 305].

В 1978 г. российский миколог Л.Л. Великанов обнаружил, что в лабораторных условиях культуральная жидкость *B. sorokiniana* оказывала антагонистическое воздействие на культуры ряда грибов и бактерий, на основании чего он предположил, что экзометаболиты способствуют выживанию фитопатогена в почве [32]. Помимо этого им было обнаружено, что экзометаболиты *B. sorokiniana* могут участвовать в регулировании прорастания спор самого гриба. На основании проведенных наблюдений был сделан вывод о том, что эти вещества не допускают одновременного массового прорастания спор фитопатогена в почве [32]. Несколькими годами позже было обнаружено, что в малых концентрациях экзометаболиты *B. sorokiniana*, напротив, являются необходимым условием прорастания его спор [480].

Таким образом, во второй половине XX в. возникли две противоречащие друг другу концепции о функциональной роли терпеноидных экзометаболитов в жизни фитопатогенного гриба *B. sorokiniana*, обе из которых активно развиваются и имеют многочисленных сторонников и в наши дни.

Одни авторы склонны считать экскретируемые вещества токсинами, участвующими в умерщвлении клеток растения и подавлении развития микроорганизмов-конкурентов, а также не допускающими одновременного массового прорастания спор в почве [9; 11; 23; 32; 50; 220; 285; 309; 358; 384]. Дополнительным подтверждением этой позиции стали современные исследования молекулярных биологов. В частности, установлено, что прегельминтоспораль является ингибитором H^+ -АТФазы [384], Ca^{2+} -АТФазы и β -1,3-глюкан синтазы (каллозо-синтазы) [342]. Прегельминтоспорола нарушает проницаемость мембран, ингибирует окислительное фосфорилирование в митохондриях и хлоропластах [1; 220], ингибирует транспорт электронов на участке ФСII – ФСI и, вероятно, влияет на сопрягающий фактор СФ₁ или же нарушает проницаемость тилакоидной мембраны для ионов [1; 148; 150].

Другие исследователи описывают эти же вещества как гиббереллин-подобные гормоны, необходимые для перестраивания метаболизма инфицированного растения-хозяина и перераспределения оттока питательных веществ из

зараженных тканей, а также необходимые для инициирования прорастания спор гриба. Сторонники данной концепции полагают, что при культивировании гриба в замкнутом объеме, на ограниченном количестве питательной среды, в культуральной жидкости накапливаются чрезвычайно высокие концентрации экзометаболитов, не свойственные естественным патосистемам. Поэтому нативные культуральные фильтраты *B. sorokiniana* приводят к эффекту, противоположному тому, который оказывают входящие в их состав соединения в природе [51; 175; 246; 304; 305; 452]. Косвенным подтверждением этой точки зрения стало обнаружение в составе культуральной жидкости *B. sorokiniana* классических фитогормонов – цитокининов, ауксинов и абсцизовой кислоты [178; 478].

И, наконец, многочисленные авторы пытаются объединить в своих работах обе точки зрения. Они полагают, что ослабление и последующая гибель клеток инфицируемого растения, часто наблюдаемые при колонизации грибом организма-хозяина, происходят вследствие глубочайшего гормонального дисбаланса, вызываемого экзометаболитами *B. sorokiniana*. Тем самым, они признают, что эти вещества действуют как гормоны, но, при высоких концентрациях, оказываемый ими эффект является токсическим [178; 184; 342; 354].

В силу сложившихся традиций, применительно к этим веществам в микологической и фитопатологической литературе обычно используется термин «токсины» [11; 31; 112; 115; 198; 342; 354; 382]. Для однозначного выяснения роли терпеноидных экзометаболитов в жизни *B. sorokiniana* требуются дополнительные исследования. В частности, важно узнать, в каких концентрациях содержатся эти соединения в естественных условиях – в инфекционной капле, в тканях инфицированного растения и в почве [11; 31; 179].

Исследование влияния условий культивирования *B. sorokiniana* на продуцирование культурами токсических экзометаболитов показало, что состав питательной среды существенно влияет на способность гриба образовывать экзометаболиты. При этом не обнаружено корреляции между образованием

токсина и массой мицелия, а также количеством усвоенного азота и количеством образуемого токсина. Для достижения максимальной сопоставимости полученных разными исследователями результатов было рекомендовано выращивать гриб на стандартных аксенических питательных средах: Чапека, Бодена-Готье и пр. [104; 117; 452].

Установлено, что токсичность культуральной жидкости *B. sorokiniana* снижается при высоких концентрациях сахара в питательной среде, при pH ниже 4,5 и выше 7,5, а также при температуре выше 25-27⁰C [104; 182; 287; 476].

Отмечено, что токсичность культуральной жидкости постепенно увеличивается в период активного роста мицелия и достигает максимума в 7-10-ти суточной культуре в условиях выращивания на картофельно-декстрозной среде при 25⁰C и в 10-15-ти суточной культуре – на среде Чапека при 10⁰C. К моменту наступления спорообразования токсичность культурального фильтрата начинает снижаться. В старых же, 3-4 недельных культурах, в которых интенсивно происходит автолиз гиф, фильтраты культуральной жидкости утрачивают токсичность [104; 117].

В литературе до сих пор нет однозначного мнения относительно варьирования токсигенных свойств у различных изолятов *B. sorokiniana*. Так, японский миколог П.Д. Тияги (P.D. Tyagi) отмечал, что способность гриба образовывать токсины детерминирована генетически и различные изоляты гриба могут существенно отличаться по количеству продуцируемых ими токсинов [452]. Того же мнения придерживались и российские исследователи М.В. Молодых и Л.В. Рочев, которые отмечали, что культуральные фильтраты у корневых изолятов *B. sorokiniana* токсичнее, чем у листовых [96]. В то же время, Р.И. Щекочиной не удалось выявить существенных различий в токсинообразовательной способности среди исследованных ею изолятов [181].

В настоящее время известно, что терпеноидные экзометаболиты *B. sorokiniana* представлены целой группой сходных соединений: смесью эпимеров прегельминтоспорола, дигидропрегельминтоспоролом, гельминтоспоралевой кислотой, гельминтоспоровой кислотой, гельминтоспоролом, лонгифолоном и пр.

[33; 390]. Основным компонентом среди этих соединений является прегельминтоспорол, который образуется в количествах 1,2 – 2,1 микрограмм на миллиграмм сухой массы мицелия [222]. Внутри клеток гриба прегельминтоспорол локализован преимущественно в небольших мембранных пузырьках – тельцах Воронина [187]. В 1976 г. в составе культуральной жидкости *B. sorokiniana* были обнаружены стеригматоцистин и виктотоксин [395; 399], в 1990 – кохлиохинон А [414], в 1994 – токсин сорокинианин [378; 379].

Изучение состава вторичных метаболитов *B. sorokiniana* с привлечением современных химических методов исследования, а также анализ способности различных изолятов гриба секретировать те или иные вещества является весьма актуальной задачей и в настоящее время.

1.4.3. Генетические особенности *B. sorokiniana*

Исследования генетических особенностей *Bipolaris sorokiniana* были инициированы в 20-е годы XX в. американским ученым Дж.Дж. Христенсеном (J.J. Christensen) [231; 232]. К настоящему времени известно, что *B. sorokiniana* обладает огромным потенциалом генетической изменчивости и способен давать начало большому числу клонов, различающихся по морфолого-культуральным признакам, требованиям к источникам питания и вирулентности по отношению к растениям-хозяевам [36; 38; 149; 188; 234].

Принято считать, что половой процесс не имеет определяющего значения в жизненном цикле *B. sorokiniana* в природе [141; 188; 484], а варьирование морфологических и физиологических характеристик этого гриба обусловлено различными типами генетической нестабильности, характерными для анаморфных грибов [56; 141]. В естественных условиях телеоморфа этого вида была обнаружена единожды в 1991 г. на гниющей соломе пшеницы в Замбии [400]. Таким образом, весь жизненный цикл *B. sorokiniana*, или, по крайней мере, значительная его часть проходит в гаплоидном состоянии [342; 428; 443].

Принято считать, что изменения генетического аппарата у *B. sorokiniana* достигаются за счёт мутаций, парасексуального процесса и факторов

цитоплазматической наследственности [56; 70; 72; 80; 141; 188; 438]. Для *B. sorokiniana* также показана возможность неравного расхождения хромосом при митозе, благодаря чему количество хромосом у этого вида в гаплоидном состоянии может колебаться от шести до восьми [318; 319].

Наибольшее количество работ, посвященных генетическим особенностям *B. sorokiniana*, сосредоточены на мутационной изменчивости. Исследования в этом направлении были начаты в 1925 г. Дж.Дж. Кристенсеном (J.J. Christensen) и Ф.Р. Дэвисом (F.R. Davies). Ими было отмечено, что количество и многообразие мутантов *B. sorokiniana* очень велико, и они могут отличаться от исходной формы скоростью роста, зональностью и окраской колонии, количеством воздушного мицелия, паразитическими свойствами и многими другими признаками [231].

Установлено, что частота мутаций *B. sorokiniana* по количеству спор в колониях колеблется от 1:2400 до 1:20000 на питательном агаре (в зависимости от условий культивирования), а на живых растениях составляет примерно 1:2900 [137]. Наибольшая частота мутаций *B. sorokiniana* в культуре наблюдается при температуре около 25⁰С, в то время как при 5⁰С она существенно снижается. Тем самым, хранение культур на холоде может позволить сохранить их изначальные свойства в течение длительного времени [233]. Также установлено, что моноспоровые изоляты *B. sorokiniana* энергично мутируют на питательных средах, содержащих продукты жизнедеятельности бактерий. При этом, среди мутаций наблюдались как положительные, так и отрицательные отклонения от исходных форм в отношении устойчивости их к бактериальным выделениям, патогенности, скорости роста и другим признакам [137].

Мутанты *B. sorokiniana* часто возникают под действием ультрафиолета, благодаря чему можно получить множество ауксотрофных, устойчивых к действию антибиотиков, цветковых мутантов, а также мутантов с изменённой вирулентностью [293]. Индуцированные ультрафиолетом мутации часто сопровождаются хромосомными абберациями, что, в свою очередь, может приводить к несовместимости хромосомных пар при скрещивании с изолятом противоположного типа спаривания [70; 72; 437; 438; 449].

Благодаря мутациям отдельных гаплоидных ядер и миграции ядер из соседнего таллома после плазмогамии, взрослый мицелий *B. sorokiniana* обычно гетерокариотичен, что создает благоприятные условия для парасексуального процесса. Этот процесс был впервые описан в 1953 г. Г. Понтекорво (G. Pontecorvo) с соавторами для гриба *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter [394]. У *B. sorokiniana* этот тип генетической рекомбинации был обнаружен и подробно описан в 1962 г. канадским микологом Р.Д. Тинлайном [438].

При парасексуальном процессе у *B. sorokiniana* ядра гетерокариотического мицелия сливаются с образованием диплоидных ядер. Такие ядра некоторое время делятся закрытым внутриядерным плевромитозом, во время которого может происходить митотический кроссинговер. После непродолжительного существования в диплоидном состоянии происходит обратная гаплоидизация диплоидных ядер, либо путём вегетативной гаплоидизации, либо (изредка) мейозом [318; 444]. Вегетативная гаплоидизация начинается с утраты одной хромосомы. Возникающее при этом анеуплоидное ядро становится генетически нестабильным и последовательно утрачивает все хромосомы одного набора, пока не установится устойчивое гаплоидное состояние. При этом хромосомы разных пар ведут себя независимо, а гены одной группы обнаруживают абсолютное сцепление [61; 99; 132].

Конидии *B. sorokiniana* обычно септированы, содержат несколько (до тридцати) ядер и прорастают биполярно – двумя концами споры, что и нашло отражение в названии рода гриба. Благодаря этой особенности, колонии моноспоровых изолятов обычно образуются из двух ростовых трубок, каждая из которых содержит только одно ядро [157; 316; 418; 442]. Длительное время оставалось неясным, одинаковы ли ядра в пределах одной единственной споры, и, соответственно, какова степень гомогенности моноспоровых изолятов *B. sorokiniana*. Еще в 1937 г. Дж.Дж. Кристенсен и Ф.Р. Дэвис показали, что молодые конидиеносцы *B. sorokiniana* одноядерны, соответственно, все ядра конидии происходят из одного ядра [234]. В то же время, другие авторы обнаружили, что даже моноспоровые изоляты этого гриба изначально могут

содержать разнокачественные ядра [157; 372; 373; 418].

Проблеме наследования пола и комбинативной изменчивости у *B. sorokiniana* посвящены работы многих авторов. В настоящее время достоверно установлено, что тип спаривания у этого гриба контролируется одной парой аллельных генов, а характеристики колоний (цвет, размер, активность спорообразования) аддитивны, причём каждый признак контролируется несколькими генами [311; 331; 444; 449; 453; 484].

Как уже отмечалось, телеоморфа *B. sorokiniana* достаточно легко воспроизводится в лабораторных условиях, но практически не встречается в природе. Попытке найти объяснение данному феномену, были посвящены работы целого ряда исследователей, однако однозначный ответ никем так и не был получен. Р.М. Хосфорд (R.M. Hosford) и соавторы предположили, что помимо генов, контролирующих тип спаривания, существуют другие гены (гены вегетативной несовместимости), которые экспрессируются в тех или иных условиях и блокируют половой процесс [311].

Российскими исследователями отмечено, что отношение типов спаривания *B. sorokiniana* в естественных условиях часто отклоняется от 1:1 [334; 444; 484]. Так, к примеру, отношение «мужского» и «женского» полов в составе популяций гриба из Ленинградской области колеблется в пределах 2:1 – 3:1. Преобладание одного типа спаривания над другим, вероятно, обусловлено наличием селективных преимуществ у изолятов, имеющих один из типов спаривания, при бесполом размножении. Однако до настоящего времени, остается неясным, какие именно признаки сцеплены с одной из аллелей типа спаривания у этого вида [89].

В естественных условиях, при воздействии специфических факторов окружающей среды, в различных частях ареала у *B. sorokiniana* могут формироваться специфические наследуемые признаки. Благодаря этому, популяции из различных регионов Земного шара представлены огромным количеством биотипов, различающихся размером конидий, интенсивностью спороношения, характером и скоростью роста на питательных средах и другими

признаками. Зависимости паразитических свойств штаммов от их географического происхождения до сих пор выявлено не было [38; 181].

Обобщая вышесказанное, необходимо отметить, что многие вопросы биологии и физиологии *Bipolaris sorokiniana*, такие как особенности роста и развития гриба, взаимодействие с растениями и почвенными микроорганизмами, механизмы проникновения в ткани растения-хозяина, закономерности и механизмы изменчивости изучены достаточно детально и всесторонне. В то же время, целый ряд вопросов остается нерешенным до наших дней. В частности, до сих пор не ясна роль вторичных метаболитов в функционировании патосистемы, связь между токсигенными свойствами и агрессивностью гриба, а также варьирование токсинообразующих свойств в пределах вида. Не вполне ясно, является ли этот огромный и полиморфный вид однородным по вышеупомянутым признакам и как связано морфологическое, генетическое и физиолого-биохимическое разнообразие с паразитизмом гриба на различных органах растения.

В истории классифицирования гельминтоспориев в целом и *B. sorokiniana* в частности регулярно применялись новые критерии (особенности строения конидий, субстратная специализация, особенности онтогенеза конидий, особенности совершенных стадий и пр.) которые позволяли кардинально пересмотреть ранее существующую систему. К сожалению, работы микологов-таксономистов и фитопатологов, посвященные *B. sorokiniana*, часто проводились обособленно, и развивались параллельными, непересекающимися путями. По нашему мнению, объединение этих направлений может оказаться эффективным средством решения проблем внутривидовой таксономии и селективной диагностики *B. sorokiniana*.

ГЛАВА 2.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась на базе кафедры микологии и фитоиммунологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина в период 1997-2005 гг. Ряд исследований проводился на базе кафедры химической метрологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, а также Опытного хозяйства «Элитное» Института растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН (Харьковский р-н, Харьковская область).

Объектом исследований были 38 различных по устойчивости к гельминтоспориозам сортов и гибридов ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), любезно предоставленные сотрудниками лаборатории иммунитета растений и лаборатории селекции ячменя Харьковского института растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН. Перечень использованных сортов и гибридов ячменя, а также данные об их происхождении и внутривидовой принадлежности приведены в приложении А. Также объектом исследования были 60 моноспоровых изолятов гриба *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Schoem., выделенные нами из инфицированных листьев, корней и семян ярового ячменя (по 20 каждого типа).

Отбор инфицированных грибом *Bipolaris sorokiniana* растений для выделения чистых культур возбудителя и проведения всех последующих лабораторных исследований производился на базе Опытного хозяйства «Элитное» Института растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН (Харьковский р-н, Харьковская область). Почвенно-климатическая характеристика Опытного хозяйства «Элитное» в период проведения исследований приведена в приложении Б.

Для выделения моноспоровых изолятов, отобранные в полевых условиях фрагменты растений с признаками поражения *B. sorokiniana* промывали стерильной водой, раскладывали в чашки Петри на увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу и инкубировали в термостате при температуре 25⁰С на протяжении пяти суток. Отсев моноспоровых изолятов производился с использованием бинокулярной лупы МБС-9 путем захвата

отдельных конидий гриба микробиологической иглой и перенесения их на агаризованную среду Чапека в чашки Петри. Оценку чистоты полученных культур производили с помощью микроскопа. Для дальнейшего исследования были использованы лишь генетически однородные изоляты, колонии которых не расщеплялись на сектора с различной консистенцией и окраской мицелия, а также активностью спороношения [86; 177]. Особенности выделения изолятов из различных органов растения-хозяина описаны в третьей главе настоящей работы.

Гриб культивировали на агаризованной среде Чапека (выделение и сохранение культур, а также изучение морфолого-культуральных свойств), сахарозно-аспарагиновом агаре с дрожжевым экстрактом (получение спор для искусственного заражения растений) и жидкой среде Чапека (изучение активностей ферментов и токсигенных свойств) [126].

Морфологические особенности спор патогена (характер септированности, длину и ширину) определяли с помощью микроскопа МБИ-3 при увеличении в 900 раз. Замеры производили с помощью окуляр-микрометра. Для каждого моноспорового изолята анализировали параметры 300 спор [86].

Для изучения паразитических свойств моноспоровых изолятов *B. sorokiniana* были отобраны 30 изолятов гриба (по 10 из листьев, семян и корней). В качестве дифференциаторов нами были использованы 9 сортов и гибридов ярового ячменя, отличающиеся по устойчивости к темно-бурой пятнистости: Сложный гибрид 6729 (Мексика), Темп (Россия), Одесский 115 (Украина), Tregal CI6359 (США), SV 89300 (Швеция), Kraaj 71-509 (Нидерланды), Bayeg C15599 (Дания), Excel (США) и Line TR-226 (Канада).

Споровую суспензию *B. sorokiniana* для проведения искусственного заражения растений получали из культур гриба возрастом 9 суток, выращенных на сахарозно-аспарагиновом агаре в чашках Петри [126]. Титр конидий в суспензии, используемой для инфицирования растений, составлял 2500 шт/мл. Приготовление суспензии нужной концентрации производили с помощью гемоцитометра Горяева [3; 482].

При проведении искусственного заражения, отрезки листьев 10-ти суточных проростков каждого сорта и гибрида ячменя длиной 2 см раскладывали в чашки Петри на предварительно увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу. Затем на каждый отрезок листа с помощью автоматической пипетки наносилось по 0,025 мл споровой суспензии гриба. Чашки Петри с отрезками листьев инкубировали в светоустановке «Флора» на протяжении пяти суток с суточным периодом освещения 16 часов (освещенность 800 люкс, температура 22-24⁰ С) [3; 161; 71; 153; 278; 279; 355].

Показателями агрессивности изолята служили активность некротизации тканей инфицированного растения и интенсивность спорообразования гриба на отрезках листьев ячменя. Реакцию сорта на заражение патогеном учитывали на 5 сутки после инокуляции [3; 68; 71; 109; 153; 279; 355; 370].

Развитие некроза учитывали по 4-бальной шкале, где балл 1 – точечные некрозы без хлороза; балл 2 – некротические пятна с хлоротичным окаймлением или без хлороза, не распространяющиеся по отрезку листа; балл 3 – некротические пятна с хлорозом, распространяющиеся по отрезку листа; балл 4 – некротизирован весь отрезок листа. Балл 0 в использованной шкале отсутствует, поскольку абсолютно непоражаемых сортов при лабораторном методе тестирования выявить не удаётся [3; 68; 153; 279; 370].

Интенсивность спорообразования *B. sorokiniana* на отрезках листьев определяли методом смывания конидий возбудителя 0,0001% раствором Твина-80 и последующего подсчета количества спор в суспензии с помощью гемоцитометра Горяева. Согласно общепринятой методике, в работе анализируются усредненные значения количества спор в пересчете на один отрезок листа [86; 368; 482].

Для изучения ферментативной и токсигенной активности *B. sorokiniana* были отобраны 9 изолятов гриба из листьев, корней и семян. Изоляты выращивали в глубинной культуре в круглодонных колбах объемом 100 мл, содержащих по 50 мл. жидкой питательной среды Чапека. Культивирование производили при температуре 25⁰С на механической качалке [86].

В культуральной жидкости гриба нами были изучены активности основных литических ферментов, служащих для питания гриба в условиях паразитизма на растении: целлюлаз (β -1,4-эндоглюканазы, β -1,4-экзоглюканазы и целлобиазы) и пектиназ. Активности измеряли на 2, 4, 6 и 8 сутки культивирования [85; 213].

Активность β -1,4-эндоглюканазы определяли вискозиметрически путем измерения времени истечения 1% раствора карбоксиметилцеллюлозы до и после взаимодействия с культуральным фильтратом гриба и выражали в процентах снижения вязкости [85; 213].

Определение активностей β -1,4-экзоглюканазы и целлобиазы проводили путем определения содержания глюкозы образовавшейся после воздействия культуральной жидкости на субстрат: микрокристаллическую целлюлозу и целлобиозу, соответственно. Перед определением активности готовили реакционную смесь, состоящую из 2 мл культуральной жидкости и 2 мл 1% суспензии субстрата, которую инкубировали в термостате при температуре 40⁰С на протяжении 24 часов. Активность выражали количеством образованной глюкозы [85; 213].

Определение содержания глюкозы проводили по методу Дюбуа. Для этого к 0,5 мл супернатанта из реакционной смеси приливали 0,5 мл 5 % водного раствора фенола и 2,5 мл концентрированной серной кислоты. По прошествии 10 минут измеряли оптическую плотность раствора при 490 нм с использованием фотоэлектрического фотометра КФК-3. Калибровочную кривую строили по стандартным растворам глюкозы [85; 213].

Пектолитическую активность определяли вискозиметрически путем измерения времени истечения 1% раствора свекловичного пектина до и после взаимодействия с культуральным фильтратом гриба и выражали в процентах снижения вязкости.

Согласно общепринятой методике, при анализе активностей ферментов мы учитывали общее содержание белка в культуральной жидкости на соответствующие сутки культивирования и биомассу. Содержание белка в растворе определяли спектрофотометрически с использованием однолучевого

спектрофотометра СФ-26 при длинах волны 260 и 280 нм. Последующий расчет содержания белка производили по формуле Калькара: $C \text{ (мг/мл)} = 1,45 \times E_{280} - 0,74 \times E_{260}$, где E_{280} и E_{260} интенсивности поглощения при соответствующих длинах волны [85].

Биомассу определяли после отфильтровывания мицелиальной массы на предварительно взвешенный бумажный фильтр, высушивании мицелия в сушильном шкафу течение 24 часов при температуре 104°C и повторного взвешивания [85].

Токсичность 10-ти суточных культуральных жидкостей *B. sorokiniana* определяли по отношению к семенам и проросткам проса сорта Мироновское 16. Опыт закладывался в 5 повторностях по 50 семян проса в одной пробе. Контролем служили семена, замоченные в дистиллированную воду (контроль 1) и стерильную питательную среду Чапека (контроль 2). Показателем токсичности экзометаболитов была степень подавления ими энергии прорастания семян и всхожести [53; 86]. Выбор модельного объекта для изучения токсигенных свойств изолятов *B. sorokiniana* обоснован в третьей главе диссертации.

Состав экзометаболитов *B. sorokiniana* определяли в хлороформных экстрактах культуральной жидкости методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках Silufol [35], а также газовой хроматографии с использованием хроматографа HP-5890 и хроматомасс-спектрометрии с использованием газового хроматомасс-спектрометра QP-500 «Shimadzu» [43].

Для изучения закономерностей развития возбудителей обыкновенной корневой гнили на под- и околоземных частях растений ячменя образцы растений, отобранные в полевых условиях предварительно отмывали от остатков почвы и разрезали на фрагменты длиной около 1 мм. По отдельности фрагменты корней, оснований стеблей и узлов кущения помещали на агаризованную среду Чапека с добавлением стрептомицина (0,1%) и поверхностно-активного вещества — ограничителя роста Тритона X 100 (0,04%). По прошествии пяти суток инкубирования в термостате при температуре 25°C мы микроскопировали

образовавшиеся колонии грибов и идентифицировали видовую принадлежность возбудителей. Объем пробы для каждого сорта или гибрида составлял 50 растений [15; 89; 94; 127].

Идентификация *B. sorokiniana* производилась непосредственно из колоний, развившихся на поверхности фрагментов растений. Идентификация фузариев проводилась после отсева колоний гриба на голодный картофельно-глюкозный агар в соответствии с определителями К. Буса (C. Booth), В.И. Билай, а также В. Герлаха и Г. Ниренберга (W. Gerlach, H. Nirenberg). Верность определения фузариев подтверждена профессором Дж. Челковским (J. Chelkowski), Институт генетики растений, Польская Академия наук [24; 218; 288].

На основании данных о частотах выделяемости *B. sorokiniana* и видов рода *Fusarium* из различных частей различных сортов и гибридов растения-хозяина делались выводы о пораженности этих частей грибами-возбудителями, закономерностях развития патогенов, а также степени устойчивости анализируемых растений к гельминтоспориозной и фузариозной корневой гнилям. Используемые методические приемы определения степени развития гельминтоспориоза и фузариоза, а также ранжирования сортов по устойчивости к заболеваниям описаны в четвертой главе настоящей работы [15; 89; 127].

Для изучения закономерностей развития *B. sorokiniana* в семенах ячменя нами использовались четыре альтернативных метода диагностики: метод визуальной оценки, метод проращивания семян во влажной камере, метод проращивания семян на агаризованной среде Чапека и метод проращивания семян в рулонах фильтровальной бумаги.

Для визуального оценивания развития чёрного зародыша, пробы семян каждого сорта и гибрида ярового ячменя в количестве 400 штук раскладывали по группам в соответствии со степенью потемнения покрова зерновок. Распределение семян по группам производили с использованием бинокулярной лупы МБС-9 в соответствии с 4-бальной шкалой, где балл 0 – внешне здоровые зерновки; балл 1 – имеются отдельные буроватые пятна вне зоны зародыша; балл 2 – слабое потемнение покровов семян в зоне зародыша и впадины возле него;

балл 3 – сильное потемнение покровов в зоне зародыша; балл 4 – потемнело более половины поверхности зерновки. На основании полученных данных была рассчитана степень развития черного зародыша [64; 82; 83; 125].

При оценивании пораженности семян методом влажной камеры, пробу семян каждого сорта и гибрида ячменя в количестве 300 шт. очищали от поверхностной инфекции промыванием в проточной воде в течение 30 минут и раскладывали по 15 шт. на дно простерилизованных чашек Петри. Дно чашек Петри предварительно застилалось стерильной фильтровальной бумагой и увлажнялось добавлением 8 мл. дистиллированной воды. Чашки Петри инкубировали в светоустановке «Флора» на протяжении семи суток с суточным периодом освещения 16 часов (освещенность 800 люкс, температура 22-24° С). По прошествии срока инкубирования, с помощью микроскопирования определяли пораженность семян возбудителями чёрного зародыша и сопутствующими видами грибов [41; 42; 86; 26; 185; 328].

При оценивании пораженности семян методом проращивания на агаризованной среде Чапека, пробу семян каждого сорта и гибрида ячменя в количестве 300 шт. раскладывали по 15 шт. на дно чашек Петри с агаризованной средой Чапека. Предварительно семена стерилизовали 1% раствором гипохлорита натрия и промывали на протяжении часа в проточной воде. Для подавления развития внешней семенной инфекции семена обеззараживали на протяжении 5 минут, для подавления развития грибов, ассоциированных с покровами – 15 минут. Чашки Петри инкубировали на протяжении 5 суток в термостате при температуре 25⁰С. По прошествии срока инкубирования, с помощью микроскопической техники определяли пораженность семян возбудителями чёрного зародыша и сопутствующими видами грибов [185; 204; 402].

При оценивании пораженности семян рулонным методом семена очищали от поверхностной инфекции промыванием в проточной воде в течение 30 минут и раскладывали по 30 шт. на лист увлажнённой фильтровальной бумаги размером 30 x 10 см. Общее количество исследованных семян для каждого сорта и гибрида

составляло 300 шт. Раскладывание семян производили на всю ширину листа в виде прямой линии на расстоянии 2 см от верхнего края. Фильтровальную бумагу с уложенными на неё семенами накрывали сверху листом плотной полиэтиленовой пленки такого же размера. Затем оба листа с разложенными между ними семенами сворачивали в не тугий рулон и помещали на $\frac{1}{2}$ длины в стеклянный стаканчик с дистиллированной водой. Стаканчики с рулонами сверху накрывали стеклянным колпаком для поддержания во влажном состоянии, помещали в светоустановку «Флора» и инкубировали на протяжении семи суток с суточным периодом освещения 16 часов (освещенность 800 люкс, температура 22-24⁰ С). По истечении времени инкубирования рулоны разворачивали и проводили дифференцированный подсчёт инфицированных корешков, влагалищной части первого листа, а также общей пораженности проростков [10; 15; 22; 42; 376]. Для выявления причины загнивания проростков образцы инфицированной ткани высевали на питательный агар Чапека с сульфатом стрептомицина [127; 204].

Результаты исследований обработаны статистически методами корреляционного, дисперсионного и факторного анализов с использованием программного пакета Statistica 6.0 [44; 133].

ГЛАВА 3.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *BIPOLARIS SOROKINIANA* В СВЯЗИ С ПАРАЗИТИЗМОМ НА РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

3.1. Современные представления об органотропной специализации у *B. sorokiniana*

Вид *Bipolaris sorokiniana* чрезвычайно полиморфен и его изоляты обладают значительным морфологическим разнообразием, а также проявляют различные уровни агрессивности и физиологической специализации [33; 102; 110; 118; 195; 231; 393; 413; 426].

Популяции *B. sorokiniana* из различных регионов Земного шара представлены большим количеством биотипов, различающихся размером конидий, интенсивностью спороношения, характером и скоростью роста на питательных средах, активностью токсинообразования и другими признаками [110; 181; 373]. В составе этого вида обнаружено множество физиологических рас [369]. Изоляты гриба существенно различаются вирулентностью и агрессивностью по отношению к различным видам и даже сортам растений-хозяев [471; 472], а структура популяции *B. sorokiniana* по агрессивности постоянно изменяется по мере изменения видового состава растений-хозяев [195; 241; 272; 336].

Вплоть до недавнего времени было принято считать, что для *B. sorokiniana* не характерна органотропная специализация и любой вирулентный изолят, независимо от того из какой части растения он был выделен, способен в равной степени вызывать гельминтоспориозную корневую гниль, темно-бурую пятнистость листьев, а также черный зародыш семян [55; 107; 138].

В конце 1980-х гг. российские фитопатологи Л.В. Молодых и М.В. Рочев впервые обратили внимание на различие свойств листовых и корневых изолятов гриба. На основании проведенных исследований ими был сделан вывод о существовании в пределах данного вида двух форм, одна из которых более приспособлена к развитию на корнях, а другая – на листьях [55; 96; 119; 120].

Было установлено, что в составе любой популяции *B. sorokiniana* постоянно присутствует смесь обеих форм гриба. Авторы установили, что споры корневых изолятов возбудителя характеризуются несколько меньшими размерами, по сравнению с листовыми. Кроме того, они обладают повышенной способностью к прорастанию в капельно-жидкой среде в присутствии корневых выделений растения-хозяина, а также более приспособлены к сохранению в почве. [96; 119-121].

Эта точка зрения нашла отражение в обзорной работе Л.Л. Великанова и Б.А. Хасанова 2003 г. издания, где говорится, что «в настоящее время в пределах вида *Bipolaris sorokiniana* выделяют корневые и листовые формы». [33].

Признание существования вышеназванных форм требует пересмотра многих сопряженных вопросов: каковы источники инфекции каждой из форм; какова роль этих форм в возникновении черного зародыша семян; что представляет собой жизненный цикл патогена; отличаются ли формы по стратегиям колонизации растения-хозяина, способности инфицировать те или иные виды дикорастущих злаков и т.п.

К сожалению, листовая и корневая формы *B. sorokiniana* до сих пор не охарактеризованы количественно и отсутствуют четкие критерии их распознавания. В настоящее время не вызывает сомнения, что вид *B. sorokiniana* чрезвычайно полиморфен по морфолого-культуральным, физиолого-биохимическим и паразитическим признакам, однако закономерности проявления этих признаков в пределах листовой и корневой форм гриба до сих пор либо не установлены, либо фрагментарны и противоречивы. Поэтому глубокое изучение биологических особенностей различных изолятов *B. sorokiniana* в связи с паразитизмом на различных органах растения-хозяина является актуальной научной задачей.

3.2. Морфолого-культуральные особенности *B. sorokiniana*

3.2.1. Морфология конидий *B. sorokiniana* на природных субстратах

Классическим критерием, который используется при изучении внутривидовой структуры грибов, является морфология их репродуктивных структур. Для *Bipolaris sorokiniana* показана широкая амплитуда варьирования размеров конидий и количества формирующихся в них септ. Кроме того, многие авторы указывали на наличие связи между размерами спор и агрессивностью изолятов гриба [33; 164; 320; 365; 422; 430]. Поэтому мы ожидали, что морфологические особенности спор могут стать одним из основных критериев при решении поставленных нами задач.

На первом этапе нашего исследования было изучено варьирование морфологических параметров спор *B. sorokiniana*, сформировавшихся на растениях ярового ячменя, пораженных гельминтоспориозной корневой гнилью, темно-бурой пятнистостью листьев и черным зародышем семян. Согласно общепринятой методике [84: 86], для получения массового спороношения фитопатогенного гриба мы помещали фрагменты растений с признаками вышеупомянутых заболеваний в чашки Петри в условия влажной камеры. По прошествии пяти суток инкубирования над каждым некротическим пятном появлялось массовое спороношение *B. sorokiniana*, что позволило нам исследовать индивидуальные значения, а также разброс длины, ширины и количества септ в конидиях возбудителя.

Применительно к хлебным злакам термин «корневая гниль» имеет широкое значение и охватывает как заболевание корней, так и оснований стеблей в прикорневой зоне [19; 66; 107]. Согласно данным литературы и результатам собственных наблюдений *B. sorokiniana* обычно развивается на подземной и околоземной части стебля злаков и достаточно редко – непосредственно на корнях [67; 172; 317]. Поэтому при изучении свойств возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили мы исследовали подземные части стеблей, а не корни. Отбор материала в полевых условиях проводили при появлении первых локальных некротических пятен – в фазу молочно-восковой спелости.

Следуя сложившимся терминологическим традициям, в последующем все изоляты гриба выделенные из пораженных корневой гнилью частей растений мы будем называть корневыми.

Отбор пораженных темно-бурой пятнистостью листьев проводили в фазу развития флагового листа при появлении на нем первых признаков проявления заболевания. Сбор пораженных черных зародышем семян проводили в фазу полной спелости.

Известно, что в образовании одного локального некротического пятна на больном растении, как правило, участвует лишь одна инфицирующая конидия патогена [138; 140]. Поэтому все дочерние споры, которые соответствуют одному некротическому пятну, обычно имеют общее происхождение. Такие группы конидий эквивалентны конидиям моноспоровых изолятов [55; 56; 138], однако они образуются не на искусственной питательной среде, а непосредственно на больном растении. Для наименования такого рода изолятов в литературе до сих пор отсутствует специальное название. Поэтому, чтобы отличать такие изоляты от изолятов, выращенных в условиях чистой культуры на синтетических средах мы назвали их «природными изолятами».

В ходе выполнения работы нами были проанализированы данные о морфологических параметрах спор для 20 листовых, 20 семенных и 20 корневых природных изолятов *B. sorokiniana*. Полученные результаты обобщены в таблице 3.1. Для проведения последующих морфолого-культуральных исследований, для каждого исследованного природного изолята нами была получена моноконидиальная чистая культура.

Как видно из таблицы, средняя длина зрелых спор для листовых изолятов *B. sorokiniana* составляла 74,2 μm , для семенных – 72,2 μm в то время как для корневых – всего 66,4 μm . Таким образом, средняя длина спор, образовавшихся на надземных частях растений, оказалась достоверно больше длины спор с подземных частей.

Ширина спор в пределах листовых, семенных и корневых природных изолятов достоверно не отличалась и составляла 19,6 μm ; 19,7 μm и 19,8 μm ,

соответственно. То же касается и усредненного количества септ в спорах, значения для которых составили 6,9; 6,6 и 6,7 штук в конидии.

Полученные нами результаты согласуются с результатами Л.В. Молодых и М.В. Рочева, которые обнаружили, что споры листовых изолятов гриба несколько длиннее, чем корневых [96]. Наряду с этим, нами впервые установлено, что споры семенных изолятов *B.sorokiniana* морфологически близки к спорам листовых (см. табл. 3.1). Мы полагаем, что в основе сходства листовых и семенных изолятов лежит то, что основным источником инфицирования семян являются споры, сформировавшиеся на листьях. Кроме того, условия паразитирования на надземных органах растения значительно отличаются от таковых на подземных.

Согласно литературным данным, споры каждого вида гриба в процессе эволюции вырабатывают определенный эффективный объем их цитоплазмы, который определяется рядом факторов (длительностью их сохранения, особенностями распространения и пр.) [325]. Объем спор зависит как от их длины, так и ширины, поэтому независимое сравнение этих параметров не всегда оправдано [186; 325]. В связи с этим, при изучении морфологических особенностей спор часто используется интегральный показатель – отношение длины спор к их ширине [186; 455].

Таблица 3.1

Морфологические особенности конидий природных изолятов *B. sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoemaker, сформировавшихся на различных органах ячменя

Вариант опыта		Кол-во септ, шт	Длина, мкм	Ширина, мкм	Отношение длина / ширина	Объем, мкм ³
I		II	III	IV	V	VI
ЛИСТОВЫЕ ИЗОЛЯТЫ	Л1	7,3	84,9	20,5	4,1	77336
	Л2	7,3	77,6	19,4	4,0	61142
	Л3	7,2	76,9	19,7	3,9	60972
	Л4	7,1	77,8	19,6	4,0	62091
	Л5	7,0	72,9	18,4	4,0	51178
	Л6	7,1	72,9	18,4	4,0	51178
	Л7	6,3	72,2	21,7	3,3	59203
	Л8	7,4	78,1	20,9	3,7	66720
	Л9	6,0	59,3	19,8	3,0	36441
	Л10	7,2	76,5	19,5	3,9	59727
	Л11	6,5	69,2	18,7	3,7	46867
	Л12	7,1	78,0	20,0	3,9	63684
	Л13	6,5	76,4	19,1	4,0	58348
	Л14	6,9	65,3	20,4	3,2	45527
	Л15	7,3	80,3	19,8	4,1	66820
	Л16	7,0	72,3	19,4	3,7	53075
	Л17	6,6	69,8	18,6	3,8	47428
	Л18	7,2	83,6	20,8	4,0	76083
	Л19	6,9	70,7	19,1	3,7	49969
	Л20	6,9	69,5	18,2	3,8	46010
	Среднее по группе	6,9	74,2	19,6	3,8	56990
	НСР _{0,05}	0,6	6,6	0,9		

Таблица 3.1 (продолжение)

		I	II	III	IV	V	VI
СЕМЕННЫЕ ИЗОЛЯТЫ	C1	7,0	75,2	19,5	3,9	57714	
	C2	7,1	68,5	19,9	3,4	48870	
	C3	6,4	66,9	20,1	3,3	47082	
	C4	7,3	78,3	19,5	4,0	62571	
	C5	7,1	76,6	19,9	3,8	61112	
	C6	7,0	65,1	20,2	3,2	44804	
	C7	6,5	68,6	18,5	3,7	45565	
	C8	6,5	70,0	18,5	3,8	47443	
	C9	6,9	71,5	21,6	3,3	57793	
	C10	7,1	75,8	19,7	3,8	59240	
	C11	7,2	79,8	19,6	4,1	65324	
	C12	6,7	70,2	18,8	3,7	48489	
	C13	7,3	80,6	20,0	4,0	68001	
	C14	7,0	78,4	19,3	4,1	62087	
	C15	7,2	73,6	18,9	3,9	53583	
	C16	6,3	75,5	19,6	3,9	58474	
	C17	5,7	64,6	20,4	3,2	44556	
	C18	5,8	61,6	20,3	3,0	40315	
	C19	6,1	63,5	19,9	3,2	41997	
	C20	7,1	79,3	19,6	4,0	65508	
	Среднее по группе	6,7	72,2	19,7	3,7	54026	
НСР _{0,05}	0,7	6,3	0,8				
КОРНЕВЫЕ ИЗОЛЯТЫ	K1	7,0	65,1	20,2	3,2	44804	
	K2	7,1	66,6	19,6	3,4	45500	
	K3	7,1	68,5	19,9	3,4	48871	
	K4	6,5	70,2	18,6	3,8	47973	
	K5	6,9	71,6	21,6	3,3	57955	
	K6	6,2	75,5	19,6	3,9	58474	
	K7	7,2	75,3	19,5	3,9	57868	

Таблица 3.1 (продолжение)

I		II	III	IV	V	VI
КОРНЕВЫЕ ИЗОЛЯТЫ	K8	6,1	58,4	20,1	2,9	35879
	K9	5,8	56,9	20,3	2,8	34398
	K10	6,5	68,0	17,6	3,9	42594
	K11	6,5	69,0	18,5	3,7	46098
	K12	5,8	57,1	19,7	2,9	33616
	K13	5,8	65,0	19,1	3,4	42235
	K14	6,9	65,4	20,2	3,2	45218
	K15	6,3	70,7	21,4	3,3	55984
	K16	7,1	66,7	19,8	3,4	46103
	K17	6,2	62,9	20,3	3,1	42035
	K18	7,0	67,0	19,7	3,4	46284
	K19	6,6	61,4	19,8	3,1	39067
	K20	6,9	67,0	20,3	3,3	47693
	Среднее по группе	6,6	66,4	19,8	3,4	45932
	НСР _{0,05}	0,8	5,0	1,0		

Примечание: серым цветом оттенены ячейки таблицы, соответствующие короткоспоровым изолятам.

Коэффициент отношения длины споры к ширине – Q рассчитывается по формуле $Q=L/W$, где L – длина споры, а W – ширина. Объем споры обычно определяется лишь условно путем вычисления объема геометрического тела, форма которого максимально близка к форме спор. *Bipolaris sorokiniana* имеет преимущественно эллипсоидально-цилиндрические споры, поэтому объем его конидий может быть рассчитан по формуле для вычисления объема эллипсоида $4/3\pi A^2B$, где A – большая полуось соответствующего эллипса, а B – малая полуось. Применительно к спорам изучаемого гриба $A=L/2$, $B=W/2$ [34; 455].

Анализ отношений длины спор к их ширине (таблица 3.1) показал, что в соответствии с этим показателем все исследованные природные изоляты *B. sorokiniana* могут быть разделены на 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 (0,89). В связи с этим, первая группа изолятов была названа нами «короткоспоровыми», а вторая «длинноспоровыми». В связи с тем, что диапазоны варьирования Q для длинно-, и короткоспоровых изолятов не перекрываются, мы полагаем, что этот показатель может использоваться как надежный критерий для разграничения вышеназванных групп.

На рисунке 3.1 представлен разброс средних значений длины и ширины конидий для 60 природных изолятов *B. sorokiniana*. Критерием для объединения спор в группы послужило отношение их длины к ширине. Верхним овалом очерчены параметры длинноспоровых изолятов, нижним – короткоспоровых. Из представленной факторной диаграммы видно, что диапазон варьирования средней длины составил 56,9 μm – 72,2 μm для короткоспоровых изолятов и 68,0 μm – 84,9 μm для длинноспоровых. Диапазон варьирования средней ширины составил 19,1 μm – 21,7 μm и 17,6 μm – 20,9 μm , соответственно. Из приведенной факторной диаграммы видно, что ни длина, ни ширина спор, рассматриваемые по отдельности, не позволяют достоверно различить длинно- и короткоспоровые изоляты, и надежным критерием для их разграничения может служить лишь отношение длины к ширине.

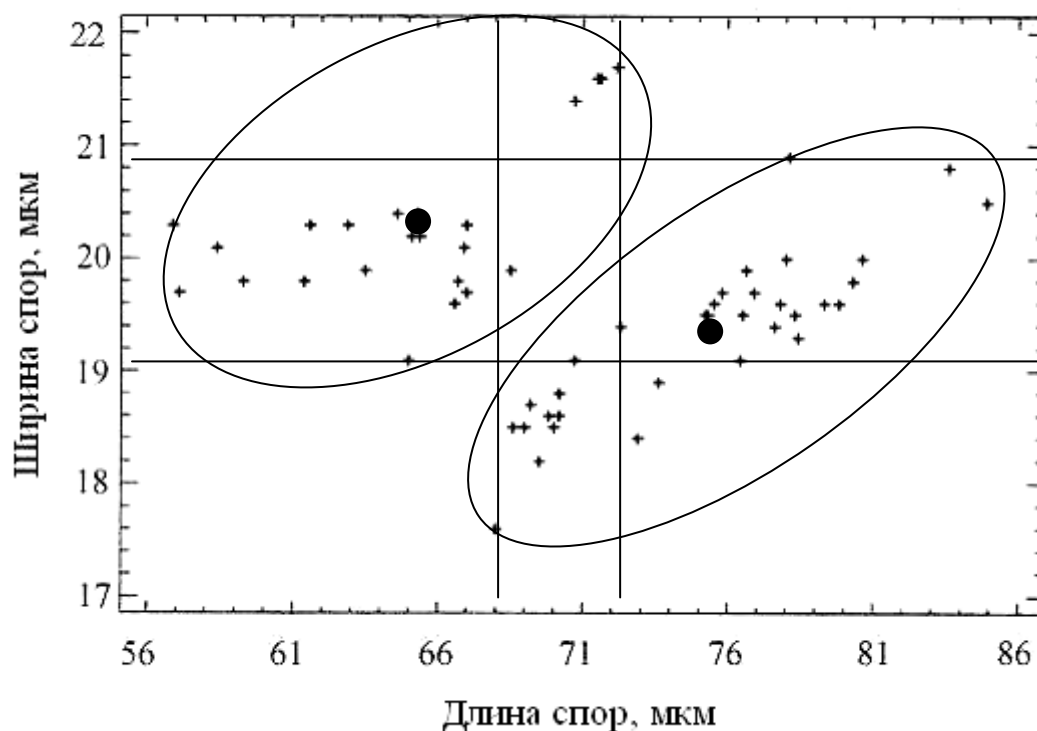


Рис. 3.1. Варьирование средней длины и ширины конидий длинно- и короткоспоровых природных изолятов *B. sorokiniana*.

Примечание: Верхним овалом очерчены параметры длинноспоровых изолятов, нижним – короткоспоровых.

Сравнение объемов цитоплазмы конидий показало, что в пределах короткоспоровых природных изолятов этот показатель варьирует в пределах 33616 – 59203 мкм³ и составляет в среднем 45289 мкм³, а длинноспоровых – 42594 – 77336 мкм³ и составляет в среднем 57336 мкм³. Очевидно, что объем споры *B. sorokiniana* формируется, в первую очередь, за счет ее длины, так как определяется квадратом этого параметра. Об этом свидетельствуют и коэффициенты корреляции между длиной, шириной и объемом конидий. Для пары признаков длина – объем, он составляет 0,97, а для пары ширина – объем всего 0,22. Так как усредненные длины конидий для некоторых длинно- и короткоспоровых изолятов перекрываются (таблица 3.1 и рисунок 3.1), то их объемы перекрываются в еще большей степени. Таким образом, установлено что объем спор не позволяет определить принадлежность изолята к длинно- или короткоспоровой группе.

В формировании коэффициента Q ширина спор играет значительно более весомую роль, чем объем. Так, коэффициенты корреляции для пар L – Q и W – Q составляют 0,89 и -0,46, соответственно. Полученные коэффициенты корреляции позволяют сделать вывод, что, стремясь к сохранению максимальной стабильности объема, конидии *B. sorokiniana* компенсируют увеличение длины некоторым уменьшением ширины и наоборот. Допустимый нормой реакции диапазон варьирования длины несколько больше, чем ширины, поэтому полностью компенсировать изменения объема спор этим способом не удастся.

Представляет интерес проанализировать закономерности распределения длинно- и короткоспоровых изолятов в пределах групп из листьев, семян и корней ячменя. Как видно из таблицы 3.1 и рисунка 3.2, это распределение крайне неравномерное. Из 20 листовых природных изолятов *B. sorokiniana* 17 оказались длинноспоровыми и 3 – короткоспоровыми. Из 20 семенных изолятов 13 оказались длинноспоровыми и 7 – короткоспоровыми. Из корневых – 5 длинноспоровыми и 15 – короткоспоровыми. Удельная доля длинноспоровых изолятов на листьях составляет 85%, на семенах – 65%, а на корнях – всего 25%. Таким образом, на надземных органах растения количественно преобладают длинноспоровые, а на подземных – короткоспоровые изоляты. Из 60 изученных нами изолятов 35 являются длинноспоровыми и 25 – короткоспоровыми.

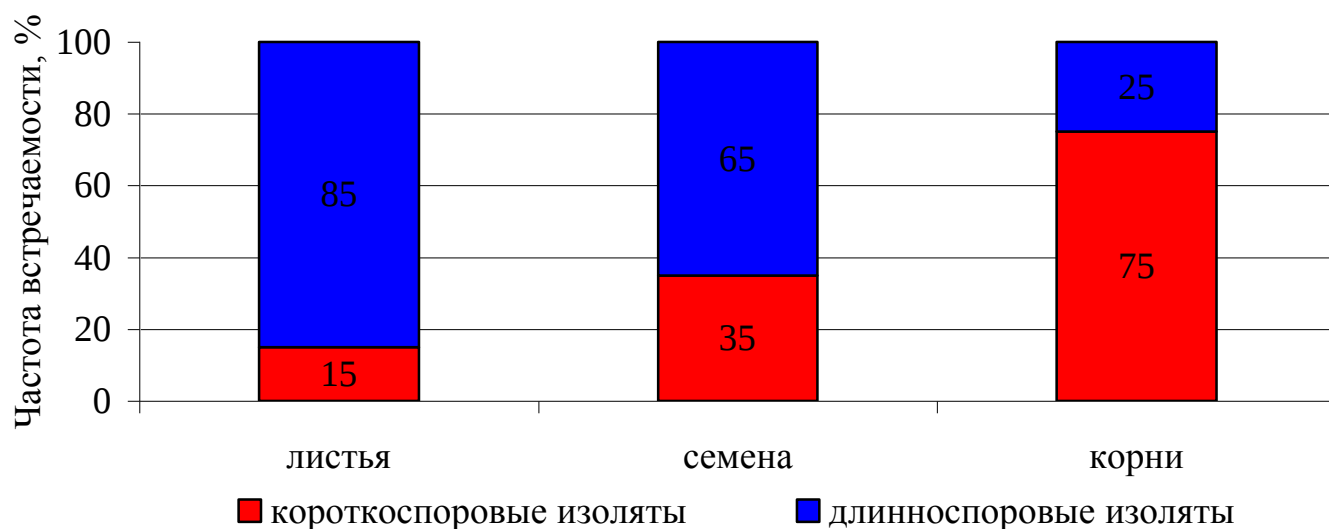


Рис. 3.2. Частота встречаемости длинно- и короткоспоровых изолятов *Bipolaris sorokiniana* на различных органах ячменя.

Опираясь на рассчитанные отношения длины конидий к их ширине, мы можем прийти к заключению, что листовые, семенные и корневые изоляты *B. sorokiniana* неоднородны по составу. Обнаруженное Л.В. Молодых и М.В. Рочевым и подтвержденное нами выше достоверное различие длин спор изолятов из листьев и корней обусловлено количественным преобладанием на листьях длинноспоровых, а на корнях – короткоспоровых изолятов и не может служить доказательством их морфологического единства.

Проанализировав полученные данные, мы считаем, что использование применительно к формам *Bipolaris sorokiniana* названий «листовая» и «корневая» является не вполне корректным, так как они охватывают сборные искусственные группы. Вполне очевидно, что существующие названия подразумевают, что одна форма паразитирует на листьях, а вторая – на корнях. Нами же установлено, что и на листьях, и на корнях присутствует смесь длинно-, и короткоспоровых изолятов. Кроме того, существующие названия четко привязаны к органам растения – листьям и корням и не учитывают возможность развития патогена на семенах и стеблях.

О том, что изоляты *B. sorokiniana*, выделенные из корней и листьев, неоднородны по своему составу, по всей видимости, было известно еще авторам листовой и корневой форм гриба Л.В. Молодых и М.В. Рочеву. В одной из своих работ они указывали, что корневая форма более (!) приспособлена к развитию на корнях, а листовая – на листьях [119]. Исходя из этого высказывания, мы предполагаем, что они не исключали возможности обнаружения листовой формы на корнях и корневой на листьях. Как научный факт неоднородность листовых и корневых изолятов *B. sorokiniana* описана в 1998 г. в монографии одного из учителей М.В. Рочева, московского фитопатолога Ю.Т. Дьякова [55].

Данные о том, что к листовой форме можно отнести бóльшую часть, но не все изоляты из листьев, а к корневой – из корней, хорошо согласуются с полученными нами результатами. Напомним, что, согласно нашим данным, на листьях преобладают длинноспоровые, а на корнях – короткоспоровые изоляты. Исходя из этого, мы предполагаем, что длинноспоровые изоляты относятся к

листовой, а короткоспоровые – к корневой формам *Bipolaris sorokiniana* по Л.В. Молодых и М.В. Рочеву.

Для установления таксономического статуса длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* необходимо проведение детальных генетических исследований. Без этих исследований невозможно сделать однозначный вывод о том, чем являются эти группы изолятов: подвидами, формами, разновидностями или биотипами. До тех пор, пока этот вопрос остается нерешенным, мы считаем необходимым следовать сложившимся терминологическим традициям [33; 55; 119-120] и используем термин «форма». При этом название «длинноспоровая форма» мы предлагаем как альтернативу названию «листовая форма», а «короткоспоровая форма» – «корневая форма».

Следует отметить, что, ранее нами были проанализированы лишь усредненные значения длины и ширины спор, полученные при исследовании 60-ти природных изолятов *B. sorokiniana*. Однако не менее важно изучить диапазон варьирования этих параметров для отдельных спор возбудителя, на основании которых были рассчитаны средние значения. Анализ первичных данных позволяет установить, можно ли на основании замеров всего лишь нескольких спор определить принадлежность изоляты к длинно- или короткоспоровой форме. Кроме того, на основании первичных данных может быть составлено уравнение регрессии, которое математически охарактеризует зависимость между длиной и шириной спор для каждой группы изолятов.

На рисунке 3.3 представлена факторная диаграмма, отображающая разброс длины и ширины конидий *B. sorokiniana*, сформировавшихся на естественно инфицированных темно-бурой пятнистостью, черным зародышем и гельминтоспориозной корневой гнилью растениях ячменя. Эта диаграмма построена на основании первичных данных, т.е. замерах размеров индивидуальных спор, а не усредненных значениях для каждого природного изолята. Для большей наглядности, с помощью программного пакета Statistica 6.0 диапазоны разброса параметров спор для каждой группы природных изолятов были обведены окружностями. По-отдельности сгруппированы длинноспоровые

изоляты (нижние три окружности) и короткоспоровые (верхние три окружности).

Из факторной диаграммы видно, что морфологические свойства изолятов определяются не тем, на какой части растения они развивались, а тем, к какой из двух форм (длинно- или короткоспоровой) они принадлежат. Рисунок 3.3 позволяет увидеть, что на листьях как длинно-, так и короткоспоровые изоляты могут формировать особо длинные конидии, что, вероятно, обусловлено более высокой питательной ценностью этой части растения для гриба-паразита.

Как видно из рисунка 3.3, размеры многих отдельно взятых спор *B. sorokiniana* для длинно- и короткоспоровых изолятов одинаковы, о чем свидетельствует большая зона перекрытия верхних и нижних окружностей на диаграмме. Наличие значительной зоны перекрытия окружностей для длинно- и короткоспоровых природных изолятов находит отражение и в диапазоне варьирования отношения длины конидий к ширине. Так, у длинноспоровых изолятов этот показатель варьирует в пределах 2,8 – 5,1, а у короткоспоровых – 2,2 – 4,3.

Таким образом, из результатов факторного анализа становится очевидно, что идентификация принадлежности изолята к длинно- и короткоспоровой форме должна основываться не на единичных замерах размеров спор, а на замерах параметров большого количества спор и расчета усредненного отношения длины конидий к ширине для анализируемой совокупности.

Согласно современным представлениям, для вида *Bipolaris sorokiniana* характерны конидии (20) 43-109 (135) × (14) 19-25 (34) μm и имеющие (2) 6-10 (12) септ [33; 157; 362]. По нашим данным, варьирование размеров конидий для длинноспоровых изолятов составляет 47,5 – 109,7 × 14,0– 24,8 μm, а для короткоспоровых – 41,5 – 96,5 × 16,0 – 26,4 μm (рисунок 3.3). В связи с тем, что диапазон варьирования размеров спор, полученный нами, достаточно точно соответствуют диапазону варьирования параметров спор, предусмотренному диагнозом вида, мы можем сделать вывод, что проанализированная нами выборка из 60 природных изолятов репрезентативна.

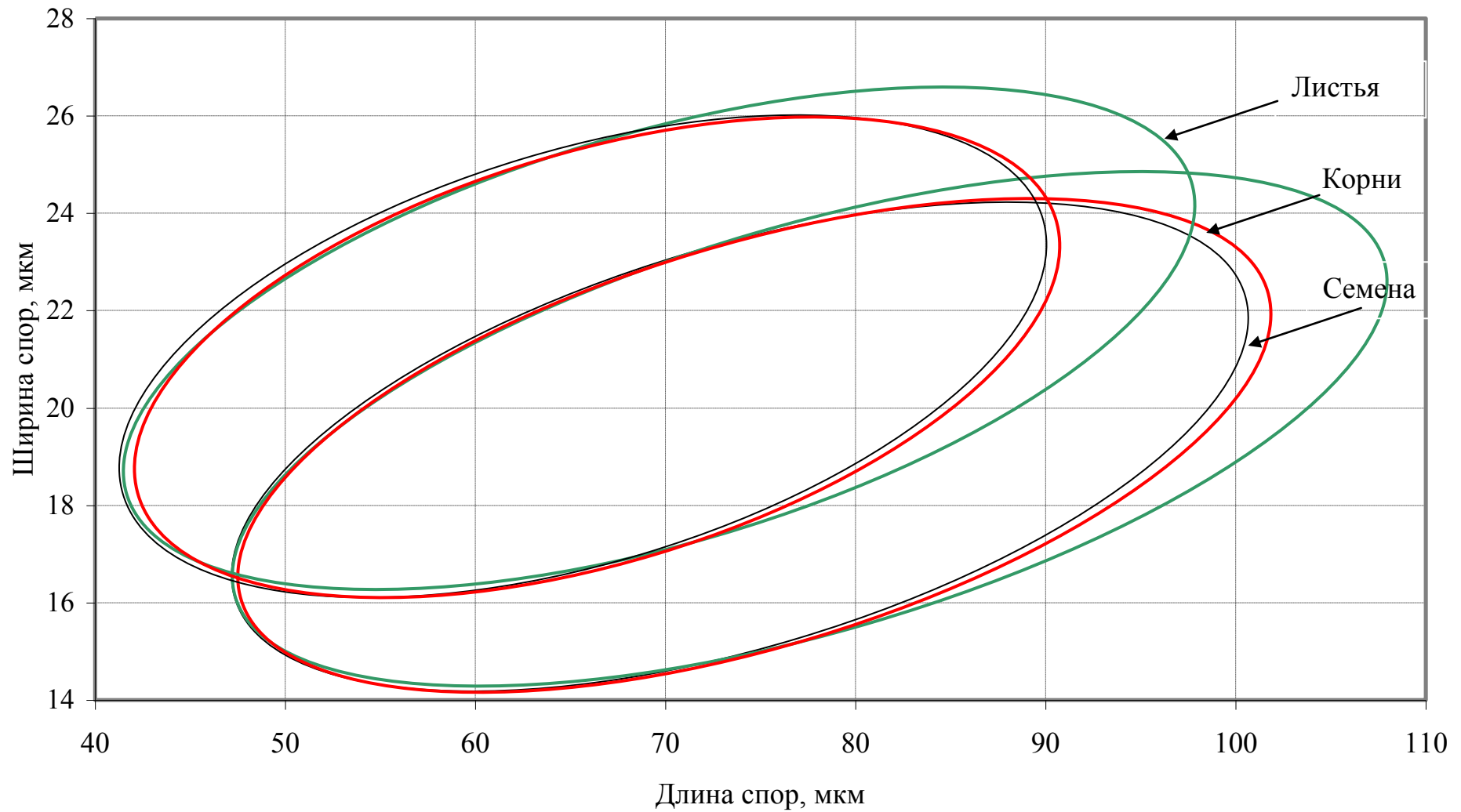


Рис. 3.3. Варьирование размеров конидий *B. sorokiniana*, образовавшихся на листьях, семенах и корнях ячменя

Примечание: длинноспоровые изоляты (нижние три окружности), короткоспоровые (верхние три окружности).

Обобщая данные исследования морфологических особенностей конидий природных изолятов *B. sorokiniana* следует указать, что на основании отношения длины конидий к ширине в пределах вида можно выделить две обособленные формы: длинно- и короткоспоровую. Для изолятов, относящихся к длинноспоровой форме усредненное отношение длины спор к ширине варьирует в пределах 3,7 – 4,1, а короткоспоровой – 2,8 – 3,4. Для изученных длинноспоровых природных изолятов среднее количество септ в конидии составляет 6,9 шт, длина – 75,1 μm , ширина – 19,3 μm , отношение длины к ширине – 3,9, объем – 57336 μm^3 , а для короткоспоровых, 6,5 шт, 65,2 μm , 20,3 μm , 3,2 μm и 45289 μm^3 , соответственно. Представители обеих форм могут быть обнаружены как на надземных, так и на подземных частях растения-хозяина, однако длинноспоровая количественно доминирует на листьях и семенах, а короткоспоровая – на корнях.

3.2.2. Морфология конидий *B. sorokiniana* в условиях чистой культуры

Хорошо известно, что морфолого-культуральные признаки *B. sorokiniana* очень вариабельны и могут значительно отличаться в зависимости от условий питания гриба [36; 117; 264]. При этом одним из наиболее изменчивых признаков является размер конидий [73]. Чтобы установить, не связаны ли выявленные нами морфологические отличия листовых, семенных и корневых природных изолятов с различной питательной ценностью соответствующих частей растения, нами был проведен анализ морфологических особенностей спор этих же изолятов, сформировавшихся на аксеничной питательной среде Чапека. Проводя морфолого-культуральные исследования мы пытались установить, сохраняются ли выявленные морфологические отличия длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* в условиях чистой культуры и можно ли на основании морфолого-культуральных данных определить принадлежность изолята к одной из двух форм.

При проведении этого этапа исследования с помощью бинокулярной лупы и гистологической иглы для каждого из охарактеризованных в предыдущем разделе природных изолятов *B. sorokiniana* нами были получены моноконидиальные чистые культуры. Усредненные данные о морфологических особенностях конидий всех исследованных моноспоровых изолятов, сформировавшихся на питательной среде Чапека обобщены в таблице 3.2.

У конидий моноспоровых изолятов, выросших на среде Чапека, по сравнению с конидиями, сформировавшимися непосредственно на инфицированных органах ячменя во влажной камере, наблюдается достоверное уменьшение длины и количества септ, в то время как их ширина достоверно не изменяется, что вполне соответствует литературным данным [73]. Средняя длина спор для изучаемых изолятов на питательной среде Чапека варьирует в пределах 40,0 – 68,9 μm , ширина – 15,5 – 21,8 μm , а среднее количество септ колеблется в пределах 3,9 – 6,2 шт.

Усредненная длина спор листовых изолятов, сформировавшихся на среде Чапека, составляет 52,9 μm , для семенных – 52,4 μm , а для корневых – 48,1 μm ,

Ширина спор в пределах изучаемых групп изолятов составляет 18,4; 19,1 и 19,8 μm , соответственно, а усредненное количество септ в спорах для всех групп изолятов составляет 5,2 шт. Из приведенных показателей достоверно отличается лишь длина спор у изолятов из надземной и подземной частей растений (таблица 3.2).

Диапазон варьирования отношения длины спор к их ширине в пределах короткоспоровых изолятов составил 1,9 – 2,5, а длинноспоровых – 2,6 – 3,4. Как видно из приведенных данных, отличия между группами изолятов на искусственной среде стали не настолько четко выраженными, так как максимальное значение коэффициента Q для короткоспоровых изолятов приближено к минимальному для длинноспоровых. Тем не менее, и на искусственной питательной среде коэффициент Q позволил разделить изоляты на группы по признаку длинно- и короткоспоровости.

Объем цитоплазмы конидий короткоспоровых изолятов на среде Чапека варьирует в пределах 16969 – 63837 μm^3 и составляет в среднем 31153 μm^3 , а длинноспоровых – 14017 – 35879 μm^3 и составляет в среднем 20943 μm^3 (таблица 3.2). Таким образом, как и при исследовании природных изолятов, этот показатель непригоден для определения принадлежности изолята к длинно- или короткоспоровой форме.

На рисунке 3.4 представлена факторная диаграмма, отображающая разброс длины и ширины спор листовых, семенных и корневых изолятов *B. sorokiniana*, сформировавшихся на искусственной среде Чапека. Эта диаграмма также построена на основании первичных данных, т.е. замерах размеров индивидуальных спор, а не усредненных значениях для каждого изолята. Как и на рисунке 3.3, по-отдельности сгруппированы длинноспоровые изоляты (нижние три окружности) и короткоспоровые (верхние три окружности).

Факторная диаграмма однозначно демонстрирует, что и на среде Чапека все изоляты, независимо от того, из какого органа растения они были выделены, четко распределяются в две группы: длинно- и короткоспоровые. Так, границы окружностей, характеризующих разброс размеров спор для листовых, семенных и

корневых изолятов *B. sorokiniana* в пределах длинно- и короткоспоровой групп полностью накладываются друг на друга (см. рис. 3.4).

Тенденция формирования несколько более длинных конидий на листьях, по сравнению с корнями и семенами, отмеченная на рисунке 3.3, полностью исчезает, при выращивании листовых изолятов на искусственной среде, что может свидетельствовать о модификационной природе этого явления.

Важно отметить, что все изоляты, проявившие себя на естественных субстратах как длинно- и короткоспоровые, сохранили эти же свойства и на аксенической среде Чапека. Таким образом, можно сделать вывод, что длинно- и короткоспоровость изолята не является результатом проявления модификационной изменчивости.

Опираясь на полученные результаты, мы полагаем, что морфология конидий является одним из фундаментальных доказательств внутривидовой гетерогенности изучаемого вида. Нами доказано, что длинно- и короткоспоровость изолятов *B. sorokiniana* проявляется как при их развитии на естественных субстратах, так и при культивировании на питательной среде Чапека.

Для изолятов, относящихся к длинноспоровой форме, выращенных на искусственной питательной среде усредненное отношение длины спор к ширине варьирует в пределах 2,6 – 3,4, а короткоспоровой – 1,9 – 2,5. Тем самым, несмотря на то, что в условиях выращивания на питательной среде конидии гриба морфологически более однообразны, их разделение на две формы все равно сохраняется.

Таким образом, мы полагаем, что отношение длины конидий к ширине может использоваться как надежный и удобный критерий при определении принадлежности изолята к одной из форм. По нашему мнению, внутривидовая гетерогенность изучаемого вида является основной причиной разноречивости литературных данных о биологических свойствах *B. sorokiniana*.

Таблица 3.2

Морфологические особенности конидий различных изолятов *B. sorokiniana*
(Sacc. in Sorokin) Schoemaker на агаризованной среде Чапека

Вариант опыта		Кол-во септ, шт	Длина, мкм	Ширина, мкм	Отношение длина / ширина	Объем, мкм ³
I		II	III	IV	V	VI
ЛИСТОВЫЕ ИЗОЛЯТЫ	Л1	6,0	63,4	19,2	3,3	40392
	Л2	5,8	55,0	17,7	3,1	28023
	Л3	6,1	53,6	18,5	2,9	27817
	Л4	6,0	55,7	19,2	2,9	31176
	Л5	4,1	45,8	17,6	2,6	19322
	Л6	5,9	52,4	18,1	2,9	26010
	Л7	4,7	46,4	20,0	2,3	22536
	Л8	6,0	60,0	19,5	3,1	36741
	Л9	5,0	47,5	20,3	2,3	23972
	Л10	5,8	62,9	18,5	3,4	38308
	Л11	4,0	52,2	18,0	2,9	25670
	Л12	5,3	48,9	18,1	2,7	22652
	Л13	5,1	57,6	18,0	3,2	31256
	Л14	4,5	43,0	17,9	2,4	17322
	Л15	5,4	54,3	17,3	3,1	26697
	Л16	4,5	46,5	16,9	2,8	19125
	Л17	4,9	63,2	18,6	3,4	38883
	Л18	5,5	59,1	19,7	3,0	36013
	Л19	4,9	47,6	17,9	2,7	21227
	Л20	4,7	43,8	16,9	2,6	16969
	Среднее по группе	5,2	52,9	18,4	2,9	27505
	НСР _{0,05}	0,5	5,3	0,9		

Таблица 3.2 (продолжение)

	I	II	III	IV	V	VI
СЕМЕННЫЕ ИЗОЛЯТЫ	C1	5,4	49,7	17,7	2,8	22882
	C2	5,5	43,2	18,8	2,3	18363
	C3	4,8	46,4	20,0	2,3	22536
	C4	6,0	61,1	19,1	3,2	37319
	C5	5,7	57,7	18,6	3,1	32410
	C6	5,9	48,2	20,1	2,4	24440
	C7	4,8	48,4	18,1	2,7	22191
	C8	5,1	51,7	19,9	2,6	27836
	C9	4,6	44,4	20,2	2,2	20842
	C10	5,5	56,3	19,4	2,9	32183
	C11	5,6	68,9	20,1	3,4	49940
	C12	4,9	51,7	19,9	2,6	27838
	C13	5,9	62,3	18,9	3,3	38393
	C14	5,7	64,6	19,0	3,4	41498
	C15	5,2	50,0	17,7	2,8	23159
	C16	4,0	52,7	15,5	3,4	22530
	C17	3,9	44,0	20,0	2,2	20265
	C18	4,4	41,2	19,6	2,1	17413
	C19	5,8	46,8	19,5	2,4	22353
	C20	5,6	61,4	19,2	3,2	37884
	Среднее по группе	5,2	52,5	19,1	2,8	28114
	НСР _{0,05}	0,5	5,4	0,8		
КОРНЕВЫЕ ИЗОЛЯТЫ	K1	5,0	40,5	21,3	1,9	18285
	K2	5,3	50,1	20,9	2,4	27456
	K3	6,0	44,5	21,2	2,1	21972
	K4	4,7	47,5	17,6	2,7	20783
	K5	4,8	44,2	20,1	2,2	20552
	K6	4,8	51,9	17,9	2,9	25235
	K7	6,2	74,8	21,8	3,4	63837

Таблица 3.2 (продолжение)

I		II	III	IV	V	VI
КОРНЕВЫЕ ИЗОЛЯТЫ	K8	6,1	58,4	20,1	2,9	35879
	K9	4,4	40,6	20,3	2,0	17513
	K10	6,0	62,7	19,0	3,3	39093
	K11	5,5	61,4	19,8	3,1	39067
	K12	5,3	40,0	20,0	2,0	16748
	K13	5,2	42,7	19,4	2,2	18513
	K14	4,9	46,7	18,6	2,5	21230
	K15	5,8	52,1	21,7	2,4	30828
	K16	5,0	39,6	19,8	2,0	16251
	K17	4,7	42,8	20,4	2,1	19558
	K18	5,5	44,9	19,5	2,3	20575
	K19	4,3	37,2	19,6	1,9	14196
	K20	3,9	38,9	17,7	2,2	14017
	Среднее по группе	5,2	48,1	19,8	2,4	25079
	НСР _{0,05}	0,7	4,1	0,9		

Примечание: серым цветом оттенены ячейки таблицы, соответствующие короткоспоровым изолятам.

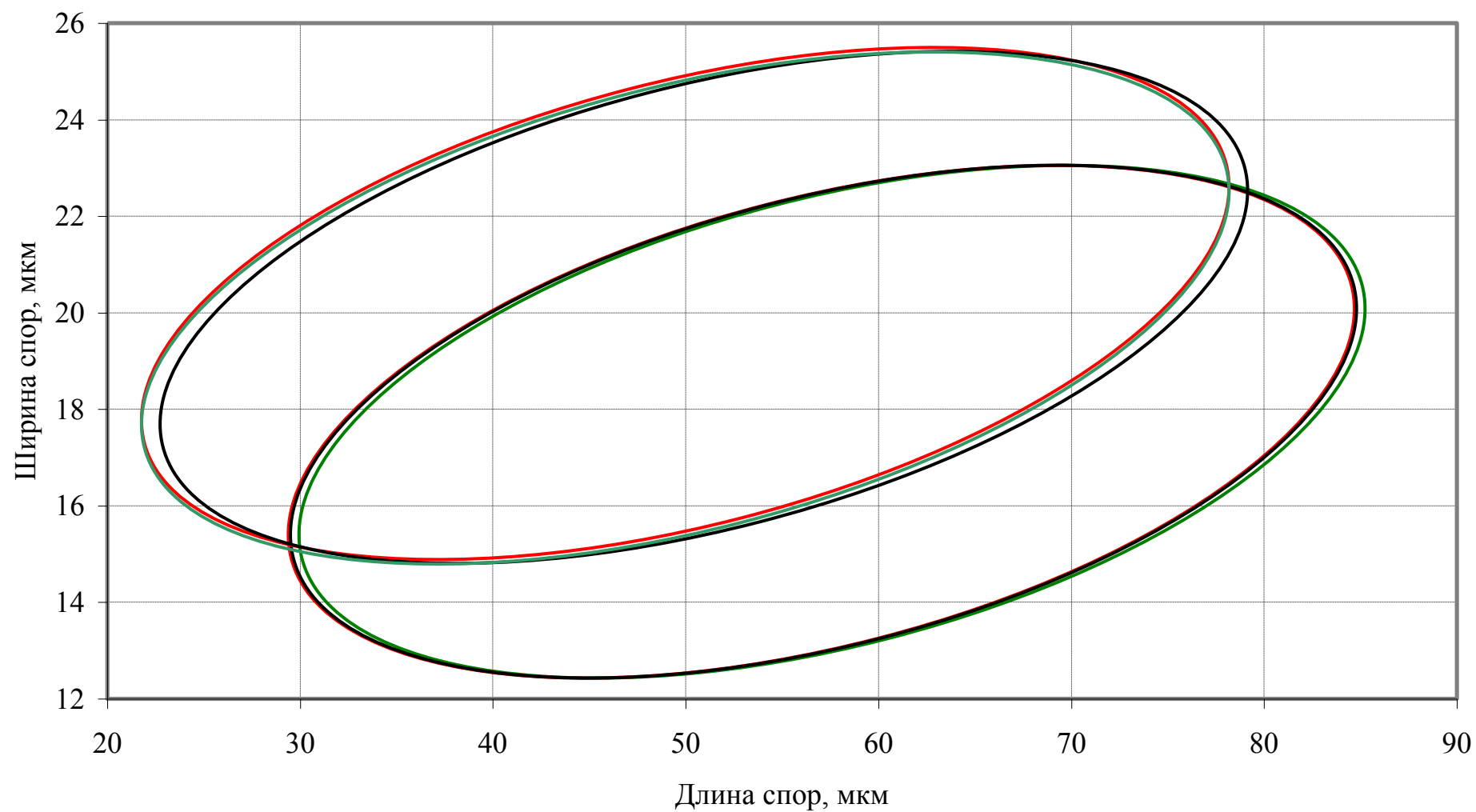


Рисунок 3.4. Варьирование размеров конидий листовых, семенных и корневых изолятов *B. sorokiniana* на среде Чапека

Примечание: длинноспоровые изоляты (нижние три окружности), короткоспоровые (верхние три окружности)

3.3. Физиолого-биохимические особенности длинноспоровых и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana*

3.3.1. Целлюлозолитическая и пектолитическая активность *B. sorokiniana*

Некротизация инфицированной растительной ткани при проникновении фитопатогена может иметь принципиально различную природу. К примеру, она может быть следствием действия токсинов или литических ферментов возбудителя, или же являться проявлением защитной реакции самого растения. Поэтому для объяснения выявленных нами различий в агрессивности длинно- и короткоспоровых изолятов потребовалось проведение серии дополнительных исследований. При планировании этой части эксперимента мы исходили из того, что паразитические свойства любого патогенного гриба должны иметь основу на биохимическом уровне, и метаболизм фитопатогенов, которые используют различные стратегии колонизации субстрата, принципиально различается [12; 45; 140; 323].

Согласно литературным данным, *B. sorokiniana* относится к экологической группе гемибийотрофов, т.е. тех грибов, которые на различных этапах паразитизма могут использовать как био-, так и некротрофную стратегию колонизации субстрата [323; 324]. В связи с этим, мы ожидали, что изучение физиолого-биохимических признаков длинно- и короткоспоровых изолятов гриба позволит установить используемые ими стратегии паразитизма и в какой-то мере объяснить выявленные нами различия в агрессивности. Особое внимание было уделено тем физиологическим процессам, которые в наибольшей степени связаны с паразитизмом, а именно: изучению активностей целлюлаз и пектиназ, а также способности изолятов продуцировать токсины.

Основная роль в питании *B. sorokiniana* в тканях растения и на растительных остатках принадлежит литическим ферментам – пектиназам и целлюлазам. Эти же ферменты используются грибом при проникновении в растения [12; 85; 213]. К сожалению, биохимические особенности *B. sorokiniana* в связи с паразитизмом на различных органах растения-хозяина до сих пор никем не были изучены. Поэтому сравнение активностей вышеупомянутых ферментов у длинно- и

короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* представляло значительный интерес. При планировании эксперимента предполагалось выяснить, отличаются ли изоляты по активности вышеупомянутых ферментов и чем определяется активность ферментов – органом растения, из которого был выделен изолят или же принадлежностью изолята к длинно- или короткоспоровой форме.

Для проведения биохимического эксперимента из числа 30 имеющихся у нас моноспоровых изолятов *B. sorokiniana* нами были отобраны 9 (по три из листьев, корней и семян). Из них четыре изолята были длинноспоровыми, а пять – короткоспоровыми. Изучалась активность целлюлаз и пектиназ, содержание белка в культуральной жидкости и динамика накопления биомассы. Измерение всех параметров проводили на 2, 4, 6 и 8 сутки культивирования. Более подробно методика проведения эксперимента описана в разделе «Объект и методы исследований». Полученные данные наглядно отражены в рисунках 3.5 – 3.7. Первичные данные, использованные для составления графиков, и данные статистической обработки результатов опыта представлены в приложении В.

Данные о содержании белка в культуральной жидкости и динамике накопления биомассы обобщены на рисунке 3.5. Первичные данные, на основании которых были построены графики, а также результаты дисперсионного анализа приведены в приложениях В 1 и В 2. Как видно из рисунка, у всех исследованных изолятов содержание белка и биомасса постепенно возрастали по мере культивирования, достигая максимума на шестые сутки. На восьмые сутки отмечена стабилизация роста культур и начало автолиза старых гиф. В итоге, на восьмые сутки и содержание белка, и масса мицелия у большинства изолятов несколько снизилась по сравнению с шестисуточной культурой.

Наряду с этим было отмечено, что различные изоляты значительно отличались друг от друга по сравниваемым показателям. При этом длинноспоровые изоляты продемонстрировали достоверно более высокую интенсивность накопления биомассы и экскреции белка, чем короткоспоровые. Так, среднее содержание белка в культуральной жидкости на шестые сутки для длинноспоровых изолятов составляло 0,97 мг/мл, а короткоспоровых – 0,49 мг/мл. Средняя масса мицелия в

пересчете на 1 мл питательной среды для длинноспоровых изолятов *B. sorokiniana* на шестые сутки культивирования составляла 37,5 мг/мл, в то время как короткоспоровых – 24,8 мг/мл.

Целлюлазы представляют собой сложный мультиферментный комплекс и по своей специфичности целлюлазы разделяются на эндоглюканызы, экзоглюканызы и целлобиазы. Эндоглюканызы расщепляют внутренние связи в молекулах целлюлозы. Экзоглюканызы «атакуют» молекулы целлюлозы с конца, последовательно отщепляя целлобиозные остатки. Целлобиазы гидролизуют молекулы целлобиозы и растворимых целлоолигосахаридов до конечного продукта – глюкозы. Каждый из этих ферментов обычно представлен множеством изоформ [213].

Динамика изменения активностей экзо- и эндоглюканыз в культуральной жидкости *B. sorokiniana* представлена на рисунке 3.6. Первичные данные, на основании которых были построены графики, а также результаты дисперсионного анализа приведены в приложениях В 3 и В 4. Анализ полученных результатов показал, что, как и в случае с содержанием белка, активность обоих ферментов постепенно возрастала, достигая максимума на шестые сутки, и несколько уменьшалась на восьмые сутки культивирования. При этом средняя активность экзоцеллюлаз на шестые сутки составляла 0,09 мг/мл/час/мг белка для длинноспоровых изолятов и – 0,011 мг/мл/час/мг белка для короткоспоровых. Сходная закономерность была выявлена нами и для эндоцеллюлаз, средняя активность которых составляла 66,38% для длинноспоровых и всего 29,1% – для короткоспоровых изолятов.

Общая тенденция, продемонстрированная нами выше на примере содержания белка, накопления биомассы и активностей экзо- и эндоцеллюлаз, была выявлена также на примере целлобиаз и пектиназ. Динамика изменения активностей этих ферментов представлена на рисунке 3.7. Первичные данные, на основании которых были построены графики, а также результаты дисперсионного анализа приведены в приложениях В 5 и В 6. Средняя активность целлобиаз на шестые сутки культивирования составляла 0,015 мг/мл/час/мг белка для длинноспоровых

изолятов и – 0,007 мг/мл/час/мг белка для короткоспоровых. Средняя активность пектиназ для длинноспоровых изолятов составляла 14,8%, а для короткоспоровых – всего 3,6%.

Таким образом, анализ активностей целлюлаз и пектиназ в культуральной жидкости различных изолятов *B. sorokiniana*, выращенных на жидкой питательной среде Чапека, позволил установить наличие значительных биохимических различий между длинно- и короткоспоровыми изолятами гриба.

Из полученных данных отчетливо видно, что биохимические свойства изолята определяются не органом растения, из которого он был выделен, а принадлежностью к длинно- или короткоспоровой форме. При этом длинноспоровые изоляты, доминирующие на надземных органах растения-хозяина, по сравнению с короткоспоровыми, характеризуются более высоким содержанием белка в культуральной жидкости, большей интенсивностью накопления биомассы в чистой культуре, а также более высокой активностью целлюлаз и пектиназ.

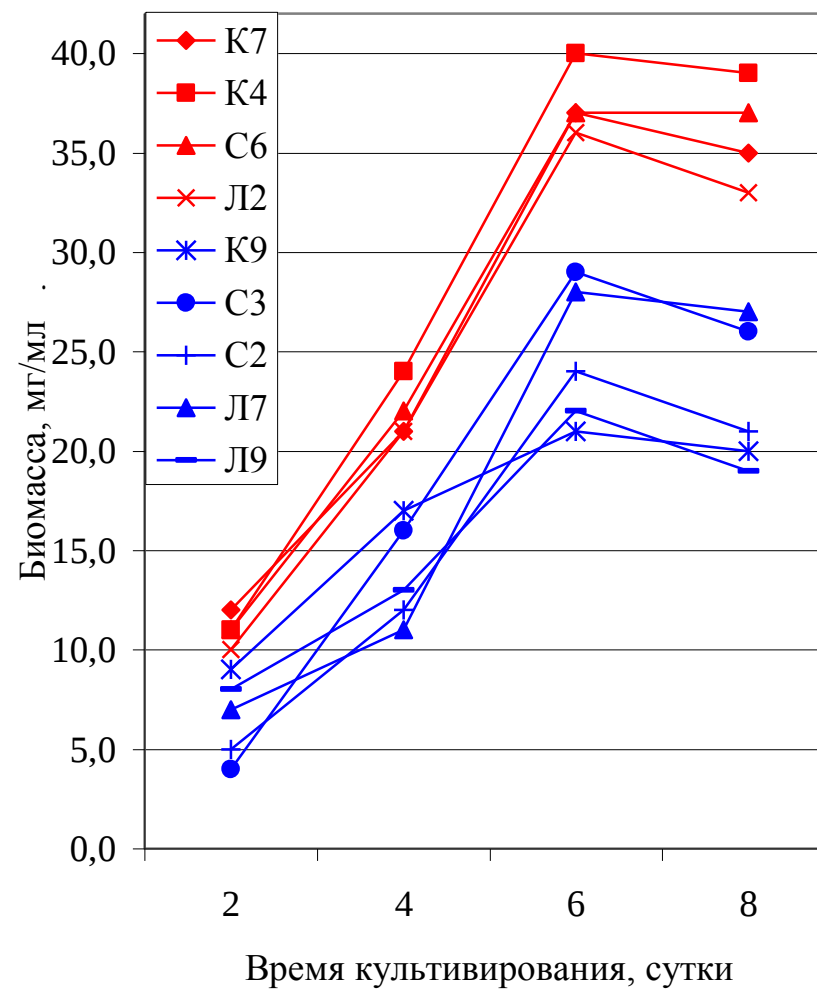
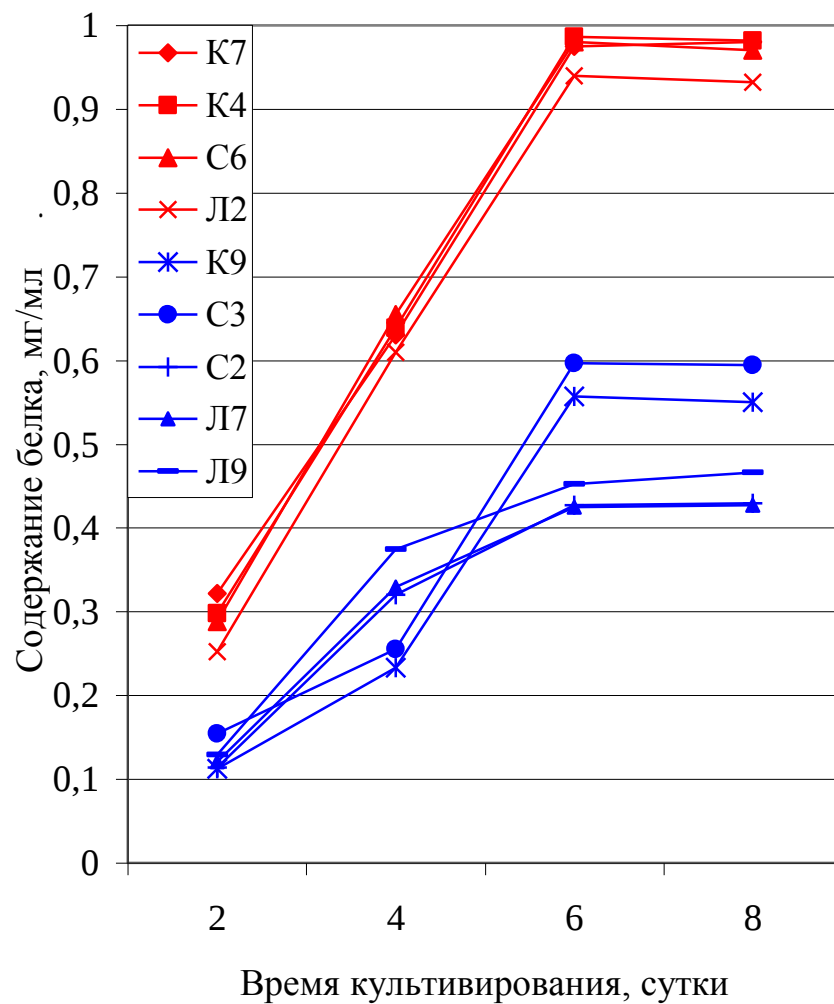


Рис. 3.5. Содержание белка в культуральной жидкости и интенсивность накопления биомассы культурами *B. sorokiniana*.

Примечание: красный цвет – длиннospоровые изоляты, синий – короткospоровые.

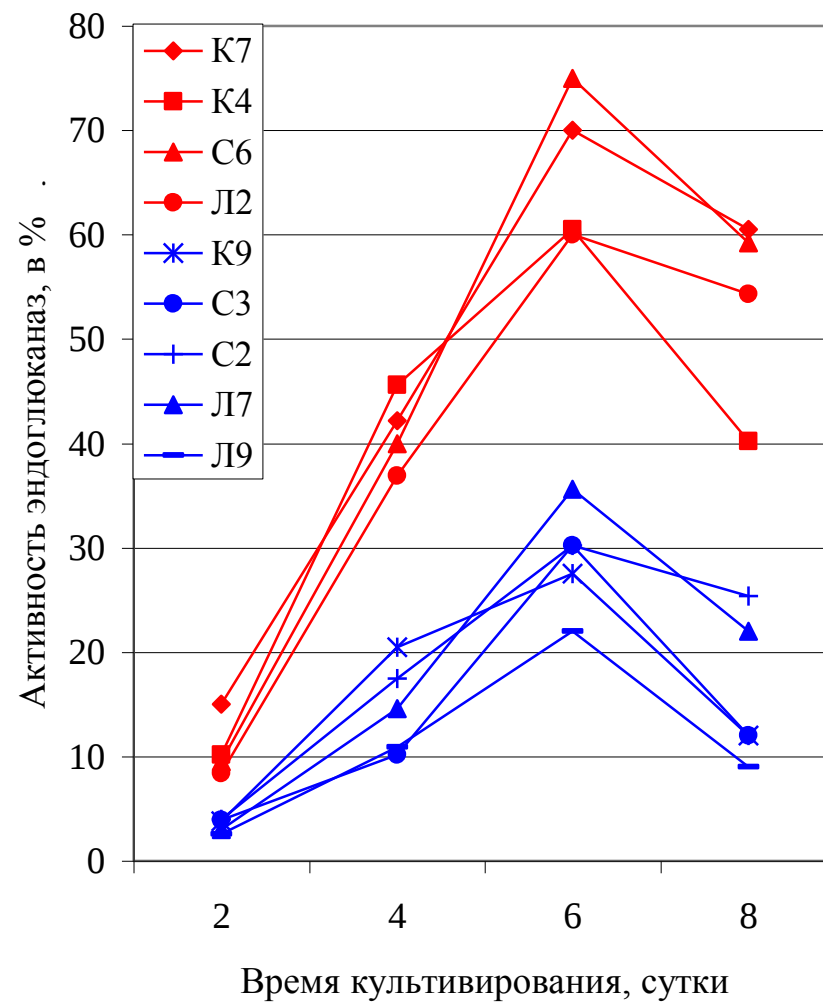
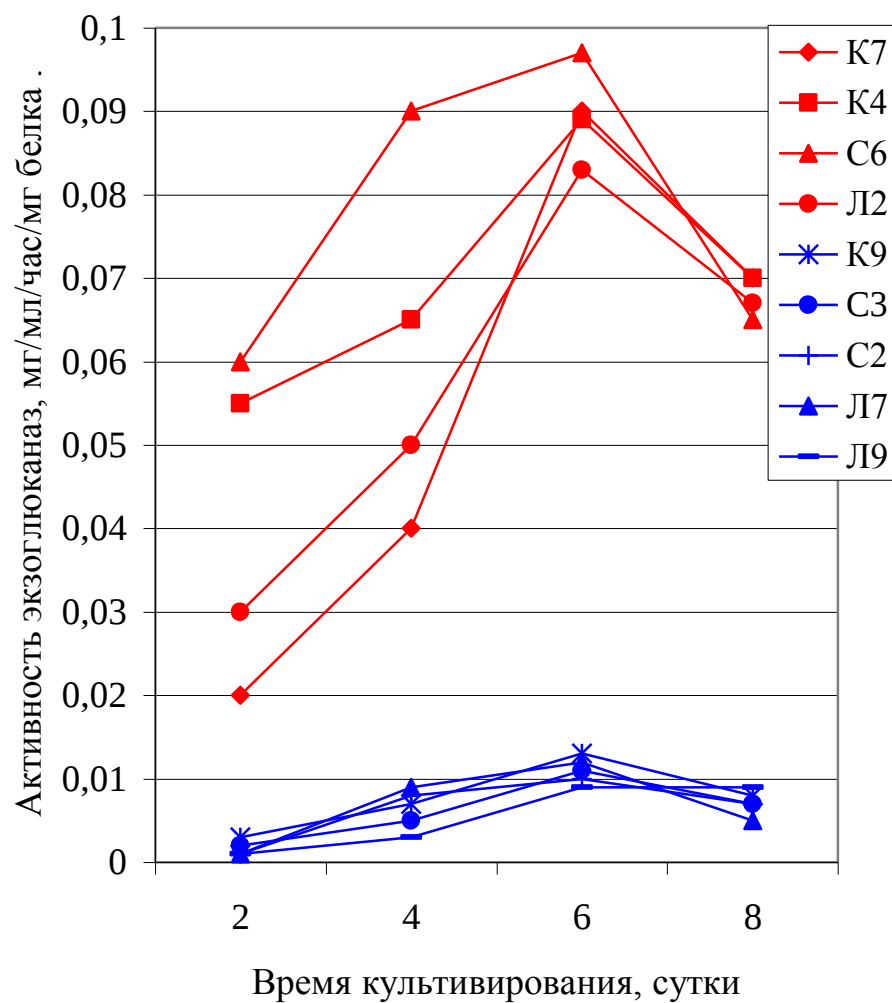


Рис. 3.6. Активность β -1,4-экзо- и β -1,4-эндоглюканаз в культуральной жидкости различных изолятов *B. sorokiniana*.

Примечание: красный цвет – длинноспоровые изоляты, синий – короткоспоровые.

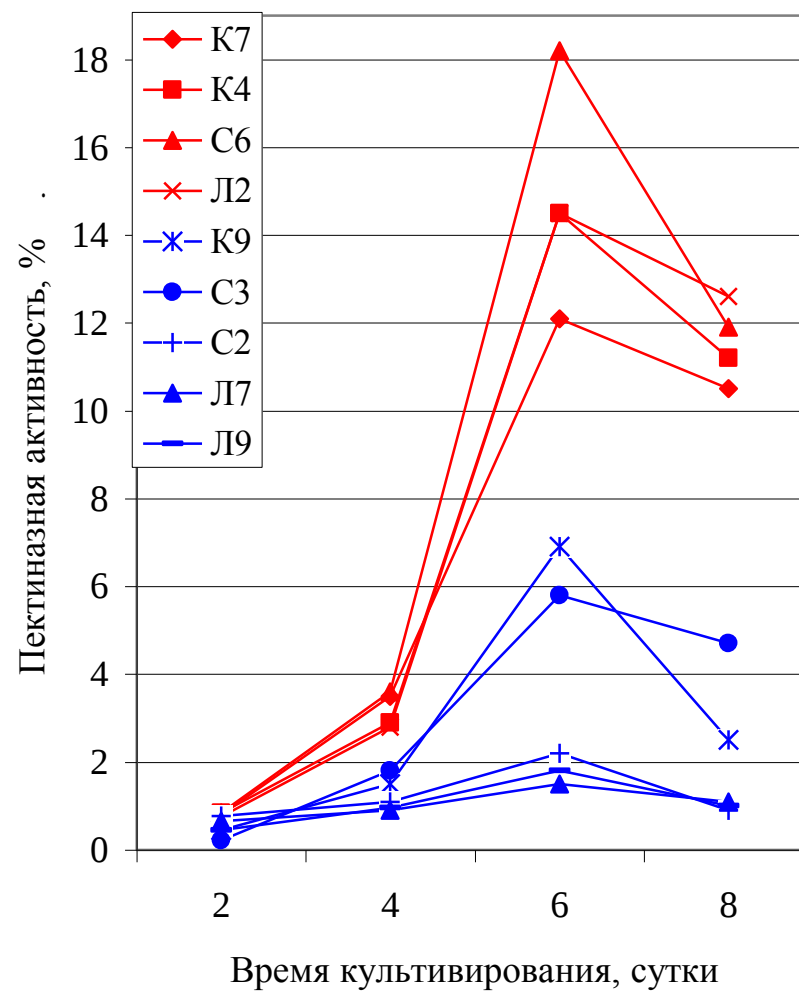
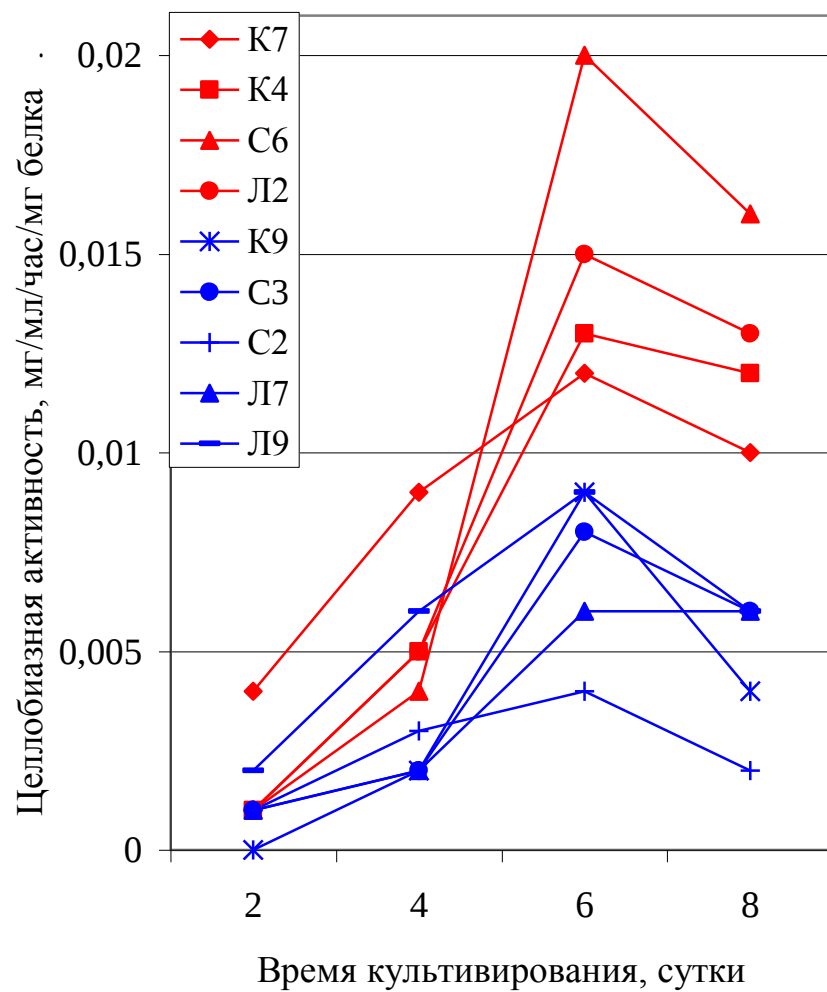


Рис. 3.7. Целлюбиазная и пектиная активность в культуральной жидкости различных изолятов *B. sorokiniana*.

Примечание: красный цвет – длинноспоровые изоляты, синий – короткоспоровые.

3.3.2. Токсигенные особенности *B. sorokiniana*

В процессе жизнедеятельности мицелий *B. sorokiniana* постоянно выделяет в окружающую среду ряд вторичных метаболитов. Доминирующими компонентами в составе экзометаболитов гриба являются соединения терпеноидной природы: прегельминтоспорол, прегельминтоспораль, β -сорокинианин и пр. Эти вещества накапливаются в составе культуральной жидкости в процессе выращивания гриба, и благодаря их присутствию нативная культуральная жидкость приобретает неспецифические токсические свойства по отношению к различным растениям [178; 184; 342; 354].

Длительное время было принято считать, что терпеноидные экзометаболиты используются грибом в качестве патотоксинов при инфицировании растения. В связи с этим, начиная с 1960-х гг., был разработан ряд лабораторных методов диагностики устойчивости растений к гельминтоспориозам, основанных на данных об устойчивости растений к действию культуральной жидкости или отдельных ее компонентов [11; 16; 49; 82; 182; 328; 346; 389; 421; 267; 397; 345]. В настоящее время эти методы подвергаются серьезной и обоснованной критике, а их практическая значимость ставится под сомнение. Тем не менее, ни у кого не вызывает сомнения, что вторичные экзометаболиты *B. sorokiniana* играют важнейшую роль в патогенезе вызываемых им заболеваний, а изучение их состава и закономерностей образования представляет большой научный интерес [33; 150; 177; 178; 182; 185; 342; 354].

Приступая к изучению вторичных экзометаболитов *B. sorokiniana*, мы попытались найти ответ на два основных вопроса: отличаются ли изоляты гриба по токсигенной способности и от чего зависит токсичность культуральной жидкости – органа растения, из которого был выделен изолят или же принадлежности изолята к длинно- или короткоспоровой форме.

В связи с тем, что в семенах хлебных злаков практически всегда присутствует семенная инфекция *B. sorokiniana*, которая визуалью не диагностируется, возникают большие методические трудности при изучении влияния на них культуральной жидкости патогена. При проращивании таких семян в

подавляющей их части начинает развиваться мицелий *B. sorokiniana*, который по мере своего роста продуцирует экзометаболиты. Интенсивность воздействия этих метаболитов зависит как от степени инфицированности семян, так и генетических особенностей возбудителя, инфицировавшего то или иное семя. В итоге, тестируемые семена подвергаются дополнительному эндогенному воздействию токсинов, что не позволяет корректно оценить действие на них культуральной жидкости. Вероятно поэтому, в литературе нет однозначного мнения о токсичности культуральной жидкости листовых и корневых изолятов *B. sorokiniana* [96; 181].

Для преодоления описанных выше методических трудностей и соблюдения чистоты эксперимента в качестве модельного объекта нами были использованы семена проса сорта Мироновское 51. В отличие от ячменя, просо никогда не инфицируется грибом *B. sorokiniana*. В то же время, просо является представителем семейства Poaceae, поэтому закономерности воздействия токсинов гриба на эту культуру должны быть аналогичными или максимально близкими к воздействию на хлебные злаки. Использование в биотестировании не растений-хозяев при работе с неспецифическими токсинами грибов, к которым относятся и токсины *B. sorokiniana*, широко распространено при проведении подобных исследований [285; 309; 358; 389].

Методика определения токсичности культуральной жидкости различных изолятов *B. sorokiniana* подробно описана в разделе «Объект и методы исследований». По низкой всхожести семян проса после замачивания в культуральную жидкость фитопатогенного гриба делали вывод о высокой токсичности жидкости и наоборот.

В связи с тем, что культуральная жидкость *B. sorokiniana* помимо метаболитов гриба содержит неиспользованные остатки питательной среды, при проведении эксперимента нами использовались два контрольных варианта: замачивание семян дистиллированную воду и в питательную среду Чапека. Данные о всхожести семян проса после их замачивания в нативные культуральные фильтраты тридцати моноспоровых изолятов *B. sorokiniana* представлены в

таблице 3.3. Обобщенные данные о токсигенных свойствах длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* представлены на рисунке 3.8.

Как и следовало ожидать, токсичность культуральной жидкости различных изолятов *B. sorokiniana* значительно отличалась. Минимальной токсичностью обладала культуральная жидкость короткоспорового изолята СЗ, выделенного из семян. Всхожесть семян проса после замачивания в культуральную жидкость этого изолята составила 80,4% и достоверно не отличалась от контроля. Максимальной токсичностью обладала культуральная жидкость длинноспорового изолята Л2, выделенного из листьев. Всхожесть семян проса после замачивания в культуральную жидкость этого изолята составила всего 18,5%, что примерно в четыре раза ниже, чем в контроле.

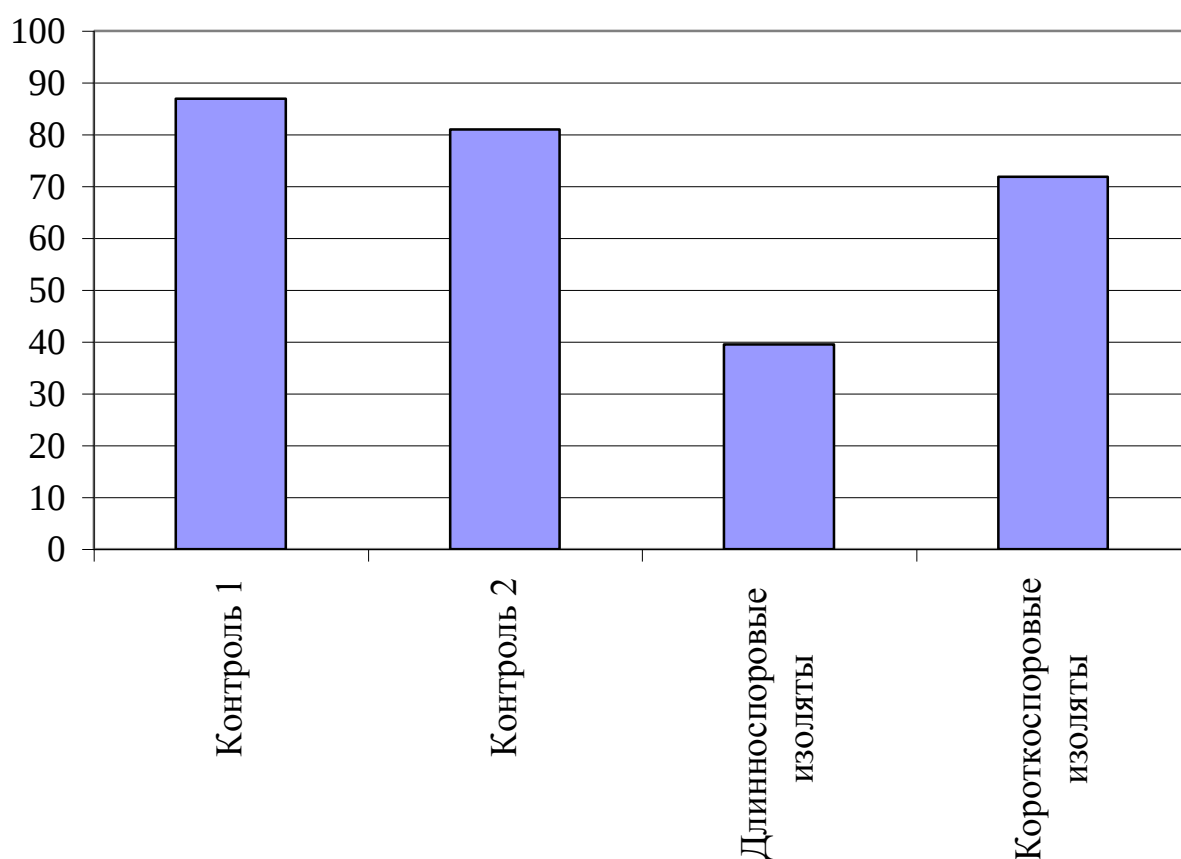


Рисунок 3.8. Всхожесть семян проса после замачивания в нативные культуральные фильтраты длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana*.

Примечание: контроль 1 – питательная среда, контроль 2 – дистиллированная вода.

Таблица 3.3

Всхожесть семян проса после замачивания в нативные культуральные фильтраты
различных изолятов *Bipolaris sorokiniana*

Вариант опыта		Всхожесть, %
I		II
Контроль 1 (питательная среда)		86,9
Контроль 2 (дистиллированная вода)		81,0
Листовые изоляты	Л1	34,1
	Л2	18,5
	Л3	49,7
	Л4	31,7
	Л5	51,2
	Л6	38,9
	Л7	77,7
	Л8	43,0
	Л9	76,2
	Л10	22,4
	Среднее по группе	44,3
Семенные изоляты	С1	44,0
	С2	63,8
	С3	80,4
	С4	51,3
	С5	49,6
	С6	71,6
	С7	39,5
	С8	19,4
	С9	70,3
	С10	46,7
	Среднее по группе	53,7

Таблица 3.3 (продолжение)

I		II
Корневые изоляты	K1	78,7
	K2	72,2
	K3	64,2
	K4	31,2
	K5	80,4
	K6	55,0
	K7	42,3
	K8	62,1
	K9	65,0
	K10	41,8
	Среднее по группе	59,3
Среднее для длинноспоровых изолятов		39,5
Среднее для короткоспоровых изолятов		71,9
В среднем по изолятам		52,4
НСР _{0,05}		7,8

Примечание: серым цветом оттенены ячейки таблицы, соответствующие короткоспоровым изолятам.

Средняя всхожесть семян проса после замачивания в культуральную жидкость листовых изолятов составила 44,3%, семенных – 53,7%, а корневых – 59,3%. Тем самым, листовые изоляты обладали достоверно большей токсигенной активностью, чем корневые, а семенные изоляты занимали промежуточное положение (табл. 3.3).

При изучении токсичности культуральной жидкости *Bipolaris sorokiniana* нами было установлено, что токсигенные свойства изолята определяются не органом растения, откуда был выделен изолят, а его принадлежностью к длинно- или короткоспоровой форме. Всхожесть семян при замачивании в культуральную жидкость длинноспоровых изолятов гриба оказалась почти в два раза ниже, чем короткоспоровых и составила 39,5% против 71,9%, соответственно. Тем самым, нами было установлено, что токсичность культуральной жидкости длинноспоровых изолятов существенно выше, чем короткоспоровых.

Вплоть до настоящего времени остается дискуссионным вопрос о связи между токсичностью культурального фильтрата и агрессивностью соответствующего изолята патогена. Одни авторы отмечали, что эти показатели связаны прямой корреляционной зависимостью [150; 178; 389]. Другим исследователям не удалось установить какой-либо зависимости [171]. По нашему мнению, расхождение литературных данных по этому вопросу может быть связано со сложностью состава экзометаболитов, с одной стороны, и использованием при проведении исследований различных изолятов возбудителя, с другой.

В результате биотестирования, проведенного на семенах проса, стало очевидным, что токсичности культуральных жидкостей длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* существенно отличаются. Выявленное нами варьирование токсичности культуральной жидкости могло быть обусловлено как количественным, так и качественным различием состава вторичных экзометаболитов. Для изучения этого вопроса в дальнейшем нами были применены более точные – хроматографические методы исследования.

Для проведения хроматографического исследования нами были отобраны 9 изолятов *B. sorokiniana* (те же, что и при изучении ферментативной активности).

Изоляты культивировали в круглодонных колбах объемом 100 мл, содержащих по 40 мл жидкой питательной среды Чапека, на протяжении 10 суток на ротационной качалке при комнатной температуре. По истечении времени выращивания культуральную жидкость гриба отделяли от мицелия и спор методом фильтрации на фильтровальной бумаге и обрабатывали равным количеством хлороформа. Хлороформный экстракт экзометаболитов отделяли от остатков культуральной жидкости с помощью делительной воронки и упаривали под вакуумом до объема несколько микролитров. Полученный концентрат экзометаболитов в дальнейшем подвергался хроматографированию [252-254].

Наиболее простым, дешевым, и, соответственно, широко распространенным методом изучения состава вторичных метаболитов грибов является тонкослойная хроматография. На рисунке 3.9 представлена схема размещения фракций вторичных метаболитов *B. sorokiniana* после разделения концентрата хлороформного экстракта на силикагелевых пластинках Silufol. При просмотре пластинок в ультрафиолетовом свете нам удалось выявить шесть отчетливых пятен, различающихся удаленностью от места нанесения пробы, размером, окраской и интенсивностью свечения.

Пятно №1 характеризовалось низкой подвижностью в хлороформе, поэтому оно практически не сместилось с места нанесения пробы на пластинку. В ультрафиолете оно светилось бирюзовым цветом. Пятна № 2 и 3 смещались от старта на расстояние 4-6 см. Оба пятна в ультрафиолете имели одинаковую болотно-зеленую окраску и на ряде хроматографических пластинок разделялись плохо. Пятно №4 имело очень маленький размер и светилось ярко-желтым цветом. Самым крупным было пятно №5, которое имело в ультрафиолете ярко-зеленую окраску и удалялась от места нанесения пробы на расстояние 15-16 см. Самым подвижным в хлороформе оказалось пятно №6, которое двигалось вместе с фронтом растворителя и имело в ультрафиолете ярко-голубую окраску. Несмотря на относительно небольшой размер, последнее пятно имело в ультрафиолете самую интенсивную окраску.

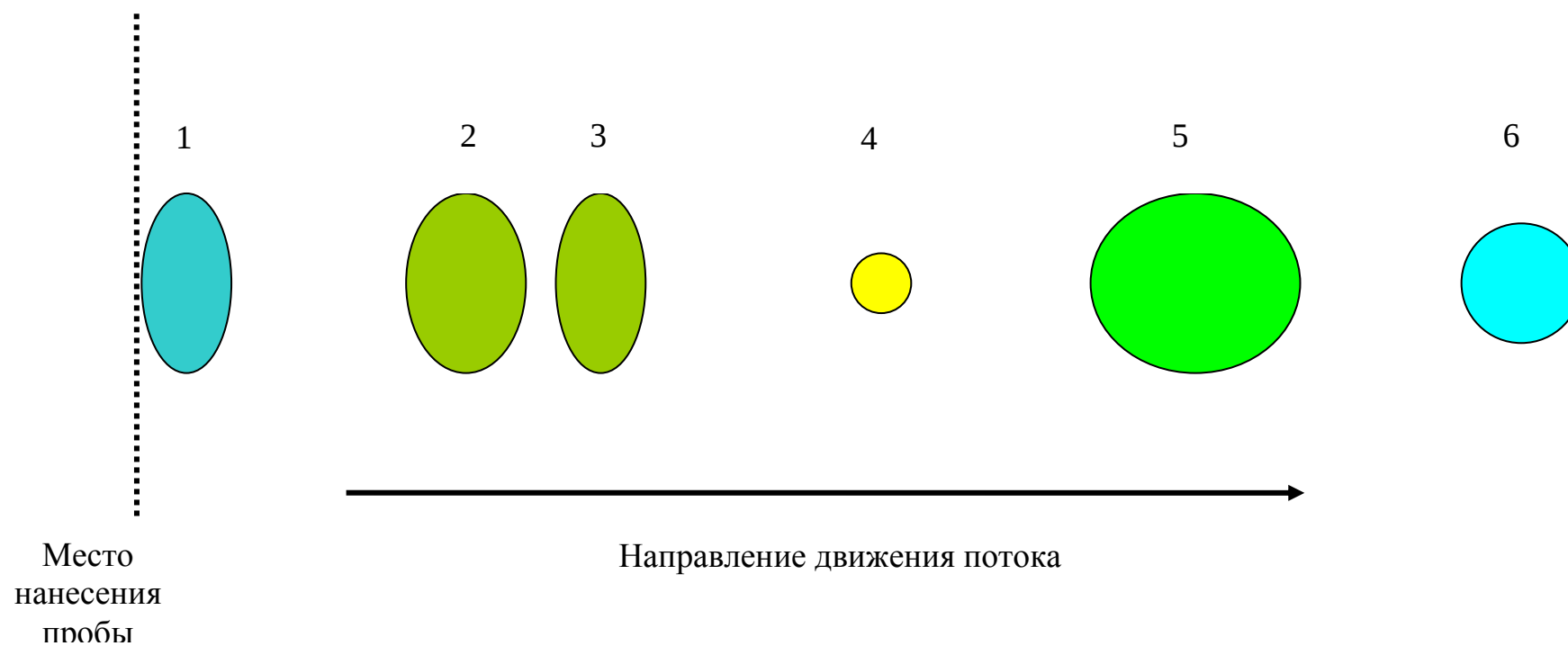


Рисунок 3.9. Хроматограмма хлороформного экстракта экзометаболитов *Bipolaris sorokiniana* на пластинках Silufol (ультрафиолет, 254 нм)

Сравнение хроматограмм, культуральных жидкостей длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* не позволило нам обнаружить существенных различий. Порядок размещения пятен, их размер и окраска для всех исследованных изолятов возбудителя были одинаковы и соответствовали рисунку 3.9.

Таким образом, при использовании метода тонкослойной хроматографии хлороформных экстрактов культуральной жидкости нам не удалось получить дополнительных доказательств отличий сравниваемых групп изолятов. По нашему мнению, эти результаты могут быть обусловлены сложностью состава культуральной жидкости, с одной стороны, и низкой разрешающей способностью использованного метода при разделении смесей сложного состава, с другой.

Как известно, метод тонкослойной хроматографии позволяет получить хорошие результаты только в том случае, если в анализируемой смеси в достаточном количестве присутствует относительно небольшое количество соединений, различающихся по подвижности в выбранной системе растворителей [35]. Мы предположили, что в состав хлороформного экстракта культуральной жидкости *B. sorokiniana* входит более чем шесть различных вторичных экзометаболитов. Тем самым, каждое из обнаруженных нами на пластинках Silufol пятен представляет собой группу веществ со сходной подвижностью в хлороформе, которые, налагаясь друг на друга, придают пятну его размер и окраску.

Для проверки высказанного предположения, вещества из самого крупного (и, соответственно, содержащего наибольшее количество экзометаболитов) пятна №5 были реэкстрагированы в хлороформе и повторно разделены с помощью более точного и современного метода исследований – метода газовой хроматографии на хроматографе HP-5890. Для реэкстрагирования была использована хроматограмма длинноспорового изолята *B. sorokiniana* Л2 культуральная жидкость которого обладала наибольшей токсичностью. Результаты этого исследования представлены на рисунке 3.10.

Как и следует из рисунка 3.10, пятно №5 представляет собой группу веществ. В его составе нами было обнаружено 31 соединение, из числа которых 7 (со временем извлечения 5,9 6,3 6,4 6,6 6,8 7,3 и 7,8) присутствуют в больших количествах. Подробные данные о времени извлечения, площади и высоте пика для всех обнаруженных в составе экстракта веществ приведены в приложении В 7.

Таким образом, с помощью газовой хроматографии пятна №5 нам удалось подтвердить высказанное ранее предположение о том, что отсутствие визуальных различий между хроматограммами длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* в случае применения тонкослойной хроматографии может быть обусловлено сложностью состава вторичных метаболитов в культуральной жидкости гриба.

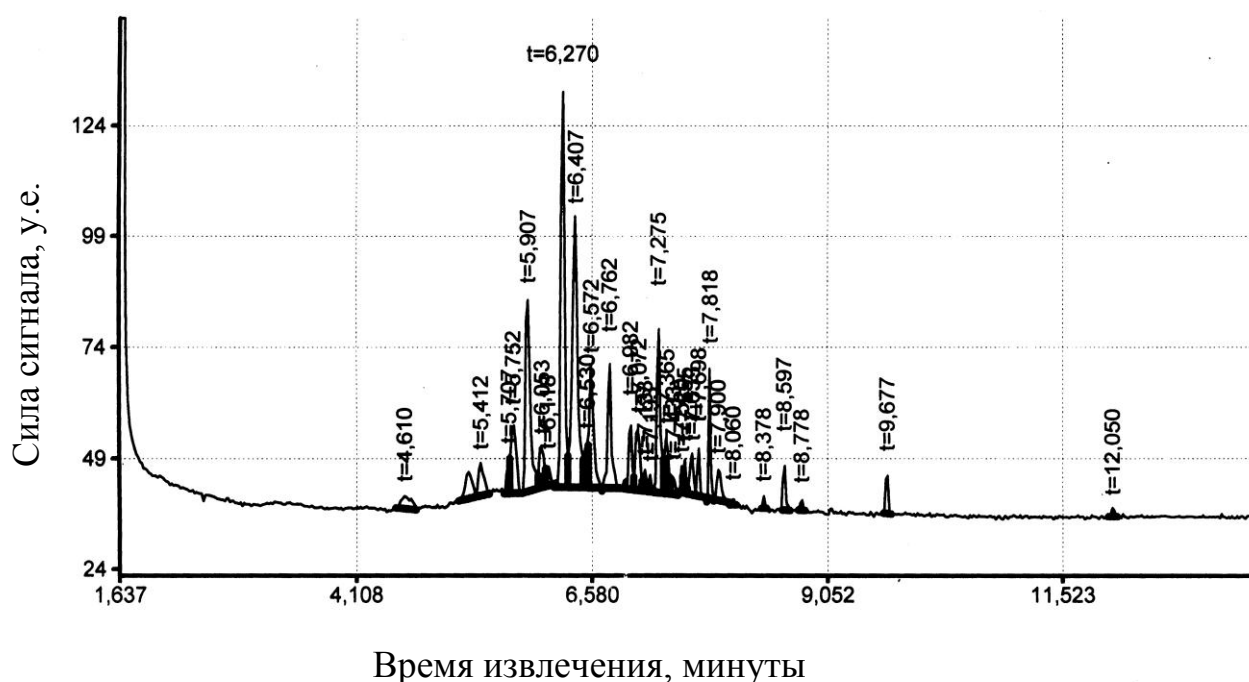


Рисунок 3.10. Газовая хроматограмма фракции №5 хлороформного экстракта культуральной жидкости длинноспорового изолята *B. sorokiniana*.

К сожалению, и метод газовой хроматографии не лишен недостатков. Так, этот метод позволяет разделить анализируемую смесь на индивидуальные компоненты и охарактеризовать каждый компонент временем возгонки и количеством. В то же время, без привлечения дополнительных трудоемких исследований в большинстве случаев не представляется возможным узнать, какие именно соединения присутствовали в смеси и корректно сравнить между собой различные пробы. Для решения этих проблем в практике газовой хроматографического исследования принято параллельно проводить разделение эталонных веществ, присутствие которых в смеси предполагается априори [43].

Наиболее современным и точным методом изучения состава гетерогенных смесей высококипящих органических соединений в настоящее время является хроматомасс-спектрометрия. Этот метод был разработан относительно недавно и сочетает в себе черты газовой хроматографии и масс-спектрометрии. В отличие от предыдущего метода, он позволяет охарактеризовать каждое из обнаруженных в анализируемой пробе соединений не только временем извлечения и количеством, но и характерным только для этого вещества масс-спектром. Таким образом, хроматомасс-спектрометрия позволяет качественно и количественно сравнивать сложные смеси органических соединений. Экзометаболиты *B. sorokiniana* методом хроматомасс-спектрометрии ранее не разделялись.

На рисунке 3.11 приведен спектр вторичных метаболитов изолята длинноспорового изолята Л2. В составе концентрата хлороформного экстракта культуральной жидкости этого изолята нами были обнаружены 56 высококипящих органических соединений. Основными компонентами культуральной жидкости являются вещества со временем извлечения 19,84, 18,04, 17,66, 17,41 и 15,95 общее содержание которых в фильтрате составляет 10,22; 7,22; 8,21; 11,7 и 4,94% соответственно. Данные обо всех веществах, обнаруженном в культуральной жидкости, приведены в приложении В 8.

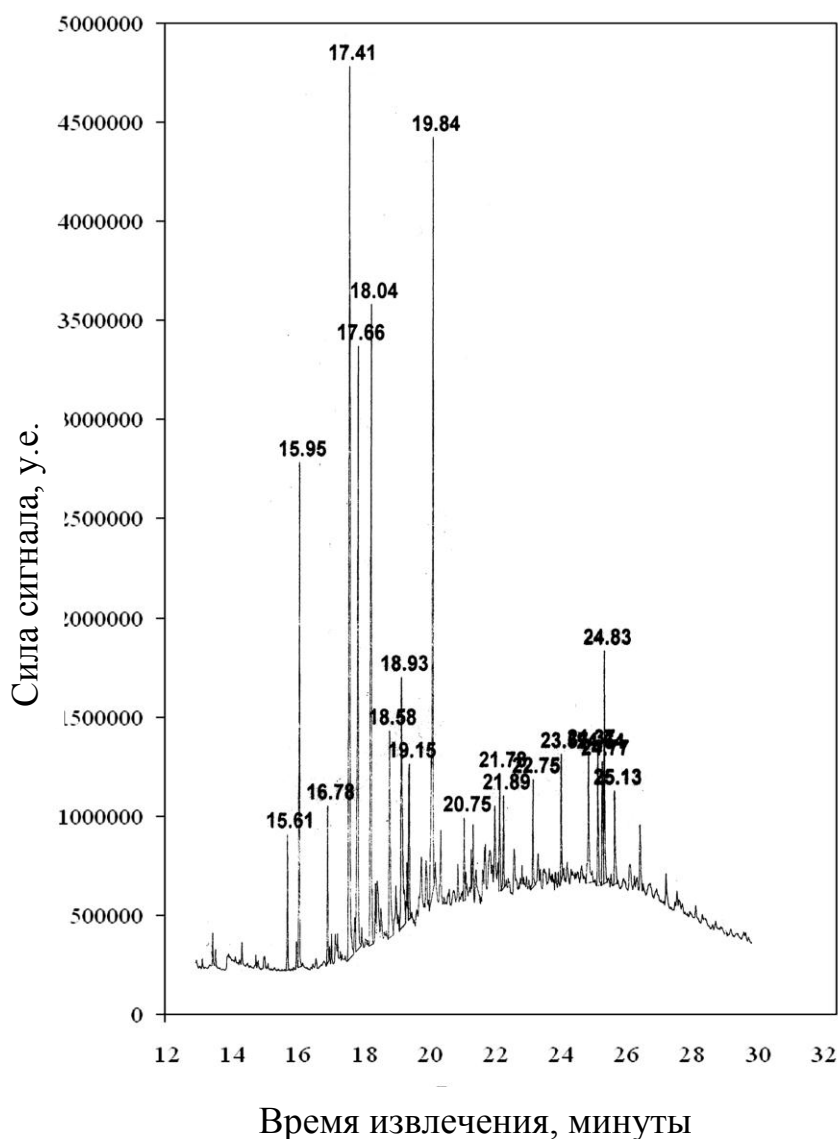


Рисунок 3.11. Хроматомасс-спектр хлороформного экстракта культуральной жидкости длинноспорового изолята *Bipolaris sorokiniana*.

В результате изучения токсигенных свойств различных изолятов *B. sorokiniana* нами было установлено, что длинноспоровые изоляты характеризуются значительно большей токсичностью культуральной жидкости, чем короткоспоровые. В составе культуральной жидкости гриба присутствуют, по меньшей мере, 56 высококипящих органических экзометаболитов, совокупное воздействие которых придает ей характерные свойства. Отсутствие достоверной разницы между хроматограммами экзометаболитов длинно- и короткоспоровых изолятов гриба на пластинках Silufol, вероятно, обусловлено неспособностью этого метода селективно выявлять весь комплекс экзометаболитов возбудителя.

3.4. Особенности паразитизма длинноспоровых и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana*

Основным фитопатологическим показателем, который позволяет оценить паразитические свойства патогенного гриба, является агрессивность [57]. Агрессивность может быть охарактеризована по активности некротизации тканей растения-хозяина патогеном, а также по интенсивности спорообразования возбудителя в условиях паразитизма. Первый из вышеназванных показателей позволяет охарактеризовать степень повреждения растения патогеном после инфицирования тем или иным изолятом возбудителя и характеризует его паразитические свойства на организменном уровне. Второй показатель характеризует способность патогена вызывать вторичные заражения растений и характеризует его на популяционном уровне [57; 140].

В нашем исследовании агрессивность изолятов определялась по их способности инфицировать отрезки листьев ярового ячменя в условиях влажной камеры. Для проведения исследования были отобраны 30 моноспоровых изолятов *B. sorokiniana* (по 10 листовых, семенных и корневых) из которых 12 были короткоспоровыми и 18 длинноспоровыми. В качестве сортов-дифференциаторов нами были отобраны 9 сортов ярового ячменя различных по устойчивости к темно-бурой пятнистости листьев. Более подробно методика заражения листьев и учета агрессивности описана в разделе «Объект и методы исследований».

Обобщенные данные об агрессивности исследованных изолятов *B. sorokiniana* представлены в таблице 3.4. Первичные данные, использованные при составлении таблицы 3.4, представлены в приложении В. Для большей наглядности, ячейки таблицы, соответствующие короткоспоровым изолятам оттенены. Развитие *B. sorokiniana* на листьях ячменя при искусственном заражении в чашках Петри наглядно показано на рисунке 3.12.

Таблица 3.4

Характеристика агрессивности изолятов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin)

Schoemaker различного происхождения

Вариант опыта		Количество спор, шт.	Степень развития некроза, баллы
I		II	III
ЛИСТОВЫЕ ИЗОЛЯТЫ	Л1	2067	3,4
	Л2	2556	3,1
	Л3	2036	2,9
	Л4	1839	3,1
	Л5	1831	2,7
	Л6	1761	2,9
	Л7	3861	2,6
	Л8	2217	2,8
	Л9	4161	2,3
	Л10	1900	3,1
	Среднее по группе	2423	2,9
СЕМЕННЫЕ ИЗОЛЯТЫ	С1	2400	2,9
	С2	6867	2,3
	С3	5250	2,5
	С4	1672	2,9
	С5	1733	2,9
	С6	3467	2,0
	С7	2933	2,6
	С8	3183	2,9
	С9	3833	2,4
	С10	1828	2,7
	Среднее по группе	3317	2,6

Таблица 3.4 (продолжение)

I		II	III
КОРНЕВЫЕ ИЗОЛЯТЫ	K1	3783	2,6
	K2	5661	2,4
	K3	9033	1,4
	K4	2819	3,3
	K5	7033	2,2
	K6	1194	3,3
	K7	1272	2,9
	K8	5844	1,5
	K9	3800	2,4
	K10	1856	2,8
	Среднее по группе	4230	2,5
Среднее для длинноспоровых изолятов		2061	3,0
Среднее для короткоспоровых изолятов		5216	2,2
В среднем по изолятам		3323	2,7
НСР _{0,05}		576,4	—

Примечание: серым цветом оттенены ячейки таблицы, соответствующие короткоспоровым изолятам.

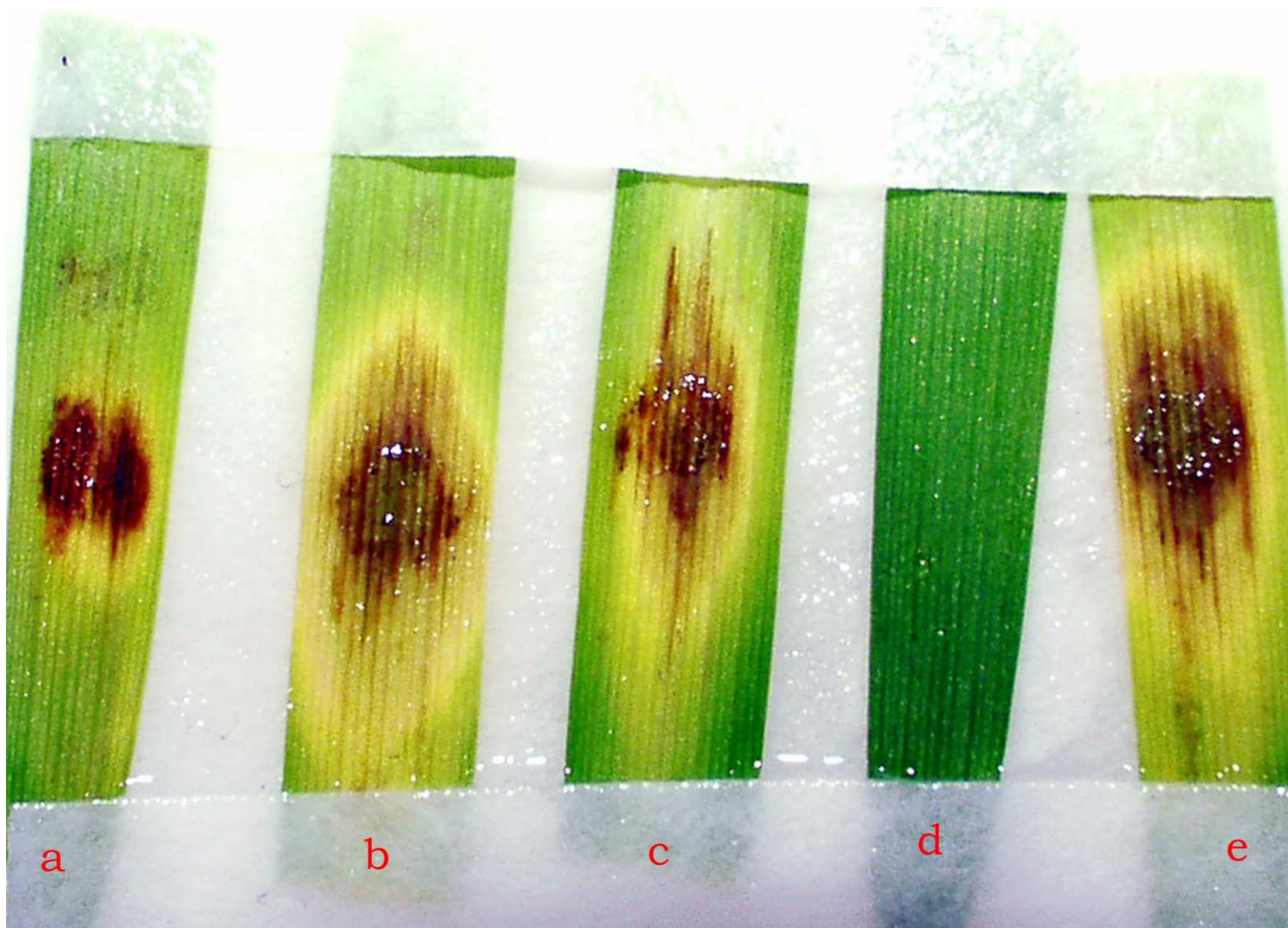


Рис. 3.12. Развитие *B. sorokiniana* на листьях ячменя при искусственном заражении в чашках Петри (сорт Bayer C15599)

Примечание: а, b, c, e – инфицированные листья, d – неинфицированный лист.

Как видно из таблицы 3.4, изученные изоляты характеризуются существенным варьированием агрессивности. Так, интенсивность спорообразования изолятов на отрезках листьев варьирует в пределах 1194 – 9033 спор на одно некротическое пятно, а активность некрозообразования в пределах 1,4 – 3,4 балла по 4-х бальной шкале.

Средняя интенсивность спорообразования изолятов из листьев составила 2423 шт., из семян – 3317 шт., а из корней – 4230 спор на одно некротическое пятно. Усредненная степень развития некроза, вызванного листовыми изолятами, составила 2,9 балла; семенными – 2,6 балла, а корневыми – 2,5 балла. Эти результаты хорошо согласуются с данными ряда других авторов, которые отмечали, что изоляты *B. sorokiniana* из листьев и корней достоверно различаются по агрессивности [96; 119; 120; 129].

Нами установлено, что, как и в случае с размерами спор, достоверное отличие листовых и корневых изолятов *B. sorokiniana* по агрессивности не может свидетельствовать об однородности их состава, а объясняется количественным преобладанием длинноспоровых изолятов на листьях, а короткоспоровых – на корнях. Опираясь на полученные результаты, мы можем отметить, что агрессивность изолятов *B. sorokiniana* обусловлена не тем, из какого органа растения они были выделены, а их принадлежностью к длинно- или короткоспоровой форме.

Закономерности варьирования агрессивности длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* наглядно отражены на рисунках 3.13 и 3.14. Нами установлено, что короткоспоровые изоляты характеризуются достоверно более высокой интенсивностью спорообразования, которая составляла в среднем 5216 спор на одно некротическое пятно. Усредненная интенсивность спорообразования длинноспоровых изолятов была в 2,5 раза ниже и составляла всего 2061 спор на одно некротическое пятно.

Активность некрозообразования длинноспоровых изолятов *B. sorokiniana*, напротив, оказалась несколько выше и составила в среднем 3,0 балла, в то время как для короткоспоровых всего 2,2 балла. Коэффициент корреляции между

активностью спорообразования и интенсивностью некрозообразования составил - 0,81, что подтверждает наличие устойчивой обратной зависимости между сравниваемыми показателями. Таким образом, длинноспоровые изоляты в среднем характеризуются достоверно более высокой активностью некрозообразования и, в то же время, более низкой интенсивностью спорообразования в условиях паразитирования (рис. 3.15 и 3.16).

Разброс интенсивности спорообразования для длинноспоровых изолятов оказался относительно невелик и варьировал в пределах 1194 – 3183 шт. Для короткоспоровых изолятов он существенно больше и составлял 3467 – 9033 шт. Таким образом, длинноспоровые изоляты проявили себя как более однородные по этому показателю.

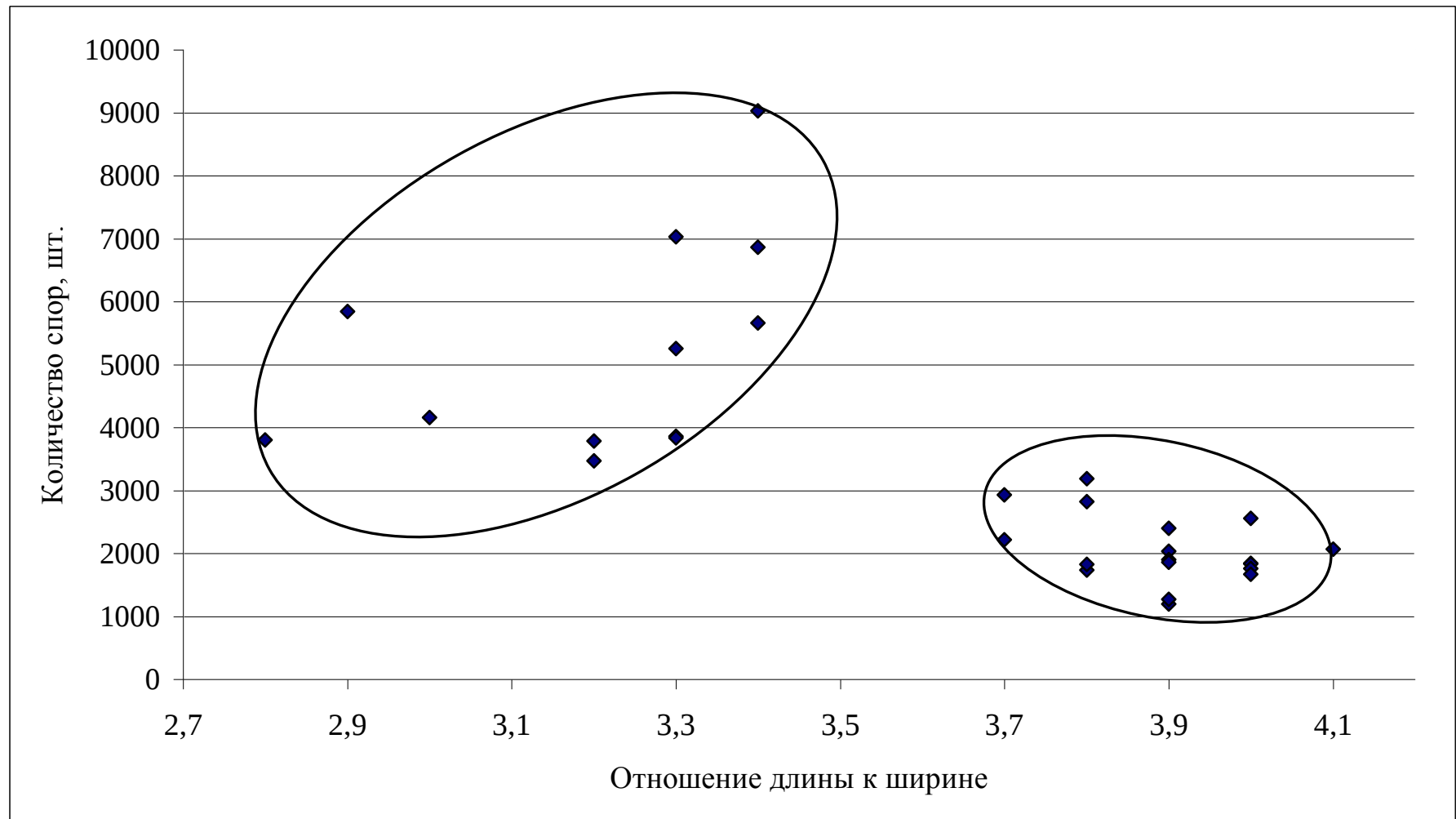


Рис. 3.13. Зависимость между отношением длины конидий к ширине и интенсивностью спорообразования изолятов *B. sorokiniana* на отрезках листьев

Примечание: левая окружность – короткоспоровые изоляты, правая окружность – длинноспоровые изоляты.

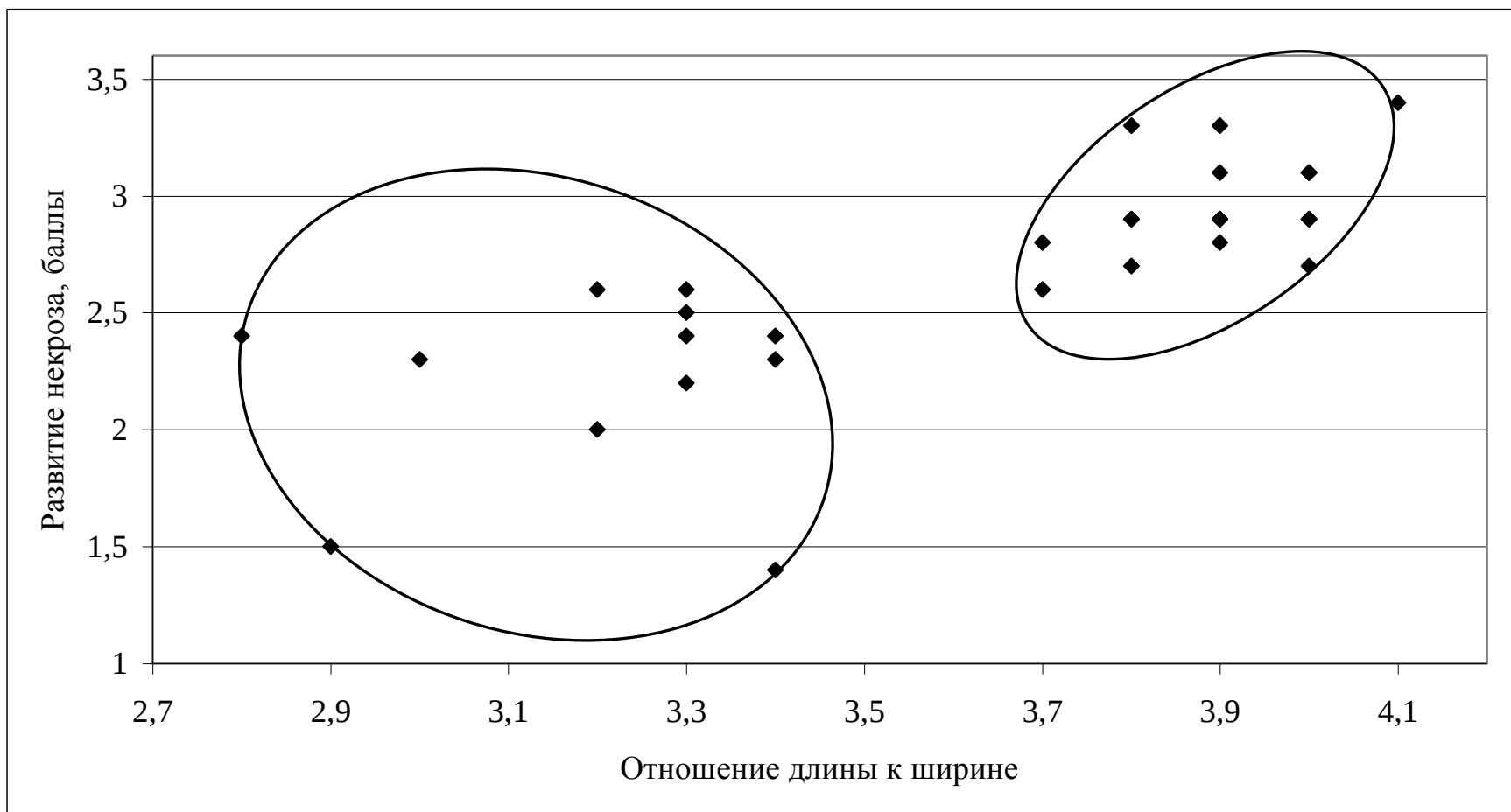


Рис. 3.14. Зависимость между отношением длины конидий к ширине и активностью некрозообразования изолятов *B. sorokiniana* на отрезках листьев

Примечание: левая окружность – короткоспоровые изоляты, правая окружность – длинноспоровые изоляты.

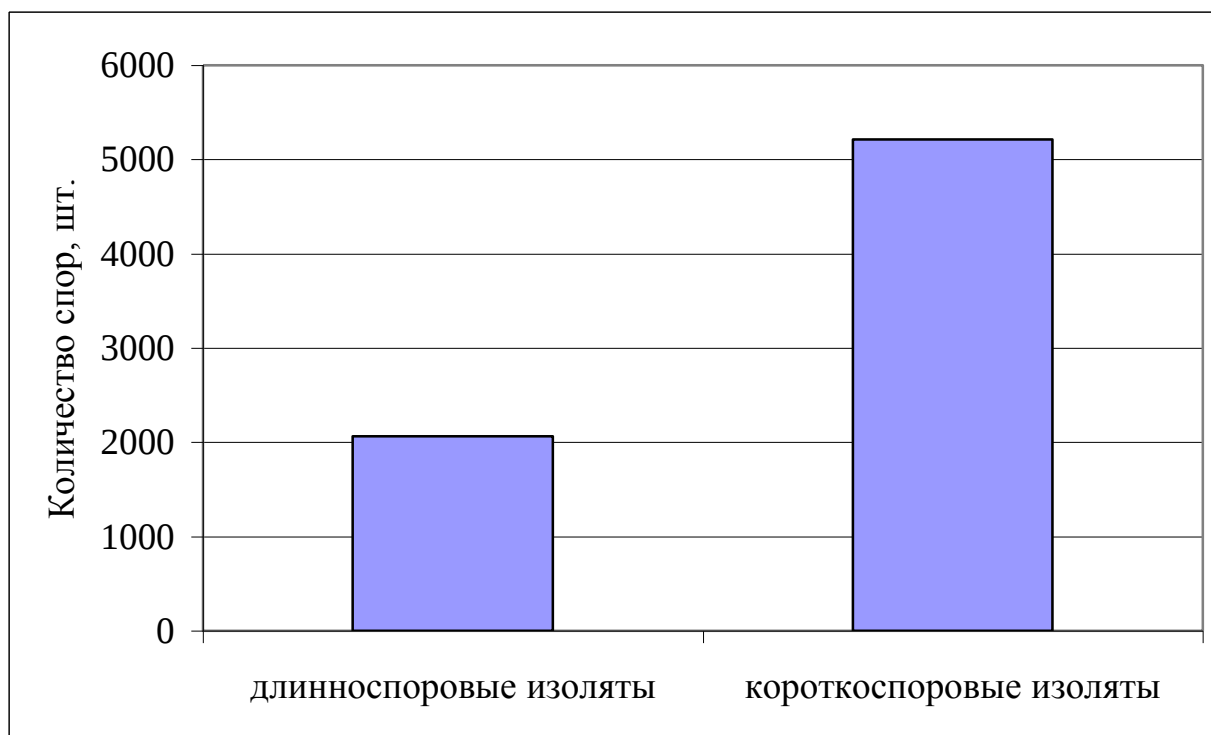


Рис. 3.15. Интенсивность спорообразования длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana*

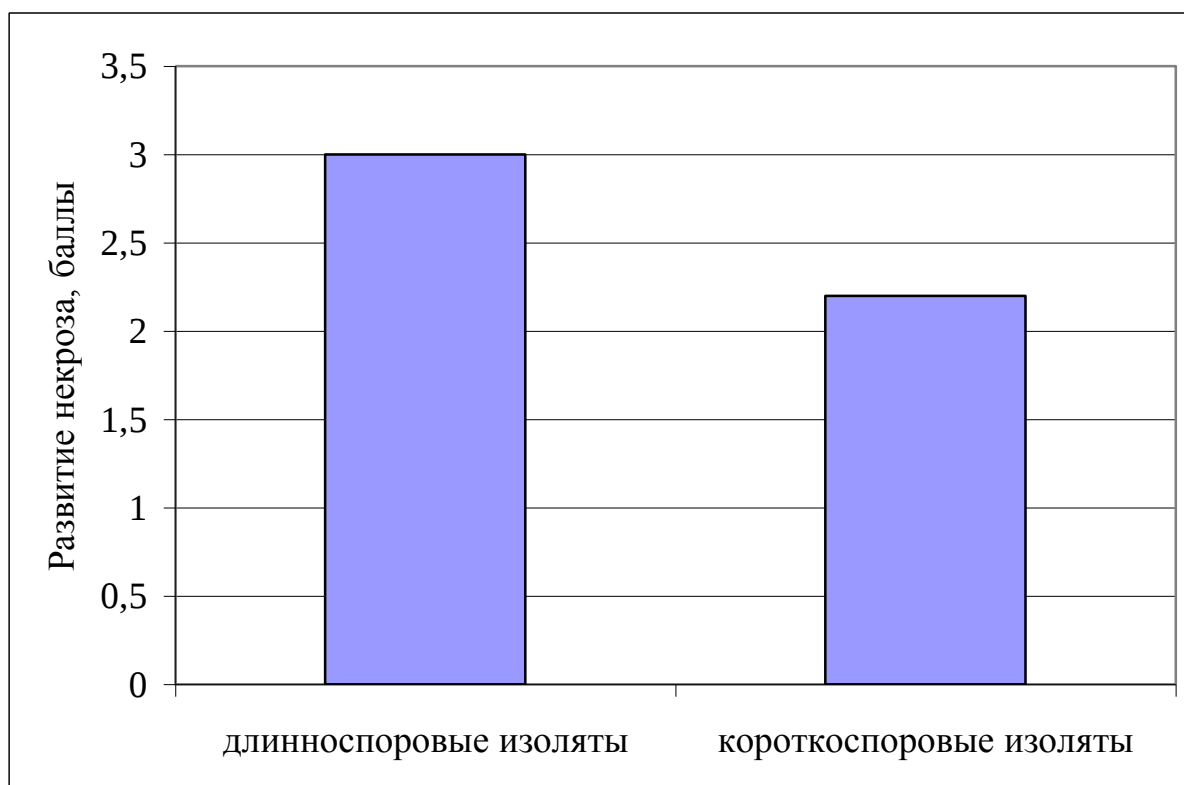


Рис. 3.16. Активность некрозообразования длинно- и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana*

Обобщая данные по всем изученным изолятам *B. sorokiniana*, необходимо отметить, что диапазон варьирования активности спорообразования представлял собой непрерывный континуум, так как максимальное значение, выявленное для некоторых длинноспоровых изолятов, достоверно не отличалось от минимального для некоторых короткоспоровых. Таким образом, следует подчеркнуть, что, несмотря на статистическую очевидность различий между длинно- и короткоспоровыми изолятами по активности спорообразования, данные о количестве спор, сформированных одним отдельно взятым изолятом, не всегда позволяют с уверенностью отнести этот изолят к одной из двух форм.

Значения активности некрозообразования для изучаемых изолятов также составляли непрерывный континуум, поэтому данные о развитии некроза, который был вызван одним отдельно взятым изолятом, также не всегда пригодны для определения принадлежности изолята к одной из двух форм.

Сравнение токсичности культуральных жидкостей различных изолятов *B. sorokiniana* (таблица 3.3) и их способности некротизировать отрезки листьев ячменя при искусственном заражении (таблица 3.4) позволило нам обнаружить достаточно высокую прямую коррелятивную зависимость между этими показателями (коэффициент корреляции 0,65). Опираясь на полученные данные, мы можем сделать вывод о том, что токсическим метаболитам *B. sorokiniana*, наряду с ферментами, принадлежит весомая роль в возникновении симптомов гельминтоспориоза и степени развития заболевания на отрезках листьев.

В связи с выявлением различий между длинно- и короткоспоровыми изолятами *B. sorokiniana* по интенсивности спорообразования на отрезках листьев представляло интерес изучить этот показатель и в чистой культуре на аксенической питательной среде.

Изучение активности спорообразования тех же самым моноспоровых изолятов на среде Чапека в чашках Петри показало, что этот показатель в культуре очень варьирует. При этом изоляты из листьев в среднем образуют несколько большее количество конидий, чем изоляты из корней, что соответствует результатам, полученным ранее В.Н. Пидопличко и Т.Г. Зражевской [110; 111]. В то же время,

в условиях чистой культуры зависимость активности спорообразования от типа изолята оказалась более размытой, чем при инфицировании отрезков листьев.

Важно отметить, что в условиях культивирования колонии различных изолятов *B. sorokiniana* формировали сплошной спектр морфотипов, от огромных быстро растущих колоний с развитым воздушным мицелием и скудным спороношением до небольших, медленно растущих преимущественно субстратных колоний с активным спороношением. Одни изоляты начинали массово спороносить уже на четвертые сутки культивирования, в то время как пик спороношения других наступал значительно позже. Внешний вид наиболее типичной колонии *B. sorokiniana* на аксенической среде Чапека показан на рисунке 3.17.

Отличие сравниваемых изолятов по динамике линейного роста (см. приложение В 10) существенно затрудняло их корректное сравнение по активности спорообразования. Наибольшая разница в активности спорообразования была выявлена нами на 10-е сутки культивирования при пересчете количества конидий на единицу площади колонии. Однако, и в этом случае, степень перекрытия значений активности спорообразования для длинно- и короткоспоровых изолятов была достаточно высока. Таким образом, нами установлено, что активность спорообразования изолятов *B. sorokiniana* на искусственной питательной среде не позволяет дифференцировать их принадлежность к длинно- или короткоспоровой форме.

Подводя итог этому этапу исследований можно сказать, что помимо выявленных нами морфологических и физиолого-биохимических различий, длинно- и короткоспоровая формы *B. sorokiniana* достоверно отличаются по их способности колонизовать растение. Для длинноспоровой формы, которая в природе доминирует на надземных органах растения-хозяина, характерна более высокая активность некрозообразования, и более низкая активность спорообразования в условиях паразитизма на отрезках листьев ячменя. Короткоспоровые изоляты, которые в природе развиваются преимущественно на подземных органах растения-хозяина, напротив, характеризуются более низкой

активностью некрозообразования, и более высокой активностью спорообразования. Выявленное нами различие агрессивности длинно- и короткоспоровых изолятов возбудителя является важным подтверждением наличия глубоких биологических различий между формами *B. sorokiniana* в связи с их приспособленностью к паразитизму на надземных и подземных органах растения.

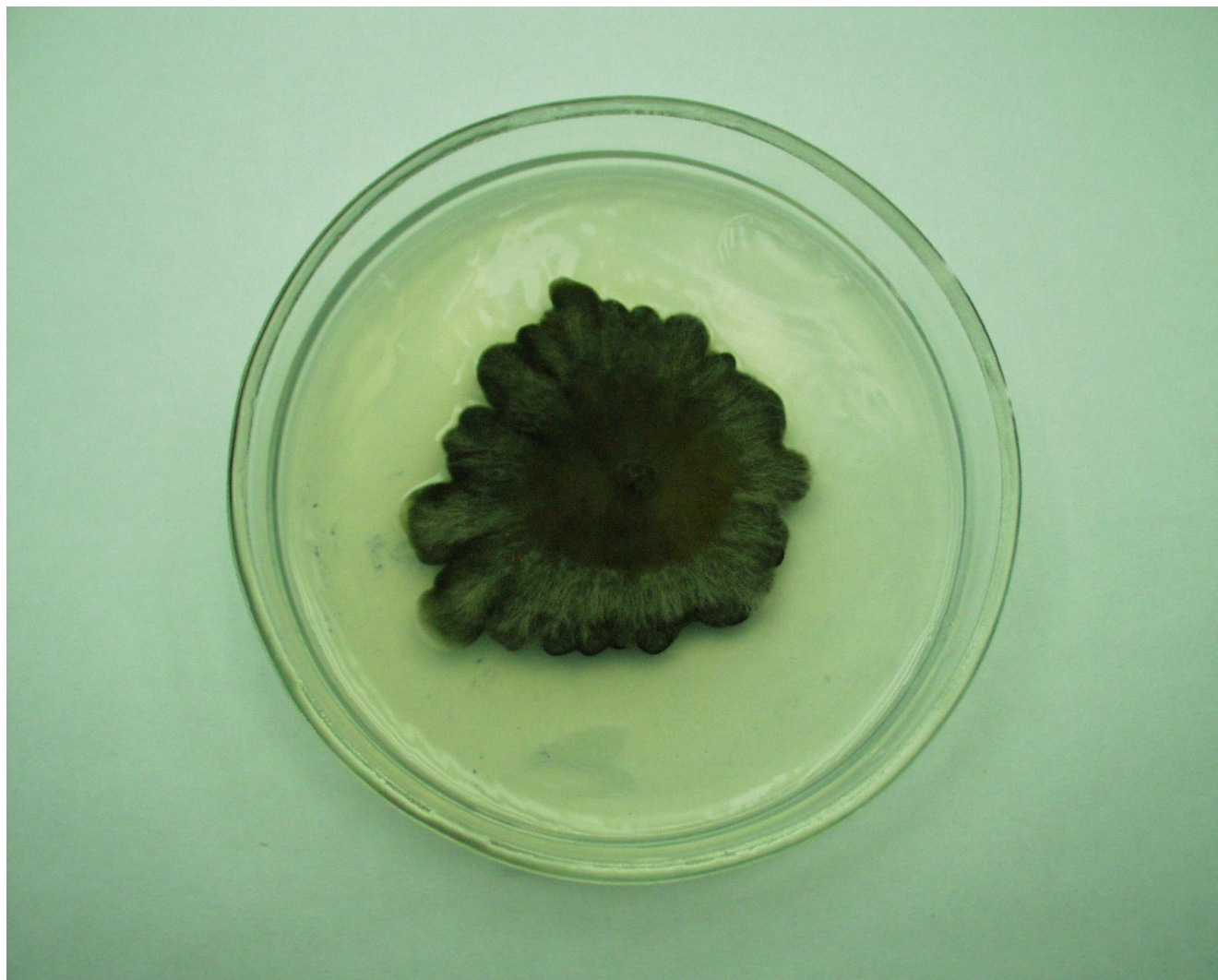


Рис. 3.17. Колония *B. sorokiniana* в чистой культуре на агаризованной среде Чапека в чашке Петри (возраст культуры 7 суток)

Имея отличительные экспериментальные данные об агрессивности, активности литических ферментов и токсигенных свойствах длинноспоровых и короткоспоровых изолятов *Bipolaris sorokiniana*, мы попытались обосновать взаимосвязь между этими показателями и особенностями паразитизма возбудителя на над- и подземных органах растения-хозяина.

Как мы уже отмечали, длинноспоровые изоляты, доминирующие на листьях и семенах, характеризуются более высокой активностью некрозообразования, токсичностью культуральной жидкости, а также активностью целлюлаз и пектиназ. Короткоспоровые изоляты, доминирующие на подземных частях растений, напротив, характеризуются более низкой активностью некрозообразования, токсичностью культуральной жидкости, а также активностью целлюлаз и пектиназ. Опираясь на полученные данные, мы полагаем, что все вышеупомянутые факторы в условиях патогенеза действуют сопряженно. При этом высокая активность литических ферментов одновременно с высокой токсигенной активностью придает длинноспоровым изолятам большую некрозообразовательную способность.

Следует подчеркнуть, что *Bipolaris sorokiniana* входит в число гемибииотрофных паразитов, т.е. таких, которые в условиях патогенеза могут сочетать стратегии биотрофии и некротрофии [323; 324]. При этом, в патогенезе различных форм проявления гельминтоспориоза порядок чередования и степень использования стратегий некро- и биотрофии несколько различается. Вероятно, в этом и следует искать рациональное объяснение выявленных нами различий между длинноспоровыми и короткоспоровыми изолятами возбудителя.

Из литературы известно, что при инфицировании листьев *B. sorokiniana* активно использует токсины и литические ферменты, благодаря которым он разрушает клетки растения-хозяина и вызывает возникновение локального некротического пятна. Через образовавшееся некротическое пятно гифы возбудителя проникают в ткани растения, после чего гриб обычно переходит на биотрофную стратегию развития и в течение всего периода вегетации развивается в тканях растения, не убивая клетки организма-хозяина. Питание возбудителя в

тканях листа обеспечивается межклеточным мицелием. При этом мицелий и спороношение *B. sorokiniana* развивается вокруг места первичного некроза в живых тканях. К моменту отмирания листьев злаков в конце периода вегетации растения-хозяина спороношение возбудителя на листьях практически прекращается.

Таким образом, при паразитизме на листьях *B. sorokiniana* обычно начинается инфицирование растения как некротроф, а завершает как биотроф. Косвенным подтверждением этому служит факт, что при темно-бурой пятнистости листьев некротическое пятно достигает максимальных размеров через 7-10 суток после начала инфицирования и в последующем его развитие останавливается [268; 273; 279; 316; 379]. Схема проникновения и последующего развития мицелия *B. sorokiniana* в тканях листа представлена на рисунке 3.18.

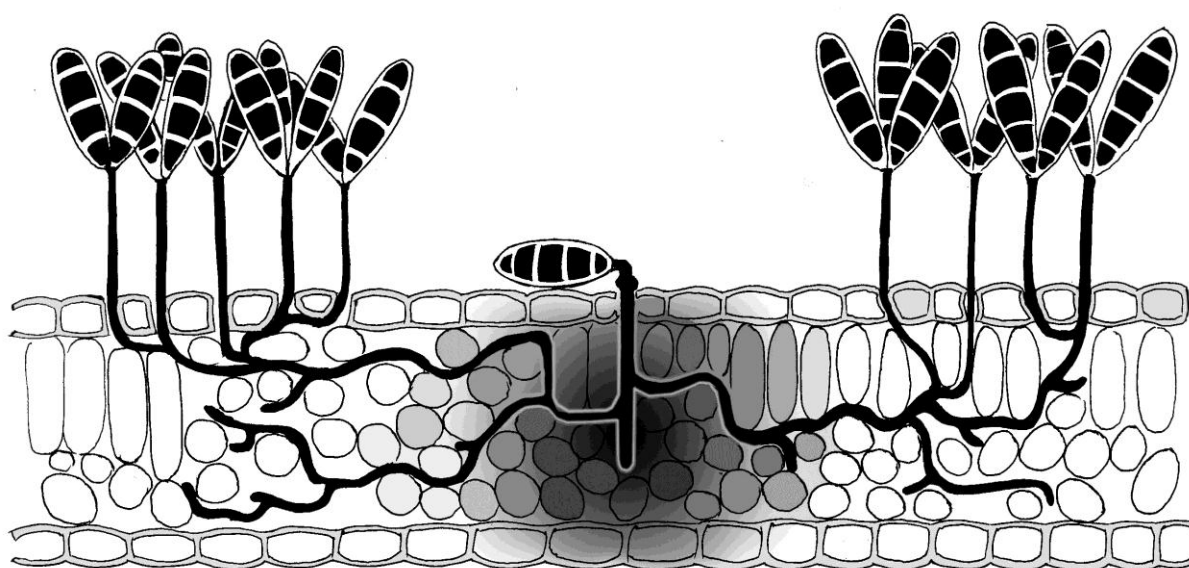


Рисунок 3.18. Схема проникновения и развития мицелия *B. sorokiniana* в тканях листа

Обнаруженная нами способность длинноспоровых изолятов *B. sorokiniana* в большей степени некротизовать листья ячменя при искусственном инфицировании, а также их более высокая токсигенная и ферментативная активность, согласуется с описанной выше способностью этих изолятов интенсивно некротизовать листья ячменя при заражении темно-бурой

пятнистостью. В то же время, остается неясным, благодаря чему в последующем развивается биотрофная фаза заболевания. Можно лишь предположить, что после завершения инфицирования под действием живых клеток мезофилла растения-хозяина в организме патогена происходит существенная перестройка метаболизма, которую не удастся обнаружить при работе с чистыми культурами возбудителя в условиях сапротрофного питания [57; 140; 268]. Подобные изменения метаболизма патогена при переходе от сапротрофного развития к паразитизму характерны для головневых грибов [57; 99].

В условиях паразитизма на подземных и околоземных частях растения *B. sorokiniana* использует иную экологическую стратегию. При развитии семенной инфекции гельминтоспориозной корневой гнили (в условиях окружающей среды, благоприятных для растения-хозяина) возбудитель обычно начинает питаться как биотроф (эндотроф), не нанося существенных повреждений растению и практически не проявляясь визуально [118; 263; 284; 317]. Почвенная инфекция корневой гнили инфицирует преимущественно ослабленные растения после их повреждения другими патогенами или вредителями. Поэтому интенсивное проявление корневой гнили обычно наблюдается достаточно поздно, с началом естественного отмирания растения-хозяина по мере ослабления в нем защитных реакций [82; 118; 176; 263; 266; 284; 317].

Таким образом, развитие гельминтоспориозной корневой гнили обычно начинается как эндотрофное и длительное время имеет скрытый латентный характер. Затем, по мере старения растений, происходит постепенная активизация развития *B. sorokiniana* в тканях растения и гриб начинает питаться как факультативный сапротроф. При этом максимальная степень развития мицелия, а также активность спорообразования гриба наблюдается на растительных остатках уже после полной гибели растения. Именно на растительных остатках формируется основной запас конидий возбудителя, который сохраняется в почве до следующего вегетационного сезона [82; 263; 266; 284; 317]. Таким образом, выявленные нами физиолого-биохимические и паразитические особенности

короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* вполне согласуются с особенностями их развития при возникновении гельминтоспориозной корневой гнили.

Отдельно следует остановиться на высокой интенсивности спорообразования короткоспоровых изолятов по сравнению с длинноспоровыми. Ранее обсуждалось, что конидии *B. sorokiniana* обладают высокой чувствительностью к действию метаболитов почвенных сапротрофов, поэтому в почвах с высокой микробиологической активностью большая часть спор возбудителя быстро погибает [4; 229; 256; 349; 424]. В связи с этим, повышенная интенсивность спорообразования короткоспоровых изолятов, по нашему мнению, позволяет сформировать большой запас конидий и является важнейшим фактором, обеспечивающим выживание этой формы в почве.

При возникновении черного зародыша семян основная часть инфекции распространяется потоками воздуха, а заражение происходит преимущественно через покровы зерна. Покровы семян представлены мертвой тканью, поэтому при их колонизации *B. sorokiniana* начинает свое развитие как сапротроф. В дальнейшем, гриб может ограничиться заселением покровов, а может проникать глубже – в эндосперм и другие части семян [41; 42; 45; 97]. В связи с тем, что при колонизации семян *B. sorokiniana* начинает свое развитие как сапротроф, по нашему мнению и длинноспоровые, и короткоспоровые изоляты могут вызывать гельминтоспориоз семян. При этом длинноспоровые изоляты, количественно преобладающие на листьях и имеющие более высокую активность целлюлаз и пектиназ, имеют селективные преимущества перед короткоспоровыми, чем и определяется их доминирование в семенах.

Чтобы сделать однозначные выводы о роли ферментов и токсинов возбудителя в патогенезе вызываемых им заболеваний необходимо исследовать накопление этих метаболитов в условиях паразитизма. На этом этапе исследований, опираясь на полученные данные, мы можем лишь констатировать, что между длинноспоровыми и короткоспоровыми изолятами *B. sorokiniana* существуют значительные морфологические, физиолого-биохимические и

паразитические различия, которые проявляются при их выращивании в условиях чистой культуры и искусственном инфицировании растений в лабораторных условиях.

Основываясь на частотах обнаружения длинноспоровых и короткоспоровых изолятов *B. sorokiniana* (таблица 3.1), можно предположить, что первичным источником возобновления соответствующих форм в жизненном цикле патогена являются больные семена. Мы считаем, что инфекция семян, вызванная длинноспоровой формой гриба, впоследствии реализуется преимущественно в виде темно-бурой пятнистости листьев, а короткоспоровой – в виде гельминтоспориозной корневой гнили. Источником семенной инфекции *B. sorokiniana*, по нашему мнению, служат конидии гриба, сформировавшиеся как на листьях (преимущественно длинноспоровая форма), так и на основаниях стеблей растений-хозяев (преимущественно короткоспоровая форма) (см. рис. 3.19).

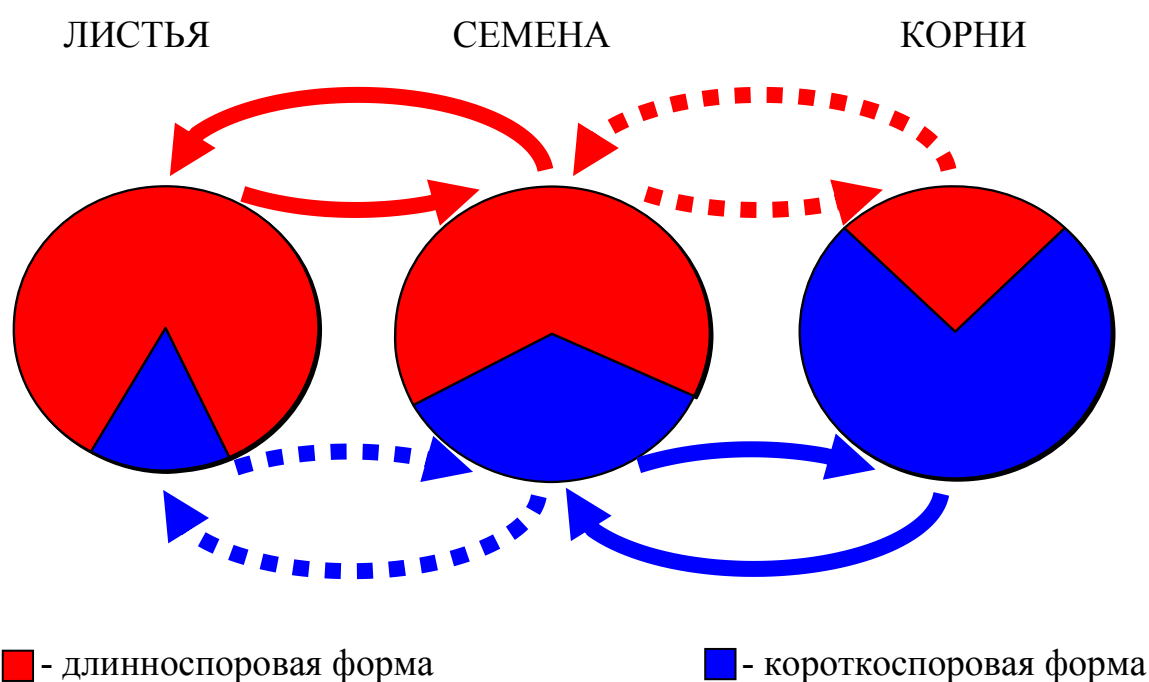


Рис. 3.19. Смена субстратов в жизненном цикле длинно- и короткоспоровой форм *Bipolaris sorokiniana*.

Примечание: сплошная стрелка – основной путь инфицирования, прерывистая стрелка – дополнительный путь инфицирования.

Таблица 3.5

Различие свойств длинно- и короткоспоровой форм *Bipolaris sorokiniana*

Признак	Короткоспоровая форма	Длинноспоровая форма
Отношение длины конидий к ширине (на больных растениях)	2,8 – 3,4	3,7 – 4,1
Отношение длины конидий к ширине (на аксеничной среде Чапека)	1,9 – 2,5	2,6 – 3,4
Средняя активность спорообразования на отрезках листьев, шт.	5216	2061
Средняя активность некрозообразования на отрезках листьев, баллы	2,2	3,0
Средняя токсичность культуральной жидкости, % невсхожих семян	28,1	60,5
Активность экзоцеллюлаз в культуральной жидкости	низкая	высокая
Активность эндоцеллюлаз в культуральной жидкости	низкая	высокая
Активность целлюбиаз в культуральной жидкости	низкая	высокая
Активность пектиназ в культуральной жидкости	низкая	высокая

Подводя итог изучению биологических особенностей различных изолятов *Bipolaris sorokiniana* можно прийти к заключению, что в связи с паразитизмом на различных органах растения-хозяина в пределах исследуемого вида возникли две формы, одна из которых более приспособлена к развитию на надземных органах растения, а вторая – на подземных. Обобщенные данные о свойствах длинно- и короткоспоровой форм *Bipolaris sorokiniana* представлены в таблице 3.5.

Установлено, что представители обеих форм могут быть обнаружены на любой инфицированной части растения, однако, длинноспоровая форма количественно преобладает на надземных органах растения, а короткоспоровая – на подземных. По нашему мнению, длинноспоровая форма *B. sorokiniana* соответствует листовой в понимании Л.В. Молодых и М.В. Рочева, а короткоспоровая – корневой. Первичным источником возобновления обеих форм в жизненном цикле *B. sorokiniana*, вероятно, служат больные семена.

Каждая из форм характеризуется специфическими морфологическими, паразитическими и физиолого-биохимическими признаками, а надежным критерием для их разграничения служит усредненное отношение длины конидий к их ширине. В условиях паразитизма среднее отношение длины конидий к ширине у представителей длинноспоровой формы варьирует в пределах 3,7 – 4,1, а при культивировании на среде Чапека – 2,6 – 3,4. Для короткоспоровой формы этот показатель варьирует в пределах 2,8 – 3,4 и 1,9 – 2,5, соответственно.

Нами установлено (см. рис. 3.3 и 3.4), что длинно- и короткоспоровость изолятов не является проявлением модификационной изменчивости, однако характер наследования этих признаков требует дополнительных специальных исследований.

По нашему мнению, биологические свойства изолята *B. sorokiniana* определяются не органом растения, из которого он был выделен, а его принадлежностью к одной из форм. При этом длинноспоровая форма, по сравнению с короткоспоровой, характеризуется большей интенсивностью спорообразования на отрезках листьев ячменя, но меньшей некрозообразующей способностью. Длинноспоровая форма характеризуется более высокой

активностью целлюлаз и пектиназ. Токсичность культуральной жидкости для представителей длинноспоровой формы существенно выше, чем короткоспоровой. При этом хлороформный экстракт высококипящих экзометаболитов *Bipolaris sorokiniana* насчитывает, по крайней мере, 56 соединений.

ГЛАВА 4.

РАЗВИТИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОБЫКНОВЕННОЙ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННАЯ ДИАГНОСТИКА НА РАСТЕНИЯХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

4.1. Возбудители обыкновенной корневой гнили ячменя

На подземных и околоземных частях растений ярового ячменя может развиваться целый ряд видов фитопатогенных и сапротрофных микроорганизмов. Поражение корней и оснований стеблей в прикорневой зоне традиционно называют корневой гнилью [19; 66; 107]. Основной причиной возникновения корневой гнили ячменя в Украине являются гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoemaker (= *Helminthosporium sativum* Pammel, C.J.King et Bakke), а также грибы рода *Fusarium*: *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. gibbosum* Appel & Wollenw., *F. moniliforme* J.Sheld. (= *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg), *F. oxysporum* Schlecht. и *F. sambucinum* Fuckel [108; 174; 176]. Значительно реже на под- и околоземных частях растений ячменя развиваются виды *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton (= *Oculimacula yallundae* (Wallwork & Spooner) Crous & W. Gams), *Pythium graminicola* Subraman., *Leptosphaeria hordea* Domashova и *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx et D.L.Olivier [108; 177].

Как правило, *B. sorokiniana* и фузарии встречаются совместно в тканях одного и того же больного растения, из-за чего очень трудно определить индивидуальные границы гельминтоспориозной и фузариозной корневой гнилей. Вероятно поэтому для наименования комплекса гельминтоспориозно-фузариозной корневой гнили определено обобщающее название – «обыкновенная корневая гниль» [19; 116; 171; 420; 469].

Обширные исследования, посвящённые совместному паразитизму *B. sorokiniana* и грибов рода *Fusarium* в тканях растений проводились во второй половине XX в. Было установлено, что в тканях одного и того же растения-хозяина эти грибы изначально развиваются в различных экологических нишах

[19; 127; 171]. В частности, было обнаружено, что *B. sorokiniana* обычно развивается на подземной и околоземной части стебля злаков и достаточно редко – непосредственно на корнях. Для грибов рода *Fusarium* отмечена обратная тенденция [67; 172; 317].

Эту закономерность некоторые авторы объясняют более высокой конкурентоспособностью грибов рода *Fusarium* к почвенным сапротрофным микроорганизмам по сравнению с *B. sorokiniana* [24; 300; 301; 441]. В свою очередь, в отличие от *Fusarium*, мицелий и споры *B. sorokiniana* содержат защитный пигмент меланин, с помощью которого гриб может развиваться на околоземной части стебля даже в южных районах с интенсивным солнечным излучением [90; 441].

Наряду с этим отмечено, что в случае инфицирования одних и тех же вегетативных органов *B. sorokiniana* и видами рода *Fusarium* эти грибы редко развиваются вместе и обычно заражают ткани органов, расположенные рядом или на некотором расстоянии друг от друга. При заражении ячменя смешанной культурой *B. sorokiniana* и видов рода *Fusarium* обыкновенная корневая гниль проявляется достаточно слабо. Если же заражать растения сначала одним патогеном, а по прошествии 2-3 недель другим, то первый реализуется чаще, что свидетельствует о важной роли первичного инфицирования субстрата. Также отмечено, что при множественной инфекции обыкновенной корневой гнили злаков первичным патогеном обычно является *B. sorokiniana* [143; 223; 290; 441].

В лабораторных опытах при благоприятных гидротермических условиях и отсутствии конкуренции *B. sorokiniana* не проявляет органотропной специализации и в одинаковой степени инфицирует все части растения-хозяина. В природных же условиях под совокупным воздействием различных экологических факторов формируются достаточно обособленные экологические ниши, в пределах которых может развиваться этот фитопатоген [171; 338; 469; 470].

В сельскохозяйственной практике не принято разделять гельминтоспориозную и фузариозную корневые гнили. Это вполне оправдано, так как в условиях производственного выращивания зерновых культур важно внедрять растения,

комплексно устойчивые к обоим заболеваниям. В итоге, сорта, которые на протяжении нескольких лет испытаний проявляют себя как устойчивые к обыкновенной корневой гнили, имеют высокую устойчивость и к гельминтоспориозу, и к фузариозу и могут быть рекомендованы для выращивания в производственных условиях [300; 338].

Однако для решения ряда научных вопросов, к примеру, изучения специфических особенностей и закономерностей наследования устойчивости к каждому из заболеваний по-отдельности, необходимо уметь разделять гельминтоспориозный и фузариозный компоненты корневой гнили и дифференцированно определять степени развития каждого из возбудителей. К сожалению, до сих пор не разработаны методы, позволяющие количественно выявить гельминтоспориозный компонент на фоне маскирующего действия фузариозного и дающие возможность дифференцированно определить роль *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium spp.* в общем развитии корневой гнили.

Для изучения видового состава грибов, развивающихся на под- и околоземных частях растений ячменя в Харьковской области нами были исследованы 38 сортов и гибридов ярового ячменя, различающиеся по устойчивости к обыкновенной корневой гнили. Отбор пораженных частей растений для проведения последующих лабораторных исследований проводился в фазу полной спелости зерна. По данным литературы именно на этом этапе развития растений симптомы корневой гнили проявляются в максимальной степени, причем успевает реализоваться как семенная, так и почвенная инфекция [82; 118; 176; 266].

Для выделения и идентификации видовой принадлежности грибов мы использовали общепринятый микробиологический метод исследования [86]. Согласно методике, отрезки корней, узлов кущения, а также под- и околоземных частей стеблей длиной 1 мм, предварительно промытые в проточной воде, а затем дистиллированной воде, мы помещали на агаризованную среду Чапека. По прошествии 5 суток инкубирования в термостате при температуре 25⁰С фрагменты растений массово покрывались мицелиальным налетом с конидиями грибов. Внешний вид колоний грибов, которые развились на отрезках растений на

питательной среде, представлен на рисунках 4.1 и 4.2.

Культуры гриба *B. sorokiniana* на фрагментах растений и на питательной среде вокруг них представляли собой уплотненные, субстратные, меланизированные колонии с типичным для данного вида спороношением. Благодаря этим признакам возбудитель легко идентифицировался даже при просмотре культур с помощью бинокулярной лупы. Пораженность исследованных сортов и гибридов ячменя грибом *B. sorokiniana* составляла в среднем 26,1% и достигала 47,6% для сорта Allier 63.

Представители рода *Fusarium* формировали разнообразные, рыхлые светлоокрашенные колонии с развитым воздушным мицелием. Для точного установления видовой принадлежности фузариев обязательным условием является детальное микроскопическое исследование их чистых культур в стандартных условиях на стандартной питательной среде. В связи с этим, идентификация фузариев проводилась нами после отсева колоний гриба на голодный картофельно-глюкозный агар в соответствии с определителями К. Буса (C. Booth), В.И. Билай, а также В. Герлаха и Г. Ниренберга (W. Gerlach, H. Nirenberg) [24; 218; 288].

Колонии *Fusarium graminearum* на голодном картофельно-глюкозном агаре формировали белый, серо-розовый или бледно-красный воздушный мицелий и бурый реверзум. Этот вид никогда не образует микроконидии, однако даже молодые культуры этого гриба на стандартной питательной среде массово формируют 4-8 клеточные макроконидии. В нашем опыте *F. graminearum* был обнаружен на всех без исключения сортах и гибридах ячменя. При этом пораженность растений этим возбудителем составляла в среднем 71,7% и достигала 91,4% для сорта Оренбургский 16.

Вид *Fusarium culmorum* обнаруживался по желто-коричневому хлопьевидному воздушному мицелию и характерному изменению окраски реверзума колоний в процессе выращивания от медово-бурой до насыщенно красно-бурой. Этот вид также не формирует микроконидий и на протяжении 10-15 суток культивирования на голодном картофельно-глюкозном агаре (до начала

образования макроконидий) его мицелий остается стерильным. В ходе обследования *F. culmorum* был обнаружен нами на 24 из 38 исследованных сортов и гибридов ячменя. При этом пораженность растений этим возбудителем была незначительной и не превышала 4,6% (сорт Каштан).

Колонии *Fusarium moniliforme* (= *F. verticilliodes*) представляли собой бесцветный или светло-розовый быстрорастущий воздушный мицелий с фиолетовым реверзумом и своеобразным конидиальным спороношением. Для этого вида характерно образование одно- или двуклеточных веретеновидных микроконидий, размещенных в цепочках, полное отсутствие хламидоспор, а также малая ширина микро- и макроконидий – 1,5-2,5 μm в первом случае и 2,5-4 μm во втором. Вид *F. moniliforme* был обнаружен нами лишь на некоторых сортах ярового ячменя (Спомин, Одесский 100), при этом пораженность под- и околоземных частей растений этим возбудителем не превышала 2%.

Вид *Fusarium oxysporum* имел рыхлый белый или персиковый воздушный мицелий, иногда со слабым пурпурным оттенком и реверзум цвета воздушных гиф. На голодном картофельно-глюкозном агаре этот вид массово формирует одноклеточные микроконидии и 4-8 клеточные макроконидии. Важная черта этого вида – обильные терминальные и интеркалярные хламидоспоры в гифах и спорах, нередко объединенные в цепочки или массы неправильной формы. Вид *F. oxysporum* также был обнаружен нами лишь на нескольких сортах ярового ячменя (Allier 63, Bayer C15599), а пораженность растений этим возбудителем не превышала 2%.

Таким образом, в результате детальных лабораторных исследований корней и оснований стеблей 38 сортов и гибридов ярового ячменя, отобранных в фазу полной спелости, нами были обнаружены пять видов фитопатогенных грибов, которые относятся к возбудителям корневой гнили: *B. sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme* (= *F. verticilliodes*) и *F. oxysporum*. При этом *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum* были массово обнаружены нами на всех без исключения сортах и гибридах ярового ячменя. Виды *F. culmorum*, *F. moniliforme* и *F. oxysporum* были обнаружены лишь на части

сортов и гибридов ярового ячменя и инфицировали растения в незначительной степени.

В среднем по сортам и гибридам в фазу полной спелости пораженность растений грибом *Bipolaris sorokiniana* составляла 26,1%, *F. graminearum* – 74,1%, *F. culmorum* – 2,3%, *F. oxysporum* – 0,7%, а *F. moniliforme* всего 0,3%. Другие возбудители корневой гнили: *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Pythium graminicola* и *Leptosphaeria hordea* в ходе исследования обнаружены не были. Наглядно усредненные данные о пораженности представлены на рисунке 4.3.

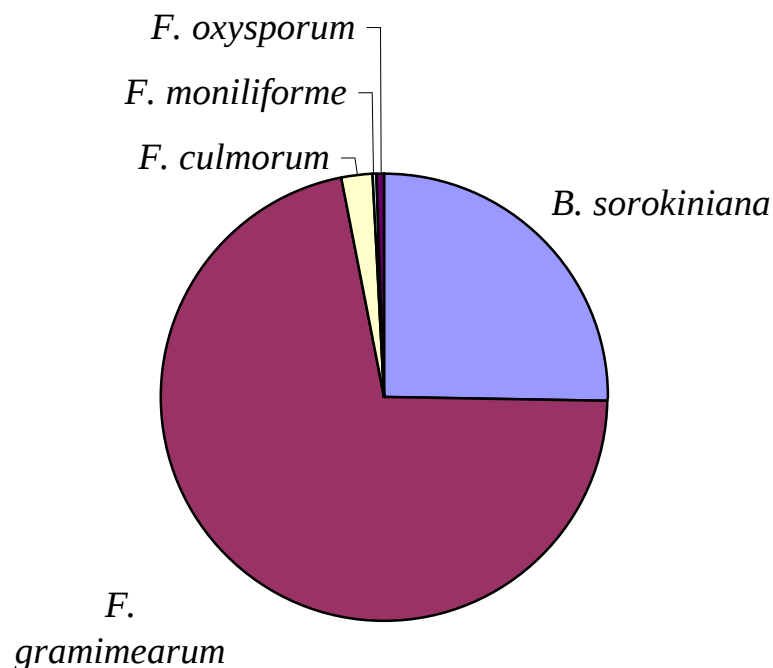


Рис. 4.3. Роль *Bipolaris sorokiniana* и видов рода *Fusarium* в поражении подземных и околоземных частей растений ярового ячменя в фазу полной спелости

Как видно из рисунка 4.3, главная роль в возникновении корневой гнили исследованных сортов и гибридов ячменя в Харьковской области принадлежит двум фитопатогенным грибам: *B. sorokiniana* и *F. graminearum*. Подробные данные о пораженности всех исследованных сортов и гибридов этими возбудителями представлены в таблице 4.2. Сравнительный анализ пораженности корней, узлов кущения и оснований стеблей грибами *B. sorokiniana* и *F. graminearum* будет проведен в разделе 4.2.

Важно отметить, что наряду с фитопатогенными грибами – *B. sorokiniana* и видами рода *Fusarium* нами единично были обнаружены сопутствующие сапротрофные плесневые грибы, представители родов *Mucor* Fresen., *Rhizopus* Ehrenb., *Aspergillus* Link и *Cladosporium* Link. В частности, нами были обнаружены виды: *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus fumigatus* Fresen., *Aspergillus niger* Tiegh., *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Mucor elegans* Eidam. и *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. На уровне рода эти грибы легко узнавались даже при просмотре колоний в бинокулярную лупу. В связи с тем, что частота обнаружения плесневых сапротрофных грибов была незначительной, мы считаем, что их присутствие не могло существенно повлиять на данные о пораженности растений возбудителями корневой гнили.

В то же время, следует отметить, что при выращивании грибов из пораженных корневой гнилью фрагментов растений на одном и том же фрагменте часто формировались смешанные колонии *B. sorokiniana* и видов рода *Fusarium*. При этом, на относительно небольших в диаметре отрезках корней, как правило, и колонии *B. sorokiniana*, и колонии фузариев были хорошо заметны (см. рис. 4.1). В случае совместного развития вышеупомянутых грибов на поверхности крупномерных фрагментов растений – стеблей и узлов кущения – обычно формировался преимущественно рыхлый светлоокрашенный мицелий видов рода *Fusarium*, на фоне развития которого мицелий *B. sorokiniana* оказывался незаметным (см. рис. 4.2). Визуальное обнаружение на этом же участке растения гриба *B. sorokiniana* было возможным лишь при изучении реверзума колоний в чашках Петри, где меланизированный мицелий этого вида хорошо заметен. Таким образом, нами установлено, что исследование исключительно внешнего вида колоний при использовании микробиологического метода определения пораженности растений часто не позволяет обнаружить *B. sorokiniana* и дает не точные данные о численности этого вида на под- и околосемных частях растений.

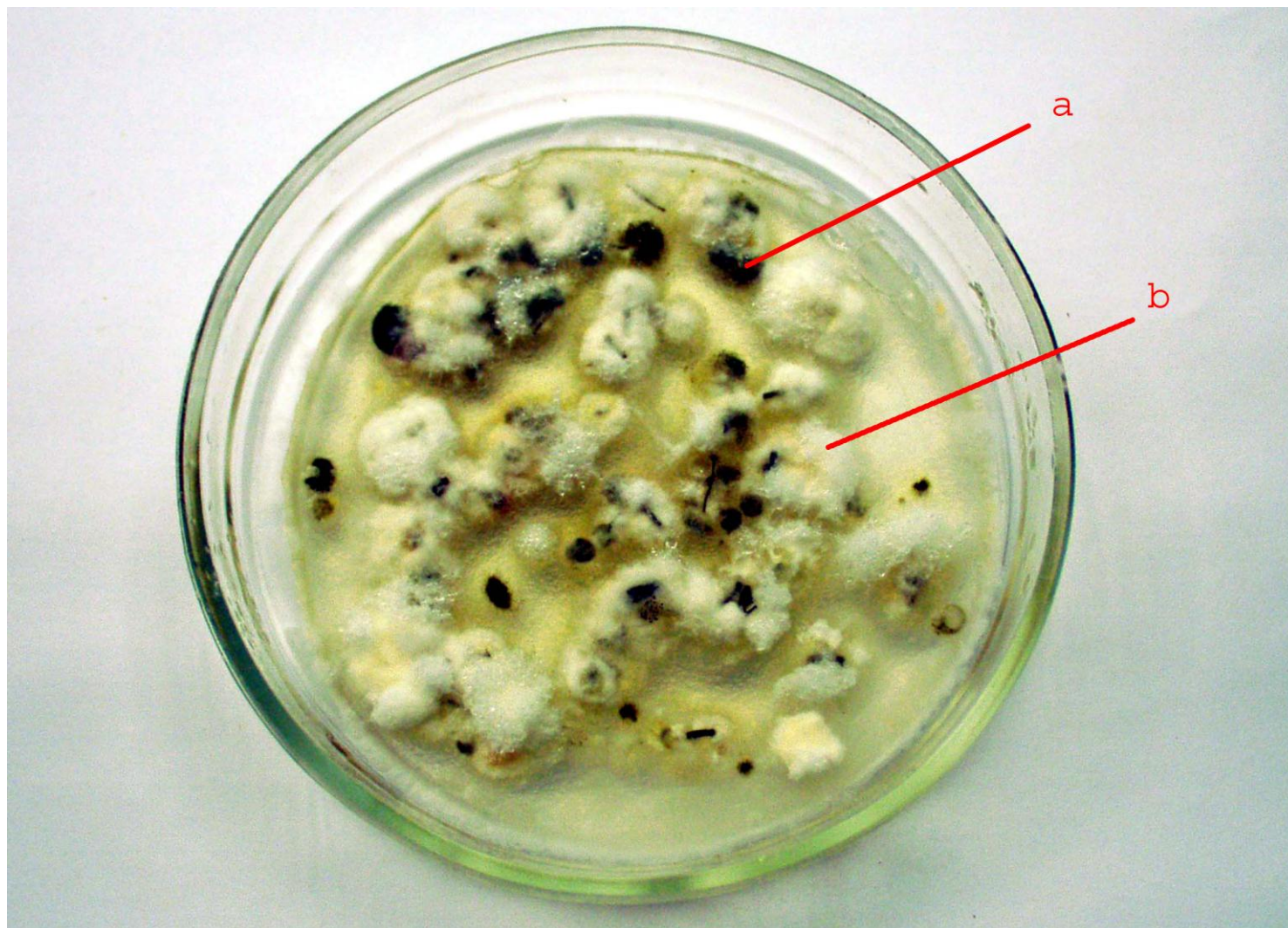


Рис. 4.1. Развитие колоний грибов на отрезках корней ярового ячменя (сорт Chariot, возраст культуры 5 суток)

Примечание: а – *Bipolaris sorokiniana*, б – *Fusarium graminearum*

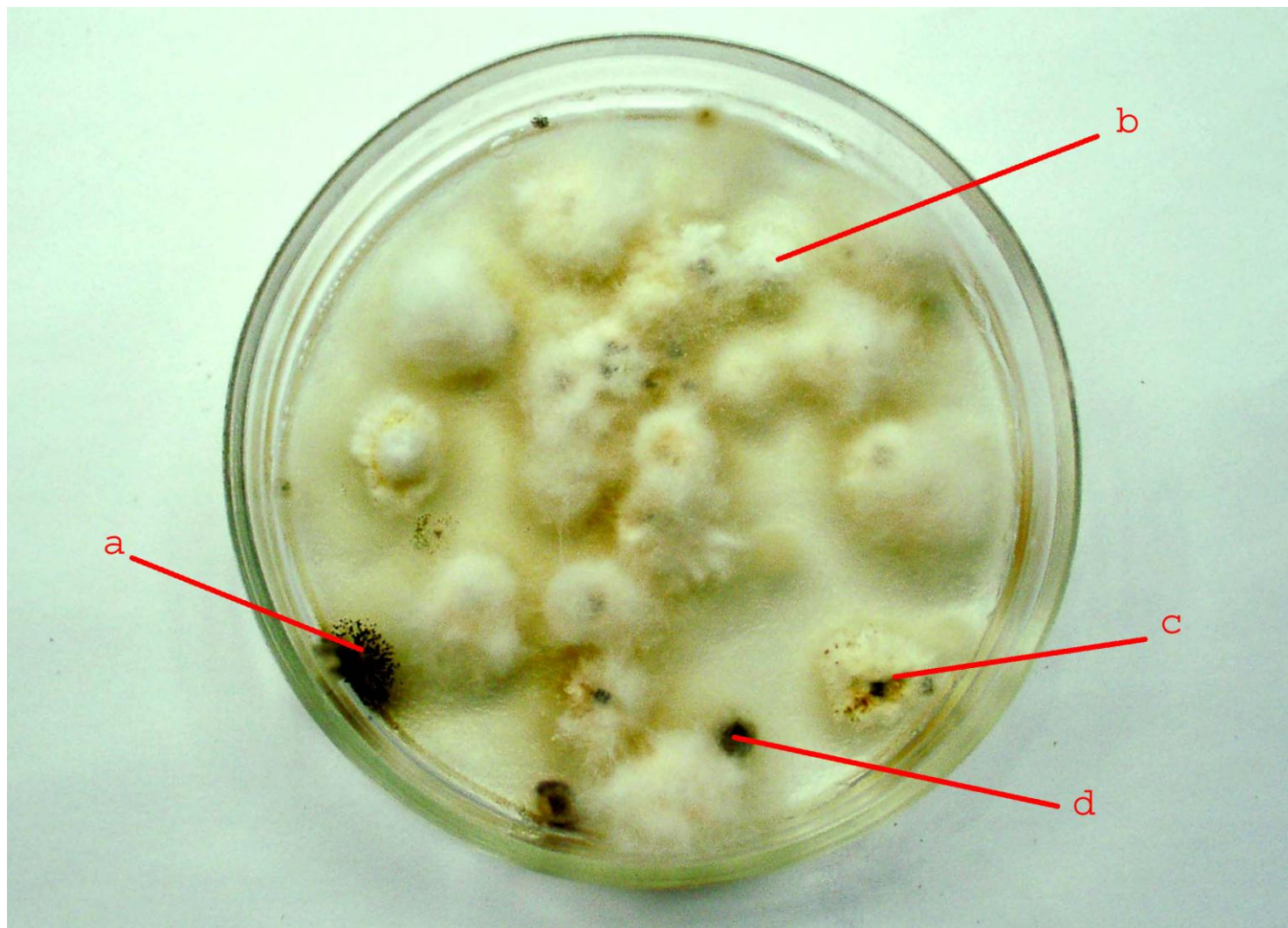


Рис. 4.2. Развитие колоний грибов на отрезках подземных и околоземных частей стеблей ярового ячменя (сложный гибрид 6613, возраст культуры 5 суток)

Примечание: а – *Aspergillus niger*, b – *Fusarium graminearum* c – *Bipolaris sorokiniana*, d – *Cladosporium herbarum*

4.2. Особенности паразитизма *B. sorokiniana* и *F. graminearum* на подземных и околоземных частях растений ярового ячменя

Изучение видового состава и численности грибов на подземных и околоземных частях растений ярового ячменя позволило выявить два доминирующих возбудителя: *Fusarium graminearum* и *Bipolaris sorokiniana*. Для установления особенностей колонизации растений этими видами, а также последующего проведения дифференцированной диагностики степеней развития фузариоза и гельминтоспориоза, важное значение имело исследование динамики развития возбудителей в период вегетации растений. Для этого пробы больных растений отбирали дважды: в фазы восковой и полной спелости зерна. Дифференцированно определялась пораженность корней, узлов кущения и оснований стеблей. Данные о пораженности исследованных нами 38 сортов и гибридов ярового ячменя грибами *B. sorokiniana* и *F. graminearum* на стадии восковой спелости зерна обобщены в таблице 4.1, а усредненные их значения наглядно представлены на рис. 4.4.

Как видно из таблицы 4.1 и рисунка 4.4, в фазу восковой спелости на стеблях достоверно преобладал *B. sorokiniana*, а на корнях и узлах кущения – *F. graminearum* (уровень значимости выявленных различий $P < 0,01$). На этом этапе развития растений пораженность стеблей грибом *B. sorokiniana* в среднем составляла 26,1%, узлов кущения – 6,4%, а корней всего 3,1 %. Для исследованных сортов и гибридов ячменя пораженность грибом *B. sorokiniana* варьировала в пределах 18,0-34,4%, 3,8-10,2% и 1,4-4,6%, соответственно.

В то же время, в фазу восковой спелости пораженность стеблей грибом *F. graminearum* в среднем составляла 10,9%, узлов кущения – 18,9%, а корней – 50,5%. Для исследованных сортов и гибридов ячменя пораженность грибом *F. graminearum* варьировала в пределах 7,6-12,8%, 12,5-27,8% и 37,3-60,9%, соответственно. Корреляционной зависимости между пораженностью различных частей растений одним и тем же видом возбудителя выявлено не было.

Таблица 4.1

Пораженность различных частей растений ярового ячменя грибами
Bipolaris sorokiniana и *Fusarium graminearum* (фаза восковой спелости)

№ пп	Сорт / гибрид	Пораженность, в %					
		Стебель		Узел кущения		Корень	
		<i>F.grami- nearum</i>	<i>B. soroki- niana</i>	<i>F.grami- nearum</i>	<i>B. soroki- niana</i>	<i>F.grami- nearum</i>	<i>B.soroki- niana</i>
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1.	Forester	11,1	26,1	19,9	5,0	54,4	3,2
2.	Bayer C15599	10,4	25,4	18,3	7,0	44,2	3,6
3.	Гранал	12,3	19,3	20,3	4,1	53,1	2,4
4.	CI 13664	11,2	24,6	21,1	3,8	43,6	2,1
5.	Одесский 131	12,7	18,0	20,9	3,9	41,5	2,3
6.	Одесский 100	10,9	24,9	20,6	5,3	50,9	3,1
7.	Донецкий 124	8,2	31,2	18,7	8,1	52,2	3,8
8.	Омский 88	10,3	27,2	18,1	5,2	48,9	2,8
9.	Сл. гибрид 6729	12,8	18,8	20,5	4,7	42,4	3,2
10.	Kraaj 71-509	10,5	26,7	19,7	6,4	36,8	4,1
11.	Темп	9,6	31,1	16,9	6,5	37,3	2,5
12.	Allier 63	7,6	34,4	12,5	10,2	41,8	4,2
13.	Незалежный	10,4	26,9	19,2	7,0	39,2	3,6
14.	Tregal (CI 6359)	10,4	31,3	16,6	8,1	44,1	3,5
15.	SV 89300	10,7	23,6	22,0	5,6	41,6	1,7
16.	Kraaj 66-3910	11,4	24,6	18,4	6,6	52,5	3,5
17.	Сл. гибрид 6631	10,7	27,5	17,3	7,8	48,6	4,3
18.	Донецкий 9	10,4	29,5	18,4	6,6	57,5	2,3
19.	Оренбургский 16	10,7	27,6	17,4	7,7	60,9	1,4
20.	Heines Naha	10,7	27,7	20,1	4,9	59,5	1,8
21.	Местный (Ставрополь)	10,5	27,6	20,0	5,0	52,7	4,1
22.	Chariot	11,2	25,2	20,3	4,7	59,9	1,7
23.	Одесский 115	12,2	20,7	19,1	6,3	51,9	3,7

Таблица 4.1 (продолжение)

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
24.	Каштан	10,3	30,6	16,5	8,6	53,2	3,3
25.	Сл. гибрид 6902	11,6	23,5	17,1	8,0	52,2	3,6
26.	Звершеня	10,2	29,8	18,9	6,1	52,0	3,6
27.	Спомин	9,9	31,2	19,9	5,1	55,5	2,8
28.	Сл. гибрид 6722	10,9	26,8	27,8	7,2	54,6	3,1
29.	Line TR-226	10,8	27,5	16,0	8,8	48,0	4,6
30.	Inis	11,6	23,3	21,4	3,8	53,9	3,2
31.	Сл. гибрид 6613	12,4	19,5	19,2	5,9	54,3	3,1
32.	Panda	11,0	26,4	17,4	7,7	60,2	1,6
33.	Hector	11,5	23,8	17,6	7,4	53,3	3,3
34.	Excel	11,0	26,2	17,4	7,6	53,5	3,3
35.	Hadmertslebener	11,8	22,7	17,7	7,3	55,9	2,7
36.	Prisma AFP ² /802	10,5	28,7	17,9	7,1	48,8	4,4
37.	Донецкий 12	12,0	21,8	19,5	5,6	55,3	2,8
38.	Паллидум 107	10,4	30,2	19,1	5,9	52,3	3,6
В среднем по сортам и гибридам		10,9	26,1	18,9	6,4	50,5	3,1
НСР _{0,05}		2,1	4,3	4,1	2,4	5,2	2,3

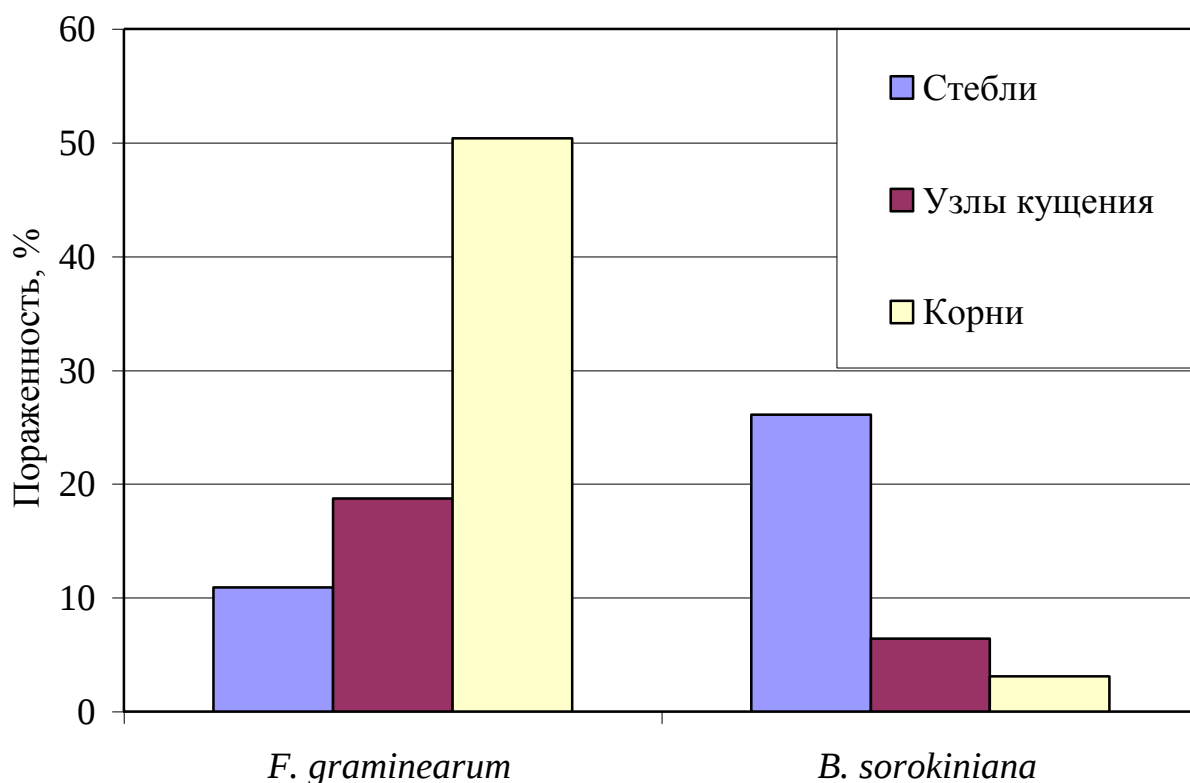


Рис. 4.4. Усредненная пораженность различных частей растений ярового ячменя грибами *B. sorokiniana* и *F. graminearum* (фаза восковой спелости)

Дисперсионный анализ ($P < 0,05$) показал, что наибольшее количество достоверных различий между пораженностью исследованных сортов и гибридов грибом *B. sorokiniana* наблюдается на стеблях, где развитие этого фитопатогена максимально. Для *F. graminearum* наибольшее количество достоверных различий между исследованными сортами наблюдается на корнях. В то же время, для подавляющего большинства сортов и гибридов значения пораженности находятся в близкой области и достоверно не отличаются. Значения НСР_{0,05} для всех вариантов опыта приведены в таблице 4.1.

Аналогичное исследование пораженности корней, узлов кущения и оснований стеблей тех же сортов и гибридов ячменя грибами *B. sorokiniana* и *F. graminearum* было проведено в фазу полной спелости зерна. Полученные результаты для исследованных нами 38 сортов и гибридов ярового ячменя обобщены в таблице 4.2. Усредненные значения пораженности для каждого вида возбудителя

наглядно представлены на рис. 4.5.

Как видно из таблицы 4.2 и рисунка 4.5, в период созревания растений происходит значительное изменение пораженности, а также количественное перераспределение возбудителей в инфицированных органах. Отмечено, что в фазу полной спелости зерна на всех под- и околоземных частях растений достоверно преобладал *F. graminearum* (уровень значимости выявленных различий $P < 0,01$).

В фазу полной спелости *B. sorokiniana* был обнаружен в среднем на 34,2% стеблей, 25,3% узлов кущения и 18,7% корней. Для исследованных сортов и гибридов ячменя пораженность стеблей, узлов кущения и корней грибом *B. sorokiniana* варьировала в пределах 24,4-47,6%, 15,3-35,1% и 8,7-28,0%, соответственно.

F. graminearum на этом этапе развития растений был выявлен в среднем на 65,9% отрезков стеблей, 74,7% – узлов кущения и на 81,7% корней. При этом пораженность этим видом возбудителя для различных сортов и гибридов варьировала в пределах 52,4-76,6%, 57,2-85,7% и 72,0-91,4%, соответственно. Корреляционной зависимости между пораженностью различных частей растений одним и тем же видом фитопатогенного гриба в фазу полной спелости также выявлено не было.

Значения пораженности подземных и околоземных частей растений грибами *B. sorokiniana* и *F. graminearum* в фазу полной спелости и в фазу восковой спелости существенно различаются. По сравнению предыдущими данными (рис. 4.4), в фазу полной спелости увеличились как абсолютные величины пораженности, так и диапазон варьирования этого показателя для изученных сортов и гибридов (табл. 4.2). Исключение составляет пораженность отрезков корней грибом *F. graminearum*, диапазон варьирования которой для исследованных сортов и гибридов несколько сократился. В связи с этим, в фазу полной спелости зерна дисперсионный анализ ($P < 0,05$) позволил выявить большее число достоверных различий между исследованными сортами и гибридами. Значения НСР_{0,05} для всех вариантов опыта приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2

Пораженность различных частей растений ярового ячменя грибами
Bipolaris sorokiniana и *Fusarium graminearum* (фаза полной спелости)

№ пп	Сорт / гибрид	Пораженность, в %					
		Стебель		Узел кущения		Корень	
		<i>F. grami- nearum</i>	<i>B. soroki- niana</i>	<i>F. grami- nearum</i>	<i>B. soroki- niana</i>	<i>F. grami- nearum</i>	<i>B. soroki- niana</i>
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1.	Forester	66,1	33,9	79,6	20,5	81,6	18,3
2.	Bayer C15599	64,7	35,3	72,7	27,3	78,2	21,8
3.	Гранал	71,1	28,9	84,1	15,9	85,0	15,0
4.	CI 13664	70,7	29,4	84,2	15,8	87,1	12,9
5.	Одесский 131	76,6	23,4	84,6	15,4	87,1	12,9
6.	Одесский 100	67,9	32,1	80,3	19,7	81,4	18,6
7.	Донецкий 124	59,7	40,3	69,2	30,8	78,3	21,8
8.	Омский 88	65,0	35,1	79,8	20,2	83,1	17,1
9.	Сл. гибрид 6729	75,6	24,4	82,7	17,3	80,5	19,6
10.	Kraaj 71-509	67,2	32,8	74,7	25,4	76,8	23,3
11.	Темп	61,2	38,9	76,0	24,1	85,8	14,2
12.	Allier 63	52,4	47,6	57,2	42,9	77,3	25,8
13.	Незалежный	64,0	36,0	71,1	28,9	78,4	21,7
14.	Tregal (CI 6359)	60,5	39,6	68,1	31,9	79,4	20,7
15.	SV 89300	62,9	37,2	79,1	20,1	89,5	10,6
16.	Kraaj 66-3910	68,1	32,0	73,6	26,5	78,8	21,3
17.	Сл. гибрид 6631	64,3	35,8	69,0	31,1	73,5	26,5
18.	Донецкий 9	61,8	38,3	73,7	26,4	86,2	13,8
19.	Оренбургский 16	64,1	35,9	69,4	30,6	91,4	8,7
20.	Heines Наһа	64,0	36,0	80,5	19,5	89,3	10,8
21.	Местный (Ставрополь)	64,1	35,9	80,0	20,1	79,0	24,1
22.	Chariot	67,2	32,8	81,2	18,8	89,9	10,1
23.	Одесский 115	73,2	26,9	76,3	23,8	77,9	22,2

Таблица 4.2 (продолжение)

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
24.	Каштан	60,2	39,8	65,8	34,2	79,8	20,2
25.	Сл. гибрид 6902	69,5	30,5	68,3	31,8	78,3	21,8
26.	Звершеня	61,2	38,8	75,6	24,5	78,0	22,0
27.	Спомин	59,5	40,6	79,7	20,3	83,2	16,9
28.	Сл. гибрид 6722	65,2	34,9	71,2	28,9	81,9	18,7
29.	Line TR-226	65,5	35,8	64,1	35,1	72,0	28,0
30.	Inis	69,7	30,3	85,7	15,3	80,9	19,2
31.	Сл. гибрид 6613	74,6	25,4	76,6	23,5	81,4	18,7
32.	Panda	65,8	34,3	69,4	30,6	90,3	9,8
33.	Hector	69,1	31,0	70,4	29,6	80,0	20,0
34.	Excel	66,0	34,0	69,7	30,3	80,2	19,9
35.	Hadmertslebener	70,6	29,5	70,9	29,2	83,8	16,2
36.	Prisma AFP ² /802	62,8	37,3	71,6	28,4	73,2	26,8
37.	Донецкий 12	71,8	28,3	77,8	22,3	83,0	17,0
38.	Паллидум 107	60,2	39,8	76,4	23,6	78,4	21,7
В среднем по сортам и гибридам		65,9	34,2	74,7	25,3	81,6	18,7
НСР _{0,05}		4,3	3,7	4,2	4,9	5,8	3,5

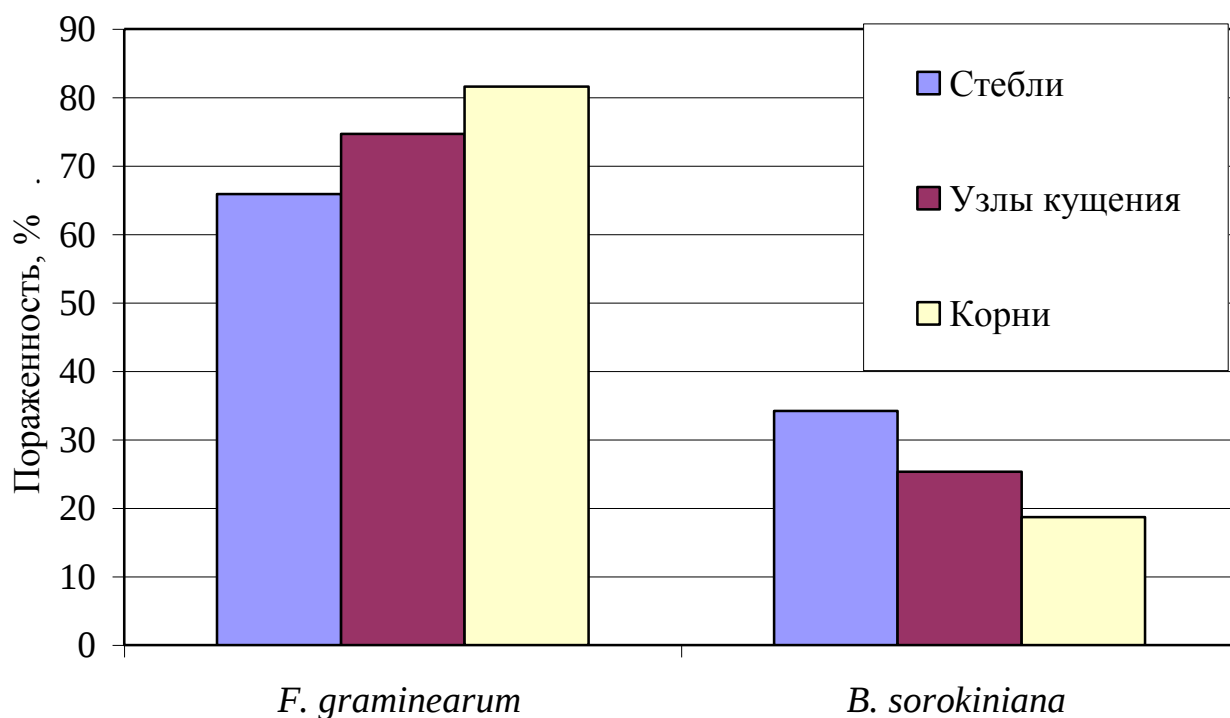


Рис. 4.5. Усредненная пораженность различных частей растений ярового ячменя грибами *B. sorokiniana* и *F. graminearum* (фаза полной спелости)

В 1992 г., российские ученые С.Ф. Сидорова, В.В. Рябчикова и Л.И. Берестецкая указали, что в течение периода вегетации злаков постепенно усиливается развитие представителей рода *Fusarium*, а развитие *B. sorokiniana*, напротив, подавляется [127]. Полученные же нами результаты демонстрируют, что к моменту уборки урожая происходит существенно (до 6 раз) усиление развития обоих видов грибов (см. рисунки 4.4 и 4.5). Наряду с этим, нами обнаружено, что по мере созревания растений происходит постепенное расселение *B. sorokiniana* из надземных частей растений в корни, а *F. graminearum* из корней в основания стеблей. При этом выявленные на стадии восковой спелости субстратные предпочтения элиминируются и ко времени уборки урожая на всех под- и околоземных частях растения количественно преобладает *F. graminearum* (уровень значимости выявленных различий $P < 0,01$).

Мы предполагаем, что данные об уменьшении численности *B. sorokiniana* в фазу полной спелости, полученные рядом авторов, по всей видимости, могут быть следствием иных экологических условий или же неполным выявлением этого

вида в связи с одновременным массовым развитием грибов рода *Fusarium*. Как уже отмечалось ранее, при интенсивном развитии *F. graminearum* его развитый светлоокрашенный воздушный мицелий полностью покрывает анализируемые отрезки растений в чашках Петри и мешает обнаружению значительно более слабо развитого темноокрашенного мицелия *B. sorokiniana* (см. рис. 4.2). Совместное культивирование колоний *B. sorokiniana* и *F. graminearum* в чашках Петри показало, что эти грибы не проявляют выраженных антагонистических свойств по отношению друг к другу (см. рис. 4.6). Более того, нередко эти грибы формируют смешанные трудноразделимые колонии, в которых оба вида сохраняют жизнеспособность на протяжении длительного времени.

Обобщая полученные результаты можно отметить, что на стадии восковой спелости зерна на растениях ячменя прослеживается четкое разграничение экологических ниш, занимаемых грибами *B. sorokiniana* и *F. graminearum*. Так, первый вид количественно преобладает на под- и околосемных частях стеблей, а второй – на узлах кущения и корнях. В этом наши результаты полностью согласуются с данными, полученными другими исследователями в различных регионах Земного шара [67; 171; 176; 263; 469].

По мере отмирания под- и околосемных частей растений ячменя происходит существенное усиление развития на них обоих видов фитопатогенных грибов. При этом *B. sorokiniana* постепенно расселяется и колонизует корни, а *F. graminearum* – стебли. В итоге, в фазу полной спелости зерна, инфекция подземных и околосемных частей растений имеет смешанный характер с количественным преобладанием *F. graminearum*.

Можно предположить, что в этот период развития растений возбудители переходят к сапротрофному развитию, пытаясь колонизовать как можно большую часть организма-хозяина и сформировать максимальный запас конидий для возобновления развития патогена в следующем году. Подобные преобразования широко распространены среди некро- и гембиотрофных патогенов в природе [55; 140].



Рис. 4.6. Совместное развитие культур *Bipolaris sorokiniana* (слева) и *Fusarium graminearum* (справа) на агаризованной среде Чапека (7-ми суточная культура)

4.3. Дифференцированная диагностика возбудителей обыкновенной корневой гнили ярового ячменя

В предыдущем разделе нами была проанализирована динамика пораженности подземных и околоземных частей растений ярового ячменя фитопатогенными грибами *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum* в стадии восковой и полной спелости зерна. Следует отметить, что такой критерий как пораженность подтверждает и количественно характеризует факт инфицирования растений. Однако этот показатель не позволяет оценить степень развития гриба в тканях питающего растения, а, следовательно, и степень развития соответствующего заболевания. Однако именно последний показатель и представляет наибольшую практическую значимость, так как от степени развития болезни зависит величина и качество урожая [15; 66; 108; 140; 176; 263].

Учитывая большое практическое значение таких исследований и располагая фактическим материалом по видовому составу возбудителей и их численности на большом количестве сортов и гибридов ярового ячменя мы, естественно, поставили перед собой задачу – провести дифференцированную оценку степеней развития *B. sorokiniana* и *F. graminearum* в тканях растений и оценить имеющийся набор сортов и гибридов ячменя к вызываемым им гельминтоспориозной и фузариозной корневым гнилям.

Для решения этой задачи в полевых условиях нами было проведено распределение растений ячменя по группам в соответствии со степенью загнивания их под- и околоземных частей и последующий расчет степеней развития болезни. Распределение растений по группам производили в соответствии с общепринятой 5-ти бальной шкалой в которой балл 0 соответствует здоровым растениям, балл 1 – единичным некротическим точкам и штрихам, балл 2 – массовым, сливающимся некротическим точкам и штрихам, а балл 3 – сплошной некротизации инфицированной ткани. Высший балл – 4 – соответствует погибшему растению.

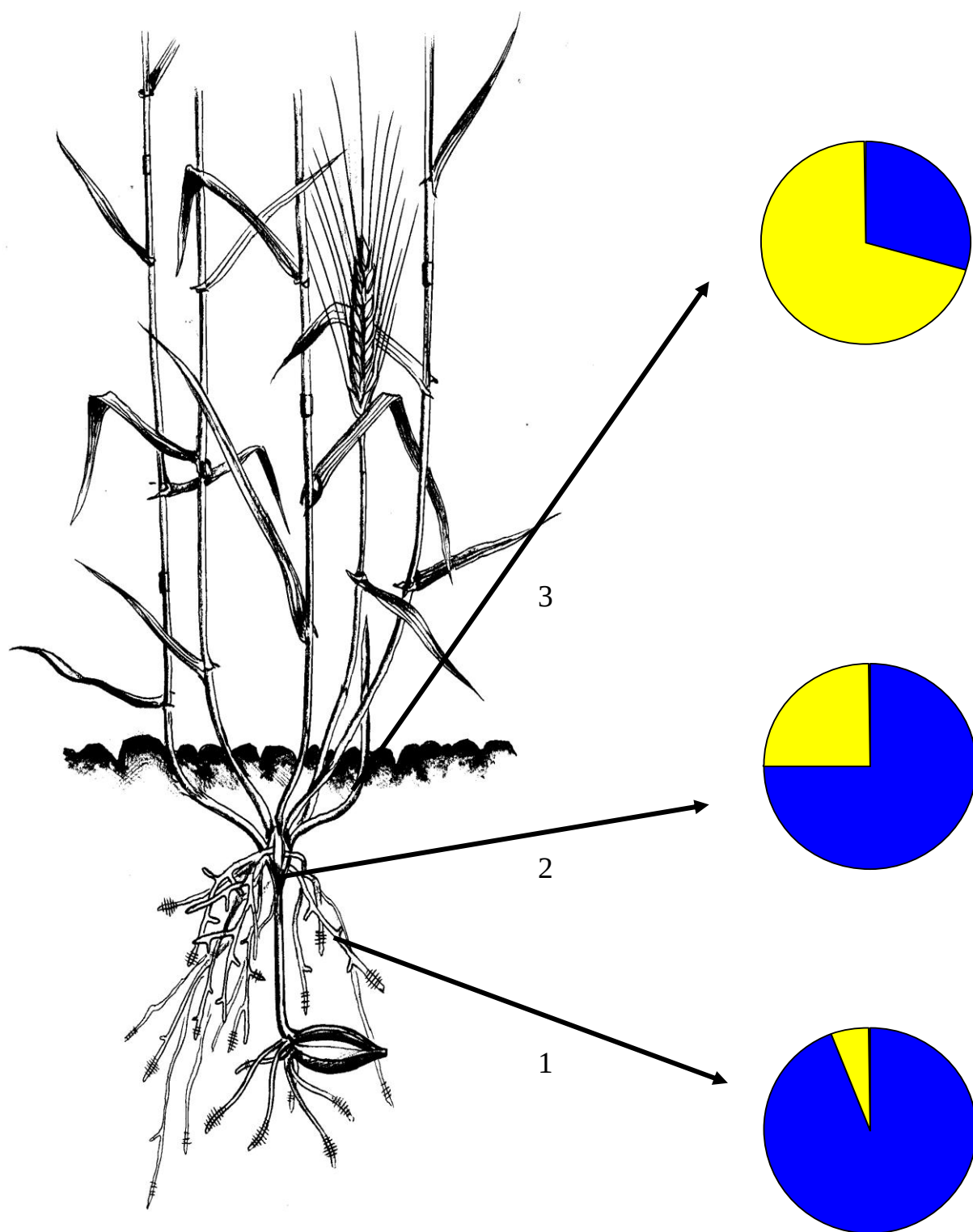
Описанная выше шкала предполагает обобщение данных о степенях загнивания корней, эпикотилия, первого междоузлия и даже влагалищной части

прикорневых листьев и позволяет интегрально оценить развитие обыкновенной корневой гнили, однако не позволяет дифференцировать фузариозный и гельминтоспориозный компоненты болезни [15; 66; 140; 176; 263].

Для дифференцированной оценки развития фузариозного и гельминтоспориозного компонентов заболевания нами было модифицировано применение описанной выше общепринятой шкалы. Суть предпринятой модификации состоит в том, что оценка степени развития заболевания производится дифференцированно для корней и оснований стеблей растений. Ранее было описано, что в фазу восковой спелости наблюдается четкое разграничение экологических ниш, занимаемых *B. sorokiniana* и *F. graminearum*. При этом первый возбудитель колонизирует преимущественно основания стеблей, а второй – корни и узлы кущения (см. табл. 4.1 и рис. 4.7). В связи с этим, мы считаем, что степень загнивания оснований стеблей в фазу восковой спелости свидетельствует преимущественно о развитии гельминтоспориозной гнили, а корней и узлов кущения – фузариозной.

Для проведения полевой диагностики в фазу восковой спелости зерна существует целый ряд дополнительных оснований. В частности, фаза восковой спелости зерна является последней стадией в развитии злаков, когда корневая система еще активно используется растением, а корни проявляют определенную устойчивость к патогенам. На более поздних стадиях развития начинается постепенное отмирание корневой системы. При этом некро- и гембиотрофные патогены переходят к сапротрофному питанию, а их развитие в растениях многократно усиливается (см. рис. 4.4 и 4.5). В связи с этим, данные поздних учетов не могут свидетельствовать о реальной устойчивости растений. Кроме того, на поздних этапах вегетации хлебных злаков корни и стебли практически не участвуют в питании растений, таким образом, развитие в них патогенов оказывает лишь опосредованное влияние на урожай и его качество (например, за счет усиления полегаемости растений).

Полученные данные о степенях развития *B. sorokiniana* и *F. graminearum* на 38 сортах и гибридах ярового ячменя представлены в таблице 4.3. Как видно из таб-



■ - *Bipolaris sorokiniana*

■ - *Fusarium graminearum*

Рис. 4.7. Пораженность различных частей растений ярового ячменя грибами *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum* в фазу восковой спелости (в среднем по 38 сортам и гибридам)

Примечание: 1 – корни, 2 – узлы кущения, 3 – основания стеблей

лицы, изучаемые сорта и гибриды существенно отличаются по степени развития на них гельминтоспориозной и фузариозной корневой гнили. Степень развития гельминтоспориозной гнили для анализируемых сортов и гибридов ярового ячменя варьировала от 13,9 усл. % для сорта Незалежный до 65,4 усл. % для сорта Bayer C15599 и составила в среднем 36,4 усл. %. Дисперсионный анализ позволил выявить достоверные различия между степенью развития заболевания на различных сортах и гибридах. Средние значения степеней развития *B. sorokiniana* и НСР при уровне значимости 0,05 также приведены в таблице 4.3.

Средняя степень развития фузариозной гнили для анализируемых сортов и гибридов ярового ячменя была достоверно выше, чем гельминтоспориозной и составила 49,2 усл. %. Для изучаемых сортов и гибридов этот показатель варьировал от 11,2 усл. % для сорта Одесский 115 до 78,9 усл. % для сорта Forester. Дисперсионный анализ также позволил выявить достоверные различия между степенью развития фузариоза на различных сортах и гибридах. Средние значения степеней развития *F. graminearum* и НСР при уровне значимости 0,05 также приведены в таблице 4.3.

Корреляционной зависимости между пораженностью растения патогенным грибом и степенью развития вызываемого им заболевания установлено не было. Так, коэффициент корреляции между пораженностью оснований стеблей грибом *B. sorokiniana* и степенью развития на них гельминтоспориоза составил -0,28, а между пораженностью корней *F. graminearum* и степенью развития на них фузариоза – -0,37. Полученные результаты свидетельствуют о том, что даже при одинаковой пораженности различные сорта по-разному противостоят развитию патогенов, что приводит к различной степени развития заболеваний.

Исходя из анализа степеней развития заболеваний, исследованные сорта были условно ранжированы нами на четыре группы устойчивости. Растения, степень развития заболеваний которых находилась в пределах 0 – 25 усл. %, были отнесены к группе высокоустойчивых, 25,1 – 50 усл. % – устойчивых, 50,1 – 75 усл. % – восприимчивых и 75,1 – 100 усл. % – высоковосприимчивых. Наглядно данные об устойчивости исследованных растений к гельминтоспориозной и

фузариозной корневой гнилям представлены на рис. 4.8. Левая часть рисунка построена на основании данных по степени загнивания стеблей, а правая – корней. Как отмечалось ранее, загнивание оснований стеблей в фазу восковой спелости вызывает преимущественно грибок *B. sorokiniana*, а корней – *F. graminearum*. Таким образом, левый рисунок отражает устойчивость сортов и гибридов ячменя к гельминтоспориозной корневой гнили, а правый – к фузариозной.

Полученные результаты позволяют отметить, что среди исследованных нами сортов и гибридов ярового ячменя 11 (28,9%) оказались высокоустойчивыми к гельминтоспориозу, 20 (52,7%) – устойчивыми, 7 (18,4%) – восприимчивыми. Ни одного сорта высоковосприимчивого к гельминтоспориозной корневой гнили обнаружено не было. По отношению к фузариозной корневой гнили высокоустойчивыми оказались 5 (13,2%) сортов и гибридов, устойчивыми – 13 (34,2%), восприимчивыми – 16 (42,1%) и высоковосприимчивыми – 4 (10,5%). Таким образом, изученные сорта и гибриды оказались более восприимчивыми к фузариозу, чем к гельминтоспориозу (см. рис. 4.8).

Сравнение степеней развития гельминтоспориозной и фузариозной корневых гнилей на одних и тех же сортах и гибридах дает нам основания говорить о том, что устойчивость растений к этим заболеваниям определяется различными факторами и, вероятно, наследуется независимо. Так, коэффициент корреляции между степенями развития вышеупомянутых болезней составил всего 0,26.

Среди изученных растений нами был выявлен ряд сортов и гибридов в одинаковой степени устойчивых к обоим заболеваниям. Так, к числу высокоустойчивых к обоим болезням можно отнести: сорт Одесский 115 и сложный гибрид 6902; устойчивых: такие сорта как Паллидум 107 и Panda, а также сложные гибриды 6722 и 6631; восприимчивых – сорта Line TR-226, Inis, а также сложный гибрид 6613. В то же время, несколько сортов (Донецкий 124, Незалежный) были высокоустойчивыми к гельминтоспориозу и восприимчивыми к фузариозу и наоборот (Hadmertslebener) (см. табл. 4.3).

Таблица 4.3

Степени развития гельминтоспориозной и фузариозной корневой гнилей и полевая устойчивость растений ярового ячменя к этим заболеваниям (фаза восковой спелости).

№ пп	Сорт / гибрид	Степень развития гельминтоспориоза, усл. %	Устойчивость к гельминтоспориозу	Степень развития фузариоза, усл. %	Устойчивость к фузариозу
I	II	III	IV	V	VI
1.	Forester	51,2	B	78,9	BB
2.	Bayer C15599	65,4	B	77,0	BB
3.	Гранал (Безостый 1)	36,2	У	48,4	У
4.	CI 13664	25,0	ВУ	49,2	У
5.	Одесский 131	45,1	У	70,6	BB
6.	Одесский 100	45,8	У	59,3	B
7.	Донецкий 124	18,2	ВУ	51,5	B
8.	Омский 88	24,6	ВУ	33,3	У
9.	Сл. гибрид 6729	23,6	ВУ	47,6	У
10.	Краај 71-509	36,8	У	78,4	BB
11.	Темп	24,7	ВУ	47,4	У
12.	Allier 63	23,8	ВУ	56,2	B
13.	Незалежный	13,9	ВУ	70,1	B
14.	Tregal (CI 6359)	28,7	У	40,9	У

Таблица 4.3 (продолжение)

I	II	III	IV	V	VI
15.	SV 89300	19,8	ВУ	63,8	В
16.	Краај 66-3910	25,9	У	48,2	У
17.	Сл. гибрид 6631	30,7	У	33,6	У
18.	Донецкий 9	21,7	У	33,9	В
19.	Оренбургский 16	34,6	У	19,7	ВУ
20.	Heines Naha	40,4	У	74,8	В
21.	Местный (Ставроп.)	49,4	У	32,6	У
22.	Chariot	34,8	У	53,1	В
23.	Одесский 115	28,1	ВУ	11,2	ВУ
24.	Каштан	36,2	У	50,0	В
25.	Сл. гибрид 6902	19,1	ВУ	22,8	ВУ
26.	Звершеня	21,7	ВУ	36,0	У
27.	Спомин	39,1	У	12,4	ВУ
28.	Сл. гибрид 6722	25,4	У	43,1	У
29.	Line TR-226	51,3	В	67,7	В
30.	Inis	54,3	В	63,9	В
31.	Сл. гибрид 6613	58,0	В	56,3	В
32.	Panda	42,8	У	36,8	У

Таблица 4.3 (продолжение)

I	II	III	IV	V	VI
33.	Hector	51,3	B	74,9	B
34.	Excel	58,7	У	49,4	B
35.	Hadmerslebener	57,5	B	12,7	ВУ
36.	Prisma AFP ² /802	34,7	У	61,1	B
37.	Донецкий 12	42,7	У	47,6	У
38.	Паллидум 107	41,7	У	53,5	B
В среднем по сортам и гибридам		36,4		49,2	
НСР _{0,05}		5,9		7,2	

Примечание: ВУ – высокоустойчивый, У – устойчивый, В – восприимчивый, ВВ – высоковосприимчивый

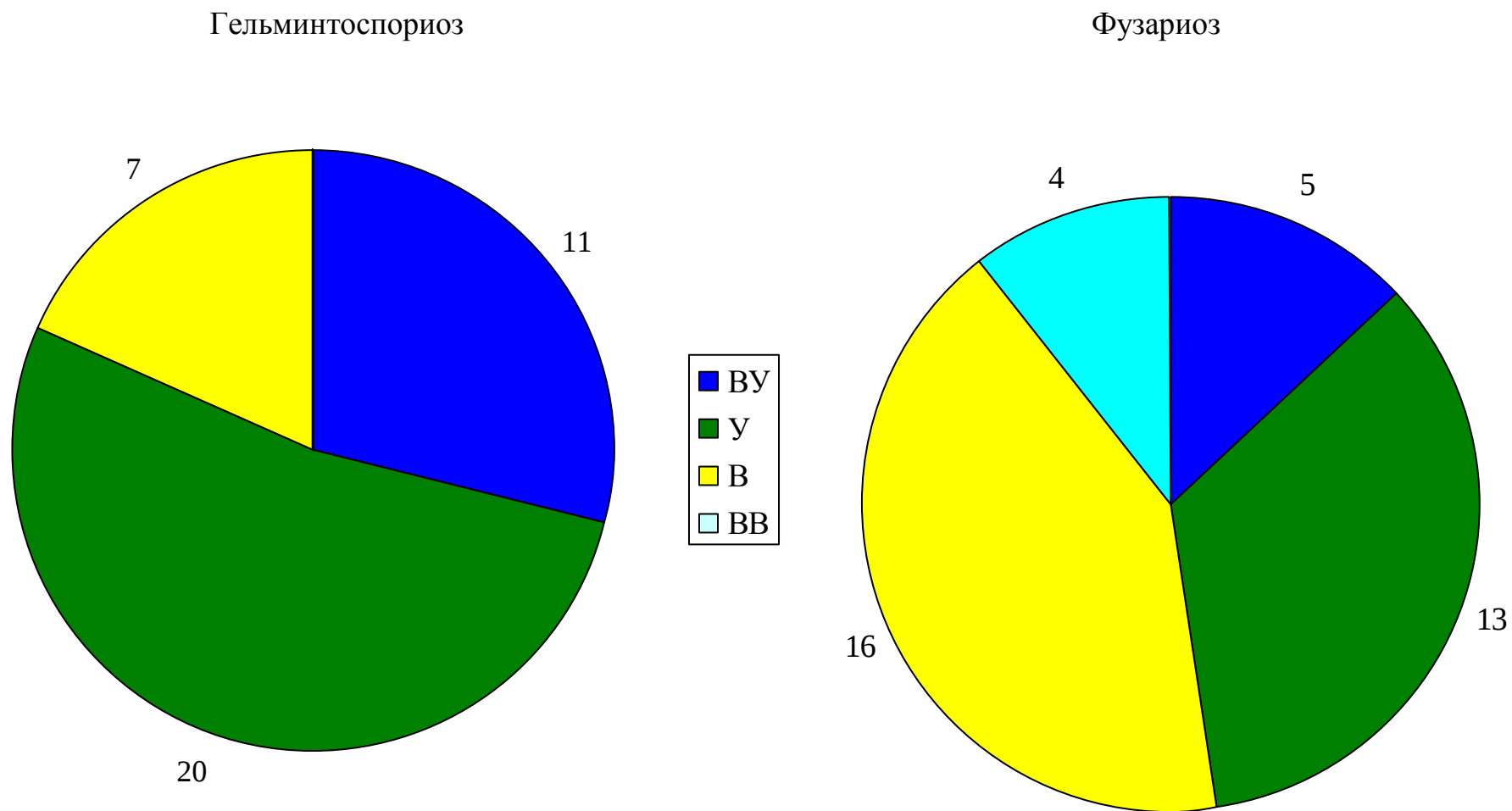


Рис. 4.8. Распределение сортов и гибридов ярового ячменя по степени устойчивости к гельминтоспориозной и фузариозной корневой гнилей.

Примечание: ВУ – высокоустойчивый, У – устойчивый, В – восприимчивый, ВВ – высоковосприимчивый; цифрами обозначено количество сортов и гибридов

В 1990 г. белорусские фитопатологи Л.К. Хацкевич, А.А. Бенкен и М.В. Гайке впервые обратили внимание на отсутствие корреляции между степенями загнивания корней и оснований стеблей для различных сортов растения-хозяина. Л.К. Хацкевич и соавторы предположили, что это не одно, а два заболевания и предложили выделить новое самостоятельное заболевание «стеблевую гниль злаков». Изучая развитие болезни в фазу полной спелости семян, белорусские исследователи показали, что и загнивание корней, и выделенная ими стеблевая гниль имеют смешанную, фузариозно-гельминтоспориозную культуру. Различия степеней поражения оснований стеблей и корней они объясняли различием механизмов устойчивости вышеупомянутых частей растений в ответ на фузариозно-гельминтоспориозную инфекцию [163].

Опираясь на особенности паразитизма *B. sorokiniana* и *F. graminearum* на корнях и основаниях стеблей, выявленные нами в фазу восковой спелости, мы полагаем, что стеблевая гниль изначально имеет гельминтоспориозную природу и вызывается грибом *B. sorokiniana*, а корневая – фузариозную и вызывается видами рода *Fusarium*. Таким образом, по нашему мнению, различия устойчивости стеблей и корней обусловлены тем, что первичными возбудителями заболеваний этих органов растений являются разные виды патогенных грибов.

Подводя итог этому этапу исследования необходимо отметить, что в подземных и околоземных частях растений ярового ячменя в Харьковской области развиваются фитопатогенные грибы: *B. sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme* и *F. oxysporum*. Наряду с ними были обнаружены плесневые грибы, представители родов *Mucor* Fresen., *Rhizopus* Ehrenb., *Aspergillus* Link, *Penicillium* Link и *Cladosporium* Link.

Обнаружено, что основные возбудители обыкновенной корневой гнили ячменя: *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum* при паразитизме занимают обособленные экологические ниши. Первый возбудитель изначально ассоциирован с основаниями стеблей, а второй – с корнями и узлами кущения. Установлено, что по мере отмирания растений происходит постепенное

расселение *B. sorokiniana* в подземные части растений, а *F. graminearum* – в надземные. При этом к моменту уборки урожая на всех под- и околосемных частях ярового ячменя количественно преобладает *F. graminearum*.

По нашему мнению, модифицированное использование традиционной шкалы учета степени развития корневых гнилей – независимый учет степеней загнивания подземных и околосемных частей растений ячменя в фазу восковой спелости зерна, можно использовать для дифференцированной оценки степеней развития гельминтоспориозной и фузариозной корневых гнилей. При этом степень загнивания корней свидетельствует преимущественно о развитии фузариоза, а оснований стеблей – гельминтоспориоза. Мы считаем, что такой прием позволяет селективно оценить роль *Bipolaris sorokiniana* и видов рода *Fusarium* в патогенезе обыкновенной корневой гнили и изучить закономерности устойчивости растений ярового ячменя к этим возбудителям.

Модифицированное нами использование шкалы учета применительно к 30 сортам и гибридам ярового ячменя позволило оценить их реакцию на заражение возбудителями гельминтоспориозной и фузариозной корневой гнилей и показало, что устойчивость растений к этим заболеваниям определяется различными факторами и, вероятно, наследуется независимо. Рекомендации по учету корневых гнилей и данные о реакции исследованных сортов и гибридов переданы в лабораторию селекции ячменя Института растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН.

ГЛАВА 5.

МЕТОДЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ДИАГНОСТИКИ *BIPOLARIS SOROKINIANA* В СЕМЕНАХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

5.1. Проблема диагностики черного зародыша семян

Семена являются основным источником возобновления темно-бурой пятнистости листьев и гельминтоспориозной корневой гнили ячменя. Поэтому, умение выявить и количественно охарактеризовать семенную инфекцию *Bipolaris sorokiniana* в чернозародышевых семенах крайне необходимо для решения целого ряда фундаментальных и прикладных задач [28; 280; 295; 345].

В настоящее время разработан и активно используется целый ряд методов диагностики черного зародыша семян: метод визуальной оценки [64; 81-83; 125], метод проращивания семян во влажной камере [26; 41; 42; 81; 86; 185; 328; 345] или на поверхности агаризованной среды [185; 204; 230; 281; 295; 402], а также метод проращивания семян в рулонах фильтровальной бумаги [10; 15; 22; 28; 42; 127; 204; 376]. Использование различными учеными принципиально различных методов диагностики *B. sorokiniana* в семенах часто делает результаты их исследований противоречивыми и несопоставимыми [120; 124]. К сожалению, сравнительный анализ этих методов до сих пор не проводился.

По нашему мнению, применение всех методов диагностики по отношению к одним и тем же семенам одних и тех же сортов и гибридов ячменя в одних и тех же стационарных условиях позволит сравнить эти методы, установить их преимущества и недостатки и найти рациональное объяснение противоречивости получаемых с их помощью результатов.

По данным литературы, в семенах ячменя обычно развивается не только *B. sorokiniana*, но и целый ряд других видов фитопатогенных и сапротрофных грибов [52; 63; 191; 375; 483]. В связи с этим, нами особое внимание было уделено возможности каждого из сравниваемых методов селективно диагностировать *B. sorokiniana* на фоне развития сопутствующих видов грибов, ассоциированных с семенами.

5.2. Визуальный метод диагностики

Наиболее простым и распространённым методом диагностики черного зародыша ячменя является визуальный. Он основан на глазомерном разделении пробы семян на группы, в соответствии со степенью почернения их покровов и последующем расчете степени развития болезни. Этот метод диагностики часто используется с целью прогнозирования развития гельминтоспориозной корневой гнили при посеве инфицированных семян. При интенсивном почернении покровов зерновки делается прогноз интенсивного развития корневой гнили и наоборот [82; 83; 125].

В таблице 5.1. обобщены результаты визуальной оценки степени почернения покровов семян 38 сортов и гибридов ярового ячменя урожая 1998-2000 гг. Как видно из таблицы, наибольшее развитие черного зародыша наблюдалось в семенах урожая 1998 и 2000 гг. и составляло в среднем 38,4 усл. % и 42,4 усл. %. В 1999 г. степень развития черного зародыша была значительно ниже и составляла в среднем 12,0 усл. %. Полученные данные согласуются с литературными, в соответствии с которыми интенсивность почернения покровов семян в значительной степени определяется влажностью воздуха в период формирования зерна [52; 107; 124; 151; 239]. Так, 1998 и 2000 гг. характеризовались высокой влажностью воздуха в период налива и созревания зерна, в то время как 1999 г. был засушливым в этот период (см. Приложение Б 1).

Для различных сортов и гибридов ячменя степень развития черного зародыша варьировала в пределах 10,6 – 68,1 усл. % (урожай 1998 г.), 3,0 – 22,1 усл. % (урожай 1999 г.) и 23,3 – 59,0 усл. % (урожай 2000 г.). Дисперсионный анализ позволил выявить ряд достоверных различий между степенями развития заболевания для ряда сортов и гибридов (значения НСР_{0.05} приведены в таблице 5.1). В то же время, с помощью метода визуальной оценки нам не удалось выявить какой-либо закономерности в развитии заболевания на одних и тех же сортах в разные годы. Так, коэффициенты корреляции степеней развития черного зародыша по сортам и гибридам в различные годы варьировали в пределах –0,1 – 0,04.

Из литературы известно, что для визуального восприятия наличия инфекции требуется интенсивное развитие мицелия гриба в покровах зерновки. Отсутствие же внешних симптомов заболевания не может свидетельствовать о том, что они свободны от инфекции [26; 41; 42; 328]. Для усиления развития внутренней и скрытой семенной инфекции мы применили краткосрочное (на 1 минуту) замачивание анализируемых семян в дистиллированную воду. После замачивания семена раскладывали тонким слоем на листах фильтровальной бумаги и подсушивали при комнатной температуре. По прошествии 10 суток после замачивания мы повторно определяли их пораженность черным зародышем с помощью визуального метода. Опыт закладывали в трех повторностях. Объем пробы семян для каждого сорта и гибрида составлял 400 шт. Сравнительные данные о степени почернения покровов интактных и предварительно увлажненных семян представлены в таблице 5.2.

Как видно из таблицы 5.2, даже краткосрочное увлажнение семян приводит к существенной активизации внутренней и скрытой семенной инфекции и, как следствие, усилению почернения покровов семян. Так, если средняя степень почернения покровов интактных семян составила 42,4 усл. %, то увлажненных – 78,4 усл. %, что в 1,86 раза больше. Коэффициент корреляции между данными, полученными для одних и тех же сортов и гибридов достаточно высок и составляет 0,72. Полученные нами данные хорошо согласуются с литературными, согласно которым перестой зерна в поле обычно приводит к существенному усилению развития черного зародыша [42; 52].

Из полученных данных видно, что диагностика черного зародыша визуальным способом сильно зависит от интенсивности развития мицелия в покровах семян, которая, в свою очередь, зависит от влажности семян на момент их уборки и условий их дальнейшего хранения. Опираясь на это, мы считаем, что визуальный метод диагностики позволяет оценить интенсивность развития мицелия патогенов в покровах зерновки, но мало пригоден для количественного выявления внутренней и скрытой семенной инфекции.

Таблица 5.1.

Развитие черного зародыша семян различных сортов и гибридов
ярового ячменя (визуальный метод диагностики)

№ пп	Сорт / гибрид	Развитие болезни, усл. %		
		урожай 1998 г.	урожай 1999 г.	урожай 2000 г.
I	II	III	IV	V
1.	Forester	56,2	22,1	41,0
2.	Bayer C15599	58,0	20,8	50,7
3.	Гранал (Безостый 1)	12,7	7,3	51,5
4.	CI 13664	38,1	7,9	23,3
5.	Одесский 131	40,1	18,0	38,3
6.	Одесский 100	18,1	11,4	45,9
7.	Донецкий 124	28,2	6,8	47,7
8.	Омский 88	18,4	11,5	54,5
9.	Сл. гибрид 6729	27,4	13,3	59,0
10.	Kraaj 71-509	41,3	20,0	46,3
11.	Темп	16,9	4,6	34,5
12.	Allier 63	39,0	17,1	52,3
13.	Незалежный	67,6	9,0	43,3
14.	Tregal (CI 6359)	38,7	3,0	49,8
15.	SV 89300	52,3	11,5	51,0
16.	Kraaj 66-3910	39,7	7,5	42,6
17.	Сл. гибрид 6631	30,0	3,2	53,0
18.	Донецкий 9	37,4	12,6	47,1
19.	Оренбургский 16	17,9	5,9	45,3
20.	Heines Naha	38,3	20,8	40,0
21.	Местный (Ставроп.)	41,1	13,2	44,8
22.	Chariot	68,1	15,3	41,7
23.	Одесский 115	10,6	14,6	47,7
24.	Каштан	41,5	13,6	36,8
25.	Сл. гибрид 6902	48,8	12,3	29,3

Таблица 5.1. (продолжение)

I	II	III	IV	V
26.	Звершення	29,9	7,1	52,0
27.	Спомин	22,4	6,1	23,7
28.	Сл. гибрид 6722	28,2	6,3	27,4
29.	Line TR-226	45,5	10,8	48,3
30.	Inis	40,2	14,4	49,0
31.	Сл. гибрид 6613	42,4	21,3	30,4
32.	Panda	50,3	22,1	35,7
33.	Hector	40,6	13,0	28,4
34.	Excel	38,0	7,8	23,7
35.	Hadmerslebener	52,3	6,4	46,5
36.	Prisma AFP ² /802	49,8	11,6	26,0
37.	Донецкий 12	36,4	22,1	53,7
38.	Паллидум 107	55,7	5,0	49,9
В среднем по сортам и гибридам		38,4	12,0	42,4
НСР _{0,05}		5,8	4,0	7,1

Таблица 5.2.

Влияние увлажнения семян на последующее развитие черного зародыша
(визуальный метод диагностики)

№ пп	Сорт / гибрид	Развитие болезни, усл. %	
		интактные семена	увлажненные семена
I	II	III	IV
1.	Forester	41,0	86,6
2.	Bayer C15599	50,7	84
3.	Гранал (Безостый 1)	51,5	79,2
4.	CI 13664	23,3	59,3
5.	Одесский 131	38,3	84,2
6.	Одесский 100	45,9	90,1
7.	Донецкий 124	47,7	94,6
8.	Омский 88	54,5	88,7
9.	Сл. гибрид 6729	59,0	75,2
10.	Kraaj 71-509	46,3	83,3
11.	Темп	34,5	72,3
12.	Allier 63	52,3	85,1
13.	Незалежный	43,3	82,1
14.	Tregal (CI 6359)	49,8	81,9
15.	SV 89300	51,0	86
16.	Kraaj 66-3910	42,6	74,7
17.	Сл. гибрид 6631	53,0	69,9
18.	Донецкий 9	47,1	76,6
19.	Оренбургский 16	45,3	85,7
20.	Heines Naha	40,0	71,3
21.	Местный (Ставроп.)	44,8	78,8
22.	Chariot	41,7	77,7
23.	Одесский 115	47,7	84,3
24.	Каштан	36,8	63,6
25.	Сл. гибрид 6902	29,3	69,9

Таблица 5.2. (продолжение)

I	II	III	IV
26.	Звершення	52,0	92,2
27.	Спомин	23,7	61
28.	Сл. гибрид 6722	27,4	76,7
29.	Line TR-226	48,3	88,6
30.	Inis	49,0	80,9
31.	Сл. гибрид 6613	30,4	66,7
32.	Panda	35,7	73,5
33.	Hector	28,4	53,1
34.	Excel	23,7	65,5
35.	Hadmerslebener	46,5	79,9
36.	Prisma AFP ² /802	26,0	75
37.	Донецкий 12	53,7	94,4
38.	Паллидум 107	49,9	86,7
В среднем по сортам и гибридам		42,4	78,4
НСР _{0,05}		7,1	9,2

5.3. Метод влажной камеры

Широко распространенным методом учёта возбудителей в семенах ячменя является метод их проращивания в условиях влажной камеры (на увлажнённой поверхности фильтровальной бумаги, марли или песка в чашках Петри или керамических растильнях) [26; 41; 42; 86; 328].

Согласно общепринятой методике, для изучения семенной инфекции методом влажной камеры нами были отобраны пробы семян каждого сорта и гибрида ячменя в количестве 300 шт. Семена очищали от спор грибов на поверхности промыванием в проточной воде в течение 30 минут, после чего раскладывали по 15 шт. в стерильные чашки Петри. Дно чашек Петри предварительно застилали стерильной фильтровальной бумагой и увлажняли добавлением 8 мл. дистиллированной воды. Чашки Петри инкубировали в светоустановке «Флора» на протяжении семи суток с суточным периодом освещения 16 часов (освещенность 800 люкс, температура 22-24⁰С) [41; 42; 86; 26; 185; 328].

По прошествии срока инкубирования, семена покрывались мицелием и репродуктивными структурами различных грибов (рис. 5.1 и 5.2), что позволило нам составить список видов, ассоциированных с семенами, а также оценить пораженность семян возбудителями чёрного зародыша.

По данным литературы, метод влажной камеры позволяет выявить в семенах ячменя целый ряд фитопатогенных и сопутствующих им сапротрофных грибов. В первую очередь, это *B. sorokiniana* и *A. alternata*, а также представители родов *Fusarium*, *Drechslera*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Несколько реже развиваются *Absidia*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Gonatobotrys*, *Lichtheimia*, *Rhynchosporium*, *Saccharomyces*, *Septoria*, *Sordaria*, *Spicaria*, *Stachybotrys*, *Stemphylium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium* и пр. [26; 41; 42; 66; 136; 230; 280; 322]. Нередко на семенах злаков также развиваются различные виды бактерий [136].

В наших исследованиях, детальное лабораторное обследование семян 38 сортов и гибридов ярового ячменя также позволило обнаружить целый ряд видов грибов, ассоциированных с семенами. Среди фитопатогенов нами были

зарегистрированы *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoem., *Fusarium moniliforme* J.Sheld. (= *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg), *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc., *F. oxysporum* Schlecht., *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker и *D. graminea* (Rabenh. ex Schltdl.) Shoemaker.

Помимо этого, в тестируемых семенах нами был обнаружен ряд видов плесневых грибов: *Aspergillus clavatus* Desm., *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus fumigatus* Fresen., *Aspergillus parasiticus* Speare, *Mucor elegans* Eidam., *Penicillium verticillatum* Corda и *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* (Ehrenb.) Vuill.

Было установлено, что основными возбудителями болезней семян исследованных сортов и гибридов ярового ячменя являются грибы *Alternaria alternata* и *Bipolaris sorokiniana*. Эти фитопатогены легко дифференцируются при просмотре влажных камер с помощью бинокулярной лупы, в итоге можно легко подсчитать количество семян, поражённых каждым из них по-отдельности и обоими возбудителями одновременно.

Как видно из рисунков 5.3 и 5.4, *B. sorokiniana* формирует конидиеносцы с крупными одиночными или собранными в пучки поперечно-септированными темноокрашенными конидиями. *A. alternata* образует более мелкие темноокрашенные конидии, имеющие одновременно как продольные так и поперечные септы, которые собраны в цепочки по 2-3 и более. Внешний вид репродуктивных структур *A. alternata* представлен на рисунках 5.5 и 5.6.

В ходе проведенного исследования нами было установлено, что гриб *A. alternata* количественно преобладал на всех без исключения сортах и гибридах ячменя. При этом средняя пораженность семян альтернариозом составляла 79,2%. *B. sorokiniana* значительно уступал альтернарии по численности и поражал в среднем 29,1% семян. При этом на подавляющем большинстве семян развивался исключительно гриб *A. alternata*, на одной пятой семян – *A. alternata* и *B. sorokiniana* одновременно и лишь на 6,2% семян – только *B. sorokiniana*. Усредненные данные о частотах выделяемости грибов *A. alternata* и *B. sorokiniana* из анализируемых семян ярового ячменя представлены на рисунке 5.7.



Рис. 5.1. Развитие возбудителей черного зародыша семян во влажной камере (сорт Каштан)



Рис. 5.2. Внешний вид пораженной зерновки ячменя после семи суток инкубирования во влажной камере

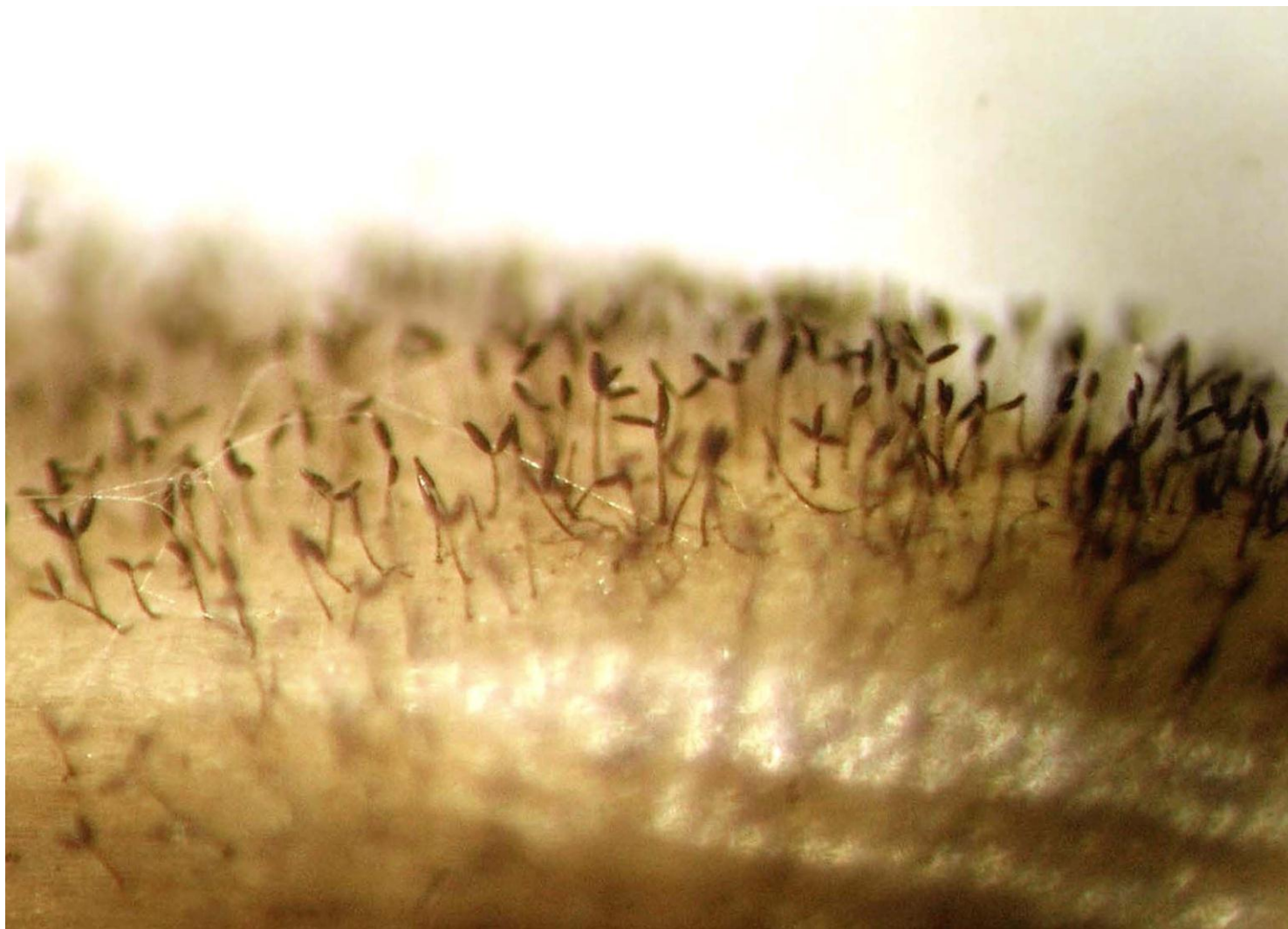


Рис. 5.3. Спороношение *Bipolaris sorokiniana* на поверхности больных семян ячменя во влажной камере ($\times 80$)



Рис. 5.4. Конидии *B. sorokiniana*, сформировавшиеся на поверхности больных семян ячменя во влажной камере ($\times 730$)

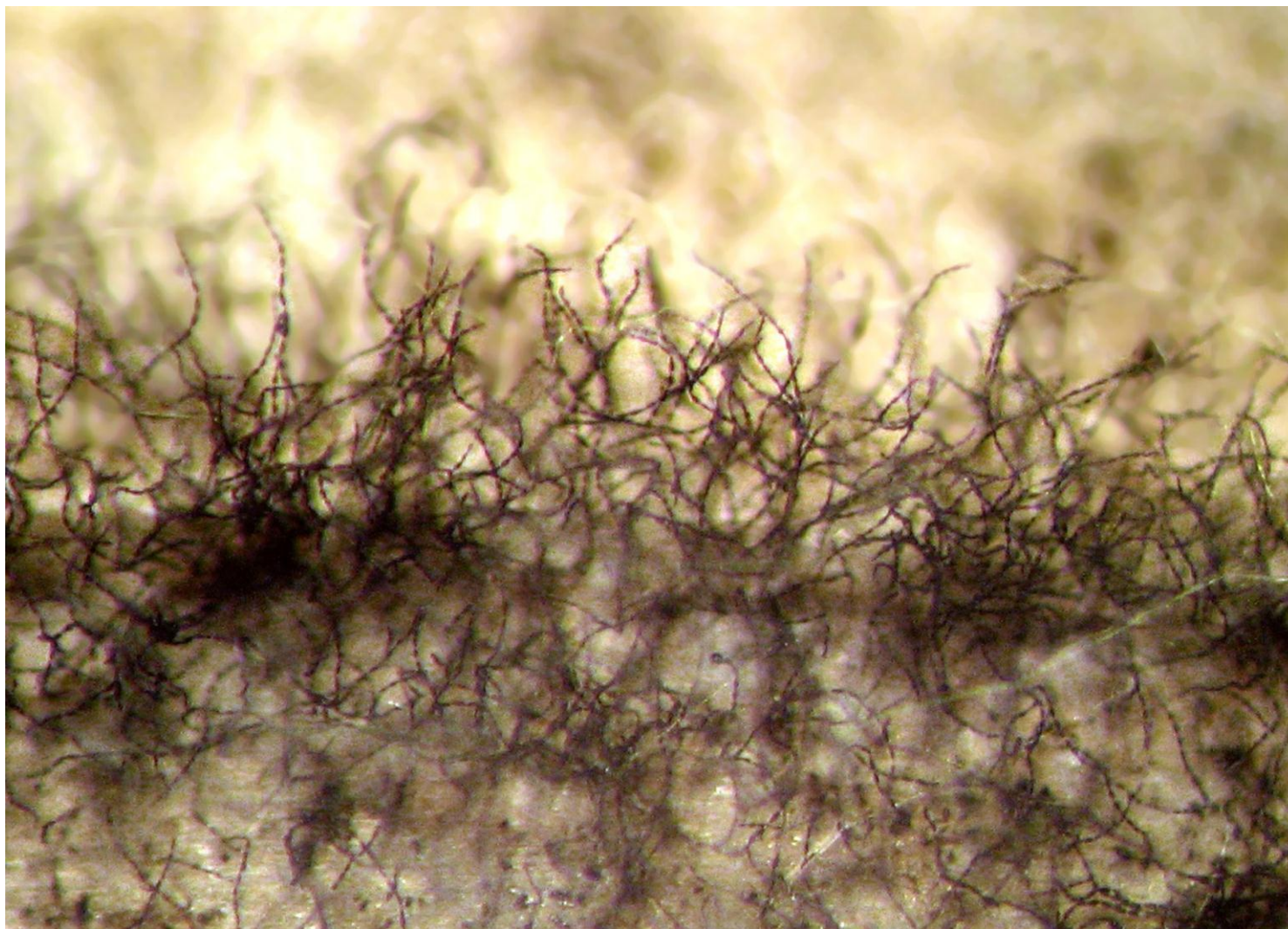


Рис. 5.5. Спороношение *Alternaria alternata* на поверхности больных семян ячменя во влажной камере ($\times 80$)

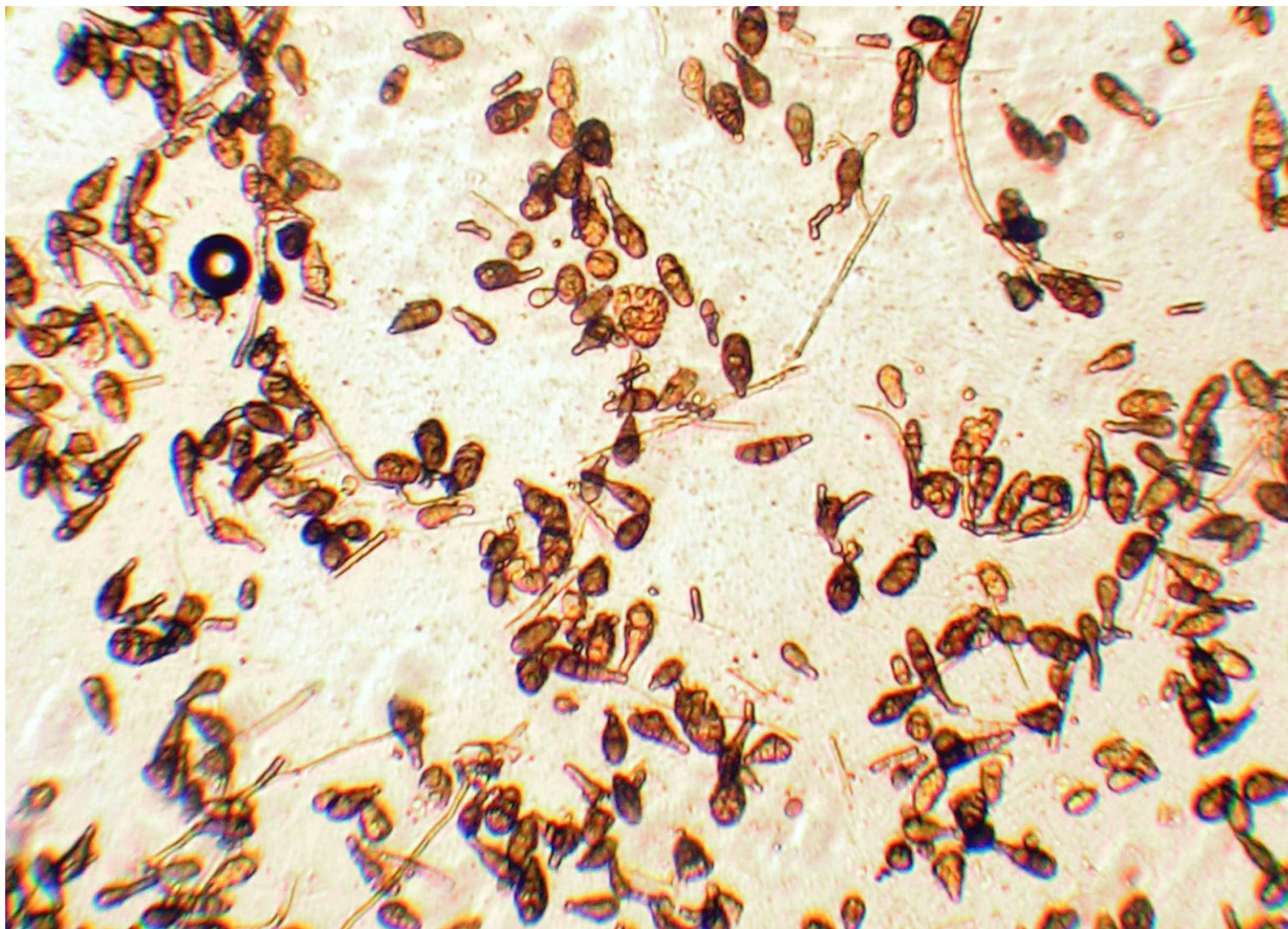


Рис. 5.6. Конидии *A. alternata*, сформировавшиеся на поверхности больных семян ячменя во влажной камере ($\times 730$)

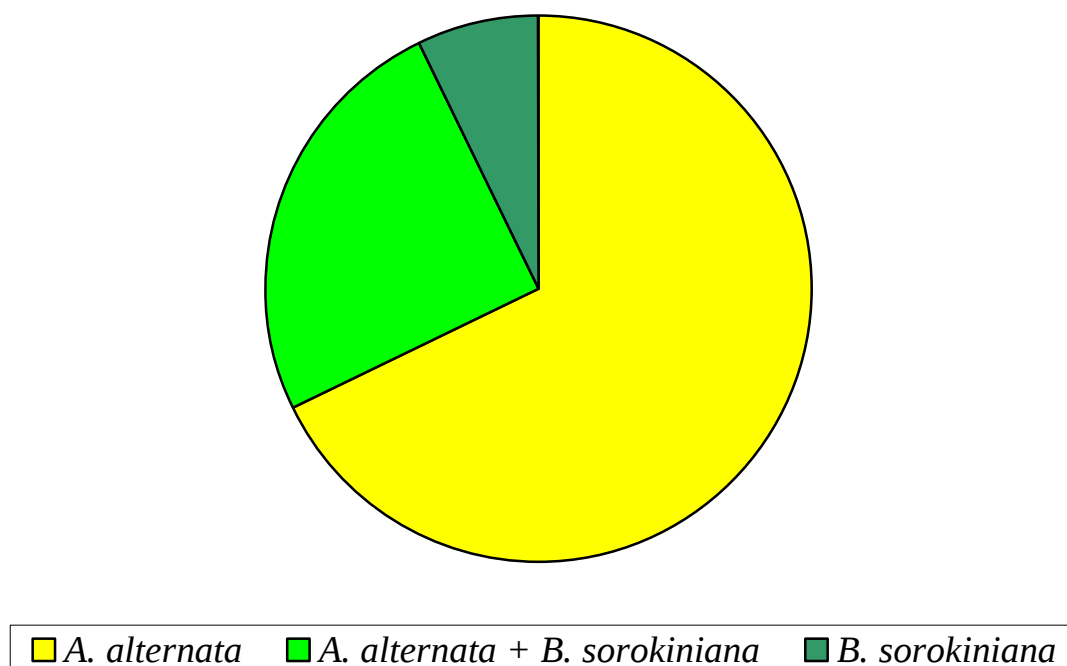


Рис. 5.7. Частоты выделяемости *A. alternata* и *B. sorokiniana* из семян различных сортов и гибридов ячменя (метод влажной камеры)

Согласно результатам использования метода влажной камеры, пораженность семян ячменя видами рода *Fusarium* была относительно небольшой. Наиболее часто на исследованных сортах и гибридах ячменя нами был обнаружен вид *F. moniliforme*, максимальная пораженность которым достигала 11,6%. Значительно реже были обнаружены виды *F. culmorum* – не более 4,8% и *F. oxysporum* – не более 2,0%. Несмотря на массовое обнаружение вида *Fusarium graminearum* в пораженных корнях (о чем говорилось в предыдущей главе), в семенах этот вид не был нами обнаружен. Наличие мицелия фузариев не исключало формирование мицелия *B. sorokiniana* и *A. alternata*, поэтому, по нашему мнению, оно едва ли существенно повлияло на полученные данные о пораженности семян возбудителями черного зародыша.

Наибольшую методическую сложность при выявлении *Bipolaris sorokiniana* методом влажной камеры представляло развитие на семенах спороношений видов *Drechslera teres* (до 16,2%) и *Drechslera graminea* (до 3,1%). Конидии у видов рода *Bipolaris* и видов рода *Drechslera* чрезвычайно похожи, в связи чем, длительное время они рассматривались в составе единого рода *Helminthosporium*. Поэтому без

детального исследования конидии видов рода *Drechslera* могут быть ошибочно диагностированы как конидии *Bipolaris sorokiniana* [107; 158-160; 165].

Надежным критерием, позволяющим различить *B. sorokiniana* и виды рода *Drechslera* является морфология основания спор. У представителей рода *Drechslera* основание конидий обычно округлое с плоским, практически незаметным рубчиком; у *Bipolaris* – сужающееся, слегка заостренное, обычно с хорошо заметным рубчиком (рис. 5.4). Кроме того, споры *B. sorokiniana* могут быть цилиндрическими, яйцевидными или эллипсовидными и обычно окрашены в тёмно-бурый, почти черный цвет. В противоположность им, конидии *Drechslera graminea* и *Drechslera teres* исключительно цилиндрические и имеют более светлую окраску [33; 158-160; 188; 190; 230].

Помимо фитопатогенных грибов на исследуемых семенах ячменя во влажной камере единично формировались колонии ряда сапротрофных плесневых грибов: *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. (= *R. nigricans* Ehrenb), *Mucor elegans* Eidam., *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus fumigatus* Fresen., *Aspergillus parasiticus* Speare, *Aspergillus clavatus* Desm. и *Penicillium verrucosum* Dierckx. По нашему мнению, ввиду низкой частоты обнаружения, присутствие этих видов не оказывало существенного влияния на выявление возбудителей черного зародыша.

Опираясь на полученные данные, мы считали необходимым детально проанализировать частоты выделяемости двух доминирующих видов фитопатогенных грибов: *A. alternata* и *B. sorokiniana*. Обобщенная диаграмма пораженности семян 38 сортов и гибридов ярового ячменя возбудителями черного зародыша в условиях влажной камеры представлена на рисунке 5.8, а первичные данные, на основании которых была построена диаграмма, приведены в приложении В 11.

Из диаграммы следует, что на семенах всех без исключения сортов и гибридов обильно развивались как *A. alternata*, так и *B. sorokiniana* с количественным преобладанием альтернариозного компонента. Так, в среднем на 58,0% семян был обнаружен грибок *A. alternata*, 6,2% – *B. sorokiniana*, 21,3% – оба гриба одновременно

и лишь 14,5% семян не имели признаков заболевания. Суммарная пораженность семян черным зародышем для некоторых сортов, таких как Одесский 100, Незалежный, Оренбургский 16, Нектор, Hadmerslebener, Паллидум 107 достигала 100%.

С помощью метода влажной камеры нами было выявлено, что для различных сортов и гибридов пораженность грибом *A. alternata* варьировала в пределах 43,7 – 99,7%, а *B. sorokiniana* в пределах 0,9 – 80,3 %. Корреляции между пораженностью семян одних и тех же сортов и гибридов ячменя этими возбудителями установлено не было (коэффициент корреляции 0,26).

Коэффициент корреляции между пораженностью семян грибом *B. sorokiniana* и суммарной пораженностью этих же семян черным зародышем составил всего 0,43. В то же коэффициент корреляции между пораженностью семян грибом *A. alternata* и суммарной пораженностью черным зародышем составил 0,94. Таким образом, метод влажной камеры позволил установить, что основной вклад в развитие черного зародыша семян всех исследованных сортов и гибридов ячменя вносил альтернариозный компонент инфекции.

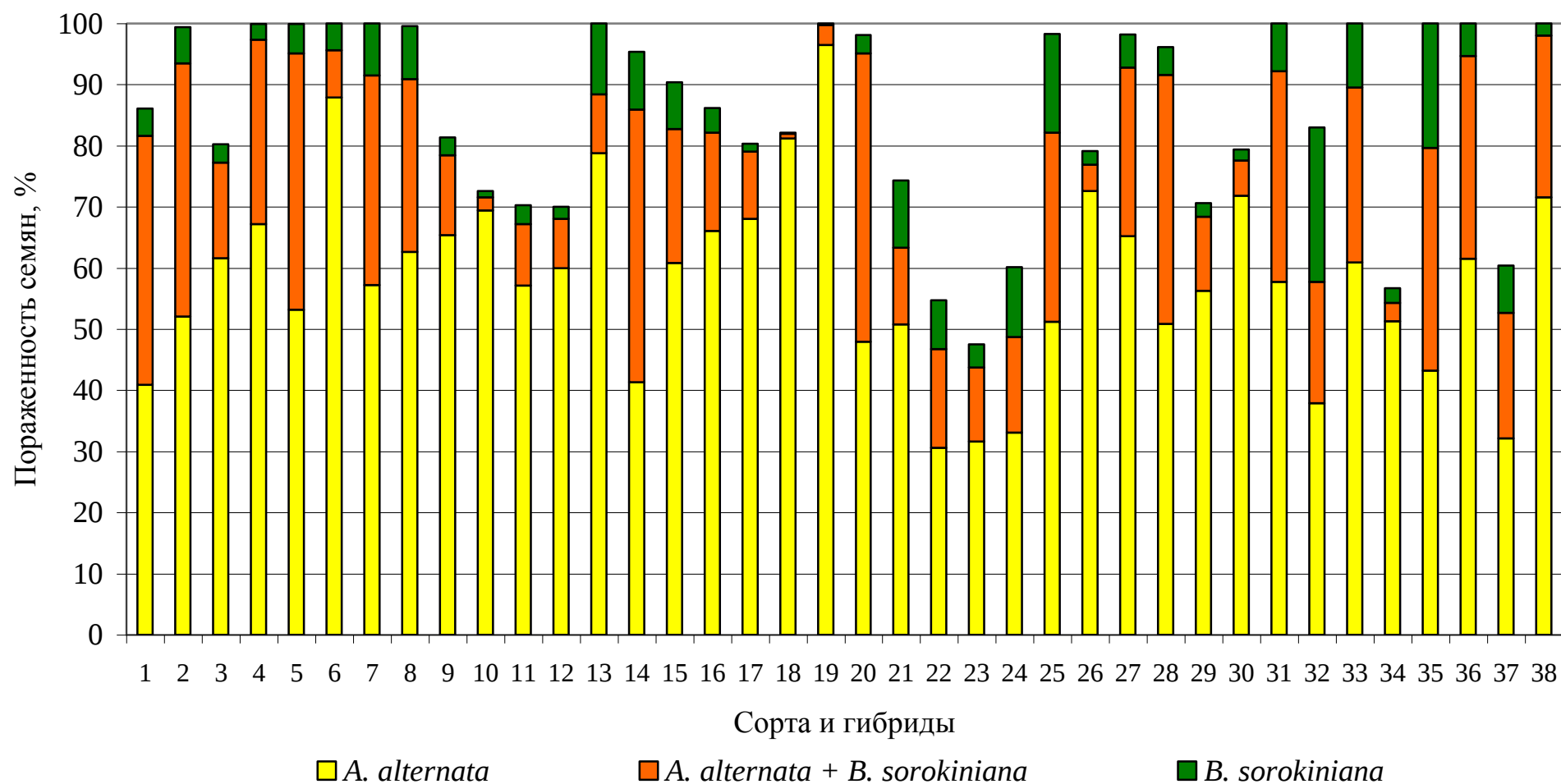


Рис. 5.8. Пораженность семян ярового ячменя грибами *Alternaria alternata* и *Bipolaris sorokiniana* (метод влажной камеры)

Сравнение результатов, полученных с помощью метода визуальной оценки и метода проращивания семян во влажной камере, показало, что с помощью первого метода одновременно оцениваются как минимум два самостоятельных и широко распространенных заболевания зерна – альтернариоз, вызываемый *A. alternata* и гельминтоспориоз, вызываемый *B. sorokiniana*. Установлено, что метод влажной камеры дает обобщенные данные о пораженности семян черным зародышем, но не позволяет селективно определить степени развития *A. alternata* и *B. sorokiniana*. Визуальный метод диагностики черного зародыша семян не позволяет сделать выводы ни о видовом составе грибов-возбудителей, ни о степени их развития в семенах. Как показал проведенный нами эксперимент, основной причиной возникновения чернозародышевости семян может быть *A. alternata*, поэтому данные о степени почернения покровов семян не могут использоваться для прогноза развития *B. sorokiniana* при их последующем посеве, расчета возможных потерь урожая, поиске устойчивых к гельминтоспориозу форм и решении ряда других научных и прикладных вопросов.

Суммируя вышесказанное, можно прийти к заключению, что, по сравнению с методом визуального осмотра, метод влажной камеры имеет ряд существенных преимуществ. В частности, он позволяет дифференцированно оценить пораженность семян грибами *A. alternata* и *B. sorokiniana*, а также выявить, по крайней мере, часть скрытой семенной инфекции. Крупным недостатком этого диагностического метода является то, что он позволяет оценить лишь пораженность семян возбудителями черного зародыша (количество инфицированных семян) и малопригоден для оценки степени развития альтернариоза и гельминтоспориоза.

Из литературы известно, что локализация мицелия *A. alternata* и *B. sorokiniana* в чернозародышевых семенах несколько различается. Так, первый гриб развивается исключительно в покровах зерновки, а второй может инфицировать различные структуры семени от покровов до зародыша [28; 124; 236]. Мы предположили, что при проращивании семян во влажной камере в первую очередь развивается мицелий и спороношение грибов, ассоциированных с

покровами. Поэтому, сильное поражение семян грибом *A. alternata* может помешать полному выявлению локализованной глубоко внутри семян инфекции *B. sorokiniana* и не позволить определить их истинную пораженность.

Занижение данных о глубокой семенной инфекции *B. sorokiniana* может быть дополнительным большим недостатком метода влажной камеры. Чтобы подтвердить или опровергнуть последнее предположение было проведено сопоставление данных о пораженности семян *B. sorokiniana*, полученных методом влажной камеры, а также микробиологическим и рулонным методами диагностики.

5.4. Микробиологический метод диагностики

Широко распространенным методом диагностики *B. sorokiniana* в семенах является микробиологический метод. Он основан на проращивании семян на поверхности питательного агара. При этом по прошествии нескольких суток культивирования на питательной среде вокруг семян начинают развиваться колонии возбудителей, которые могут быть идентифицированы [86; 93; 185; 281].

Важнейшим условием использования микробиологического метода диагностики является поверхностная стерилизация семян. Так, на поверхности семян хлебных злаков обычно массово содержатся споры различных видов плесневых грибов [81; 308]. В условиях влажной камеры споры грибов с поверхности семян не имеют дополнительного источника питательных веществ, кроме тех, что содержатся внутри самих спор. Единственным условием для их развития является проникновение мицелия в покровы зерновки и последующая ее колонизация. Поэтому при использовании метода влажной камеры наличие спор различных плесневых грибов на поверхности семян не оказывает ощутимого воздействия на развитие внутренней семенной инфекции. В случае раскладывания поверхностно-инфицированных семян на питательный агар споры с поверхности семян получают селективные преимущества перед внутренней семенной инфекцией, быстро прорастают и образуют обширные колонии. В итоге, без проведения поверхностной стерилизации, внешняя семенная инфекция существенно затрудняет выявление внутренней [295; 402].

В соответствии с общепринятой методикой, для уничтожения внешней семенной инфекции в течение пяти минут мы выдерживали семена в 1% водном растворе гипохлорита натрия, а затем на протяжении часа промывали их в проточной воде. После стерилизации поверхности, по аналогии с методом влажной камеры, мы раскладывали семена на питательный агар в чашки Петри и по прошествии пяти суток инкубирования в термостате производили учет их пораженности черным зародышем. Данные, о пораженности семян грибами *B. sorokiniana* и *A. alternata*, полученные микробиологическим методом диагностики, обобщены в таблице 5.3.

Как следует из таблицы, пораженность семян грибом *A. alternata* варьирует в пределах 35,9% (сорт Каштан) – 84,7% (сорт Паллидум 107) и составляет в среднем 67,1%, что в 1,2 раза ниже, чем при использовании метода влажной камеры. Коэффициент корреляции между данными о пораженности семян альтернариозом, полученными с использованием метода влажной камеры и микробиологического метода, очень высок и составляет 0,98. Таким образом, оба метода при данном способе протравливания семян позволяют получить сопоставимые результаты.

Для гриба *B. sorokiniana* при пятиминутном протравливании семян раствором гипохлорита натрия была выявлена та же тенденция, что и в случае с грибом *A. alternata*. При этом максимальная пораженность семян этим возбудителем составляет 47,4% (Сложный гибрид 6631), а минимальная 3,0 % (сорт Оренбургский 16). Усредненная пораженность семян грибом *B. sorokiniana* после пятиминутного протравливания составила 20,4%, что в 1,4 раза ниже, чем при использовании метода влажной камеры. Коэффициент корреляции между данными о пораженности семян *B. sorokiniana*, полученными с использованием метода влажной камеры и микробиологического метода, также высок и составляет 0,84.

Сравнение результатов применения метода влажной камеры и микробиологического метода при режиме стерилизации пять минут позволило обнаружить конкурентные взаимоотношения между *A. alternata* и *B. sorokiniana* в покровах семян. Как следует из таблицы 5.3 и рисунка 5.8 на семенах тех сортов и гибридов, где пораженность альтернариозом была максимальной, пораженность грибом *B. sorokiniana* оказывалась более низкой, чем при использовании метода влажной камеры. Для тех же сортов и гибридов, где пораженность альтернариозом была минимальной, пораженность грибом *B. sorokiniana* оставалась примерно на том же уровне, что и при использовании метода влажной камеры или даже возрастала. Именно этим, по нашему мнению, определяется очень высокий коэффициент корреляции – 0,98 при сравнении данных пораженности семян грибом *A. alternata*, и более низкий – 0,84 для *B. sorokiniana*.

Таблица 5.3

Пораженность семян различных сортов и гибридов ячменя грибами
B. sorokiniana и *A. alternata* (микробиологический метод диагностики)

№ пп	Сорт / гибрид	Пораженность, %			
		Протравливание в течение 5 минут		Протравливание в течение 15 минут	
		<i>A. alternata</i>	<i>B. sorokiniana</i>	<i>A. alternata</i>	<i>B. sorokiniana</i>
I	II	III	IV	V	VI
1.	Forester	72,8	18,3	2,3	66,7
2.	Bayer C15599	81,6	26,2	5,7	78,2
3.	Гранал (Безостый 1)	64,3	15,6	0,0	39,4
4.	CI 13664	83,2	16,7	4,6	41,8
5.	Одесский 131	78,0	31,3	4,0	61
6.	Одесский 100	76,6	14,7	0,7	22,6
7.	Донецкий 124	72,6	29,6	0,0	71,8
8.	Омский 88	79,4	28,8	3,9	39,3
9.	Сл. гибрид 6729	67,5	21,5	0,0	26,7
10.	Kraaj 71-509	62,4	10,3	0,0	21,9
11.	Темп	56,5	17,2	0,0	83,5
12.	Allier 63	62,2	9,8	0,0	50,4
13.	Незалежный	72,5	11,1	1,5	54,4
14.	Tregal (CI 6359)	65,7	34,3	0,0	46,3
15.	SV 89300	68,1	19,1	0,0	59,2
16.	Kraaj 66-3910	74,7	14,7	2,1	25,6
17.	Сл. гибрид 6631	64,1	47,4	0,0	86,9
18.	Донецкий 9	65,6	3,2	0,0	19,9
19.	Оренбургский 16	83,1	3,0	2,7	29,3
20.	Heines Naha	81,2	24,6	2,5	76,3
21.	Местный (Ставроп.)	54,2	24,0	0,0	44,4
22.	Chariot	40,3	22,5	0,0	79,8
23.	Одесский 115	38,6	16,8	0,0	42,1

Таблица 5.3 (продолжение)

I	II	III	IV	V	VI
24.	Каштан	35,9	31,7	0,0	98,3
25.	Сл. гибрид 6902	70,3	21,9	0,0	37,9
26.	Звершення	64,7	6,0	0,0	38,6
27.	Спомин	78,7	18,6	1,7	56,7
28.	Сл. гибрид 6722	78,9	18,3	0,0	36,7
29.	Line TR-226	58,6	14,7	0,0	45,6
30.	Inis	71,0	6,0	0,5	52,6
31.	Сл. гибрид 6613	80,7	25,2	3,2	58,1
32.	Panda	50,5	38,7	0,0	70
33.	Hector	75,7	34,5	1,7	57
34.	Excel	42,5	8,5	0,0	25,3
35.	Hadmerslebener	67,6	33,3	1,3	83,2
36.	Prisma AFP ² /802	77,9	14,7	2,0	75,6
37.	Донецкий 12	48,0	26,7	0,0	80
38.	Паллидум 107	84,7	17,5	4,9	74,3
В среднем по сортам и гибридам		67,1	20,4	0,4	54,1
НСР _{0,05}		5,2	4,6	0,1	5,4

Опираясь на полученные данные, мы пришли к выводу, что интенсивно развивающийся на поверхности семян мицелий *A. alternata* мешает развитию внутренней семенной инфекции *B. sorokiniana*. Однако, в целом, метод влажной камеры и микробиологический метод диагностики черного зародыша семян при протравливания семян в течение пяти минут позволили получить сопоставимые результаты.

Незначительное занижение пораженности семян возбудителями черного зародыша (в 1,2 раза для *A. alternata* и 1,4 раза для *B. sorokiniana*) при использовании микробиологического метода диагностики, по нашему мнению, связано с негативным воздействием на грибы раствора гипохлорита натрия. Мы полагаем, что во время обработки семян дезинфицирующим раствором происходит постепенная пропитка протравителем покровов зерновки. В итоге, одновременно с уничтожением спор грибов на поверхности семян происходит подавление развития грибов, ассоциированных с их покровами. Мы предположили, что увеличение времени протравливания семян приведет к полному уничтожению мицелия грибов, который развивается в покровах зерновки.

Согласно многочисленным литературным данным, мицелий *Bipolaris sorokiniana* может быть локализован глубоко внутри семян, и именно этот компонент семенной инфекции наиболее вредоносен для растений и реализуется в виде гельминтоспориозной корневой гнили [107; 113; 128; 151; 280]. Для облегчения выделения глубокой семенной инфекции *B. sorokiniana* мы модифицировали традиционно использующуюся методику протравливания семян, увеличив срок их обработки раствором гипохлорита натрия с пяти до пятнадцати минут. При изменении режима протравливания семян мы исходили из того, что развитие мицелия *A. alternata* из покровов семян мешает развитию глубокой семенной инфекции. Поэтому, мы предположили, что полное уничтожение инфекции, ассоциированной с покровами семян, позволит облегчить обнаружение возбудителей, локализованных внутри семян.

Увеличение срока протравливания семян раствором гипохлорита натрия до пятнадцати минут действительно привело к существенному подавлению альтернариоза, вплоть до полного уничтожения инфекции (см. таблицу 5.3). Так, в ответ на более длительное протравливание семян, 20 из 38 исследованных сортов и гибридов ярового ячменя оказались полностью лишены альтернариозной инфекции, а средняя пораженность семян грибом *A. alternata* составила всего 0,4%.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым гриб *A. alternata* ассоциирован с семенами хлебных злаков исключительно в виде конидий гриба на поверхности семян, а также мицелия, который развивается в их покровах. Поэтому пропитка покровов семян дезинфицирующим раствором приводит к полному уничтожению мицелия и спор этого вида [63; 483].

Увеличение времени протравливания семян до пятнадцати минут привело к значительному возрастанию доли семян, из которых выделился *B. sorokiniana* (в 2,7 раза) на фоне полного отсутствия или слабого развития *A. alternata*. Так, средняя пораженность семян изучаемых сортов и гибридов грибом *B. sorokiniana* при протравливании в течение 15 минут составила 54,1% по сравнению с 20,4% при протравливании в течение 5 минут (см. рис. 5.11).

По нашему мнению усиление развития гельминтоспориозной инфекции при увеличении срока протравливания семян обусловлено тем, что, в отличие от *A. alternata*, гриб *B. sorokiniana* может развиваться не только в покровах зерновки, но и глубоко внутри семян, вплоть до зародыша. Длительное протравливание семян полностью убивает мицелий обоих видов грибов, который находится в покровах зерновки, однако не затрагивает ту часть семенной инфекции, которая локализована глубоко внутри семян. Коэффициент корреляции между пораженностью семян одних и тех же сортов и гибридов грибом *B. sorokiniana* при разных режимах протравливания составил всего 0,58, что подтверждает обнаруженное ранее значительное угнетающее влияние *A. alternata* на проявление внутренней семенной инфекции *B. sorokiniana*.

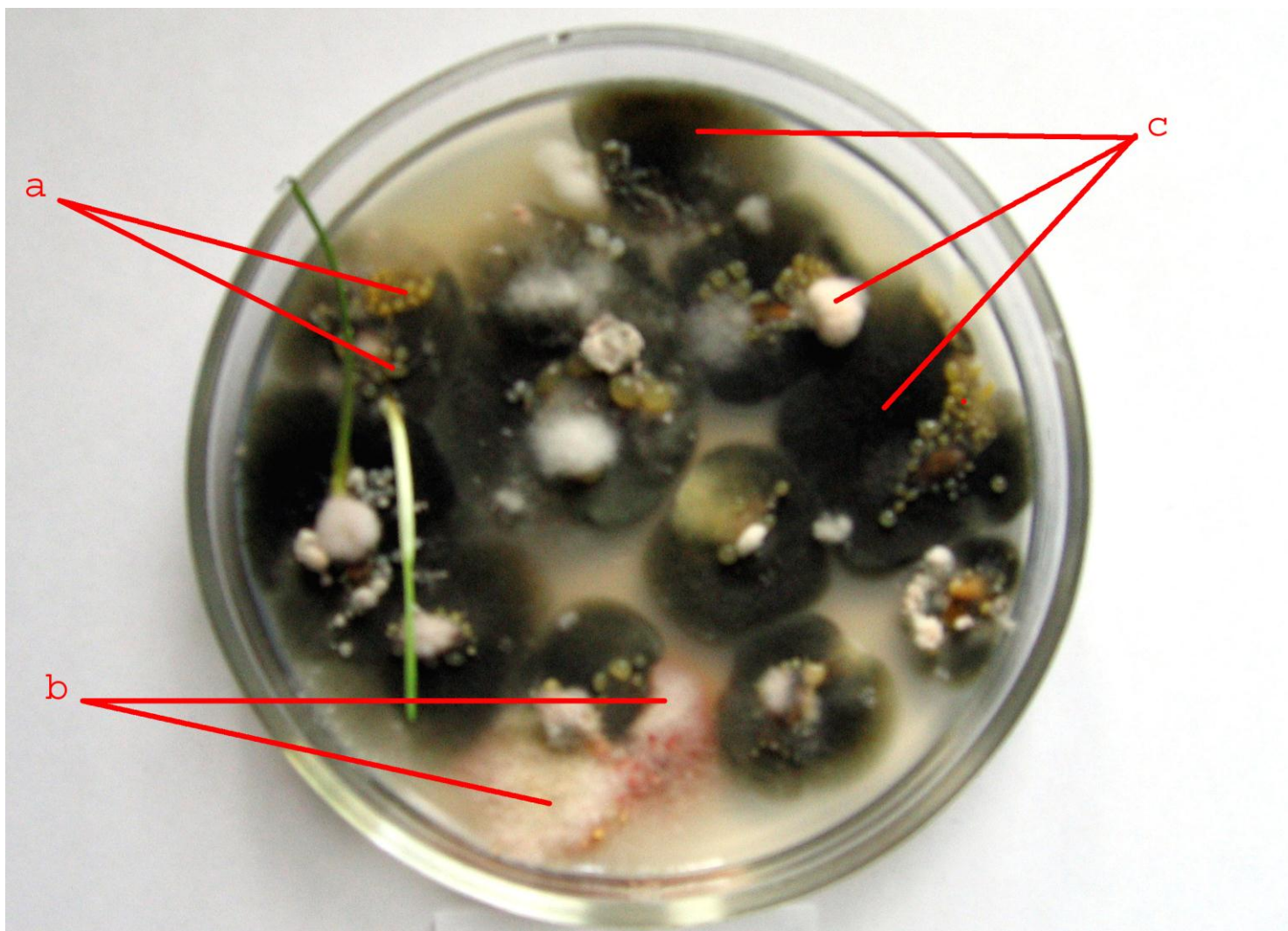


Рис. 5.10. Развитие колоний грибов и бактерий из семян сложного гибрида 6631 (микробиологический метод диагностики, протравливание в течение 15 минут)

Примечание: а – колонии бактерий, b – *Fusarium moniliforme*, c – *Bipolaris sorokiniana*

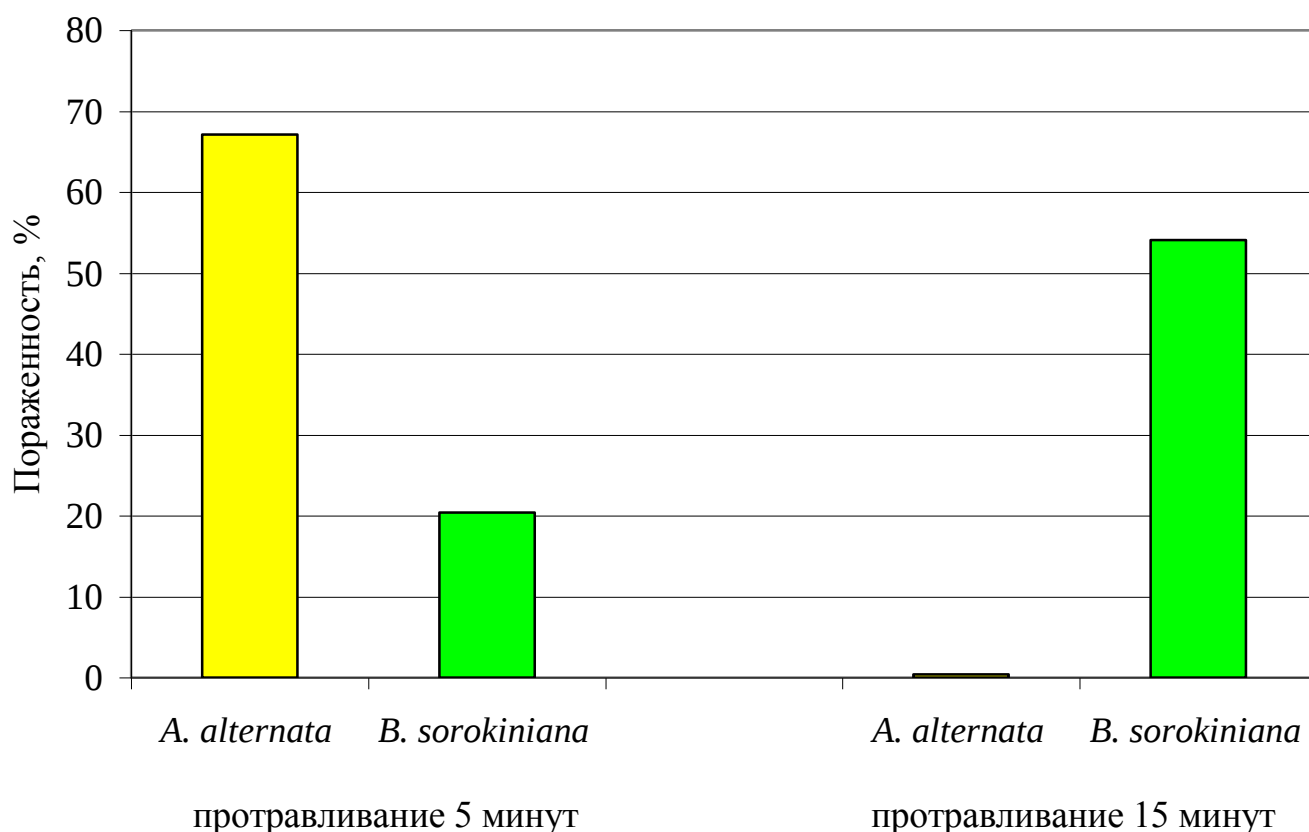


Рис. 5.11. Средняя пораженность семян различных сортов и гибридов ярового ячменя грибами *B. sorokiniana* и *A. alternata* при разных режимах протравливания

Опираясь на полученные данные, мы пришли к заключению, что интенсивное развитие колоний *A. alternata*, которые вырастают из покровов зерна, не позволяет развиваться той части инфекции, которая локализована глубоко внутри семян. Уничтожение мицелия грибов, ассоциированных с покровами семян, предоставляет возможность для развития внутренней семенной инфекции, что нашло отражение в усилении развития *B. sorokiniana*.

Длительное протравливание семян приводит к существенному снижению их всхожести. В связи с этим, не вызывает сомнения, что сильно ослабленные или убитые семена утрачивают способность противостоять развитию внутри них инфекционных грибов, что также способствует максимальному проявлению внутренней семенной инфекции. Таким образом, максимальное проявление внутренней инфекции при длительном протравливании семян может быть обусловлено двумя основными причинами: подавлением развития грибов-

конкурентов (в первую очередь, *A. alternata*) и снижением сопротивляемости растений развитию внутренней семенной инфекции.

Обобщая вышесказанное, мы можем прийти к заключению, что диагностические возможности микробиологического метода анализа пораженности семян хлебных злаков существенно зависят от режима стерилизации их поверхности. При краткосрочном протравливании семян этот метод дает результаты, сопоставимые с результатами использования метода влажной камеры. При этом удастся выявить преимущественно ту часть инфекции, которая ассоциирована с покровами зерновки.

Увеличение срока протравливания семян приводит к полному подавлению инфекции, ассоциированной с покровами, ослаблению растений, и, как следствие, максимальному проявлению той части инфекции, которая локализована глубоко внутри семян. При этом результаты анализа, полученные с помощью метода влажной камеры и микробиологического метода, полностью несопоставимы.

5.5. Рулонный метод диагностики

В практике семенного контроля широко используются косвенные методы диагностики, когда вывод о пораженности семян делается на основании данных о пораженности выросших из них проростков. Примером такого метода, который активно используется для экспресс-диагностики развития черного зародыша, является рулонный метод [10; 15; 22; 42; 127; 204; 376].

Этот метод основан на проращивании семян в туго свёрнутых рулонах фильтровальной бумаги, помещённых в вертикальном положении в питательный раствор. После нескольких суток культивирования на поверхности корней и влагалищах листьев в прикорневой зоне появляются бурые некротические пятна. По мнению авторов метода, сведения о степени пораженности проростков свидетельствуют о степени развития *Bipolaris sorokiniana* в семенах [22; 28; 41; 42; 125; 376].

В отличие от проращивания семян во влажной камере, этот метод позволяет создать оптимальные условия аэрации и влажности, что благоприятно сказывается на прорастании семян. Так, в закрытых микробиологических сосудах семена обычно увлажняются лишь с одной стороны и лишены притока воздуха, что снижает их энергию прорастания и всхожесть [10].

По мнению ряда авторов, рулонный метод позволяет определить не только инфекцию *B. sorokiniana*, локализованную в покровах зерновки, но и ту ее часть, которая локализована в зоне зародыша, так как глубоко инфицированные семена дают наиболее пораженные всходы либо не всходят вообще [28; 60; 151; 295; 345].

В таблице 5.4 представлены данные о пораженности проростков 38 сортов и гибридов ярового ячменя, выращенных в рулонах. В первой колонке таблицы отображены данные о пораженности влагалищной части листа проростка, во второй – корней, а в третьей – данные общей пораженности проростков. Как видно из таблицы, средняя пораженность проростков для различных сортов и гибридов сильно варьировала. Пораженность влагалищной части листа варьировала в пределах 0,5 – 51,5% (в среднем 22,1%), а корней в пределах 0,9 –

73,1% (в среднем 31,2%). В ряде случаев поражение корней сопровождалось одновременным поражением влагалищной части листа, благодаря чему общая пораженность проростков варьировала в пределах 1,3 – 81,3% (в среднем 37,4%).

Коэффициент корреляции между пораженностью корней и влагалищной части листа составил 0,55, влагалищной частью листа и общей пораженностью – 0,70, а пораженностью корней и общей пораженностью – 0,92. Таким образом, отчетливо видно, что наибольший вклад в общую пораженность проростков вносит пораженность корней, а пораженность влагалищной части листа лишь сопутствует первому заболеванию.

Представляет значительный интерес сравнить данные, полученные методом проращивания семян в рулонах, с данными рассмотренных ранее методов диагностики. Как и следовало ожидать, пораженность проростков достоверно не коррелирует со степенью почернения покровов зерновок (коэффициент корреляции 0,06). По нашему мнению, это обусловлено тем, что основной причиной почернения покровов исследованных семян был альтернариозный компонент. В связи с тем, что гриб *A. alternata* не способен вызывать загнивание всходов, данные, полученные с помощью рулонного и визуального методов диагностики, абсолютно не коррелируют.

При сравнении результатов рулонного метода и метода влажной камеры получен значительно более высокий коэффициент корреляции – 0,52. Однако он также недостаточен для того, чтобы сделать вывод о тождественности сравниваемых методов диагностики.

При сравнении данных о пораженности семян *B. sorokiniana*, полученных рулонным методом и микробиологическим методом, были получены коэффициенты корреляции – 0,48 для режима протравливания 5 минут и 0,88 для режима протравливания 15 минут. Значения коэффициентов корреляции для всех сравниваемых методов диагностики приведены в обобщающей таблице 5.5.



Рис. 5.12. Развитие семенной инфекции при проращивании семян ярового ячменя в рулонах

Таблица 5.4

Поражённость проростков различных сортов и гибридов ярового ячменя
(рулонный метод диагностики)

№ пп	Сорт / гибрид	Поражённость, %		
		влагалищная часть листа	корни	общая поражённость
I	II	III	IV	V
1.	Forester	30,3	51,7	55,3
2.	BayerC15599	21,1	62,2	66,3
3.	Гранал (Безостый 1)	15,4	35,6	35,6
4.	CI 13664	20,7	27,6	34,5
5.	Одесский 131	43,5	52,2	52,2
6.	Одесский 100	11,7	18,9	18,9
7.	Донецкий 124	12,7	43,6	49,0
8.	Омский 88	16,0	32,0	32,0
9.	Сл. гибрид 6729	5,8	17,2	18,1
10.	Kraaj 71-509	0,6	3,4	3,4
11.	Темп	51,5	41,2	63,2
12.	Allier 63	24,6	37,7	40,2
13.	Незалежный	26,2	39,6	41,1
14.	Tregal (CI6359)	9,5	1,4	10,0
15.	SV 89300	22,0	30,7	31,5
16.	Kraaj 66-3910	10,8	3,6	10,8
17.	С. гибрид 6631	43,0	56,8	83,3
18.	Донецкий 9	0,5	0,9	1,3
19.	Оренбургский 16	12,7	9,9	12,7
20.	Heines Naha	43,8	34,7	43,8
21.	Местный (Ставроп.)	14,4	17,1	17,1
22.	Chariot	30,9	47,8	55,8

Таблица 5.4 (продолжение)

I	II	III	IV	V
---	----	-----	----	---

23.	Одесский 115	28,8	2,6	28,8
24.	Каштан	35,5	20,5	47,8
25.	Сл. гибрид 6902	14,7	9,9	14,7
26.	Звершения	10,3	17,1	17,9
27.	Спомин	29,6	35,6	35,6
28.	Сл. гибрид 6722	16,0	8,0	16,0
29.	Line TR-226	22,2	22,2	22,2
30.	Inis	49,4	44,2	49,4
31.	Сл. гибрид 6613	22,2	46,5	46,5
32.	Panda	24,8	37,4	49,3
33.	Hector	19,6	20,0	41,0
34.	Excel	6,2	15,6	16,1
35.	Hadmerslebener	30,4	48,8	63,6
36.	PrismaAFP ² / 802	24,3	73,1	78,1
37.	Донецкий 12	17,7	58,4	58,4
38.	Паллидум 107	19,9	60,0	60,0
В среднем по сортам и гибридам		22,1	31,2	37,4
НСР _{0,05}		5,5	6,1	5,9

Полученные коэффициенты наглядно демонстрируют, что при кратковременном протравливании семян (равно как и при использовании метода влажной камеры) удаётся выявить в первую очередь ту часть семенной инфекции, которая локализована в покровах семян. В то же время, интенсивное загнивание всходов в рулонах является результатом проявления глубокой семенной инфекции, которая локализована в зоне зародыша.

Важной причиной неполного соответствия результатов рулонного и микробиологического методов диагностики, по нашему мнению, является наличие сопутствующих инфекций семян, в первую очередь, фузариозной. Из литературы хорошо известно, что семена хлебных злаков часто оказываются инфицированными видами рода *Fusarium*. При этом в отличие от *A. alternata*, для фузариев характерна способность инфицировать проростки [26; 28].

В анализируемых нами образцах рядом с побуревшими проростками ячменя иногда появлялся мицелий и конидии видов рода *Fusarium* (преимущественно *Fusarium moniliforme* J. Sheld (= *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg), что свидетельствовало о фузариозной природе их поражения. В подавляющем большинстве случаев на фильтровальной бумаге рядом с инфицированным фузарием проростком формировались бледно-розовые, желто-бурые или фиолетовые пятна.

Очевидно, что факт поражения проростка не может свидетельствовать о том, что он инфицирован именно *B. sorokiniana*, а факт наличия в проростке мицелия того или иного вида фузария не исключает возможности наличия там же и *B. sorokiniana*. Поэтому, по нашему мнению, рулонный метод позволяет обобщенно охарактеризовать степень развития фузариозно-гельминтоспориозной инфекции и мало пригоден для дифференцированного определения пораженности растений этими патогенами. Очевидно, что при относительно низкой инфицированности семян фузариями можно наблюдать достаточно высокое соответствие между результатами, полученными при использовании метода влажной камеры и метода проращивания семян в рулонах. Однако, ясно и то, что сильная инфицированность

семян фузариями делает результаты этих двух методов диагностики полностью несопоставимыми.

Другой важной причиной несоответствия результатов сравниваемых методов является то, что всхожесть анализируемых семян редко составляет 100%, а при рулонном методе диагностики учитывается состояние проростков. Соответственно, по мере возрастания доли невсхожих семян в пробе точность результатов рулонного метода диагностики резко снижается. Обычно невсхожие семена формально относят к максимально пораженным, которые из-за сильного инфицирования патогенами утратили способность прорасти. Однако, на наш взгляд, такой подход не вполне оправдан. Существует масса причин, из-за которых семена могут оказаться невсхожими, и нет никаких оснований приписывать невсхожесть семян интенсивному развитию в них фитопатогенов. Даже появление на поверхности невзошедших семян мицелия *B. sorokiniana* не может считаться убедительным основанием для того, чтобы связывать их невсхожесть с этим патогеном. В итоге, по нашему мнению, одной из основных причин неполного соответствия результатов рулонного метода диагностики с результатами метода влажной камеры является наличие невсхожих семян в анализируемых образцах.

Обобщая вышесказанное, мы считаем, что неполное соответствие результатов применения рулонного метода диагностики с результатами, полученными с помощью метода влажной камеры и микробиологического метода обусловлено: неполным проращением семян, наличием сопутствующей фузариозной инфекции и неодинаковой ролью глубокой и поверхностной инфекции *B. sorokiniana* в загнивании проростков.

Многочисленные исследователи отдают предпочтение рулонному методу диагностики в связи с тем, что с его помощью определяется реальное состояние всходов, выросших из больных семян. Они предполагают, что на основании данных о загнивании всходов, выросших в рулонах, можно сделать наиболее реалистичный прогноз последующего развития гельминтоспориоза в полевых условиях [28; 60; 151; 295; 345].

Анализ полученных нами результатов показал, что это предположение нуждается в уточнении. Так, необходимо обратить особое внимание на тот факт, что при использовании рулонного метода диагностики основная часть инфекции *B. sorokiniana* реализуется в виде загнивания корешков. В то же время, в предыдущей главе нами было показано, что в естественных условиях на корнях реализуется преимущественно фузариозная инфекция, а *B. sorokiniana* колонизует под- и околоземную часть стеблей. Полученные различия, вероятно, связаны с тем, что *B. sorokiniana* не обладает органотропной специализацией и в лабораторных условиях может в одинаковой степени колонизовать любую часть растения. В природных условиях под совокупным воздействием различных экологических факторов возможности для колонизации всех частей проростков очень ограничены.

Также важно обратить внимание на то, что при посеве чернозародышевых семян в почву первые симптомы почернения всходов обычно проявляются лишь через 2 – 2,5 недели на восприимчивых сортах и примерно через 4 недели – на устойчивых [66; 146; 209]. В случае же использования рулонного метода диагностики всходы начинают активно загнивать с момента их прорастания.

В третьей главе работы мы указывали, что в семенах количественно преобладают длинноспоровые изоляты, а корневая гниль вызывается преимущественно короткоспоровыми. Тем самым, очевидно, что не вся семенная инфекция реализуется в природе в виде гельминтоспориозной корневой гнили. Поэтому, как и следовало ожидать, коэффициенты корреляции между данными о пораженности исследованных сортов и гибридов, полученные рулонным способом, а также степенями развития фузариоза и гельминтоспориоза на взрослых растениях оказались очень низкими и не превышают 0,33.

Таким образом, согласно нашим результатам, проявление инфекции при проращивании семян в рулонах не может служить надежной моделью при прогнозировании развития инфекции в полевых условиях. Данные о загнивании всходов в рулонах могут свидетельствовать о пораженности семян грибами-возбудителями, однако, нет никаких оснований отождествлять загнивание всходов в рулонах и загнивание проростков и взрослых растений в полевых условиях. В

результате анализа всех рассмотренных выше лабораторных методов диагностики мы можем прийти к заключению, что степень инфицированности семян является важным, но не единственным определяющим фактором при последующем развитии гельминтоспориозной корневой гнили.

Подводя итог данному этапу исследований, необходимо отметить, что в семенах ярового ячменя, выросших в условиях Харьковской области нами были обнаружены фитопатогенные грибы: *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera teres* и *Drechslera graminea*. Выявлено, что основной причиной заболевания всех исследованных семян ячменя был гриб *A. alternata*, пораженность которым составляла в среднем 79,2% и варьировала в пределах 43,7 – 99,7%.

Сравнительный анализ данных о пораженности семян 38 сортов и гибридов ярового ячменя грибом *B. sorokiniana* и последующего развития на растениях гельминтоспориозной корневой гнили показал, что степень инфицированности посевного материала возбудителем является важным, но не единственным фактором, определяющим последующее развитие корневой гнили. Высокой корреляционной зависимости между этими показателями нам обнаружить не удалось.

При использовании визуального метода диагностики невозможно дифференцировать альтернариозный и гельминтоспориозный компоненты черного зародыша, а также выявить скрытую семенную инфекцию. При использовании этого

Таблица 5.5

Сравнительная характеристика основных методов диагностики *B. sorokiniana*
в семенах ярового ячменя (по коэффициенту корреляции Пирсона)

Метод диагностики	Влажной камеры	Микробиологический (стерилизация 5 мин).	Микробиологический (стерилизация 15 мин)	Рулонный
Рулонный	0,52	0,48	0,88	1
Микробиологический (стерилизация 5 мин)	0,84	1		
Микробиологический (стерилизация 15 мин).	0,58	0,56	1	
Влажной камеры	1			

метода значительное влияние на выявление семенной инфекции оказывает режим хранения семян.

При применении метода влажной камеры и микробиологического метода диагностики возможно дифференцированно оценить пораженность семян грибами *B. sorokiniana* и *A. alternata*, а также выявить целый ряд сопутствующих инфекций. Однако полученные результаты значительно различаются в зависимости от выбора метода, а также режима протравливания семян.

С помощью метода влажной камеры можно обнаружить преимущественно ту часть инфекции, которая ассоциирована с покровами зерновки, поэтому при интенсивном развитии *A. alternata* в покровах полученные данные о пораженности семян *B. sorokiniana* оказываются заниженными. Сходные результаты позволяет получить микробиологический метод анализа с режимом стерилизации поверхности семян в течение пяти минут. Поэтому коэффициент корреляции Пирсона между значениями пораженности семян грибом *B. sorokiniana* для исследованных 38 сортов и гибридов ярового ячменя, полученными с помощью вышеупомянутых методов достаточно высок и составляет 0,84 (таблица 5.5).

Экспериментально доказано, что увеличение срока протравливания семян до 15 минут приводит к практически полному подавлению той части семенной инфекции, которая ассоциирована с покровами зерновки. Поэтому микробиологический метод анализа с режимом протравливания семян 15 минут позволяет максимально полно охарактеризовать глубокую семенную инфекцию *B. sorokiniana*. В связи с этим, коэффициент корреляции Пирсона между пораженностью исследованных сортов и гибридов ячменя грибом *B. sorokiniana* при различных режимах протравливания составляет всего 0,56 (таблица 5.5).

Использование рулонного метода диагностики не позволяет надежно дифференцировать *B. sorokiniana* и виды рода *Fusarium* и выявляет смешанную фузариозно-гельминтоспориозную инфекцию. Кроме этого, точность результатов рулонного метода анализа резко уменьшается по мере возрастания доли невсхожих семян в анализируемой пробе. При высокой всхожести семян и их незначительной инфицированности сопутствующими фитопатогенами, рулонный метод диагностики

позволяет оценить преимущественно глубокую семенную инфекцию *B. sorokiniana*. В связи с этим, коэффициент корреляции Пирсона между данными о пораженности исследованных семян грибом *B. sorokiniana*, полученными рулонным методом и микробиологическим методом при режиме стерилизации 15 минут достаточно высок и составляет 0,88 (таблица 5.5).

Сравнительный анализ традиционных лабораторных методов диагностики *B. sorokiniana* в семенах, проведенный для семян одних и тех же сортов и гибридов ярового ячменя в одних и тех же условиях позволил выявить низкую сопоставимость получаемых с помощью этих методов результатов. По нашему мнению это может быть основной причиной противоречивости литературных данных о семенной инфекции *B. sorokiniana*, а также закономерностях наследования устойчивости растений к гельминтоспориозам.

Для выявления скрытой семенной инфекции *B. sorokiniana* мы рекомендуем использовать микробиологический метод диагностики с разработанной нами модификацией режима протравливания семян. Мы рекомендуем перед размещением анализируемых семян на дно чашек Петри с агаризованной средой Чапека использовать обеззараживание их поверхности в 1% растворе гипохлорита натрия в течение 15 минут и последующую промывку в проточной воде на протяжении часа. Этот прием позволяет максимально полно оценить глубокую семенную инфекцию *B. sorokiniana* и может быть рекомендован для дальнейшего использования при проведении научных и прикладных фитопатологических исследований.

ВЫВОДЫ

1. Проведенными комплексными исследованиями установлено, что в пределах вида *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorokin) Shoemaker существуют две формы, названные нами длинноспоровая и короткоспоровая. Эти формы отличаются по морфолого-культуральным, физиолого-биохимическим и паразитическим свойствам. Свойства любого изолята *B. sorokiniana* определяются не органом растения, из которого он был выделен, а его принадлежностью к одной из форм.
2. В количественном отношении длинноспоровая форма преобладает на надземных органах растения, а короткоспоровая – на подземных. Частота обнаружения длинноспоровой формы на листьях составляет 85%, семенах – 65%, а корнях – 25%.
3. Надежным критерием для разграничения форм *B. sorokiniana* служит усредненное отношение длины конидий к их ширине. Для длинноспоровой формы при паразитизме этот показатель варьирует в пределах 3,7 – 4,1, а на искусственной среде Чапека – 2,6 – 3,4. Для короткоспоровой формы этот показатель варьирует в пределах 2,8 – 3,4 и 1,9 – 2,5, соответственно.
4. Длинноспоровая форма характеризуется достоверно более высокой скоростью накопления биомассы в чистой культуре, а также активностью эндоглиюканаз, экзоглиюканаз, целлюбиаз и пектиназ на 4-8 сутки культивирования. Токсигенные свойства длинноспоровых изолятов в среднем в 1,8 раза выше, чем короткоспоровых.
5. Формы *B. sorokiniana* существенно отличаются по показателю агрессивности. Для длинноспоровой формы характерна меньшая интенсивность спорообразования на отрезках листьев сортов-дифференциаторов (в среднем в 2,5 раза по сравнению с короткоспоровой), но большая некрозообразующая способность (в среднем 3 балла по сравнению с 2,2 балла у короткоспоровых).
6. Изучен видовой состав возбудителей корневой гнили ярового ячменя в условиях Харьковской области. Установлено, что основными возбудителями

являются *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum*. При паразитизме на ячмене *B. sorokiniana* и *F. graminearum* занимают обособленные экологические ниши: первый возбудитель ассоциирован с основаниями стеблей, а второй – с корнями и узлами кущения. По мере отмирания растений происходит расселение *B. sorokiniana* в корни, а *F. graminearum* – в стебли. В фазу полной спелости на всех подземных и околоземных частях растений количественно преобладает фузариозный компонент.

7. Установлено, что степень загнивания оснований стеблей в фазу восковой спелости свидетельствует о преимущественном развитии гельминтоспориозной корневой гнили, а корней – фузариозной. На основании выявленных особенностей возбудителей предложен метод дифференцированной диагностики возбудителей обыкновенной корневой гнили ярового ячменя.
8. Установлено, что инфекция семян ярового ячменя в условиях Харьковской области представлена комплексом возбудителей. В покровах зерна развиваются преимущественно *Alternaria alternata* и *Bipolaris sorokiniana*, а глубокая семенная инфекция представлена *B. sorokiniana* и видами рода *Fusarium*.
9. На 38 сортах и гибридах ярового ячменя в одних и тех же условиях проведен сравнительный анализ основных методов диагностики черного зародыша: визуального, влажной камеры, микробиологического и рулонного. Установлено, что эти методы позволяют в различной степени выявить различные компоненты семенной инфекции.
10. Для дифференцированной диагностики возбудителей, ассоциированных с покровами семян ячменя, рекомендуется использовать метод влажной камеры и микробиологический метод с режимом стерилизации 1% раствором гипохлорита натрия в течение 5 минут. Для выявления глубокой фузариозно-гельминтоспориозной инфекции семян ячменя рекомендуется использовать рулонный метод диагностики.

11. Установлено, что жизнеспособность инфекции в покровах семян зависит от продолжительности их протравливания. Для количественной диагностики глубокой инфекции *B. sorokiniana* в семенах ячменя мы рекомендуем использовать микробиологический метод анализа с предварительной стерилизацией поверхности 1% раствором гипохлорита натрия в течение 15 минут.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адешивили Т.Ш., Симонян Г.Г., Тарабрин Г.А. Влияние токсинов гриба *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. на фотохимическую активность хлоропластов пшеницы // Физиол. раст.- 1989.- Т. 36, №1.- С. 143-149.
2. Аль-Асас Х. Роль нематод в возникновении корневых гнилей озимой пшеницы в условиях северной части лесостепи Украины: Автореф. дис... канд. биол. наук: 06.01.11 / УкрНИИ защиты растений.- К., 1991.- 24 с.
3. Афанасенко О.С. Методы анализа популяций возбудителя пятнистостей листьев ячменя // Сборник методических рекомендаций по защите растений.- СПб: Изд-во ВНИЗР.- 1998.- С.127-134.
4. Афанасьева М.М. Взаимоотношение гриба *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke с почвенными микроорганизмами: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.05 / МГУ.- М., 1977.- 22 с.
5. Афанасьева М.М. Рост и развитие *Helminthosporium sativum* в почве // Матер. I республиканской конференции «Систематика, экология и физиология почвенных грибов».- К: Наук. думка, 1975.- С. 137-138.
6. Афанасьева М.М. Фунгистатическое действие почвы и выживаемость конидий *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke // Микол. и фитопатол.- 1975.- Т.9, №5.- С. 428-433.
7. Афанасьева М.М., Чулкина В.А. Влияние минеральных удобрений на численность конидий *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke в почве // Микол. и фитопатол.- 1977.- Т. 11, №2.- С. 131-135.
8. Ашмарина Л.Ф. Выживаемость фитопатогенных грибов на растительных остатках // Интегрированная защита с/х культур от болезней и вредителей в Сибири.- Новосибирск: Наука.- 1986.- С. 54-58.
9. Ашмарина Л.Ф. Возрастная восприимчивость яровой пшеницы к токсическим метаболитам *Bipolaris sorokiniana* // Борьба с болезнями сельскохозяйственных культур в Сибири и на Дальнем Востоке.- Новосибирск: Наука.- 1982.- С. 43-48.

10. *Бабаян Р.С.* Проращивание семян в рулонах из фильтровальной бумаги и полиэтиленовой пленки // Сельскохозяйств. биол.- 1981.- Т. 16, №3.- С. 473-475.
11. *Байлей К.А.* Испытание устойчивости ячменя к обычным корневым гнилям с использованием токсинов, производимых *Cochliobolus sativus* // Вестник сельскохозяйств. науки.- 1992.- № 5-6.- С. 56-59.
12. *Беккер З.Э.* Физиология и биохимия грибов.- М. : Изд-во МГУ, 1988.- 227 с.
13. *Бенкен А.А.* Роль растительных выделений в развитии грибных инфекций // Микол. и фитопатол.- 1970.- Т. 4, №4.- С. 383-386.
14. *Бенкен А.А., Гайке М.В., Хацкевич Л.К.* Сетчатый гельминтоспориоз ячменя // Труды IV Всесоюзн. совещ. по иммунитету растений.- К: Наука.- 1969, Т. 5, № 2.- С. 38-42.
15. *Бенкен А.А., Гришечкина С.Д., Хацкевич Л.К.* Упрощённый способ диагностики гельминтоспориозной корневой гнили злаков колосовых культур // Микол. и фитопатол.- 1988.- Т. 22, №2.- С.153-157.
16. *Бенкен А.А., Коршунова А.Ф.* Методические указания по диагностике корневых гнилей хлебных злаков.- Л.: Изд-во ВИЗР, 1977.- 58 с.
17. *Бенкен А.А., Хацкевич Л.К.* Оценка устойчивости растений к почвенным фитопатогенам // Микол. и фитопатол.- 1980.- Т. 14, №6.- 531-538.
18. *Бенкен А.А., Хацкевич Л.К.* Параморфогенные вещества в практике фитопатологических исследований. // Микол. и фитопатол.- 1972.- Т. 6, №2.- С. 174-177.
19. *Бенкен А.А., Хацкевич Л.К.* Почвенная инфекция обыкновенной корневой гнили хлебных злаков // Микол. и фитопатол.- 1976.- Т. 10, №6.- С. 491-496.
20. *Бенкен А.А., Хацкевич Л.К.* Формирование инфекционных зачатков возбудителей корневой гнили зерновых культур // Микол. и фитопатол.- 1976.- Т. 10, №2.- С. 111-117.
21. *Бенкен А.А., Хацкевич Л.К., Нестеров А.Н.* Проблема корневой гнили злаков // Микол. и фитопатол.- 1987.- Т. 21, №6.- 566-573.

22. Бенкен А.А., Хрустовская В.Н. Лабораторная оценка болезнеустойчивости растений и паразитических свойств возбудителей обыкновенной корневой гнили злаков // Труды ВНИИ защиты растений.- 1977.- №56.- С. 9-13.
23. Березина В.Ю., Гурова Т.А. Оценка относительной устойчивости сортов яровой пшеницы к токсинам возбудителя обыкновенной корневой гнили злаков по замедленной флуоресценции // Методы и технические средства исследования физических процессов в сельском хозяйстве.- Ч.1.- Новосибирск: Сиб. физ.-техн. ин-т аграрных проблем.- 1996.- С. 23-27.
24. Билай В.И. Фузариоз: биология и систематика.- К.: Наук. думка, 1977.- 443 с.
25. Болезни сельскохозяйственных культур: В 3 т. / В.Ф. Пересыпкин, Н.Н. Кирик, М.П. Лесовой и др. / Под общ. ред. В.Ф. Пересыпкина.- К.: Урожай, 1989.- Т. 1: Болезни зерновых и зернобобовых культур.- 1989.- 213 с.
26. Буга С.Ф. Многолетняя динамика инфицированности семян ячменя грибами *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. и *Fusarium spp.* в Белоруссии // Микол. и фитопатол.- 1995.- Т. 29, №3.- С. 40-44.
27. Буга С.Ф., Голобоб Т.И. Роль сорта в формировании комплекса патогенов ячменя в Белоруссии // Микол. и фитопатол.- 1998.- Т. 32, №1.- С. 73-77.
28. Буга С.Ф., Лукашик Н.Н. Гельминтоспориоз и посевные качества семян ячменя // Тезисы докл. научно-производственной конф. «Пути дальнейшего совершенствования защиты растений в Белоруссии и республиках Прибалтики».- Ч. 1.- Минск: Изд-во ун-та.- 1979.- С.8-10.
29. Буга С.Ф., Лукашик Н.Н., Лобань С.В. Особенности формирования фитосанитарного состояния семян ячменя в БССР // Защита растений (Минск).- 1991.- №16.- С. 39-50.
30. Булат С.А., Мироненко Н.В. Генетическая дифференциация фитопатогенного гриба *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib.) Drechsl. ex Dastur (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.: Sorok.) Shoem. с использованием полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами // Советская генетика.- 1993.- № 29.- С. 960-965.

31. Быстрых Е.Е., Тарабрин Г.А. Оценка устойчивости пшеницы к гельминтоспориозу с использованием токсинов возбудителя // Докл. Росс. Акад. сельскохозяйств. наук.-1993.- №5.- С. 5-7.
32. Великанов Л.Л. К вопросу о природе токсических метаболитов *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. // Микробиологические процессы в почвах и урожайность сельскохозяйственных культур: (Материалы к секции респ. конф. «Пути повышения эффективности факторов интенсификации с.-х. пр-ва»).- Вильнюс: Ин-т ботаники.- 1978.- С. 69-71.
33. Великанов Л.Л., Хасанов Б.А. Таксономия формальных родов *Helminthosporium*, *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum* и *Curvularia* //. Новое в систематике и номенклатуре грибов / под ред. Ю.Т.Дьякова и Ю.В. Сергеева.- Москва: Национальная академия микологии, 2003.- С. 304-341.
34. Выгодский М.Я. Справочник по высшей математике. – М.: Госиздат. физ.-мат. лит-ры, 1962. – 870 с.
35. Высокоэффективная тонкослойная хроматография: Перевод с англ. А.С. Бочкова / Кайзер Р.Е., Блом Ж., Халпаап Х. и др.: Под ред. В.Г. Березкина.- М.: Мир, 1979.- 245 с.
36. Водяная Л.А. Влияние внешних факторов на изменчивость *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke // Микол. фитопатол.- 1972.- Т. 6, №4.- С. 297-300.
37. Водяная Л.А. К вопросу о специализации гриба *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke – возбудителя гельминтоспориоза злаков // Агрохимия.- М.: Наука, 1969.- С. 128-129.
38. Водяная Л.А., Хромова В.И. Естественная изменчивость вида *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke – возбудителя гельминтоспориоза злаков // Агрохимия.- М.: Наука, 1969.- С. 125-128.
39. Возняковская Ю.М., Труфанова А.К. Взаимодействие *Helminthosporium sativum* – возбудителя корневой гнили зерновых культур с сапрофитными почвенными бактериями // Микол. и фитопатол.- 1988.- Т. 22, № 2.- С.157-161.

40. *Войтова Л.Р.* Биологические особенности возбудителя гельминтоспориоза ячменя в условиях Белоруссии и меры борьбы с ним: Автореф. дис... канд. биол. наук: 06.00.11 / Минский гос. ун-т.- Минск, 1966.- 19 с.
41. *Войтова Л.Р.* Семенная инфекция корневой гнили ячменя // *Защ. раст.*- 1977.- №10.- С. 46-47.
42. *Войтова Л.Р.* Фитоэкспертиза семян зерновых // *Защ. раст.*- 1972.- №9.- С. 32-33.
43. *Гиошон Ж., Гийемен К.* Количественная газовая хроматография: Пер. с англ. А.Е. Ермошкина. - М.: Мир, 1991.- 389 с.
44. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. Ю.А. Данилова.- М.: Изд. дом «Практика», 1999.- 459 с.
45. *Гойман Э.* Инфекционные болезни растений: Пер. с англ.- М.: Иностр. л-ра, 1954.- 608с.
46. *Голощанов А.П., Голощанова Г.С.* Баланс общего азота у пшеницы, поражённой *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. // *Микол и фитопатол.*- 1987.- 21, № 4.- С. 322-325.
47. *Гребенчук О.О., Степанова М.В.* Азотный и фосфорный метаболизм *Helminthosporium sativum* P., K. et B. // *Микробиол. журн.*- 1972.- Т. 34, №1.- С. 92-94.
48. *Григорьев М.Ф.* Методические указания по изучению устойчивости зерновых культур к корневым гнилям.- Л.: Изд-во ВИР, 1976.- 59 с.
49. *Григорьев М.Ф., Липатова Н.Н.* Устойчивость ячменя к корневым гнилям // *Защ. раст.*- 1981.- №10.- С. 25-26.
50. *Григор`єв М.Ф.* Фітотоксичні властивості *Helminthosporium sativum* P., K. et B. // *Мікробіол. журн.*- 1974.- Т. 35, №3.- С. 77-81.
51. *Гудвин Т., Мерсер Э.* Введение в биохимию растений: в 2 т. / Пер. с англ. А.О. Ганаго и др. / Под ред. В.Л. Кретовича.- М.: Мир, 1986.- Т.2.- С. 263.
52. *Джиембаев Ж.Т.* Главнейшие болезни зерновых культур в Казахстане и научные основы борьбы с ними: Автореф. дис... докт. с/х. наук: 06.01.11 / ВНИИ защиты растений.- Л., 1972.- 33 с.
53. *Дурынина Е.П., Великанов Л.Л.* Методы выделения и физиологическая

активность токсинов *Helminthosporium sativum* // Тезисы докл. Всес. конф. «Микроорганизмы – стимуляторы и ингибиторы роста растений и животных».- Ч.1.-Ташкент: Изд-во ун-та.- 1989.- С. 62.

54. *Дурынина Е.П., Чичева Т.Б.* Роль почвы в сохранении и распространении фитопатогенных грибов // Итоги науки и техники, Серия «Защита растений».- М.: ВИНТИ.- 1980.- №2.- С. 73-115.
55. *Дьяков Ю.Т.* Популяционная биология фитопатогенных грибов.- М.: Изд. дом «Муравей», 1998.- 384 с.
56. *Дьяков Ю.Т.* Системы размножения грибов и их эволюция // Микол. и фитопатол.- 1999.- Т. 33, № 3.- С. 137-149.
57. *Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г.* Общая и молекулярная фитопатология: Учебное пособие.- М.: Изд-во об-ва фитопатологов, 2001.- 302 с.
58. *Жаркова Т.Н.* Методы учёта заражённости растений яровой пшеницы корневой гнилью в Иркутской области // Труды Зап.-Сиб. регион. НИИ Госкомгидромета «Вопросы агрометеорологии и климатологии».- М.: Гидрометеиздат, 1987.- С. 62-66.
59. *Жуков А.В., Лебедева Н.И., Верецагин А.Г.* Влияние гельминтоспориозной корневой гнили на состав ацилсодержащих липидов в проростках пшеницы // Физиол. раст.- 2001.- Т. 48, № 2.- С. 214-222.
60. *Захарова Т.И., Чумаков А.Е.* Вредоносность основных грибных болезней зерновых культур // Микол. и фитопатол.- 1986.- Т. 20, № 2.- С. 143-153.
61. *Инге-Вечтомов С.Г.* Генетика с основами селекции: Учеб. для биол. спец. ун-тов.- М.: Высш. шк., 1989, 592 с.
62. *Камышко О.П., Тупеневич С.М.* Микрофлора в экспериментальном севообороте и её антагонистическая активность к почвенным фитопатогенам // Микол. и фитопатол.- 1976.- Т. 10, № 1.- С. 32-36.
63. *Карамшук З.П., Муранец А.П.* Альтернариоз семян яровой пшеницы // Изв. АН КазССР, Сер. биол.- 1989.- №1.- С.9-14.
64. *Коробейникова А.В.* Вредоносность альтернариоза семян пшеницы // Защ. раст.- 1975.- №5.- С. 23.

- 65.Коршунова А.Ф., Чумаков А.Е., Щекочихина Р.И. Защита растений от корневых гнилей.- Л.: Колос, 1976.- 184 с.
- 66.Кристенсен Дж. Корневые гнили пшеницы, овса, ржи и ячменя // Болезни растений (Ежегодник Министерства земледелия США): Пер. с англ.- М.: Иностран. л-ра, 1956.- С. 314-321.
- 67.Крючкова Л.О., Дударева Г.Ф. Звичайна коренева гниль // Захист рослин.- 2000.- №11.- С.10-11.
- 68.Лангольф Э.И. Методика определения патогенности штаммов гриба *Bipolaris sorokiniana* // Научн.-техн. бюлл. СО ВАСХНИЛ.- 1981.- №38.- С.24-26.
- 69.Лапиковский А.А., Межуев А.Г., Лапиковская М.А. Поражение корневыми гнилями и урожай ячменя в зависимости от места размещения его в севообороте // Пути повышения урожайности полевых культур.- 1986.- №17.- С. 80-83.
- 70.Левитин М.М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов.- Л.: Агропромиздат, 1986.- 208 с.
- 71.Левитин М.М., Петрова А.Н., Афанасенко О.С. Сравнительное изучение популяций *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. по признаку вирулентности // Микол. и фитопатол.- 1985.- Т. 19, №2.- С. 154-157.
- 72.Левитин М.М., Фёдорова И.В. Генетика фитопатогенных грибов.- Л.: Наука, 1972.- 215 с.
- 73.Лекомцева С.Н., Зименкова Л.П. Об изменчивости гриба *Helminthosporium sativum* Р., К. et В. // Научные доклады высшей школы, Сер. Биологические науки.- 1966.- №4.- С. 129-132.
- 74.Лилли В.Г., Барнетт Г.Л. Физиология грибов: Пер. с англ.- М.: Иностран. л-ра, 1953.- 532 с.
- 75.Линник Л.И. Влияние кислотности почвы на поражённость ячменя гельминтоспориозной корневой гнилью // Тезисы докл. научн.-практич. конфер. «Пути дальнейшего совершенствования защиты растений в республиках Прибалтики и Белоруссии».- Ч. 2.- Рига: Даугава.- 1983.- С. 17-19.
- 76.Лошаков В.Г., Иванова С.Ф., Верещак В.Н. Болезни зерновых культур в специализированных севооборотах // Изв. ТСХА.- 1988.- № 5.- С. 85-95.

- 77.Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции. М.: Наука, 1981.- 274 с.
- 78.Мак-Нью Дж. Влияние плодородия почвы на выживаемость *Helminthosporium sativum* // Болезни растений (Ежегодник Министерства земледелия США): Пер. с англ.- М.: Иностран. л-ра, 1956.- С. 99-113.
- 79.Маликова А.В. Сорные растения, как возможные ингибиторы почвенной инфекции.- М.: Изд-во Моск. обл. пед. ин-та, 1991.- С. 115-117.
- 80.Мацкевич Н.В. Спонтанная изменчивость и кариология несовершенных грибов.- М.: Наука, 1981.- 184 с.
- 81.Методические указания по изучению посевных качеств и урожайных свойств семян сельскохозяйственных культур.- М.: Агропромиздат, 1981.- С.100-103.
- 82.Методические указания по оценке сравнительной устойчивости яровых пшениц и ячменей к возбудителям корневых гнилей и заболевания семян.- Л.: Изд-во ВАСХНИЛ, 1967.- 56 с.
- 83.Методические указания по диагностике и методам полевой оценки устойчивости ячменя к возбудителям пятнистостей листьев.- Л.: Наука, 1987.- 20 с.
- 84.Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов.- Л.: Изд-во ВИЗР, 1974.- 69 с.
- 85.Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош.- Л.: Агропромиздат, ЛО, 1987.- 430 с.
- 86.Методы экспериментальной микологии: Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др.: Отв. ред. В.И. Билай.- Киев.: Наук. думка, 1982.- 550 с.
- 87.Мироненко Н.В., Булат С.А. Основы молекулярно-генетического различия изолятов и видов фитопатогенных грибов // Молекулярные и генетические механизмы взаимодействия микроорганизмов с растениями: Сб. научн. тр.- Пушкино: Изд-во ин-та молек. генетики РАН.- 1989.- С.168-174.
- 88.Мироненко Н.В., Булат С.А. Популяционный анализ фитопатогенного гриба *Cochliobolus sativus* методом полимеразной цепной реакции: новый тип ДНК маркеров // Тезисы докл. 9-го Всесоюзн. совещ. по иммунитету растений к болезням и вредителям.- Т. 2.- Минск: Изд-во ун-та.- 1991.- С. 169-170.
- 89.Мироненко Н.В., Сердюк А.А., Филатова О.А. Распределение типов спаривания в

- популяциях *Cochliobolus sativus* // Микол. и фитопатол.- 2001.- Т. 35, № 5.- С. 36-40.
90. *Мирчинк Т.Г.* Почвенная микология: Учеб. пособие для вузов.- М.: Изд-во МГУ, 1976.- 219 с.
91. *Михайлина Н.И.* Заселённость почвы *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke и развитие корневой гнили яровой пшеницы в различных видах севооборотов // Микол. и фитопатол.- 1982.- Т. 16, № 5.- С. 433-439.
92. *Михайлина Н.И.* Об источниках инфекции корневой гнили пшеницы // Защ. раст.- 1972.- №6.- С. 22.
93. *Михайлина Н.И.* Семена пшеницы с «черным зародышем» // Защ. раст.- 1973.- №12.- С.15.
94. *Михайлина Н.И.* Сравнительная оценка методов определения вредоносности корневой гнили у яровой пшеницы // Сельскохоз. биология.- 1983.- Т. 18, №4.- С. 72-77.
95. *Михайлова Л.А., Гоголева С.Г., Гульяева Е.И.* Взаимодействие штаммов *Bipolaris sorokiniana* и образцов пшеницы // Микол. и фитопатол.- 2002.- Т. 36, №2.- С. 63-66.
96. *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 Нечерноземной зоны РСФСР (Ленинград).- 1988.-№ 12.- С. 63-65.
97. *Морщацький А.А.* Роль диких злаків у поширенні корневих гнилей озимої пшениці // Укр. бот. журн.- 1979.- Т.36, № 4.- С. 373-375.
98. *Мурашинский К.Е.* Материалы по изучению фузариоза хлебов. I. Виды *Fusarium* на хлебах в Сибири // Труды Сибирской сельскохоз. акад.- 1924.- № 3.- С. 87-120.
99. *Мюллер Э., Лёффлер В.* Микология: Перевод с нем. К. Л. Тарасова.- М.: Мир, 1995.- 343 с.
100. *Наумова Н.А.* Анализ семян на грибную и бактериальную инфекцию.- Л.: Колос, 1970.- 208 с.

101. *Наумова Н.А., Поталайчук В.И.* Фитопатологическая экспертиза семян сельскохозяйственных растений.- Л.: Колос, 1974.- 153 с.
102. *Нестеров А.Н., Грязнов А.А.* Корневая гниль и некоторые особенности её возбудителей в зоне Северного Казахстана // Вопросы селекции, семеноводства и сортовой агротехники с/х культур: Сб. научн. тр.- Алма-Ата: Наука, 1985.- С. 84-90.
103. *Никонорова А.К.* Механизм влияния сидеральных культур на развитие и споруляцию гриба *Helminthosporium sativum* // Микол. и фитопатол.- 2000.- Т. 34, №1.- С. 48-51.
104. *Никуленко Т.Ф., Чканников Д.И.* Токсины фитопатогенных грибов и их роль в развитии болезней растений.- М.: Изд-во ВНИИТЭИагропром, 1987.- 53 с.
105. *Павлова О.И.* Выживаемость *B. sorokiniana* в разных типах почв Западной Сибири // Интегрированная защита с/х культур от болезней и вредителей в Сибири: Сб. научн. тр.- Новосибирск: Наука, 1986.- С. 45-53.
106. *Павлова О.И., Тепляков Б.И.* Инфекционный потенциал *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker в разных типах почв Западной Сибири // Научн. труды СО ВАСХНИЛ (Новосибирск).- 1983.- С. 58-65.
107. *Пересыпкин В.Ф.* Сельскохозяйственная фитопатология.- М.: Колос, 1982.- 512 с.
108. *Пересыпкин В.Ф., Тютчев С.Л., Баталова Т.С.* Болезни зерновых культур при интенсивных технологиях их возделывания.- М.: Агропромиздат, 1991.- 271 с.
109. *Петрова А.Н.* Вирулентность популяций возбудителя тёмно-бурой и сетчатой пятнистостей ячменя и принципы создания инфекционных фонов: Автореф. дис... канд. биол. наук: 06.01.11 / ВНИИ защиты растений.- Л., 1985.- 17 с.
110. *Пидопличко В.Н., Зражевская Т.Г.* К вопросу о гетерогенности популяции гриба *Helminthosporium sativum* P., K. et B. – возбудителя корневой гнили озимой пшеницы // Матер. I республиканской конференции «Систематика, экология и физиология почвенных грибов».- К: Наук. думка, 1975.- С. 138-139.

111. *Підопличко В.М., Зражевская Т.Г.* Патогенные свойства штаммов *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke – возбудителя корневой гнили пшеницы // Микол. и фитопатол.- 1977.- Т. 11, № 2.- С. 144-148.
112. *Підопличко М.М.* Фітотоксичні властивості *Helminthosporium sativum* P., K. et B. // Мікробіол. журн.- 1971.- Т.33, № 3.- С. 325-329.
113. *Писаренко В.Н., Биенко М.Д., Дудка Е.Л.* Причины снижения посевных качеств ячменя // Защ. раст.- 1986.- №9.- С. 21-22.
114. *Полывяный А.М.* Гельминтоспориозные пятнистости листьев ячменя и меры борьбы с ними на Северо-Востоке Лесостепи Украинской ССР: Автореф. дис... канд. с/х наук: 06.01.11 / ВНИИ защиты растений.- Л., 1989.- 19 с.
115. *Получение* препаратов токсинов гриба *Bipolaris sorokiniana* – возбудителя гельминтоспориоза зерновых: Методические рекомендации [Составители Г.А. Тарабрин и др.]- М.: ВАСХНИЛ.- 1990.- 14 с.
116. *Попов Ю.В.* Корневая гниль яровой пшеницы в Кустанайской области // Микол. и фитопатол.- 1982.- Т. 16, № 3.- С. 263-266.
117. *Рогинская В.А.* Фитотоксичность возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили зерновых в связи с условиями окружающей среды / Автореф. дис... канд. биол. наук /Красноярский гос. ун-т.- Красноярск, 1982.- 53 с.
118. *Рогинская В.А., Южаков А.И., Наплекова Н.Н.* Создание искусственных популяций возбудителя обыкновенной корневой гнили для оценки устойчивости ячменя // Сибирский весник сельскохозяйств. науки.- 1983.- №5.- С. 32-37.
119. *Рочев М.В.* Органотропная специализация *Bipolaris sorokiniana* Shoem. // Микол. и фитопатол.- 1987.- Т. 2, № 2.- С. 190-191.
120. *Рочев М.В.* Поражаемость *Bipolaris sorokiniana* Shoem. листьев и корней ячменя // Интегрированная защита растений от вредителей и болезней: Сб. научн. тр.- Л.: ЛСХИ, 1985.- С.59-60.
121. *Рочев М.В., Бирюкова В.Н.* Адаптивные особенности конидиального аппарата возбудителя тёмно-бурой пятнистости ячменя // Тезисы докл. 9-го Всесоюзн. совещ. по иммунитету растений к болезням и вредителям.- Т. 2.- Минск: Изд-во

ун-та.- 1991.- С. 172-173.

122. *Рябчиков В.В.* Формирование и активность инфекционного потенциала корневых гнилей зерновых под влиянием сидеральных культур // *Воспроизводство плодородия чернозёмов в Центрально-Чернозёмной зоне: Сб. научн. тр.- Воронеж: Изд-во Воронежского гос. аграрн. ун-та, 1992.- С. 93-103.*
123. *Самерсова В.А., Шикальчик Н.В.* О специализации возбудителя гельминтоспориоза злаков // *Вести АН БССР (Сер. Сельскохозяй. науки).- 1985.- Т.22, №1.- С. 78-81.*
124. *Светов В.Г.* Влияние агроэкологических факторов на распространённость черного зародыша пшеницы // *Микол. и фитопатол.- 1989.- Т. 23, № 5.- С. 471-473.*
125. *Семёнов А.Я., Фёдорова Р.Н.* Инфекция семян хлебных злаков.- Л.: Колос, 1984.- 95 с.
126. *Семёнов С.М.* Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: Справочник.- М.: Агропромиздат, 1990.- 240 с.
127. *Сидорова С.Ф., Рябчикова В.В., Берестецкая Л.И.* Особенности патогенного комплекса возбудителей корневых гнилей зерновых культур в условиях Воронежской области // *Микол. и фитопатол.- 1992.- Т. 26, № 6.- С. 493-501.*
128. *Сиренко А.С.* Роль семенного материала в распространении грибных болезней озимого ячменя // *Защита зерновых культур от болезней и вредителей при интенсивных технологиях возделывания: Сб. научн. тр.- Краснодар: Краснодарский НИИ сельск. х-ва, 1990.- С. 41-44.*
129. *Скилягина Т.С.* Влияние субстрата на морфологию и вирулентность возбудителя гельминтоспориоза // *Матер. I республиканской конференции «Систематика, экология и физиология почвенных грибов».- К: Наук. думка, 1975.- С.142-143.*
130. *Скилягина Т.С.* Роль микробного населения в сохраняемости фитопатогенных грибов в почве // *Микроорганизмы и зелёное растение: Под общ. ред. А.Р. Вернера.- Новосибирск: Наука, 1967.- С.156-168.*
131. *Скилягина Т.С., Ашмарина Л.Ф.* Нетипичные конидии *Bipolaris sorokiniana*,

обнаруженные на листьях пшеницы и ячменя // Болезни сельскохозяйственных культур и борьба с ними в Сибири: Сб. научн. тр.- Новосибирск: Изд-во СО ВАСХНИЛ, 1989.- С. 64-71.

132. *Словарь ботанических терминов* / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.Н. Голубинский и др. / Под общ. ред. И. А. Дудки.- К.: Наук. думка, 1984.- 307 с.
133. *Снедекор Дж.У.* Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии: Пер. с англ. В.Н.Перегудова.- М.: Изд-во сельскохозяй. л-ры, журналов и плакатов, 1961.- 503 с.
134. *Сорокин Н.В.* О некоторых болезнях культурных растений Южно-Уссурийского Края // Тр. Казанск. Об-ва Естествоиспыт.- 1890.- Т. XXII, № 3.- С.1-32.
135. *Спрейг Р.* Гнили корней и корневой шейки у злаковых трав // Болезни растений (Ежегодник Министерства земледелия США): Пер. с англ.- М.: Иностран. л-ра, 1956.- С. 268-273.
136. *Станкушев Х.* Микроскопические грибы на зёрнах овса и ячменя, используемых для зимнего корма // Микол. и фитопатол.- 1969.- Т. 3, № 3.- С. 268-272.
137. *Стэкмен Э., Кристенсен Дж.* Проблемы изменчивости грибов // Болезни растений (Ежегодник Министерства земледелия США): Пер. с англ.- М.: Иностран. л-ра, 1956.- С. 34 – 62.
138. *Стэкмен Э., Харрар Дж.* Основы патологии растений: Пер. с англ.- М.: Иностран. л-ра, 1959.- 540 с.
139. *Танасевич И.Г.* Болезни ячменя в Левобережье УССР и разработка системы мероприятий по борьбе с ними / Автореф. дис... канд. биол. наук: 06.01.11 / УкрНИИ защиты растений.- К., 1981, 32с.
140. *Tarr С.* Основы патологии растений: Пер. с англ.- М.: Мир, 1975.- 590 с.
141. *Терехова В.А., Дьяков Ю.Т.* Генетическая нестабильность грибов // Микол. и фитопатол.- 1986.- Т. 20, №3.- С. 233-240.
142. *Тропова А.Т.* Влияние температуры воздуха на интенсивность заражения зерна яровых пшениц *Helminthosporium sativum* P., K. et B. // Тр. Ин-та прикладной зоологии и фитопатологии.- 1958.- № 3.- С. 195-205.

143. *Трошина Н.Б., Юмагузин М.С., Ямалеев А.М.* Грибы *Helminthosporium sativum* Р., К. et В. и *Fusarium graminearum* Schwabe в тканях растений пшеницы // Биол. науки.- 1992.- №3.- С. 115-121.
144. *Трунов Г.А.* К изучению черного бактериоза озимой пшеницы // Записки Харьковского сельскохозяйств. института.- 1939.- Т. 2, № 1-2.- С. 551-600.
145. *Туманов Т.Д., Знобищева В.А.* Развитие корневой гнили пшеницы при минимальных обработках почвы // Труды ВНИИЗР.- 1977.- Т.56, № 3.- С. 74-81.
146. *Тупеневич А.Е., Нестеров А.П.* Почвозащитная обработка почвы и органичение развития корневой гнили // Труды ВНИИЗР.- 1977.- № 56.- С. 41.
147. *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: Сб. научн. тр.- М.: Колос, 1970.- С. 3-8.
148. *Фадеев Ю.Н., Быстрых Е.Е., Тарабрин Г.А.* Нарушение фотосинтетического транспорта электронов в хлоропластах пшеницы при поражении гельминтоспориозом // Сельскохозяйств. биология.- 1988.- Т. 23, №2.- С. 25-30.
149. *Фадеев Ю.Н., Тарабрин Г.А., Тищенко А.Д.* Изменчивость грибов - возбудителей корневых гнилей пшеницы // Докл. ВАСХНИЛ.- 1982.- Т. 14, № 4.- С. 11-13.
150. *Фадеев Ю., Тищенко А., Тарабрин Г.* Причины изменения устойчивости пшеницы к гельминтоспориозной корневой гнили на ранних этапах онтогенеза растений // Доклады ВАСХНИЛ.- 1982.- Т 14, № 12.- С. 19-21.
151. *Фёдорова Р.Н.* Черный зародыш пшеницы и ячменя // Защ. раст.- 1986.- №9.- С.12.
152. *Фёдорова Р.Н., Филиппова Т.Н.* Крупность семян ячменя и выживаемость фитопатогенных грибов // Защ. раст.- 1984.- № 9.- С. 29-30.
153. *Филиппова Г.Г., Кашемирова Л.А.* Диагностика клонов возбудителя темно-бурой пятнистости листьев ячменя // Микол. и фитопатол.- 1989.- Т. 23, № 2.- С. 176-177.

154. Филиппова Г.Г., Кашемирова Л.А. Развитие *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. на сортах ярового ячменя при разных температурных условиях // Микол. и фитопатол.- 1992.- Т. 26, № 6.- С. 502-505.
155. Филиппова Г.Г., Кашемирова Л.А. Факторы, влияющие на заражение ячменя возбудителем темно-бурой пятнистости // Микол. и фитопатол.- 1991.- Т. 25, № 2.- С. 161-165.
156. Хасанов Б.А. Методы дифференциации пятнистостей пшеницы по симптомам и микроскопическим признакам возбудителей // Биол. науки.- 1990.- №2.- С.153-159.
157. Хасанов Б.А. Обзор грибов из рода *Bipolaris* Shoem. // Микол. и фитопатол.- 1991.- Т. 25, № 4.- С. 360-366.
158. Хасанов Б.А. Обзор грибов из родов *Drechslera* Ito и *Exserohilum* Leonard et Suggs // Микол. и фитопатол.- 1992.- Т. 26, № 2. С. 142-151.
159. Хасанов Б.А. Определитель грибов – возбудителей «гельминтоспориозов» растений из родов *Bipolaris*, *Drechslera* и *Exserohilum*.- Ташкент: Изд-во «Фан», 1992.- 244 с.
160. Хасанов Б.А. Таксономия рода *Helminthosporium* s.l. и критерии для идентификации видов родов *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum* и *Curvularia* // Микол. и фитопатол.- 1987.- Т. 21, № 5.- С. 433-442.
161. Хасанов Б.А., Выприцкая А.А. Патогенность грибов для хлебных злаков из родов *Bipolaris* Shoemaker и *Exserohilum* Leonard et Suggs, зарегистрированных в Средней Азии и Казахстане // Микол. и фитопатол.- 1987.- Т. 21, № 4.- С. 312-318.
162. Хацкевич Л.К. Особенности сапрофитного питания возбудителей обыкновенной корневой гнили злаков // Труды ВНИИЗР.- 1977.- Т.56, № 3.- С. 14-20.
163. Хацкевич Л.К., Бенкен А.А., Гайке М.В. Прикорневая и стеблевая гниль зерновых культур // Защ. раст.- 1990.- №9.- С. 14-15.
164. Хохряков М.К. Морфолого-биологическое обоснование таксономии грибов из рода *Helminthosporium* sensu lato на злаках: Автореф. дис... докт. биол. наук / Ботанический институт им. В.Л. Комарова.- Л., 1953.- 30 с.

165. *Хохряков М.К., Бенкен А.А.* Политомический определитель возбудителей гельминтоспориозов злаков.- Л.: ВИЗР, 1969.- 19 с.
166. *Хруставчук Т.С.* Развитие корневых гнилей озимой пшеницы в зависимости от предшественников и способов обработки почвы // Защита растений (Киев).- 1986.- № 33.- С. 22-25.
167. *Хрущёва Е.П., Миленина Н.П.* Микориза и корневые гнили у яровой пшеницы // Микол. и фитопатол.- 1978.- Т. 12, № 1.- С. 43-45.
168. *Черняева Н.И., Муромцев Г.С., Коробова Л.Н.* Роль биологического фактора в подавлении возбудителя корневой гнили зерновых культур при использовании разных форм азотных удобрений // Микол. и фитопатол.- 1986.- Т. 20, № 5.- С. 419-424.
169. *Чулкина В.А.* Влияние гельминтоспориозной гнили на реализацию потенциальной продуктивности яровой пшеницы // Микол. и фитопатол.- 1975.- Т. 9, № 6.- С. 513-517.
170. *Чулкина В.А.* Инфекция почвы и некоторые приёмы её регулирования в борьбе с обыкновенной корневой гнилью ячменя // Микол. и фитопатол.- 1972.- Т. 6, № 5.- С. 435-439.
171. *Чулкина В.А.* Корневые гнили хлебных злаков в Сибири.- Новосибирск: Наука, 1985.- 190 с.
172. *Чулкина В.А.* Методические указания по учёту обыкновенной корневой гнили хлебных злаков в Сибири.- Новосибирск: Наука, 1972.- 21 с.
173. *Чулкина В.А., Павлова О.И., Кузнецова Т.Т.* Роль соломы в оздоровлении почвы от возбудителей корневой гнили яровой пшеницы // Сибирский вестник сельскохоз. науки.- 1987.- №1.- С.20-24.
174. *Шамрай С.М., Дунаєвський О.Г.* Реакція сортів ячменю на гниль кореневу // Селекція та насінництво.- 1992.- 71.- С. 58-63.
175. *Шамрай С.Н.* Влияние биостимуляторов на морфометрические показатели ювенильного эпипа развития *Hordeum vulgare* L. // Биологический вестник.- 1998.- Т. 2, №2.- С. 72-76.

176. Шамрай С.Н. К учёту корневой гнили ярового ячменя на востоке СССР // Вестник Харьковского ун-та.- 1989.- № 330.- С. 74-76.
177. Шамрай С.Н. Паразитические свойства возбудителя корневой гнили ярового ячменя на Украине // Микол. и фитопатол.- 1988.- Т. 22, № 5.- С. 463-466.
178. Шаяхметов И.Ф. Биологическая активность метаболитов из культурального фильтрата *Cochliobolus sativus* и *Fusarium oxysporum* в связи с клеточной селекцией злаковых на устойчивость к фитопатогенам // Микол. и фитопатол.- 2001.- Т. 35, №6.- С. 66-71.
179. Шаяхметов И.Ф., Асфандиярова Р.Р. Влияние фитотоксичных метаболитов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Sh. на рост каллусной ткани и регенерацию растений пшеницы // Физиол. раст.- 1991.- 38, №2.- С. 399-405.
180. Шпокаучкене О.Ю. Грибы зерна ячменя, выращиваемого в условиях Литовской ССР // Тр. АН ЛитССР.- 1988.- Сер.В, №14.- С.10-17.
181. Щекочихина Р.И. Географическая изменчивость популяций *Helminthosporium sativum* Pamm., King et Bakke // Микол. и фитопатол.- 1977.- Т. 11, № 5.- С. 433-438.
182. Щекочихина Р.И. Роль токсинов *Helminthosporium sativum* в патогенезе корневой гнили пшеницы // Микол. и фитопатол.- 1975.- Т. 9, № 6.- С. 518-523.
183. Щербаченко Т.О. Ареал популяції збудника темно-бурої плямистості ячменю ярого – *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib.) Drechs. et Dastur // Карантин і захист рослин // 2004.- №10.- С. 6-8.
184. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И., Ахметов Р.Р. Гормональный баланс у пшеницы, пораженной возбудителем корневой гнили *Helminthosporium sativum* // Изв. РАН.: Сер. Биология.- 2001.- №4.- С. 499-502.
185. Agarwal V.K., Sinclair J.B. Principles in seed pathology: 2nd ed.- Verlag: CRC Press, 1996.- 539 p.
186. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi, 9-th ed. / P.M.Kirk, P.F.Cannon, David J.C., Stalpers J.A., Egham.- UK: CABI Bioscience; Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2001.- 624 p.
187. Åkesson H., Carlemalm E., Everitt E. Immunocytochemical localization of

- phytotoxins in *Bipolaris sorokiniana* // Fungal Genetics and Biology.-1996.- Vol. 20, N3.- P. 205–216.
188. *Alcorn J.L.* Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum* // Mycotaxon.- 1983.- Vol. 17, N 1.- P. 1-86.
189. *Alcorn J.L.* New combination and synonymy in *Bipolaris* and *Curvularia*, and a new species of *Exserohilum* // Mycotaxon.- 1991.- Vol. 41, N 2.- P. 329-343.
190. *Alcorn J.L.* The taxonomy of «*Helminthosporium*» species // Ann. Rev. Phytopathology.- 1988.- Vol. 26, N 1.-P. 37-56.
191. *Alternaria*: Biology, plant diseases and metabolites / J. Chelkowski, A. Visconti (eds).- Amsterdam: Elsevier, 1992.- 557 p.
192. *Amelung D.* Untersuchungen zur vertebreuung der blattfleckekrankheit des getreides, verursacht durch *Cochliobolus sativus* Ito et Kurib. (*Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. in Jain.) 1982 in DDR // Nachrichtenbl. Pflanzenschutz DDR.- 1984.- Vol. 38, N 1.- P. 12-13.
193. *Ammon H.U.* Ober einige arten aus den gattungen *Pyrenophora* und *Cochliobolus* mit *Helminthosporium* als Nebenfruchtform // Phytopath. Z.- 1963.- T. 47, N 4.- S. 244-300.
194. *Anderson R., Bailey K.* Impact of crop management system on disease severity of wheat and field pea 1995-1997 // Can. J. Plant Pathol.- 1999.- Vol. 21, N 2.- P. 191-193.
195. *Anderson R.L., Bailey K., Paeris F.B.* Guidelines for integrating ecological principles of pest management with rotation design // In ASA Dryland Agriculture Monograph.- New York: American Society for Agronomy, 2001.- Vol. 40.- P. 56-58.
196. *Anderson W.H., Banttari E.E.* The effect of *Bipolaris sorokiniana* on yield, kernel weight and kernel discoloration in six-row spring barleys // Pl. Dis. Reporter.- 1976.- Vol. 60, N 6.- P. 754-758.
197. *Anwar A.A.* Factors affecting the survival of *Helminthosporium sativum* and fusarium lini in soil // Phytopathology.- 1949.- Vol. 39, N 12.- P. 1005-1019.
198. *Apoga D., Åkesson H., Jansson H.-B.* Relationship between production of the phytotoxin prehelminthosporol and virulence in isolates of the plant pathogenic

- fungus *Bipolaris sorokiniana* // Europ. J. Plant Pathol.- 2002.- Vol. 108, N 6.- P. 519-526.
199. *Apoga D., Jansson H.-B., Tunlid A.* Adhesion of conidia and germlings of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* to solid surfaces // Mycol. Res.- 2001.- Vol. 105, N 10.- P. 1251-1260.
 200. *Applegarth D.A., Bozoian G.* The cell wall of *Helminthosporium sativum* // Arch. Biochem. Biophys.- 1969.- Vol 134, N 11.- P. 285-289.
 201. *Arabi M.I.E., Jawhar M.* The response of *Cochliobolus sativus* to ultraviolet-C radiation // J. Phytopath.- 2001.- Vol. 149, N 9.- P. 521-525.
 202. *Arora D.K.* Effect of microorganisms on the aggressiveness of *Bipolaris sorokiniana* // Can. J. Bot.- 1987.- 66, N 3.- P. 242-246.
 203. *Arx J.A. von* The genera of fungi sporulating in pure culture: 3rd Edition.- Vaduz: J.Cramer, 1981.- 288 p.
 204. *Bailey K.L.* IPM practices for reducing fungicide use in field crops // Techniques for reducing pesticide use / D. Pimentel (ed.).- Ottawa: John Wiley and Sons Ltd, 1997.- P. 293-316.
 205. *Bailey K.L., Duczek L.J.* Managing cereal diseases under reduced tillage // Can. J. Plant Pathol.- 1996.- Vol. 18, N 2.- P. 159-167.
 206. *Bailey K.L., Duczek L.J., Potts D.A.* Inoculation of seeds of *Bipolaris sorokiniana* and soil fumigation methods to determine wheat and barley tolerance and yield losses caused by common root rot // Can. J. Plant Sci.- 1997.- Vol. 77, N 4.- P. 691-698.
 207. *Bailey K.L., Gossen B.D.* Effect of tillage and crop rotation on root and foliar diseases of wheat and pea in Saskatchewan from 1991 to 1998: Univariate and multivariate analyses // Can. J. Plant Sci.- 2001.- Vol. 81, N 4.- P. 789-803.
 208. *Bailey K.L., Gossen B.D.* Impact of agronomic practices and environment on diseases of wheat and lentil in southeastern Saskatchewan // Can. J. Plant Sci.- 2000.- Vol. 80, N 6.- P. 917-927.
 209. *Bailey K.L., Harding H., Knott D.R.* Disease progression in wheat lines and cultivars differing in levels of resistance to common root rot // Can. J. Plant Pathol.- 1989.- Vol. 11, N 3.- P. 273-278.

210. *Bailey K.L., Johnston A.M.* Managing crop losses from foliar diseases with fungicides, rotation and tillage in Saskatchewan Parkland // *Can. J. Plant Sci.*- 2000.- Vol. 80, N 1.- P. 169-175.
211. *Bailey K.L., Lafond G.P., Domitruk D.* Effect of row spacing, seeding rate and seed-placed phosphorus on root diseases of spring wheat and barley under zero tillage // *Can. J. Plant Sci.* 1997.- Vol. 78, N 4.- P. 145-150.
212. *Bakonyi J., Pomazi A., Fisci G.* Comparison of selected species of *Bipolaris*, *Drechslera* and *Exerohilum* by random amplification of polymorphyc DNA // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*- 1995.- Vol. 42, N 4.- P. 355-366.
213. *Bayer E.A, Chanzy H., Lamed R.* Cellulose, cellulases and cellulosomes // *Curr. Opin. Struct. Biol.*- 1998.- Vol. 8, N 5.- 548-557.
214. *Bechinger C., Giebel K.-F.* Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus // *Science.*- 1999.- N 285.- P. 1896-1899.
215. *Berbee M.L., Pirseyedi M., Hubbard S.* *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences // *Mycologia.*- 1999.- Vol. 9, N 8.- P. 964–977.
216. *Blok W.J., Lamers J.G.* Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping // *Phytopathology.*- 2000.- Vol. 90, N 2.- P. 253-259.
217. *Boosalis M.G.* Precious sporulation and longevity of conidia of *Helminthosporium sativum* in soil // *Phytopathology.*- 1962.-Vol. 52, N 11.- P. 1172-1177.
218. *Booth C.* The genus *Fusarium.*- Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1971.- 237 c.
219. *Briggs D.E.* Gibberellin-like activity of helminthosporol and helminthosporic acid // *Nature.*- 1966.- N 210.- P. 418-419.
220. *Briquet M., Vilret D., Goblet P.* Plant cell membranes as biochaemical targets of the phytotoxin helminthosporol // *J. Bioenerg. Biomembr.*- 1998.- Vol. 30, N 3.- P. 285-295.
221. *Broadfoot W.C., Robertson H.T.* Pseudo-black-chaff of Reward wheat // *Scientific Agriculture.*- 1933.- N 13.- P. 512-514.

222. Carlson H., Nilsson P., Jansson H.-B. Characterization and determination of prehelminthosporol, a toxin from the pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*, using liquid chromatography and mass spectrometry // J. Microb. Methods.- 1991.- Vol. 13, N 3.- P. 259-269.
223. Carlson H., Stenram U., Gustaffson M. Electron microscopy of barley root infection by the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* // Can. J. Bot.- 1991.- Vol. 69, N 12.- P. 2724-2731.
224. Chang H.S. Light effects on the sporulation of some species of *Helminthosporium* // Bot. Bull. Acad. Sin. (Taipei).- 1974.- Vol. 15, N 1.- P. 44-48.
225. Chinn S.H.F. A slide technique for the study of fungi and actinomycetes in soil with special reference to *Helminthosporium sativum* // Can. J. Bot.- 1953.- Vol. 31, N 9.- P. 718-724.
226. Chinn S.H.F. Differences in fungistasis in some Saskatchewan soils with special reference to *Cochliobolus sativus* // Phytopathology.- 1967.- Vol. 57, N 7.- P. 224-226.
227. Chinn S.H.F., Ledingham R.J. Mechanisms contributing for the eradication of spores of *Helminthosporium sativum* from amended soil // Can. J. Bot.- 1961.- Vol. 39, N 9.- P. 739-748.
228. Chinn S.H.F., Sallans B.J., Ledingham R.J. Spore populations of *Helminthosporium sativum* from amended soils in relation to the occurrence of common root rot of wheat // Can. J. Plant Sci.- 1962.- Vol. 4, N 11.- P. 720-727.
229. Chinn S.H.F., Tinline R.D. Spore germinability in soil as an inherent character of *Cochliobolus sativus* // Phytopathology.- 1963.- Vol. 53, N 6.- P. 1109-1112.
230. Chong L.M., Sheridan J.E. Mycoflora of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed in New Zealand // New Zealand J. Bot.- 1982.- Vol. 20, N 2.- P. 187-189.
231. Christensen J.J. Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum* // Phytopathology.- 1925.- Vol. 15, N 5.- P. 785-795.
232. Christensen J.J. Studies on the parasitism of *Helminthosporium sativum* // Univ. Minn. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.- 1922.- N 11.- 52 p.
233. Christensen J.J. The influence of temperature on the frequency of mutation in

- Helminthosporium sativum* // Phytopathology.- 1929.- Vol. 19, N 2.- P. 155-162.
234. *Christensen J.J., Davies F.R.* Nature of variation in *Helminthosporium sativum*// Mycologia.- 1937.- Vol. 29, N 1.- P. 85-99.
235. *Clark R.V.* Influence of some nitrogen and vitamin sources on growth, sporulation and pathogenicity of *Cochliobolus sativus* // Can. J. Bot.- 1971.- Vol. 49, N 12.- P. 2175-2186.
236. *Clark R.V., Wallen R.V.* Seed infection of barley by *Cochliobolus sativus* and its influence on yield // Can. Pl. Dis. Surv.- 1969.- N 49.- P. 60-64.
237. *Clay R.P., Enkerli J., Fuller M.S.* Induction and formation of *Cochliobolus sativus* appressoria // Protoplasma.- 1994.- Vol. 178, N1-2.- P. 34-37.
238. *Cole G.T.* Ultrastructure of conidiogenesis in *Drechslera sorokiniana* // Can. J. Bot.- 1973.- Vol. 51, N 6.- P. 629-638.
239. *Conner R.L.* Influence of irrigation and precipitation of incidence of black point in soft white spring wheat // Can. J. Plant Pathol.- 1989.- Vol. 11, N 4.- P. 388-392.
240. *Conner R.L.* Interrelationship of cultivar reactions to common root rot, black point and spot blotch in spring wheat // Plant Disease.- 1990.- Vol. 74, N 3.-P. 224-227.
241. *Conner R.L., Atkinson T.G.* Influence of continuous cropping on severity of commune root rot in wheat and barley // Can. J. Plant Pathol.- 1989.- Vol. 11, N 3.- P. 127-132.
242. *Conner R.L., Bailey K.L., Kozub G.C.* The effect of common root rot on the yield of resistant and susceptible wheat // Can. J. Plant Sci.- 1996.- Vol. 76, N 8.- P. 869-877.
243. *Conner R.L., Duczek L.J., Kozub G.C.* Influence of crop rotation on commune root rot of wheat at barley // Can. J. Plant Pathol.- 1996.- Vol. 18, N 3.- P. 247-254.
244. *Conner R.L., Lindwall C.W., Atkinson T.G.* Influence of minimum tillage on severity of common root rot in wheat // Can. J. Plant Pathol.- 1987.- Vol. 9, N 1.- P. 56-58.
245. *Cook R.J., Baker K.F.* The nature and practice of biological control of plant pathogens.- Beltsville: ARS Press, 1983.- 539 p.
246. *Culter H.G., Grumley F.G., Cox R.H.* Prehelminthosporol and prehelminthosporol-acetate: plant growth regulating properties // J. Agric. Food. Chem.- 1982.- No 30.- P. 658-662.
247. *Curppa A.* Reaction of spring barley cultivars grown in Finland to soil-borne

- infection by *Bipolaris sorokiniana* and to its toxic metabolites // J. Agr. Sci. Finl.- 1985.- Vol. 57, N 2.- P. 85-96.
248. *Dalal R.C., Strong W.M.* Sustaining productivity of a Vertisol at Warra, Queensland, with fertilizers, no-tillage, or legumes: 5. Wheat yields, nitrogen benefits and water-use efficiency of chickpea-wheat rotation // Austr. J. Exp. Agriculture.- 1998.- Vol. 38, N 5.- P. 489-501.
249. *Das A.M., Srivastava D.N.* Production and action on wheat seedlings of toxic metabolites of *Helminthosporium sativum* // Ann. Phytopath. Soc.- 1969.- Vol. 35.- P. 271-281.
250. *Dastur J.F.* Notes on some fungi isolated from «black point» affected wheat kernels in the Central Provinces // Indian J. Agric. Res.- 1942.- Vol.- 12, N 8.- P. 731-742.
251. *Davey C.B.* Nursery soil management – organic amendments // National Proceedings of Forest and Conservation Nursery Associations (Eds. T.D. Landis, D.B. Douth).- Gen. Tech. Rept PNW-GTR-389.- USDA Forest Service PNWRS.- Beltsville, 1996.- P. 6-18.
252. *De Mayo P., Spencer E.Y., White R.V.* Helminthosporal, the toxin from *Helminthosporium sativum*. I. Isolation and Characterization // Can. J. Chem.- 1961.- Vol. 39, N 7.- P. 1608-1612.
253. *De Mayo P., Spencer E.Y., White R.V.* The constitution of helminthosporal // J. Am. Chem. Soc.- 1962.- Vol. 84, N 3.- P. 494-495.
254. *De Mayo P., Williams R.E., Spencer E.Y.* Terpenoids. VIII. The immediate precursors of helminthosporal and helminthosporol // Can. J. Chem.- 1965.- Vol. 43, N5.- P. 1357-1365.
255. *Dickson J.G.* Enfermedades de las plantas de gran cultivo.- Havana: Edition Revolucionaria Instituto del libro, 1969.- 585 s.
256. *Diehl J.A., Tinline R.D.* The effect of fallow periods on common root rot of wheat in Rio Grande do Sul (Brasil) // Phytopathology- 1982.- Vol. 72, N 12.- P. 1297-1301.
257. *Dobbs C.G., Hinson W.H.* A widespread fungistasis in soils // Nature.- 1953.- N 172.- P. 197-199.
258. *Drechsler C.E.* Phytopathological and taxonomic aspects of *Ophiobolus*,

- Pyrenophora*, *Helminthosporium*, and a new genus, *Cochliobolus* // *Phytopathology*.- 1934.- Vol. 24, N 9.P. 953-984.
259. *Drechsler C.E.* Some graminicolous species of *Helminthosporium* // *J. Agr. Res.*- 1923.- Vol. 24, N 8.- P. 641-739.
260. *Duczek L.J.* Constitutive dormancy in conidia of *Bipolaris sorokiniana* // *Can. J. Plant. Pathol.*- 1994.- Vol.16, N 4.- P. 347-349.
261. *Duczek L.J.* Populations in Saskatchewan soils of spore-perforating amoebae and an amoeba (*Thecamoeba granifera* s.sp. minor) which feeds on hypha of *Cochliobolus sativus* // *Plant Soil*.- 1986.- Vol. 92, N 5.- P. 295-298.
262. *Duczek L.J.* Relationship between common root rot (*Cochliobolus sativus*) and tillering in spring wheat // *Can. J. Plant Pathol.*- 1989.- Vol. 11, N 1.- P. 39-44.
263. *Duczek L.J.* Sporulation of *Cochliobolus sativus* on crown and underground parts of spring cereals in relations to weather and host species, cultivar and phenology // *Can. J. Plant. Pathol.*- 1990.- Vol. 12, N 3.- P. 273-278.
264. *Duczek L.J., Jones-Flory L.L., Reed S.L.* Sporulation of *Bipolaris sorokiniana* on the crowns of crop plants grown in Saskatchewan // *Can. J. Plant Sci.*- 1996.- Vol. 76, N 9.- P. 861-867.
265. *Duczek L.J., Sutherland K.A.* Survival of leaf spot pathogens on crop residues of wheat and barley in Saskatchewan // *Can. J. Plant. Pathol.*- 1999.- Vol. 21, N 2.- P. 165-173.
266. *Duczek L.J., Verma P.R., Spurr D.T.* Effect of inoculum density of *Cochliobolus sativus* on common root rot of wheat and barley // *Can. J. Plant Pathol.*- 1985.- Vol. 7, N 4.- P. 382-386.
267. *Dutrecq A., Sommereyns C., Swmal J.* Using resistance to the toxin of *Helminthosporium sativum* as a means of selecting cereals: toxicity tests and toxin preparation // *Annals of Appl. Biology*.- 1978.- Vol. 89, N 2.- P. 370-373.
268. *Duveiller E., Altamirano I.G.* Pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico // *Plant Pathol.*- 2000.- Vol.49, N 2.- P.235-242.

269. *Ecologically-based pest management: new solutions for a new century.*- Washington DC: National Academy Press, 1996.- 134 p.
270. *Eilbert F., Anke H., Sterner O.* Neobulgarones A-F, new dimeric anthraquinones from cultures of *Neobulgaria pura*: Novel inhibitors of appressorium formation of *Magnaporthe grisea* // J. Antibiotics.- 2000.- Vol. 53, N 6.- P. 1123-1129.
271. *Ellis M.B.* Dematiaceous Hyphomycetes.- Kew (England): Commonwealth Mycological Institute, 1971.- 608 p.
272. *El-Nashaar H., Stack R.W.* Effect of long-term continuous cropping of spring wheat on aggressiveness of *Cochliobolus sativus* // Can. J. Plant Sci.- 1989.- Vol. 69, N 4.- P. 395-400.
273. *Engle J.S., Lipps P.E., Mills D.* Spot blotch and common root rot.- Frankfort: Ohio University press, 2004.- 3 p.
274. *Engstrom K., Brishammar S., Svensson C.* Antraquinones from some *Drechslera* species and *Bipolaris sorokiniana* // Mycol. Res.- 1993.- Vol. 97, N 2.- P. 381-384.
275. *Eriksson O.E., Hawksworth D.L.* Outline of the ascomycetes // Myconet. – 2004.- N 10.- 48 p.
276. *Fernandez M.R., Fernandes M.C.* Survival of wheat pathogens in wheat and soybean residues under conservation tillage systems in southern and central Brasil // Can. J. Plant Pathol.- 1990.- Vol. 12, N 2.- P. 289-294.
277. *Fernandez M.R., Zentner R.P.* Effect of crop rotations and fertilizer management on leaf spotting diseases of spring wheat in southern Saskatchewan // Can. J. Plant Sci.- 1998.- Vol. 78, N 5.- P. 489-496.
278. *Fetch T.G., Steffenson B.J.* Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota // Can. J. Plant Pathology.- 1994.- Vol. 16, N 3.- P. 202-206.
279. *Fetch T.G., Steffenson B.J.* Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus* // Plant Disease.- 1999.- Vol. 83, N 4.- P. 213-217.
280. *Fischl G., Szunics L.* Black-points in wheat grains // Novenytermeles.- 1993.- Vol. 42, N 5.- P. 419-429.

281. *Flannigan B.* Microflora of dried barley grain // Trans. Brit. Mycol. Soc.- 1969.- Vol. 53, N 4.- P. 371-379.
282. *Gamliel A., Austerweil M., Kritzman G.* Non-chemical approach to soilborne pest management – organic amendments // Crop Prot.- 2000.- N 19.- P. 847-853.
283. *Gardner J., Rourke D.* Zero tillage // Advancing the Art.- Brandon (Manitoba, Canada): Leech Printing Ltd, 1997.- P. 29.
284. *Garett S.D.* Factors affecting saprophytic survival of six species of cereal root-rot fungi // Trans. Brit. Mycol. Soc.- 1972.- Vol 59, N 3.- P. 445-452.
285. *Gayad S.K.* Production of symptoms of barley leaf spot disease by culture filtrate of *Helminthosporium sativum* // Nature (London).- 1961.- N 191.- P. 725-726.
286. *Gayad S.K.* The pathogenicity of six strains of *Helminthosporium sativum* to three cereals with special reference to barley // Mycopathol.- 1962.- Vol. 18, N 4.- P. 271-279.
287. *Gayad S.K., Kaiser N.* The effect of pH values on the toxicity of culture filtrates of *Helminthosporium sativum* // Mycopathol. Mycol. Appl.- 1962.- Vol. 16, N.2, P. 131-136.
288. *Gerlach W., Nirenberg H.* The Genus *Fusarium* – a pictorial atlas-mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt für land- und forstwirtschaft.- Berlin: Springer-Verlag.- 1982.- Heft 209.- 406 p.
289. *Ghurde V.R.* Saprophytic ability of species of *Helminthosporium* // Trans. Brit. Mycol. Soc.- 1966.- Vol. 49, N 4.- P. 241-243.
290. *Goswami R.S., Kistler H.C.* Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops // Molec. Plant Pathol.- 2004.- Vol. 5, N 6.- P. 515-525.
291. *Gourley C.O.* *Bipolaris sorokiniana* on snap beans in Nova Scotia // Can. Plant Dis. Surv.- 1968.- N 48.- P. 34-36.
292. *Graham K.M., Shoemaker R.A., Colpitts S.J.* *Bipolaris sorokiniana* on snap beans in New Brunswick // Ann. Rep. Can. Plant Dis. Surv.- 1964.- N 44.- P. 113-117.
293. *Greaney F.J., Machacek J.E.* The production of a white fertile saltant of *Helminthosporium sativum* by means of ultra-violet radiation // Phytopathology-1933.- Vol. 23, N 5.- P. 379-383.

294. *Griffin G.J.* Production of a fungistatic effect by soil microflora in autoclaved soil // *Phytopathology*.- 1962.- Vol. 52, N 1.- P. 90-91.
295. *Grzelak K.* Porazenie ziarna jeczmienia jarego *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. a zdolnosc kielkowania i zdrowotnosc siewek // *Ochr. Rosl.*- 1989.- N 10-11.- P. 23-26.
296. *Harding H.* Apparent recovery from field of hyaline-spored strains of *Bipolaris sorokiniana* 15 years after introduction // *Can. J. Bot.*- 1973.- Vol. 51, N 1.- P. 9-13.
297. *Harding H.* Effect of *Bipolaris sorokiniana* on germination and seedling survival of varieties or lines of 14 *Triticum* species // *Can. J. Bot.*- 1971.- Vol. 49, N 3.- P. 281-287.
298. *Harding H.* Effect of d-amino acids on conidium size and numbers of pseudosepta per conidium in isolates of *Bipolaris sorokiniana* // *Can. J. Bot.*- 1975.- Vol. 53, N 7.- P. 600-603.
299. *Harding H.* Effect of pH and sucrose concentration on conidium size and septation in four *Bipolaris* species // *Can. J. Bot.*- 1975.- Vol. 53, N 15.- P. 1457-1464.
300. *Harding H.* Fungi associated with subcrown internodes of wheat (*Triticum aestivum*) // *Can. J. Bot.*- 1973.- Vol. 51, N 12.- P. 2514-2516.
301. *Harding H.* Reaction to common root rot of 15 *Triticum* species and the incidence of *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium* spp. in subcrown internode tissue // *Can. J. Bot.*- 1972.- Vol. 50, N 16.- P. 1805-1810.
302. *Harding H.* Root rot of cereals – everyone problem? // *Can. Agr.*- 1978.- N 23.- P.25-29.
303. *Harding H.* Spore-color mutants of *Bipolaris sorokiniana* // *Can. J. Plant Pathol.*- 1984.- Vol. 6, N 4.- P. 273-279.
304. *Hashimoto T., Sakurai A., Tamura S.* Physiological activities of helminthosporol and helminthosporic acid. I. Effects on growth of intact plants // *Plant Cell Physiol.*- 1967.- Vol. 8, N 1.- P. 23-34.
305. *Hashimoto T., Sakurai A., Tamura S.* Physiological activities of helminthosporol and helminthosporic acid. II. Effects on excited plant parts // *Plant Cell Physiol.*- 1967.- Vol. 8, N 1.- P. 35-45.

306. Hassan A.A., Hack E. Role of root exudates and toxins in susceptibility of wheat cultivars from the Yemen to *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*) / Proc. of 7th International Congress of Plant Pathology.- Edinburgh (Scotland): British Society for Plant Pathology.- 1998.- P. 10-12.
307. Heimann M.G., Stevenson W.R., Rand R.E. *Bipolaris sorokiniana* found causing lesions on snapbean in Wisconsin // Plant Dis.- 1989.- Vol. 73, N 8.- P. 701.
308. Hewett P.D. A health survey of seed barley // Plant Pathol.- 1975.- Vol. 24, N 3.- P. 229-232.
309. Hodges C.F., Campbell D.A. Endogenous ethane and ethylene of *Poa pratensis* leaf blades and leaf chlorosis in response to biologically active products of *Bipolaris sorokiniana* // Europ. J. Plant Pathol.- 1999.- N 105.- P. 825–829.
310. Hoitink H.A.g., Boehm M.J., Hadar Y. Mechanisms of suppression of soilborne plant pathogens in compost-amended substrates // Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization aspects / Eds. H.A.g. Hoitink, H.M. Keener.- Worthington (OH, USA): Renaissance Publication, 1993.- P. 601-621.
311. Hosford R.M., Solangi G.R.M., Kiesling R.L. Inheritance in *Cochliobolus sativus* // Phytopathology.- 1975.- Vol. 65, N 11.- P. 699-703.
312. Hossain M.M., Hossain I. Effect of black pointed seed in seed sample on leaf spot severity and grain infection of wheat in the field // Pakistan J. Biolog. Sci.- 2001.- Vol. 4, N 11.- P. 1350-1352.
313. Howard R.J., Ferrari M.A. Role of melanin in appressorium function // Exp. Mycol.- 1989.- Vol. 13, N 2.- P. 103-118.
314. Hörnold C., Undisz K. Bioconversion of steroids by *Cochliobolus lunatus* // J. Basic Microbiol.- 1986.- Vol. 26, N 6.- P. 335-339.
315. Hrustovetz S.B. Cytological studies of ascus development in *Cochliobolus sativus*. II // Can. J. Bot.- 1956.- Vol. 34, N 6.- P. 641-652.
316. Hrushovetz S.B. Cytological studies of *Helminthosporium sativum*. I // Can. J. Bot.- 1956.- Vol. 34, N 3.- P. 321-327.
317. Huang H.C., Tinline R.D. Histology of *Cochliobolus sativus* infection in subcrown

- internodes of wheat and barley // Can. J. Bot.- 1976.- Vol. 54, N 12.- P. 1344-1354.
318. *Huang H.C., Tinline R.D.* Somatic mitosis in haploid and diploid strains of *Cochliobolus sativus* // Can. J. Bot.- 1974.- Vol. 52, N 16.- P. 1561-1568.
319. *Huang H.C., Tinline R.D.* Ultrastructure of somatic mitosis a diploid strain of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus* // Can. J. Bot.- 1975.- Vol. 53, N 4, P. 403-414.
320. *Hughes S.J.* Conidiophores, conidia and classification // Canad. J. Bot.- 1953.- Vol. 31, N 6.- P. 577-659.
321. *Hughes S.J.* New Zealand fungi. 25. Miscellaneous species // New Zealand J. Bot.- 1978.- Vol. 16, N 3.- P.311-370.
322. *Hyder A., Fakir M.M., Fakir G.A.* Fungi associated with wheat grains in Bangladesh and their pathogenic significance // Bangladesh J. Bot.- 1992.- Vol. 21, N 2.- P. 173-180.
323. *Ibeagha A., Jain S., Huckelhoven R.* Mechanisms of susceptibility and resistance to the hemibiotrophic phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* // Proc. Intern. Conf. "Rural poverty reduction through research for development".- Berlin: Deutscher Tropentag.- 2004.- P. 207.
324. *Ibeagha A., Hückelhoven R., Kogel K.-H.* Model wheat genotypes as tools to uncover effective defense mechanisms against the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* // Phytopathology.- 2005.- Vol. 95, N 5.- P. 528-532.
325. *Ingold C.T.* Fungal spores. Their liberation and dispersal.- Oxford: Clarendon press, 1971.- 302 p.
326. *Innocenti G.* Effect of tillage practices on fungal diseases of winter cereals // Inform. Fitopatol.- 1993.- Vol. 43, N 6.- P. 31-38.
327. *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)* adopted by the Sixteenth International Botanical Congress / Greuter W., McNeill J., Barrie F.R., Burdet H.M., Demoulin V., Filgueiras T.S., Nicolson D.H., Silva P.C., Skog J.E., Trehane P., Turland N.J., Hawsksworth D.L. (Editors and compilers).- Königstein: Koeltz Scientific Books, 2000.- 474 p.
328. *International rules for seed testing.* Recommendations of International Seed Testing

Association // Seed Sci.- 1996.- N24 (Suppl).- P. 29-72.

329. Ito S. On some new ascigerous stages of the species of *Helminthosporium* parasitic on cereals // Jap. J. Fac. Agric. Hokkaido Imp. Univ.- 1930.- Vol. 6, N 6.- P.352-355.
330. Ito S., Kuribayashi K. The ascigerous forms of some graminicolous species of *Helminthosporium* in Japan // Jap. J. Fac. Agric. Hokkaido Imp. Univ. - 1931.- Vol. 29, N 2.- P. 85-125.
331. Jones L.C. Studies of compatibility in Australian isolates of *Bipolaris sorokiniana* // Austr. J. Biol. Sci.- 1971.- Vol. 24, N 1.- P. :51-55.
332. Jorgensen J.H. Species *Fusarium* and *Helminthosporium* on seed of barley grown in Denmark during 1965-1967 // Acta Agric. Scand.- 1969.- N 19.- P. 92-98.
333. Kato J., Shiotani Y., Tamura S. Physiological activities of helminthosporol in comparison with those of gibberellin and auxin // Planta (Berlin).- 1966.- Vol. 68, N 5.- P. 353-359.
334. Kelly M., Burke J., Smith M. Variation in mating capacities among 103 isolates of *Cochliobolus sativus* // Phytopathology.- 1968.- Vol. 58, N 11.- P. 1055-1058.
335. Kennedy A.C., Smith K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils // Plant Soil.- 1995.- N 170.- P. 75-86.
336. Koech R., Stack R.W. Host specialization in *Cochliobolus sativus*, a fungus causing root rot of wheat and barley // Proc. Nederl. Acad. Sci.- 1991.- Vol. 45.- P. 40.
337. Krupinsky J.M., Bailey K.L. Managing plant disease risk in diversified cropping systems // Proc. of Symposium on crop diversification in northern great plains cropping systems.- Salt Lake City (UT, USA): Amer. Soc. Agronomy.- 1999.- P. 121-129.
338. Krupinsky J.M., Berdahl J.D. Selecting resistance to *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium graminearum* in intermediate wheatgrass // Plant Disease.- 2000.- Vol. 88, N 12.- 1299-1302.
339. Krupinsky J.L., Halvorson A.D., Black A.L. Leaf spot diseases of wheat in a conservation tillage study // *Helminthosporium* blight of wheat: spot blotch and tan spot / E. Duveiller et al eds.- Mexico: CIMMYT, 1998.- P. 322-326.

340. Krurinsky J.M., McMullen M. Advancing the Art – Diseases // Zero Tillage, Advancing the Art.- Manitoba: Zero Tillage Farmers Association, 1997.- P. 29-33.
341. Kumar J., Hückehoven R., Beckove U. A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* [teleomorph: *Cochliobolus sativus*] and its toxins // Phytopathology.- 2001.- Vol. 91, N 2.- P. 127-133.
342. Kumar J., Schäfer P., Hückehoven R. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control // Molec. Plant Pathol.- 2003.- Vol. 3, N 4.- P. 185-195.
343. Kuribayashi K. The ascigerous stage of *Helminthosporium sativum* // Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.- 1929.- N 10.- P. 138-145.
344. Kurppa A. Reaction of spring barley cultivars grown in Finland to soil-borne infection by *Bipolaris sorokiniana* and to its toxic metabolites // J. Agric. Sc. Finl.- 1985.- Vol. 57, N 1.- P. 85–96.
345. Kurppa A. *Bipolaris sorokiniana* on barley seed in Finland // J. Agric. Sci. Finland.- 1984.- Vol. 56, N 3.- P. 175-182.
346. Kurppa A. The pathogenisity and importance of seed-borne infection by *Bipolaris sorokiniana* on barley in Finland // J. Agric. Sci. Finland- 1985.- Vol. 57, N 2.-P. 107-115.
347. Kutcher H.R., Bailey K.L., Rossnagel B.G. Heritability of common root rot and spot blotch resistance in barley // Can. J. Plant Pathol.– 1994.– Vol. 16, N 4.– P. 287-294.
348. Kutcher H.R., Bailey K.L., Rossagel B.G. Identification of RAPD markers for common root rot and spot bloth (*Cochliobolus sativus*) resistance in barley // Genome.- 1996.- Vol.39, N 1.- P. 206-215.
349. Lacicowa B. Wzajemne oddziaлиwanie neiktorych grzydow zasiidalajacych material siewny zboz // Acta. Mycol. (Poland)- 1973.- Vol. 1, N 1.- P. 7-10.
350. Leach C.M. Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Stemphium* // Can. J. Bot.- 1967.- Vol.45, N. 14.- P. 1999-2016.

351. *Ledingham R.J.* Crop rotations and common root rot in wheat // *Can. J. Plant. Sci.*- 1961.- Vol. 41, N 6.- P. 479-486.
352. *Ledingham R.J., Atkinson T.G., Horricks J.T.* Wheat losses due to common root rot in the prairie provinces of Canada, 1969-1971 // *Can. Plant Dis. Surv.*- 1973.- Vol. 53, N 3.- P. 113-118.
353. *Liddell C. M., Burgess L.W.* Stratified distribution of *Fusarium* and *Bipolaris* on wheat and barley with dryland root rot in South Australia // *Plant Pathol. (Oxford).*- 1987.- Vol. 36, N 4.- P. 447-454.
354. *Liljeroth E., Franzon-Almgren I., Gustafsson M.* Effect of prehelminthosporal, a phytotoxin produced by *Bipolaris sorokiniana*, on barley roots // *Can. J. Bot.*- 1994.- Vol. 72, N 5.- P. 558-563.
355. *Limpert E., Miller K.* Designation of pathotypes of plant pathogens // *J. Phytopathol.* 1994.- N 140.- 346-358.
356. *Lingappa B.T., Locqwood J.L.* The nature of widespread soil fungistasis // *J. Gen. Microb.*- 1961.- Vol. 26, N 7.- P. 473-485.
357. *Loiselle R.* Inheritance of resistance to root rot and seedling blight of barley caused *Helminthosporium sativum* // *Can. J. Plant Sci.*- 1965.- Vol. 45, N 3.- P. 238-242.
358. *Ludwig R.A.* Toxin production by *Helminthosporium sativum* P., K. et B. and its significance in disease development // *Can. J. Bot.*- 1957.- Vol. 35, N 3.- P. 291-303.
359. *Ludwig R.A., Clark R.V., Julien J.B.* Studies on the seedling disease of barley caused by *Helminthosporium sativum* P., K. et B. // *Can. J. Bot.*- 1956.- Vol. 34, N 4.- P. 653-673.
360. *Lupwayi N.Z., Rice W.A., Clayton G.W.* Soil microbial biomass and carbon dioxide flux under wheat as influenced by tillage and crop rotation // *Can. J. Soil Sci.*- 1999.- Vol. 79, N 3.- P. 273-280.
361. *Lupwayi N.Z., Rice W.A., Clayton G.W.* Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation // *Soil Biol. Biochem.*- 1998.- N 30.- P. 1733-1741.
362. *Luttrell E.S.* A taxonomic revision of *Helminthosporium sativum* and related species // *Amer. Journ. Bot.*- 1955.- Vol. 42, N 1.- P. 57-68.

363. *Luttrell E.S.* Correlation between conidial and ascigerous state characters in *Pyrenophora*, *Cochliobolus* and *Setosphaeria* // *Rev. Mycol.*- 1977.- Vol. 41, N 2.- P. 271-279.
364. *Luttrell E.S.* Systematics of *Helminthosporium* and related genera // *Mycologia*.- 1964.- Vol. 56, N 1.- P. 119-132.
365. *Luttrell E.S.* Taxonomic criteria in *Helminthosporium* // *Mycologia*.- 1963.- Vol. 55, N 5.- P. 643-674.
366. *Marin J.P.* Fungi associated with foot rot of wheat in southern Spain // *Investigacion Agraria. Sect. Produccion et Proteccion Vegetales*.- 1986.- Vol. 1, N 3.- P. 409-431.
367. *Mathre D.E.* Compendium of barley diseases.- St. Paul (MN, USA): The American Phytopathological Society Press, 1997.- 90 p.
368. *Mehta Y.R.* Conidial production, sporulation period and extension of lesion of *Helminthosporium sativum* on flag leaves of wheat // *Resq. Agropec. Bras.*- 1981.- Vol. 16, N 1.- P. 77-99.
369. *Mehta Y.R.* Identification of races of *Helminthosporium sativum* of wheat in Brasil // *Resq. Agropec. Bras.*- 1981.- Vol. 16, N 3.- P. 331-336.
370. *Meldrum S.I., Platz G.J., Ogle H.J.* Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in Australia // *Austral. Plant Pathol.*- 2004.- Vol. 33, N 2.- P. 109-114.
371. *Meronuck R.A., Pepper E.H.* Chlamydospore formation in conidia of *Helminthosporium sativum* // *Phytopathology*.- 1968.- Vol. 58, N 6.- P. 634-643.
372. *Misra A.P.* Recent trends of researches in graminicolous *Helminthosporia* // *Ind. Phytopathol.*- 1989.- Vol. 42, N 2.- P. 209-220.
373. *Misra A.P.* Variability, physiologic specialization and genetics of pathogenicity in graminicolous species of *Helminthosporia* affecting cereal crops // *Ind. Pytopathol.*- 1971.- Vol.24, N 3.- P. 582-583.
374. *Money N.P.* Mechanism linking cellular pigmentation and pathogenicity in rice blast disease // *Fungal Genet. Biol.*- 1997.- Vol. 22, N 11.- P. 151-152.
375. *Motta da S., Valente-Soares L.M.* A method for the determination of two *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether in tomato products // *Bras. J. Microb.*- 2000.- Vol. 31, N 2.- P. 315-320.

376. Myhill R.R., Konzak C.F. A new technique for culturing and measuring barley seedlings // Crop Sci.- 1967.- Vol. 7, N 3.- P. 211-220.
377. Nagai M., Kawata M., Watanabe H. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies // Microbiology.- 2003.- Vol. 149, N 2.- P. 2455-2462.
378. Nakajima H., Isomi K., Hamasaki T. Sorokinianin: a novel phytotoxin produced by the phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* // Tetrahedron Lett.- 1994.- N 35.- P. 9597-9600.
379. Nakajima H., Toratsu Y., Fujii Y. Biosynthesis of sorokinianin a phytotoxin of *Bipolaris sorokiniana*. Evidence of mixed origin from the sesquiterpene and TCA pathways // Tetrahedron Lett.- 1998.- N 39.- P. 1013-1016.
380. Navneet B.K., Mehrotra R.S. Phyllosphere mycoflora of wheat in relation to leaf leachates and resistance to helminthosporium blight // Ind. Phytopathol.- 1988.- Vol. 41, N 4.- P. 398-405.
381. Neal J.L., Atkinson J.T.G., Larson R.I. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome // Can. J. Microbiol.- 1970.- Vol. 16, N 1.- P. 153-158.
382. Nilsson P., Åkesson H., Jansson H.-B. Production and release of the phytotoxin prehelminthosporol by *Bipolaris sorokiniana* during growth // FEMS Microbiol. Ecol.- 1993.- N 102.- P. 91-98.
383. Okuda M., Kalo J., Tamura S. Effects of helminthosporol and helminthosporic acid on activation of α -amilase production in barley endosperm // Planta.- 1967.- Vol. 72, N3.- P. 289-291.
384. Olbe M., Sommarin M., Gustafsson M. Effect of the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* toxin prehelminthosporol on barley root plasma membrane vesicles // Plant Pathol.- 1995.- Vol. 44, N 8.- P. 625-635.
385. Old K.M. Fungistatic effects of soil bacteria on rot-rotting fungi with particular reference to *Helminthosporium sativum* // Phytopathology.- 1965.- Vol. 55, N 7.- P. 901-905.

386. 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, N 4.- P. 350-358.
387. Orr D.D., Turkington T.K. Foliar diseases development on Harrington barley // Pest Management Research Report: Report №105.- Ontario (Canada): Agriculture and Agri-Food Canada, 1997.- P. 280-281.
388. Pammel L.H., King C.M., Bakke A.L. Two barley blights with comparison of species of *Helminthosporium* upon cereals // Iowa Arg. Exp. Sta. Bull.- 1910.- N 116.- P. 178-190.
389. Patra M., Chawla H.S. Screening of wheat genotypes against toxin and pathogen of *Helminthosporium sativum* // Wheat Information Service.- 1999.- Vol. 88, N 1.- P. 1-5.
390. Pena-Rodriguez L.M., Armingeon N.A., Chilton W.S. Toxins from weed pathogens. I. Phytotoxins from a *Bipolaris* pathogen of Johnson grass // J. Natur. Products.- 1988. Vol. 51, N 5.- P. 821-828.
391. Peterson E.A., Katznelson H. Studies on the nutrition of *Helminthosporium sativum* and certain related species // Can. J. Microb.- 1954.- Vol. 1, N 3.- P. 190-197.
392. Piccinni G., Rush C.M. Lack of relationship between susceptibility to common root rot and drought tolerance among several closely related wheat lines // Plant Dis.- 2000.- Vol. 84, N 1.- P. 25-28.
393. Pon D.S. A new light-colored race of *Helminthosporium sativum* // Phytopathol.- 1952.- Vol. 42, N 5.- P. 472-476.
394. Pontecorvo G., Roper J.A., Hemmons L.M. The genetics of *Aspergillus nidulans* // Adv. Genet.- 1953.- Vol. 5, N 3.- P. 141-238.
395. Pringle R.B. Comparative biochemistry of the phytopathogenic fungus *Helminthosporium*. XVI. The production of victotoxine by *H. sativum* and *H. victoriae* // Can. J. Biochem.- 1976.- Vol. 54, N 8.- P. 783-787.
396. Pringle R.B. Nonspecific adhesion of *Bipolaris sorokiniana* sporelings // Can. J. Plant Pathol.- 1981.- Vol. 3, N 1.- P. 9-11

397. *Pringle R.B.* Role of toxins in etiology of root rot disease of wheat // *Can. J. Bot.*- 1977.- Vol. 55, N 13.- P. 1801-1806.
398. *Pua E.-C., Pellettier R.-L., Klinck H.R.* Seedling blight, spot blotch and common root rot in Quebec and their effect on grain yield in barley // *Can. J. Plant. Pathol.*- 1985.- Vol. 7, N.4.- P. 395-401.
399. *Rabie C.J., Lubben A., Steyn M.* Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on semisynthetic liquid and solid media // *Appl. Environ. Microbiol.*- 1976.- Vol. 32, N 2.- P. 206-208.
400. *Raemaekers R.H.* First occurrence in nature of *Cochliobolus sativus*, the teleomorph of *Bipolaris sorokiniana* // Contribution to the epidemiology of *Bipolaris sorokiniana* diseases and the development of rainfed wheat, a new crop in Zambia.- Belgium: Katholieke Universiteit te Leuven, 1991.- P. 70-85.
401. *Raemaekers R.H., Tinline R.D.* Epidemic of diseases caused by *Cochliobolus sativus* on rainfed wheat in Zambia // *Can. J. Plant Pathol.*- 1981.- Vol. 3, N 4.- P. 211-214.
402. *Ramakrishna N., Lacey J., Smith E.* Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds // *Int. J. Food Microbiol.*- 1991.- Vol. 13, N 1.- P. 47-54.
403. *Reis E.M.* Integrated disease management. The changing concepts of controlling head blight and spot blotch // Proceedings of the International Conference "Wheat for the Non-traditional Warm Areas".- Brasil: D.A. Saunders.- 1990.- P. 165-177.
404. *Reis E.M.* Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil // *Plant. Dis.*- 1983.- Vol. 67, N 1.- P. 68-70.
405. *Reis E.M., Demardin J.E., Kochhan R.A.* Fluctuations of *Cochliobolus sativus* propagules in the soil related to systems of soil tillage // *Fitopatol. Brasil.*- 1990.- Vol. 15, N 6.- P. 267-269.
406. *Reis E.M., Silva C.E.L.* Decomposition of wheat crop residues and saprophytic survival of *Bipolaris sorokiniana* // *Fitopatologia.*- 1998.- Vol. 23, N 2.- P. 62-64.
407. *Roberti R., Flori P.* Evaluation of chemical seed treatment for the control of seed-borne *Fusarium culmorum* and *Bipolaris sorokiniana* on wheat // *Proc. of*

- International Symposium “Fytofarmacie en Fytiatrie”.- Pt. I.- Emilia-Romagna: Assoc. Plant. Pathol.- 1992.- P. 223-230.
408. *Robson A.D., Taylor A.C.* The effect of tillage on the chemical fertility of soil // Tillage – New directions on Australian Agriculture / P.S. Cornish, J.E. Pratley (Eds.).- Melbourne: Inkata Press, 1987.- P. 284-307.
409. *Saccardo P.A.* Sylloge Fungorum omnium hucusque cognitorum.- Patavia (Italy): Patavii sumptibus auctoris, 1892.- Vol.10.- P. 415-416; 615-616.
410. *Saccardo P.A.* Sylloge Fungorum omnium hucusque cognitorum.- Patavia (Italy): Patavii sumptibus auctoris, 1931.- Vol.25.- P. 822.
411. *Sakti J., Bailey K.L.* Responses of wild cultivated barley from West Asia to net blotch and spot blotch // Crop Science.- 1995.- Vol.35, N 1.- P. 242-246.
412. *Sámi L., Emri T., Pócsi I.* Adhesion of conidia and germlings of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* to solid surfaces // Mycolog. Res.- 2001.- Vol. 105, N 10.- P. 1246.
413. *Sanford G.B., Broadfoot W.C.* On the prevalence of pathogenic forms of *Helminthosporium sativum* and *Fusarium culmorum* in the soil of wheat fields and its relation to the root rot problem // Can. J. Plant Res.- 1934.- Vol. 10, N 4.- P. 264-274.
414. *Shaeffer J.M., Frazier E.G., Bergstrom A.R.* Cochlioquinone A, a nematocidal agent which competes for specific [3H]ivermectin binding sites // J. Antibiot. (Tokio).- 1990.- Vol. 43, N 9.- P. 1179-1182.
415. *Schäfer P., Kumar J.S., Delineau M.* Cytological analysis of organ-specific resistance responses to *Bipolaris sorokiniana* in oat // Modern fungicides and antifungal compounds. New York: BCPC.- 2005.- P. 113-119.
416. *Shimizu K., Tanaka Ch., Tsuda M.* Molecular phylogeny of graminicolous species of *Helminthosporium sensu lato*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* and *Exserohilum* // Materials of the 19-th fungal genetics conference.- Pacific Grove (California): Asilomar Conference Grounds, 1997.- P. 89.
417. *Shoemaker R.A.* Biology, cytology and taxonomy of *Cochliobolus sativus* // Can. J. Bot.- 1955.- Vol. 33, N 6.- P. 562-576.
418. *Shoemaker R.A.* Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites

- segregated from «*Helminthosporium*» // Can. J. Bot.- 1959.- Vol. 37, N 5.- P. 879-887.
419. Sivanesan A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exerohilum* and their teleomorphs // Mycol. Papers.- 1987.- N 158.- P. 1-261.
420. Smiley R.W., Patterson L.M. Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest // Plant Dis.- 1996.- Vol. 80, N 8.- P. 944-949.
421. Sommereyns G., Closset J.L. Preparation of helminthosporal by extraction with diethyl ether from culture filtrates of *Helminthosporium sativum* P., K. et B. // Phytopathol. Z.- 1978.- Bd. 92, N 3.- S. 202-210.
422. Sparague R. Diseases of cereals and grasses in North America. - New York: Ronald Press. Company, 1950.- 538 p.
423. Steffenson B.J., Hayes P.M., Kleinhofs A. Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley // Theor. Appl. Genet.- 1996.- Vol. 92, N 6.- P. 552-558.
424. Steiner G.W., Lockwood J.L. Soil fungistasis: sensitivity of spores in relation to germination time and size // Phytopathology.- 1969.- Vol. 59, N 8.- P. 1084-1092.
425. 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, N 1.- P. 14-27.
426. Stevenson I.L. Timing and nature of seed infection of barley by *Cochliobolus sativus* // Can. J. Plant Pathol.- 1981.- Vol. 3, N 2.- P. 76-85.
427. Sturz A.V., Christie B.R., Nawak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production // Critical Rew. Plant Sci.- 2000.- Vol. 19, N 1.- P. 1-30.
428. Subramanian C.V. Hyphomycetes: taxonomy and biology.- London/Toronto: Academic Press, 1983.- 502 p.
429. Subramanian C.V., Jain B.L. A revision of some graminicolous Helminthosporia // Curr. Sci.- 1966.- Vol. 35, N 14.- P. 352-355.
430. Subramanian C.V., Jain B.L. Conidiospore types in *Cochliobolus sativus* // Trans. Br.

- Mycol. Soc.- 1964.- Vol. 47, N 6.- 613-618.
431. *Subramanian C.V., Tyagi P.D.* Utilization of various forms of nitrogen by *Drechslera sorokiniana* – the pathogen causing foot rot disease in wheat // Proc. Ind. Acad. Sci.- 1968.- Vol. 68, N 3.- P. 1110-1128.
432. *Suryanarayanan T.S., Janarthanam M.K.* Induction of hyphal branching in *Bipolaris sorokiniana* by sodium chloride // Proc. Ind. Acad. Sci.-1985.- Vol. 95, N 2.- P. 65-69.
433. *Tamura S., Sakurai A., Kainuma K.* Isolation of helminthosporol as a natural growth regulator and its chemical structure // Agric. Biol. Chem.- 1965.- Vol. 29, N 4.- P. 216-221.
434. *Taniguchi E., White G.A.* Site of action of the phytotoxin, helminthosporol // Biochem. Biophys. Res. Communic.- 1967.- N 28.- P. 879–885.
435. *Thines E., Anke H.* Scytalols A, B, C, and D and other modulators of Melanin Biosynthesis from *Scytalidium sp.* 36-93 // J. Antibiot.- 1997.- Vol. 51, N 4.- P. 387-393.
436. *Thines E., Eilbert F., Sterner O.* Inhibitors of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*: A new approach to control rice blast disease // Pest. Sci.-1998.- Vol. 54, N 2.- P. 314-316.
437. *Tinline R.D. Cochliobolus sativus.* IV. Drug resistant, color and nutritionally exacting mutants // Can. J. Bot.- 1961.- Vol. 39, N 7.- P. 1695-1704.
438. *Tinline R.D. Cochliobolus sativus.* V. Heterokaryosis and parasexuality // Can. J. Bot.- 1962.- Vol. 40, N 3.- P. 425-437.
439. *Tinline R.D. Cochliobolus sativus.* VII. Nutritional control of the pathogenicity of some auxotrophs to wheat seedlings // Can. J. Bot.- 1963.- Vol. 41, N 3.- P. 491-497.
440. *Tinline R.D. Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range // Advances in plant pathology / D.S. Ingram, P.H. Williams, eds.- Vol. 6.- London, England: Academic Press, 1988.- P. 113-122.
441. *Tinline R.D.* Multiple infection of subcrown internodes of wheat (*Triticum aestivum*) by common root rot fungi // Can. J. Bot.- 1977.- Vol. 55, N 1.- P. 30-34.
442. *Tinline R.D.* Pathogenic and cultural variation in *Cochliobolus sativus* // Trans. Brit. Mycol. Soc.- 1960.- Vol. 43, N 6.- P. 696-697.

443. Tinline R.D. Studies of the perfect stage of *Helminthosporium sativum* // Can. J. Bot.- 1951.- Vol. 29, N 5.- P. 467-480.
444. Tinline R.D., Harding H. Inheritance of some genetic markers in *Cochliobolus sativus* // Mycologia.- 1988.- Vol. 80, N8.- P. 863-865.
445. Tinline R.D., Hunter J.H. Herbicides and common root rot of wheat in Saskatchewan // Can. J. Plant Pathol.- 1982.- Vol. 4, N. 4.- P. 341-348.
446. Tinline R.D., Sallans B.J., Simmonds P.M. The perithecial stage of *Helminthosporium sativum* // Proc. Can. Phytopath. Soc.- (1950) 1949.- N 17.- P. 1-30.
447. Tinline R.D., Samborski D.J. *Cochliobolus sativus*. II Photoactivated pigmentation // Mycologia, 1959.- Vol. 51, N 1. P. 77-88.
448. Tinline R.D., Spurr D.T. Agronomic practices and common root rot in spring wheat: Effect of tillage on disease and inoculum density of *Cochliobolus sativus* in soil // Can. J. Plant Pathol.- 1991.- Vol. 13, N 3.- P. 258-266.
449. Tinline R.D., Stauffer J.F., Dickson J.G. *Cochliobolus sativus*. III Effect of ultraviolet radiation // Can. J. Bot.- 1960.- Vol. 38, N 3.- P. 275-282.
450. Tinline R.D., Ukrainetz H., Spurr D.T. Agronomic practices and common root rot in spring wheat: Effect of tillage on disease and inoculum density of *Cochliobolus sativus* in soil // Can. J. Plant Pathol.- 1993.- Vol. 15, N 1.- P. 65-73.
451. Triller C., Mehta Y.R. Effect of wheat flag leaf age in resistance expression to *Bipolaris sorokiniana* // Summa Phytopathol.- 1997.- Vol. 23, N 2.- P. 167-169.
452. Tyagi P.D. Some effects of culture filtrates of *Bipolaris* spp. on wheat roots // Proc. Ind. Acad. Sci.- 1963.- Sect. B.- Vol. 57, N 1.- P. 106-116.
453. Valjavec-Gratian M., Steffenson B.J. Genetics of virulence in *Cochliobolus sativus* and resistance in barley // Phytopathology.- 1997.- Vol. 87, N 11.- P. 1140-1143.
454. Valjavec-Gratian M., Steffenson B.J. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota // Plant Disease.- 1997.- Vol. 81, N 12.- P. 1275-1278.
455. Van Den Berg A.P., Van Den Berg –Blok A.E., Noordeloos M.E. A new species and a new section of the genus *Mycena* from Netherlands // Persoonia.- 2000.- Vol. 17, N 3.- P. 481-485.

456. *Vargas P.R., Picinini E.C.* Seed health of triticale and wheat produced in different regions of Brazil.- Mexico: Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz, 1991.- 220 p.
457. *Veen J.A., Overbeek L.S., Elsas J.D.* Fate and activity of microorganisms introduced into soil // *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*- 1997.- Vol. 61, N 2.- P. 121-135.
458. *Verma P.R., Morrall A.A., Tinline R.D.* The effect of common root rot on components of grain yield in Manitou wheat // *Can. J. Bot.* – 1976.- Vol. 54, N 16.- P. 2888-2892.
459. *Wani S.P., McGill W.B., Tewari J.P.* Mycorrhizal and common root rot infection and nutrient accumulation in barley grown on Breton loam using N from biological fixation or fertilizer // *Biol. Fertil. Soils.*- 1991.- N 12.- P. 46-54.
460. *Wanyera R.* Seed-health studies in wheat (*Triticum aestivum*) in Kenia / 7th International Congress of Plant Pathology.- Birmingham: British Society for Plant Pathology.- 1998.- P. 97.
461. *Weller D.M.* Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria // *Ann. Rev. Phytopathol.*- 1988.- Vol. 26, N 2.- P. 379-407.
462. *Wheeler M.H., Bell A.A.* Melanins and their importance in pathogenic fungi. // *Current Topics in Medical Mycology* / M.R. McGinnis ed.- Vol. 2.- 1988.- P. 338-387.
463. *White G.A., Taniguchi E.* The mode of action of helminthosporal. I. Effect on the formation of amylase by embryoless barley seeds // *Can. J. Bot.*- 1969.- Vol. 47, N 6.- P. 873-884.
464. *White G.A., Taniguchi E.* The mode of action of helminthosporal. II. Effect on the permeability of plant cell membrans // *Can. J. Bot.*- 1972.- Vol. 50, N 6.- P. 1415-1420.
465. *Whittle A.M.* *Cochliobolus sativus* on barley in Scotland // *Plant Pathol.*- 1977.- Vol. 26, N 1.- P 67-74.
466. *Whittle A.M., Richardson M.J.* Yield losses caused by *Cochliobolus sativus* on Clermont barley // *Phytopath. Z.*- 1978.- Bd. 91, N 1.- S. 238-256.
467. *Wiese M.V.* Compendium of wheat diseases.- St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society Press, 1987.- 112 p.

468. Wilcoxson R.D., Rasmussen D.C., Miles M.R. Development of barley resistant to spot blotch and genetics of resistance // Plant Disease.- 1990.- Vol. 74, N 2.- P. 207-210.
469. Windels C.E., Holen C. Association of *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum* group 2, and *F. culmorum* on spring wheat differing in severity of common root rot // Plant Disease.- 1989.- Vol. 73, N 12.- P.- 953-956.
470. Windels C.E., Wiersma J.V. Incidence of *Bipolaris* and *Fusarium* on subcrown internodes of spring barley and wheat grown in continuous conservation tillage // Phytopathology.- 1992.- Vol. 82, N 6.- P. 699-705.
471. Wood L.S. Relation of variation in *Helminthosporium sativum* to seedling blight of small grains // Phytopathology, 1962.- Vol. 52, N. 3.- P. 493-497.
472. Wood L.S., Christensen J.J., Lambert J.W. *Helminthosporium sativum* becomes destructive on hitherto resistant varieties of barley // Phytopathology.- 1954.- Vol. 44.- N 4.- P. 511-516.
473. Wosten H.A. Hydrophobins: multipurpose proteins // Ann. Rev. Microbiol.- 2001.- Vol. 55, N 1.- P. 625-646.
474. Wu W., Yang J., Chang N. Purification of helminthosporal-toxin in the wheat root rot disease // J. Toxicol.- 1990.- Vol.9, N 1.- P. 118-124.
475. Wu W., Yang J., Chang N. Study of *Helminthosporium sativum* toxins // Acta Mycol. Sin.- 1989.- Vol. 8, N 1.- P. 70-79.
476. Wu W., Yang J., Zhang X. Wheat resistance to *Helminthosporium sativum* toxins and its relation with electric resistance // Acta Phytopathol. Sin.- 1989.- Vol. 18, N 2.- P. 65-71.
477. Yadav B.S. Spore germination and germ tube growth of *Drechslera sorokiniana* in relation to temperature, age, molarity and pH // Geobios.- 1983.- Vol. 10, N 2.- P. 52-55.
478. Yadav B.S. Synthesis of cytokinins and auxins in vitro by *Drechslera sorokiniana* // Ind. Phytopath.- 1985.- Vol. 38, N 2.- P. 348-349.
479. Yadav B.S., Mandanar C.L. Fluctuation in sugar and amino acid contents of leaf leachates during primary infection by *Helminthosporium sativum* // J. Ind. Bot. Soc.- 1982.- Vol. 61, N 2.- P. 172-176.

480. Yadav B.S., Mandanar C.L. Secretion of cytokinin-like substance in vivo and in vitro by *Helminthosporium sativum* and their role in pathogenesis // Z. Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz.- 1981.- Bd. 88, N 6.- S. 726-733.
481. Yadav B.S. Synchrony in *Drechslera sorokiniana* population during primary infection of barley and wheat leaves // Curr. Sci (India).-1983.- Vol. 52, N 11.- P. 553-556.
482. Yadav B.S. Behaviour of *Cochliobolus sativus* during its infection of barley and wheat leaves // Austr. J. Bot.- 1981.- Vol. 29, N 1.- P. 71-79.
483. Zhang T.Y., Wang H.L., Xu F.L. Effects of grain black point disease of wheat and the pathogenic fungi // Acta Phytophylacica Sinica.- 1990.- Vol. 17, N 4.- P. 313-316.
484. Zhong S., Steffenson B.J. Genetic and molecular characterisation of mating type genes in *Cochliobolus sativus* // Mycologia.- 2001.- Vol. 93, N 5.- P. 852-863.
485. Zhong S., Steffenson B.J. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus* // Phytopathology.- 2001.- Vol. 91, N.5.- P. 469-476.