

11. Рухтер А.А. Использование в селекции взаимосвязей биохимических признаков // Труды ГНБС. – 1999. – Т. 108. – С. 121 – 129.
12. Тевфик А.Ш. Регенерация растений канны садовой (*Canna × hybrida hort*) в культуре вегетативных почек *in vitro* // Труды ГНБС. – 2012. – Т. 134. – С. 426 – 435.
13. Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Зубкова Н.В. Канна садовая. Современные методы размножения // Цветоводство. – 2014. – № 6. – С. 18 – 21.
14. Чупахина Г.Н., Романчук А.Ю., Платунова Е.В. Аскорбиновая кислота как антистрессовый фактор растений. – В кн.: Интродукция, акклиматизация и культивация растений. – Калининград: КГУ, 1998. – С. 88 – 94.
15. Csonka L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress // Microbiol. Review. – 1989. – Vol. 53. – P. 121 – 147.
16. Lichtenthaler H.K., Rindere U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plant // CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 1988. – V. 19. – Sup. 1. – P. 29 – 85.
17. Momol M.T., Lockhart B.E.L., Dankers H., Adkins S. 2004. *Canna yellow mottle virus* detected in canna in Florida. Online. Plant Health Progress. – DOI:10.1094/PHP-2004-0809-01-HN.
18. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient, J. Photochem. // Photobiol. – В: Biol. – 2011. – P. 1 – 22.

Статья поступила в редакцию 16.08.2016 г.

**Paly A.Ye., Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., Zubkova N.V., Chelombit S.V. Morphological changes and metabolic process in vegetative organs of *Canna × hybrida hort. ex Backer* being affected by viral pathogens // Bull. Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 61-68.**

A number of structural peculiarities in vegetative sphere of some canna cultivars was revealed within infected plants. Difference in water regime was determined as well. Reduction of reliable photosynthetic activity and increasing of chlorophyll fluorescence were fixed in here, what probably proves degradation of photosynthetic apparatus. Biochemical modifications of infected plants were determined as well, that is reduction of proline and ascorbic acid concentration, increasing of phenolic compounds content, decrease of catalase activity and rise of superoxide dismutase and polyphenol oxidase.

**Key words:** garden canna; leaf anatomy; photosynthetic apparatus; protective compounds; oxidation-reduction enzymes

**СЕЛЕКЦИЯ**

УДК 582.572.8:632.4

### **СКРИНИНГ СОРТОВ ЛИЛИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ПО ПРИЗНАКУ УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ**

**Екатерина Владимировна Грошева, Марина Витальевна Маслова**

ФГБОУ ВО Мичуринский государственный аграрный университет,  
393760, Россия, Тамбовская область, г. Мичуринск  
ekaterina2687@mail.ru

Проведен скрининг сортов лилии Manitoba Morning и Cavalese по признаку устойчивости к фузариозу с применением специальных лабораторных приемов моделирования биотической нагрузки на растения с использованием токсических метаболитов патогена. Выявлено стимулирующее действие

низких концентраций культурального фильтрата *F. oxysporum* на микрорастения лилии и его токсическое влияние при более высоком содержании в среде. Определена дифференцирующая концентрация токсина в питательном субстрате для ранжирования сортов по степени проявления симптомов фузариоза.

**Ключевые слова:** сорта лилии; *in vitro*; скрининг; токсические метаболиты; фузариоз.

### Введение

Изменение погодных условий, неконтролируемый завоз посадочного материала из-за рубежа, появление устойчивых штаммов грибов, несовершенство защитных мероприятий привели к ухудшению фитосанитарной обстановки в цветоводстве и усилению вредоносности грибных болезней декоративных растений.

Грибные болезни цветочных культур вызываются многочисленными представителями различных классов грибов. Особую опасность для большинства луковичных культур представляют болезни, вызываемые некротрофными грибами представителями родов *Fusarium*, *Botrytis*, *Verticilum*, которые, внедряясь в живую ткань растения, очень быстро убивают ее своими токсинами и питаются уже мертвыми клетками. Вредоносность данных микроскопических грибов зависит от восприимчивости растения к заболеванию и от внешних условий, которые могут способствовать массовому развитию микроорганизмов и заражению ими растений. Они обычно бывают полифагами, в различной степени патогенны и обитают в различных типах почв [4].

Наиболее вредоносным заболеванием *Lilium* L. является фузариоз (луковичная гниль), который снижает декоративные признаки растений и нередко приводит к их гибели. Возбудителями данной болезни являются грибы рода *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Sned. et Hans, *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr.). Характерный признак поражения – побурение корней и гниль донца луковицы и, как следствие этого, пожелтение листьев, которое начинается с верхушек. Затем на листьях образуются желтовато-коричневые пятна, листья засыхают и растение увядает. Первым признаком заболевания является побурение концов корней. Развитию заболевания способствует повышение температуры воздуха и влажности почвы [1, 13].

Распространение фузариоза вызвало необходимость поиска устойчивых генотипов среди существующего сортимента лилий, перспективных для использования в озеленении. В настоящее время использование неспецифических токсинов возбудителей болезней широко применяется в селекции различных культур на устойчивость к биотическим факторам. Наряду с морфологической структурой популяций фитопатогенных грибов большой интерес представляет изучение продуктов метаболизма патогенов [2, 10].

Одним из путей, препятствующих массовому развитию болезней, является повышение устойчивости растений к болезням с помощью методов селекции. Однако селекция рода *Lilium* L. в основном направлена на получение высокодекоративных и зимостойких сортов, тогда как никаких существенных достижений в повышении устойчивости растений к болезням пока не имеется, что также способствует распространению патогенов.

Так как возбудители болезней способны образовывать в жидкой питательной среде комплекс токсических метаболитов, принимающих участие в патогенезе и влияющих на развитие растения-хозяина, весьма актуальна разработка приемов селекции без применения инфекционных фондов. Использование в качестве селектирующего агента культурального фильтрата патогенов – это один из способов ускорения селекционного процесса на устойчивость к болезням. Данный метод позволяет разделить сорта по степени восприимчивости к метаболитам микробиоты. Этот способ широко используется исследователями, так как экспериментально установлена корреляция между восприимчивостью к поражению возбудителем болезни

и чувствительностью растений к его токсинам. Исследования действия токсичных метаболитов возбудителей дают возможность наблюдать характер действия гриба на растение-хозяина, более глубоко понять процессы их взаимодействия, отслеживать изменения в патосистеме и, в конечном счете, отбирать устойчивые к ним формы [2, 7].

Одним из наиболее экологичных способов борьбы с фузариозом является создание иммунных сортов лилии с использованием культуры *in vitro* и выделение устойчивых генотипов среди существующего ассортимента.

Цель данной работы – проведение скрининга сортов лилии по признаку устойчивости с применением специальных лабораторных приемов моделирования биотической нагрузки на растительные ткани в контролируемых условиях с использованием токсических метаболитов патогенов.

### Объекты и методы исследования

Исследования проведены на базе лабораторий биофотоники и биотехнологии ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ.

Материалом для проведения скрининга исследуемых сортов по признаку устойчивости к фузариозу являлись микрорастения лилий *Manitoba Morning* и *Cavalese*.

‘*Manitoba Morning*’ – Кудреватые гибриды (*Martagon hybrids*) (REG: Lily Company B.V., 2010), страна происхождения Нидерланды. Окраска листочков околоцветника темно-пурпурно-розовая в верхней половине с темно-зеленовато-желтой полосой в основании. На внутренней стороне каждого листочка околоцветника в базальной половине имеются многочисленные пятна пурпурно-красного цвета. Нектарники темно-зеленовато-желтые, пыльца красновато-оранжевая. Диаметр цветка 6 см. На стебле бывает более 20 цветков. Высота растений 120 – 130 см. Цветет в июне [15].

‘*Cavalese*’ – ЛА гибриды (*LA hybrids*) (REG: Vletter & Den Haan Beheer B.V., 2000), страна происхождения Нидерланды. Окраска листочков околоцветника внутри пурпурно-красная, вне пурпурно-розовая. Нектарники белые с опушением, пыльца оранжевая. Диаметр цветка 21 см. Высота растений до 140 см. Цветет в конце июня – первой декаде июля [15].

В работе использовали стандартные методы изоляции микроорганизмов, культивирования их на искусственных питательных средах и изучения в условиях чистых культур [3, 9]. Выделение патогена проводили путем посева луковичных чешуй после поверхностной стерилизации на твердую питательную среду Чапека (нитрат натрия – 3,0 г, калий фосфорный однозамещенный – 1,0 г, сульфат магния семи водный – 0,5 г, калий хлористый – 0,5 г, сульфат железа (II) семиводный – 0,01 г, сахара 3,0 г, агар-агар – 15,0 г). Для накопления токсических метаболитов грибок выращивали на жидкой среде Чапека в течение месяца при температуре воздуха  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , после чего стерилизовали фильтрованием с использованием насадок на шприц «Millipore» 0,22  $\mu\text{m}$ , France.

Для культивирования растений *in vitro* использовали минеральную основу питательных сред MS [14]. В качестве регуляторов роста использовали 0,1 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК). Для инициации развития адвентивных побегов в состав среды MS добавляли глюкозу или сахарозу в концентрации 45 г/л, тиамин – 0,4 мг/л, пиридоксин – 0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,5 мг/л, глицин – 2 мг/л, инозитол 100 мг/л. Готовую среду стерилизовали автоклавированием при  $120^{\circ}\text{C}$  и давлении  $1,2 \pm 0,1$  атм. Субкультивирование микролуковиц осуществляли в конических колбах емкостью 250 мл с 80 мл среды. Продолжительность одного пассажа составляла 3 – 4 недели. Культивирование микрорастений лилий проводили в специально оборудованной культуральной комнате при 16-часовом световом дне с освещенностью

1800 – 2000 люкс, температуре воздуха  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  и влажности воздуха 50 – 60%. Каждые 7 дней проводили наблюдения и учёт.

Оценка влияния токсинов *F. oxysporum* на растение-хозяина проводилась с использованием в качестве селективирующего агента культурального фильтрата гриба. Для выявления дифференцирующей концентрации растворов токсических метаболитов патогена в среду добавляли различное количество фильтрата культуральной жидкости *F. oxysporum*. В опыте были использованы следующие варианты концентраций токсинов в питательной среде: 0%; 5%; 10%; 15%; 20%. Оценку степени поражения микрорастений проводили по пятибалльной шкале.

### Результаты и обсуждение

Тестирование на наличие инфекции тканей пораженных луковичных чешуй позволило выделить в чистую культуру и идентифицировать гриб *F. oxysporum*.

Грибы рода *Fusarium* причиняют значительный ущерб сельскохозяйственному производству, в связи с тем, что они способны поражать растения, относящиеся к различным систематическим группам. Метаболиты микромицета фузариума обладают широким спектром токсического действия в отношении растения-хозяина. Компоненты, содержащиеся в культуральной жидкости различных изолятов фузариума, модифицируют барьерно-транспортные характеристики плазматической мембраны растительных клеток и повышают коэффициент проницаемости плазмалеммы [12].

Использование в селекционной работе культурального фильтрата патогена позволило ряду исследователей выявить устойчивые к фузариозу формы овощных [8], зерновых [11], плодовых и ягодных культур [5, 6].

Проведенная оценка устойчивости микрорастений исследуемых сортов лилии Manitoba Morning и Cavalese к действию метаболитов патогена позволила выявить различную реакцию образцов на интоксикацию.

Изучение степени некротизации исследуемых растений показало, что через две недели культивирования у сорта Manitoba Morning 5 и 10%-ное содержание токсина в среде оказывало стимулирующее влияние на состояние растений, снижая степень проявления некрозов по сравнению с контролем (0,3 балла) до 0,2 и 0 баллов соответственно. Отмечено, что при использовании питательных сред с содержанием токсических метаболитов 15 и 20% наблюдались выраженные симптомы поражения микрорастений (некроз корней, микролуковиц, листьев) на 0,8 и 1,2 балла соответственно.

У микрорастений сорта Cavalese в вариантах с 5 и 10%-ным содержанием токсических метаболитов в среде, также как и в контроле, некрозов, отмечено не было. При использовании фильтрата культуральной жидкости гриба в концентрации 15 и 20% степень поражения растительных тканей составила 0,8 и 0,9 балла соответственно (рис. 1).

В результате эксперимента было установлено, что длина первого листа у сорта Cavalese при использовании концентрации метаболита 5% была больше на 0,4 см по сравнению с контролем и составила 2,0 см. В случаях использования 10%, 15% и 20%-ной концентрации токсина выявлено его ингибирующее действие на рост первого листа (средняя длина листа – 0,9; 0,4 и 0,3 см соответственно). У сорта Manitoba Morning при увеличении концентрации токсина отмечалось последовательное снижение длины листа от 1,0 в контроле до 0,4 см в варианте с 20% концентрацией (рис. 2).

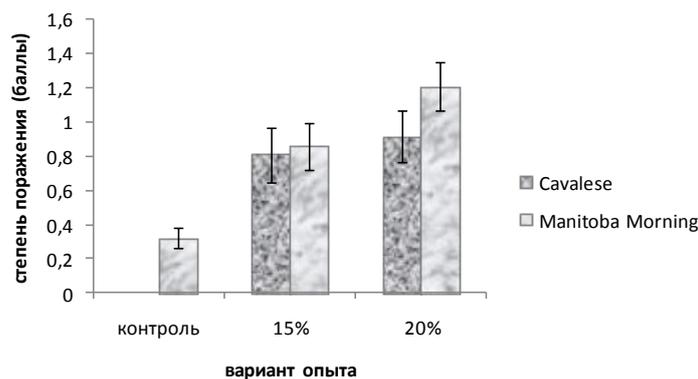


Рис. 1 Степень поражения растений лилий в культуре *in vitro* после воздействия токсических метаболитов *F. oxysporum* в различных концентрациях

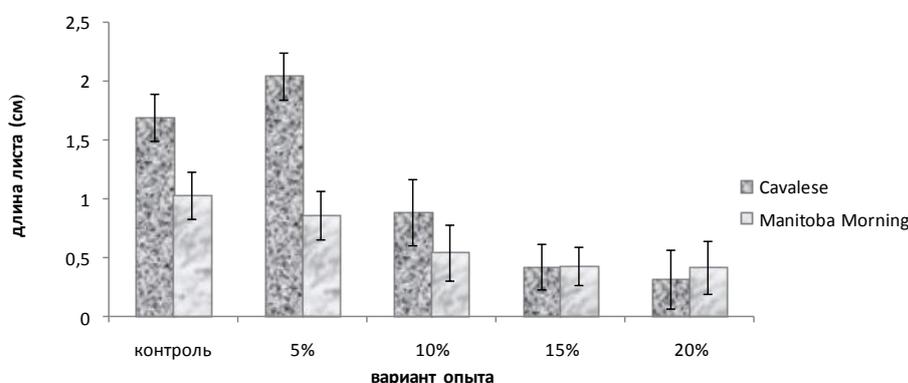


Рис. 2 Влияние токсических метаболитов *F. oxysporum* на силу роста листьев микрорастений лилий

Оценка реакции сортов на действие токсических метаболитов гриба *F. oxysporum* по количеству неразвившихся луковок показала, что, начиная с 10% по мере повышения концентрации, происходило увеличение числа неразвившихся микролуковок. По данному показателю наблюдались яркие сортовые отличия. При 10%-ном содержании токсина в среде исследуемые сорта имели одинаковое количество неразвившихся луковок (25%). В варианте с 15% концентрацией у сортов Cavalese и Manitoba Morning данный показатель был равен 41,5 и 50,0%, при концентрации 20% – 41,5 и 66,7% соответственно.

Таким образом, по всем исследуемым показателям (степень некротизации микрорастений, длина первого листа, количество неразвившихся луковок) выраженным ингибирующим действием обладали питательные среды с 15 и 20%-ным содержанием фильтрата культуральной жидкости гриба *F. oxysporum*. Наибольшее различие в реакции растений исследуемых сортов лилии отмечалось в вариантах с 20%-ной концентрацией токсина. Поэтому для дифференциации сортов в условиях *in vitro* по признаку устойчивости рекомендуется использовать питательные среды с 20%-ным содержанием метаболитов патогена.

Анализ полученных данных позволил охарактеризовать сорт Cavalese как более устойчивый к действию токсинов гриба *F. oxysporum* по сравнению с сортом Manitoba Morning, т.к. в условиях интоксикации он имел высокие показатели роста и развития растений.

### Выводы

В результате проведенных исследований выявлено, что биологически активные вещества, содержащиеся в культуральной жидкости гриба *F. oxysporum*, выделенного при тестировании пораженных растений лилии на наличие инфекции, могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на микрорастения лилий в зависимости от концентрации токсина в среде и генотипических особенностей сорта. Внесение в питательную среду метаболитов гриба в концентрации 15 и 20% у сортов Cavalese и Manitoba Morning способствовало увеличению степени некротизации растительных тканей и возрастанию количества неразвившихся микролуковиц. Снижение длины первого листа у микрорастений лилии наблюдалось уже при 10%-ном содержании в среде. Метаболиты гриба *F. oxysporum* в слабых концентрациях (5%), как правило, оказывали стимулирующее влияние на рост и развитие растений.

Отмечена дифференциация исследуемых сортов лилии по устойчивости к метаболитам патогена. Сорт Cavalese проявил более высокий уровень устойчивости к действию токсинов гриба *F. oxysporum* по сравнению с сортом Manitoba Morning. Наиболее яркие различия в показателях состояния микрорастений у исследуемых сортов отмечались в вариантах с 20%-ным содержанием токсических метаболитов в питательной среде.

Таким образом, использование данного метода позволяет проводить скрининг сортов лилии и ранжировать их по степени устойчивости к патогенам. Для этого целесообразно использовать раствор культурального фильтрата патогена с концентрацией 20%, так как она является дифференцирующей для определения степени устойчивости растений к токсинам.

### Список литературы

1. Баранова М.В. Лилии. – Л.: Агропроиздат, 1990. – 384 с.
2. Дубровский М.Л., Маслова М.В., Кружков А.В. Действие метаболитов патогенных микроорганизмов на мужской гаметофит смородины и абрикоса // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. 36. № 1. – С. 148 – 153.
3. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А., Коваль З.Э. и др. Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наукова думка, 1982. – 551 с.
4. Журавлёв И.И. Болезни цветочных культур. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1973. – 80 с.
5. Козаева М.И. Влияние токсинов изолятов рода *Fusarium* на различные по устойчивости сорта земляники // European Applied Sciences: challenges and solutions 1st International Scientific Conference. – 2015. – С. 126-128.
6. Козаева М.И. Влияние токсинов некоторых изолятов рода *Fusarium* на различные по устойчивости сорта яблони // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. № 6-2. – С. 9-11.
7. Корня Т.М., Игнатова С.А., Бабаянц О.В. Свойства фильтрата культуральной жидкости *Fusarium graminearum* Schwabe как селективного агента в условиях *in vitro* // Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика: тези доповідей IV міжнародної науково-практичної конференції (Дніпропетровськ, 11-13 листопада 2008). – Дніпропетровськ, 2008. – С. 163 – 164.
8. Малахова Н.В., Галиева Л.Д., Хасейн А., Калиева А.А., Тезекбаева Б. К., Мольцева Э.Р. In vitro селекция клеточных культур картофеля с культуральным фильтратом гриба *Fosarium solani* // Вестник Национальной академии наук Республики Казахстан. – 2016. – №1. – С.170-177.

9. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений / И. Бёттхер, Т. Ветцель, Ф.В. Древе, Х. Кеглер, К. Науманн, Б. Фрайер, К. Фрауэнштайн, Э. Фукс. – М.: Агропромиздат, 1987. – 224 с.

10. *Поликсенова В.Д.* Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам // Вестник БГУ. – Сер. 2. 2009. №1. С. 48 – 60.

11. *Савицкая А.Г.* Клеточная селекция зерновых растений на устойчивость к микотоксинам грибов рода *Fusarium* // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2013. – №6. – С.58-67.

12. *Сидорова С.Г., Кудряшова В.А.* Влияние фузариевой кислоты на липидный бислой мембраны растительной клетки // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1995. – Т. 131. – С. 332-341.

13. *Сорокопудова О.А.* Биологические особенности лилий в Сибири: монография. – М.: Белгородский Государственный ун-т, 2005. – 244 с.

14. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol.Plant. – 1962. – Vol. 15, №13. – P. 473 – 497.

15. The International lily register and checklist (2007). – London SWIP2PE United Kindom. 2012. – 948 с.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2016 г.*

**Grosheva Ye.V., Maslova M.V. Screening of lily cultivars *in vitro* according to Fusariosis-resistance** // Bull. of the State Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 68-74.

The article presents study results of lily species, Manitoba Morning and Cavalese, screening according to fusariosis-resistance. In this way special laboratorial modeling approaches of biotical load on plants with toxic pathogen metabolites were applied. Low concentrations of cultural filtrate *F. oxysporum* tended to stimulate lily microplants, at the same time its toxic influence was registered if to increase concentration in medium. Differentiative toxin concentration was identified in the nutrient substratum aimed at ranging of cultivars according to fusariosis degree.

**Key words:** *Lily L.; in vitro; screening; toxic metabolites; fusariosis*