



УДК:633.111:632.938.1:632.4

СПОРЫНЯ В ПОСЕВАХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ И ПОИСК УСТОЙЧИВЫХ СОРТОВ

Л.М. Щеклеина

ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», Россия

Эл. почта: immunitet@fanc-sv.ru

Статья поступила в редакцию 24.0.2022; принята к печати 02.12.2022

Генофонд яровой пшеницы в Российской Федерации не изучен по устойчивости к спорынье, особенно в условиях искусственной инокуляции генотипа. В статье рассмотрены вопросы применения искусственной инокуляции цветков суспензией конидий *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. для выяснения устойчивости к спорынье. Цель исследований – поиск сортов и линий яровой пшеницы, устойчивых к спорынье и не накапливающих эргоалкалоиды (ЭА) в склероциях *C. purpurea*. В изученном материале яровой пшеницы при искусственной инокуляции завязи *C. purpurea* выявлены два сорта (Новосибирская 18 и Традиция), не сформировавшие склероциев. На жестком инфекционном фоне поражение устойчивых сортов было в 6,0-23,9 раза ниже индикаторного сорта, а показатель засоренности зерна склероциями – в 6,7-20,0 раз ниже. Сорт яровой пшеницы Традиция селекции ФАНЦ Северо-Востока в течение 4 лет изучения на инфекционном фоне *C. purpurea* не поражался спорыньей, и в настоящее время успешно проходит Государственное испытание. Хроматографический анализ показал, что содержание ЭА различалось от 0,06 до 0,24% от массы склероциев или от 0,6 до 2,4 мг/г. Обнаружены 4 образца (Н-154, Т-38, Оренбургская 23, Epos), не накапливающие ЭА в склероциях, что представляет большую селекционную значимость. Особую ценность для дальнейшей работы представляет сорт яровой пшеницы Epos из Германии, который устойчив к поражению спорыньей и не накапливает ЭА.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., спорынья, устойчивые сорта, эргоалкалоиды.

ERGOT IN SPRING WHEAT AND THE SEARCH FOR RESISTANT WHEAT VARIETIES

L.M. Shchekleina*

N.V. Rudnitsky Federal Agricultural Research Center of the North-East, Kirov, Russia

*E-mail: immunitet@fanc-sv.ru

The spring wheat gene pool in the Russian Federation has not been studied for resistance to ergot, especially under conditions of artificial inoculation of the genotype. The article addresses the use of artificial inoculation of wheat flowers with *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. conidia suspension for elucidating ergot resistance. The aim of the present study is to search for varieties and lines of spring wheat that are resistant to ergot and do not accumulate ergot alkaloids (EA) in *C. purpurea* sclerotia. In the studied spring wheat material during artificial inoculation of ovary with *C. purpurea*, two varieties (Novosibirskaya 18 and Tradition) were identified that did not form sclerotia. Against a severe infectious background, the lesioning of the resistant varieties was 6.0-23.9 times lower compared with the reference variety, and the indices of grain contamination with sclerotia was 6.7-20.0 times lower. The spring wheat cultivar Traditsiya Selektii developed at FARC of the North-East was not affected by ergot during 4 years of study under the hazard of *C. purpurea* infectious, and is currently successfully passing the State Test. Chromatographic analysis showed that the content of EA varied from 0.06 to 0.24 % per sclerotia mass or from 0.6 to 2.4 mg/g. Four varieties were found (H-154, T-38, Orenburgskaya 23, Epos) that do not accumulate EA in sclerotia, which is of a high breeding significance. Of particular value for further work is the spring wheat variety Epos from Germany, which is resistant to ergot damage and does not accumulate EA.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. ergot, resistant varieties, ergoalkaloids.

Введение

В последнее десятилетие серьезную экологическую и фитосанитарную проблему в посевах ржи, пшеницы, тритикале, ячменя на территории Волго-Вятского региона представляет нарастающее распространение фитопатогенного гриба *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. – возбудителя спорыньи [1–3]. Усиление болезни имеет ряд причин. Во-первых, наличие огромных площадей запущенных земель, вышедших из сельскохозяйственного оборота и являющихся основным источником накопления инфекционных структур гриба в природе. Во-вторых, современные ресурсосберегающие агротехнологии, направленные на минимизацию обработки почвы и зернонасыщенные севообороты. В-третьих, растущая частота благоприятных для *C. purpurea* погодных условий в период цветения зерновых злаков и инфицирования завязи [4, 5]. В Кировской области при увеличивающемся распространении болезни в посевах пшеницы, доля пораженных растений в сортовых биоценозах озимой ржи достигала 8,0 % [2].

Серьезная биоэкологическая опасность спорыньи для человека и животных связана с тем, что гриб *C. purpurea* является источником опасных микотоксинов – эргоалкалоидов (ЭА), и использование зараженных зерна и кормов способно вызвать заболевание эрготизм [6]. Поэтому содержание склероциев в продовольственном и фуражном зерне во всем мире строго регламентируется, а в оригинальных и семенах высших репродукций они не допускаются [7, 8].

У отсутствия значимого прогресса отечественной селекции яровой пшеницы по устойчивости к спорынье много причин. Отчасти это можно объяснить не изученностью генофонда культуры в условиях искусственной инокуляции растений *C. purpurea* по иммунологическим признакам и токсичности склероциев, что затрудняет создание донорного материала.

Цель наших исследований – поиск сортов и линий яровой пшеницы, относительно устойчивых к спорынье и не накапливающих ЭА в образцах склероциев *C. purpurea*.

Материал и методы

Полевые исследования проводили в 2019-2021 гг. в Федеральном аграрном научном центре Северо-Востока (ФАНЦ). Материалом являлись 20 линий яровой пшеницы селекции ФАНЦ и 10 образцов из мировой коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР), являющегося базисом исходного материала для селекции. Посев проводили на фитопатологическом участке сеялкой СКС-6-10. Площадь делянки 1 м², повторность трёхкратная. В работе использовали культуры конидий *C. purpurea*, выделенные из свежесобранных склероциев пшеницы и хранящиеся на картофельно-глюкозном агаре в рабочей коллекции лаборатории иммунитета и защиты растений ФАНЦ Северо-Востока. В начале фазы колошения пшеницы (51 по шкале Zadoks) цветки с помощью шприца инокулировали водной суспензией конидий *C. purpurea* (штамм П-20/с). Инокулом готовили непосредственно перед заражением путем смыва спор с поверхности изолята дистиллированной водой. Необходимую концентрацию 3×10^6 конидий/мл устанавливали с помощью камеры Горяева [9]. У каждого сорта инокулировали по 10-15 колосьев. При полной спелости зерна оценивали восприимчивость сортов пшеницы по двум показателям: поражение (распространение) болезни в посевах и засорённость зерна склероциями. После обмолота растений из каждой зерновой пробы отбирали склероции и рассчитывали их процентное отношение к массе зерна. Характеристику генотипов по устойчивости давали на основании шкалы [10]. Собранные склероции использовали для биометрических и биохимических исследований.

Содержание и структура ЭА в сортовых склероциях *C. purpurea* проведена в институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, город Пушкино Московской области. ЭА извлекали из 1 грамма измельченных склероциев двумя методами. ЭА из измельченных склероциев экстрагировали водным раствором ацетона при pH 4,5, затем водную фракцию доводили до pH 9-10 и экстрагировали хлороформом. ЭА обнаруживали по поглощению и флуоресценции в УФ-свете и после опрыскивания пластин реактивом Эрлиха. Идентификацию метаболитов осуществляли тонкослойной хроматографией (ТСХ) со стандартными образцами и по данным УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. Содержание суммарного количества ЭА в экстрактах определяли спектрофотометрически в метаноле при $\lambda = 313$ нм. Расчет вели, используя коэффициент молярной экстинкции эрготамин ($\log \epsilon = 3,86$). Измерения каждого образца экстракта проводили не менее пяти раз [3].

Статистическую обработку результатов осуществляли методами дисперсионного и корреляционного анализа. В матрицу расчетов вносили данные по поражению сортов и засоренности зерна склероциями и устанавливали достоверность различий по отношению к сорту-стандарту Баженка. Использовали пакет программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции AGROS (версия 2.07.) и программу Microsoft Office Excel. Содержание ЭА представлено в виде среднего арифметического значения (M). Доверительные интервалы ($\pm SEM$) не превышали ± 5 % ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

При искусственной инокуляции линии пшеницы поражались от 0% (Традиция) до 21,7% (П-57), коллекционные образцы – от 0% (Новосибирская 18) до 13,9 % (ЛТ-3) при засоренности зерна склероциями у этих форм, соответственно, от 0% до 1,5 % и 0% до 1,3% (табл. 1). Можно констатировать преобладание восприимчивых к спорынье генотипов. Исключение составляют сорта Новосибирская 18 и Традиция, не сформировавшие склероциев при искусственной инокуляции. Их отсутствие может быть детерминировано аддитивным действием малых генов, контролирующих физиологические механизмы устойчивости. Так, сорт Новосибирская 18 характеризуется устойчивостью к полеганию в сочетании быстрым развитием в первой половине онтогенеза – от всходов до цветения. Механизмы устойчивости сорта Традиция, вероятно, обусловлены его короткостебельностью и прочностью соломины, вследствие чего она не полегает, обеспечивая хороший пылецевой режим в биоценозе. Как известно, тип и продолжительность цветения растений является одним из важных маркеров устойчивости к спорынье [9]. Данный сорт яровой пшеницы в течение 4 лет изучения на инфекционном фоне *C. purpurea* не поражался спорыньей, и в настоящее время успешно проходит Государственное испытание. К среднеустойчивым можно отнести сорта Тулайковская надежда из Самарской области и Кайыр из Казахстана. На контроле (без инфекции) симптомы болезни отсутствовали у всего генофондного материала или встречались единичные склероции.

Несмотря на значительную изменчивость (V , %) признаков в изученном генофонде, в целом просматривается тенденция лучшего иммунологического состояния у коллекционных образцов по сравнению с линиями своей селекции, что предполагает концентрацию исследований в повышении устойчивости яровой пшеницы к спорынье. Выделенные на инфекционном фоне устойчивые и менее поражаемые образцы могут быть использованы как источники для селекции в данном направлении.

Анализ биометрических показателей склероциев показал значительную вариабельность их по размерам и крупности. Наиболее мелкие склероции (0,06 грамм) были у сорта Long Chun 7 из Китая, а крупные (0,15 грамм) – у линии Н-154. Просматривается тенденция формирования наиболее крупных склероциев у линий селекции ФАНЦ Северо-Востока. В наших исследованиях выявлена отрицательная связь между массой одного склероция и накоплением ЭА ($r = -0,32$). Мелкие склероции невозможно полностью отделить из зернового вороха путем механической сортировки, и часть их все равно попадает в семенные и продовольственные партии зерна [11, 12], поэтому биологическая опасность этой фракции представляется наибольшей.

Табл. 1.

Табл. 2.

Наименее поражаемые генотипы яровой мягкой пшеницы (искусственная инокуляция *S. purpurea*, 2019-2021 гг.)

Сорт, линия, происхождение	Поражение спорыньей, %	Засоренность зерна склероциями, %
Сорта ФАНЦ Северо-Востока		
Традиция (селекционный номер Т-66)	0*	0*
С-65	1,7*	0,1*
У-80	2,9*	0,1*
У-28	4,7*	0,2*
С-84	5,1*	0,2*
Т-123	5,1*	0,2*
Т-141	5,2*	0,3
Баженка (стандарт)	7,4	0,4
Среднее	8,1	0,3
V, %	58,5	32,0
Образцы коллекции ВИР		
Новосибирская 18, Новосибирская область	0*	0*
Тулайковская надежда, Самарская область	1,3*	0,1*
Кайыр, Казахстан	1,3*	0,1*
Ul Alta Blanca, США	1,6*	0,1*
Eros, Германия	2,1*	0,2*
Самгау, Казахстан	2,5*	0,2*
Среднее	3,7	0,2
V, %	74,0	24,1
Индикаторный сорт	21,7	1,5

* Отличие от стандарта Баженка значимо при $P < 0,5$.

Содержание и состав ЭА в образцах склероциев у разных по восприимчивости к спорынье образцов яровой пшеницы.

Сорт, линия	Происхождение	Эргоалкалоиды			Состав
		ТСХ	мг/г склероциев	% к массе склероциев	
Н-154	Кировская область	-	0	0	-
П-57		+	0,6	0,06±0,002	Эрготамин, эрготаминин, эргокрестин
С-84		+	0,9	0,09±0,004	Эрготамин, эрготаминин, эргокрестин
Т-38		-	0	0	-
Т-79		+	2,4	0,24±0,011	Эрготамин, эрготаминин, эргокрестин
Оренбургская 23	Оренбургская область	-	0	0	-
ЛТ-3	Ленинградская область	+	1,2	0,12±0,005	Эрготамин, эрготаминин, эргокрестин
Самгау	Казахстан	+	1,4	0,14±0,006	Эрготамин
Eros	Германия	-	0	0	-
Long Chan	Китай	+	1,2	0,12±0,004	Эрготамин, эрготаминин, эргокрестин

Примечание: «0» и «-» – ЭА не обнаружены.

Склероции, собранные с 10 образцов яровой пшеницы в 2019-2020 гг. были изучены по токсичности. Хроматографический анализ экстрактов, показал, что содержание ЭА различалось от 0,06 до 0,24 % от массы склероциев или от 0,6 до 2,4 мг/г (табл. 2). ЭА обнаружены в 6 образцах, у 4 (Н-154, Т-38, Оренбургская 23, Eros) они отсутствовали. Информация об уровне ЭА важна для поиска генотипов с наименьшим их накоплением, т.к. в этом случае наличие их в зерне представляет собой менее опасную биологическую примесь.

Наибольшую ценность в изученном генофонде имел сорт Eros, который относительно слабо поражался спорыньей при искусственной инокуляции и не содержал ЭА. Что касается структуры ЭА, то в 10 образцах склероциев были обнаружены метаболиты 1 и 2, мигрирующие при ТСХ с $R_f = 0,21$ (I) и $R_f = 0,49$ (II), которые флуоресцировали в УФ-свете ($\lambda = 254$ нм) и имели фиолетовое окрашивание с реактивом Эрлиха. Масс-спектры (МС) метаболитов были идентичными. В МС/МС-спектрах метаболитов наблюдался характеристический пик 330, который соответствовал фрагменту $C_{17}H_{20}N_3O_4$. Хроматографическая подвижность и МС/МС спектр метаболита 1 совпадал со стандартом эрготаминина, а метаболита 2 со стандартом эрготаминина [3].

На основании полученных данных метаболиты 1 и 2 были идентифицированы как пептидные эргоалкалоиды эрготамин и эрготаминин соответственно. В этих же образцах склероциев был обнаружен метаболит 3, мигрирующий при ТСХ $R_f = 0,41$ (I), который также флуоресцировал и давал фиолетовое окрашивание с реактивом Эрлиха. Хроматографическая подвижность и МС/МС-спектр метаболита 3 совпадал со стандартом эргокрестина.

Выводы

В изученном материале яровой пшеницы при искусственной инокуляции завязи *S. purpurea* выявлены два сорта (Новосибирская 18 и Традиция), не сформировавшие склероциев. Обнаружено также 4 образца (Н-154, Т-38, Оренбургская 23, Eros), не накапливающие ЭА в склероциях, что представляет большую селекционную значимость. Особую ценность для дальнейшей работы представляет сорт яровой пшеницы Eros из Германии, который устойчив к поражению спорыньей и не накапливающий ЭА.

Финансирование: Программа ФНИ государственных академий наук на 2019-2021 гг. по теме № 0528-2019-0093: «Разработка и реализация фундаментальных научно-методических подходов мобилизации, изучения, создания (в т. ч. с использованием биотехнологий) и поддержания уникальных природных и экспериментальных генетических ресурсов яровых зерновых культур (пшеница, ячмень, овес); моделей сортов с повышенной продуктивностью и устойчивостью к действию стрессовых биотических и абиотических факторов, с улучшенными селекционно-ценными признаками; технологии управления производственным процессом с учетом эдафических и биотических стрессовых факторов европейского Северо-Востока России, локального и глобального изменения климата для решения актуальных задач обеспечения импортозамещения и улучшения качества питания населения».

Литература

1. Пономарева МЛ, Пономарев СН, Маннапова ГС, Илалова ЛВ. Фитосанитарный мониторинг наиболее вредоносных болезней озимой ржи в республике Татарстан. Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2019;(9):27-4.

2. Щеклеина ЛМ. Влияние погодных факторов на отдельные периоды развития гриба *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul и уровень вредоносности спорыньи в Кировской области. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2019;20(2):134-43.
3. Шешегова ТК, Щеклеина ЛМ, Антипова ТВ, Желифонова ВП, Козловский АГ. Поиск генотипов ржи и пшеницы, устойчивых к *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. и не накапливающих эргоалкалоиды в склероциях гриба. Сельскохозяйственная биология. 2021;(56):549-58.
4. Щеклеина ЛМ, Шешегова ТК. Вредоносность спорыньи на новых сортах озимой ржи в Кировской области. Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». 2018;4(2):83-9.
5. Шешегова ТК, Щеклеина ЛМ, Желифонова ВП, Антипова ТВ, Баскунов БП, Козловский АГ. Устойчивость сортов ржи к спорынье и содержание эргоалкалоидов в склероциях *Claviceps purpurea* в условиях Кировской области. Микология и фитопатология. 2019;53(3):177-82.
6. Гагкаева ТЮ, Дмитриев АП, Павлюшин ВА. Микробиота зерна – показатель его качества и безопасности. Защита и карантин растений. 2012;(9):14-8.
7. Гончаренко АА. Современное состояние производства, методы и перспективные направления селекции озимой ржи в РФ. В кн.: Мат. Всер. научн.-практ. конф. «Озимая рожь: селекция, семеноводство, технологии и переработка». Уфа; 2009. С. 40-76.
8. Miedaner Tr, Geiger HH. Biology, genetics and management of ergot (*Claviceps* spp.) in rye, sorghum and pearl mille. Toxins. 2015;7(3):659-778.
9. Mirdita V, Dhillon BS, Geiger HH, Miedaner T. Genetic variation for resistance to ergot (*Claviceps purpurea* [Fr.] Tul.) among full-sib families of winter rye (*Secale cereale* L.). Theor Appl Genet. 2008;(118):85-90.
10. Miedaner T, Mirdita V, Geiger HH. Strategies in breeding for ergot (*Claviceps purpurea*) resistance. In: International Symposium on Rye Breeding & Genetics. Minsk; 2010. P. 83.
11. Sysuev VA, Saitov VE, Farafonov VG, Suvorov AN, Saitov AV. Theoretical background of calculating of the parameters of the device for grain cleaning from ergot sclerotia. Russ Agric Scis. 2017;43(3):273-6.
12. Сысуйев ВА, Сaitов ВЕ, Фарафонов ВГ, Сaitов АВ. Исследование параметров движения зерна в жидкости устройства для удаления спорыньи. Инженерные технологии и системы. 2019;29(2):248-64.

References

1. Ponomareva ML, Ponomarev SN, Mannapova GS, Ilalova LV. [Phytopathological monitoring of the most hazardous diseases of winter rye in the Republic of Tatarstan]. Vestnik Krasnoyarskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta. 2019;(9):27-34. (In Russ.)
2. Shchekleina LM. [The influence of weather on separate periods of development of the fungus *Claviceps purpurea* (Fr.) and the level of the related hazard in Kirovskaya Oblast']. Agrarnaya Nauka Yevro-Severo-Vostoka. 2019;20(2):134-43. (In Russ.)
3. Sheshhegova TK, Shchekleina LM, Antipova TV, Zhelifonova VP, Kozlovskiy AG. [Searching for the rye and wheat genotypes that are resistant to *Claviceps purpurea* (Fr.) and do not accumulate ergot alkaloids in fungal sclerotia]. Selskokhoziaystvennaya Biologiya. 2021;(56):549-58. (In Russ.)
4. Shchekleina LM, Sheshhegova TK. [Ergot hazardousness in novel winter rye varieties in Kirovskaya Oblast']. Vestnik Mariyskogo Gosudarstvennogo Universiteta Seriya «Selskokoziaystvennyye Nauki Ekonomicheskyye Nauki». 2018;4(2):83-9. (In Russ.)
5. Sheshhegova TK, Shchekleina LM, Zhelifonova VP, Antipova TV, Baskunov BP, Kozlovskiy AG. [The resistance of rye varieties to ergot and the contents of ergot alkaloids in the sclerotia of *Claviceps purpurea* in Kirovskaya Oblast']. Mikologiya i Fitopatologiya. 2019;53(3):177-182. (In Russ.)
6. Gagkayeva TYu, Dmitriyev AP, Pavlyushin VA. [Grain Microbiota as an index of grain quality and safety]. Zashchita i Karantin Rasteniy. 2012; (9):14-8. (In Russ.)
7. Goncharenko AA. [The present-time state of production and of methods and promising directions of winter rye selection in Russia]. In: Ozimaya Rozh': Selektsiya, Semenovodstvo, Tekhnologii i Pererabotka. Ufa; 2009. P. 40-76. (In Russ.)
8. Miedaner Tr, Geiger HH. Biology, genetics and management of ergot (*Claviceps* spp.) in rye, sorghum and pearl mille. Toxins. 2015;7(3):659-778.
9. Mirdita V, Dhillon BS, Geiger HH, Miedaner T. Genetic variation for resistance to ergot (*Claviceps purpurea* [Fr.] Tul.) among full-sib families of winter rye (*Secale cereale* L.). Theor Appl Genet. 2008;(118):85-90.
10. Miedaner T, Mirdita V, Geiger HH. Strategies in breeding for ergot (*Claviceps purpurea*) resistance. In: International Symposium on Rye Breeding & Genetics. Minsk; 2010. P. 83.
11. Sysuev VA, Saitov VE, Farafonov VG, Suvorov AN, Saitov AV. Theoretical background of calculating of the parameters of the device for grain cleaning from ergot sclerotia. Russ Agric Scis. 2017;43(3):273-6.
12. Sysuyev VA, Saitov VE, Farafonov VG, Saitov AV. [Studies of the parameters of grain motion in the fluid of the device for ergot removal]. Inzhenernye Tekhnologii i Sistemy. 2019;29(2):248-64. (In Russ.)

<>