

Г.А. Жаппарова, Ш.С. Рсалиев

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
(НИИПББ)*

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ И СОХРАНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Изучено жизнеспособность и вирулентность возбудителей ржавчинных болезней пшеницы (*P.graminis*, *P.triticiana* и *P.striiformis*), хранящиеся в коллекции микроорганизмов НИИПББ. В результате проведенных исследований показано, что консервирование спор методом вакуумной сушки обеспечивает длительную сохранность (21-35 лет) возбудителей ржавчинных болезней пшеницы в жизнеспособном состоянии без изменения патогенных свойств грибов.

Ключевые слова: Консервация, спора, ржавчина, прорастаемость, гифы, жизнеспособность, вирулентность, изолят.

Введение Для регулярного снабжения селекционных учреждений и сортоучастков инфекционным материалом, предназначенным для испытания сортов пшеницы на устойчивость к ржавчине и других биологических исследований необходимо иметь в коллекции фитопатогенных микроорганизмов запас уредоспор гриба с определенным генотипом, характерным для каждой эколого-географической зоны и возможность сохранения биоматериала в жизнеспособном состоянии. В процессе развития грибы формируют морфологические структуры – жизненные формы, которые могут объединять в себе функции, как размножения, так и сохранения. Жизнеспособность и вирулентность спор грибов стоит в прямой зависимости от тех условий, в которых они находятся. Под влиянием биотических и абиотических факторов у грибов могут происходить основные физиолого-биохимические и морфологические изменения.

Традиционные методы хранения, такие как периодические пересевы, хранение под минеральным маслом, под водой, в почве являются доступными по цене и не очень затруднительны по исполнению в лабораторных условиях. Однако пригодность таких методов, и прежде всего, периодических пересевов, для долгосрочного хранения сомнительна, поскольку генетическая стабильность и другие характеристики культур не могут быть гарантированы. В другую группу входят более современные методы, обеспечивающие длительное сохранение не только жизнеспособности, но и генетической стабильности образцов, такие как лиофилизация и криоконсервации. Они активно используются практически во всех национальных коллекциях культур, а также во многих коллекциях промышленных предприятий и научных учреждений [1].

В настоящее время существуют различные методы хранения спор в зависимости от требуемой продолжительности хранения и количества имеющихся спор:

Комнатная температура (+14...+16 °С). Уредоспоры можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких дней (желтая ржавчина), недель (стеблевая ржавчина) и месяцев (листовая ржавчина) в зависимости от влажности. Время хранения спор может быть увеличено путем высушивания и поддержания спор при относительной влажности 20-30% [2];

В холодильнике при +4...+8 °С. После высушивания уредоспоры могут храниться в холодильнике от нескольких недель до одного года, в зависимости от вида ржавчины и

базовых условий. Они могут быть запечатаны в герметичном, воздухонепроницаемом контейнере или храниться в эксикаторе. В холодильнике споры на высушенном стебле или листе можно хранить в течение месяца, однако в таких условиях не рекомендуется держать споры с высокой влажностью (30% и более);

Вакуумная сушка. Вакуумное высушивание уредоспор в ампулах позволяет хранить их до 10 лет и более. Высушивают споры при пониженном давлении (40-50% вакуума) в течение 2-2,5 часа, после которой ампулы со спорами запаивают с использованием пламени горелки. После запайки ампулы проверяют на наличие вакуума, так как отсутствие изреженности воздуха приведет к потере жизнеспособности спор. Во время длительного хранения (больше 1 года) ампулы со спорами обычно хранят при +4...+8 °С. После снятия спор с хранения происходит их медленная регидратация в течение 3 часов при относительной влажности 50% [3];

Жидкий азот (-196 °С). Многие лаборатории мира хранят споры ржавчины в жидком азоте. Споры высушивают до 20-30% относительной влажности и затем запечатывают в стеклянные ампулы или алюминиевые пакеты. Перед применением спор стеблевой и листовой ржавчины подвергают тепловой обработке водой при 40 °С в течение 5-7 минут для того, чтобы прервать вызванную холодом покой. Обычно тепловая шоковая обработка и регидратация не являются необходимыми для уредоспор желтой ржавчины. При обращении с жидким азотом необходимо соблюдать общепринятые меры предосторожности [4];

Сверхнизкое замораживание (-50...-80 °С). Споры высушивают до 20-30% относительной влажности и затем запечатывают их в пластиковые мешки, стеклянные или пластиковые ампулы. Можно также хранить высушенные листья с пустулами на них с хорошей всхожестью спор в течение 18 месяцев и более. По сравнению с жидким азотом имеет место некоторое снижение жизнеспособности спор, но изоляты восстанавливаются спустя и 10 лет хранения.

Наиболее продолжительно без изменения основных биологических свойств штаммы сохраняются в жидком азоте или низкотемпературных морозильниках. При более простых способах хранения у многих видов фитопатогенов быстрее снижается жизнеспособность и другие свойства штаммов, что периодически требует их возобновления через живые растения или питательные среды. Образцы штаммов, изменившие первоначальную вирулентность, что определяется на наборе многогенных линий растений-хозяев, подлежат выбраковке [5].

Консервация спор в ампулах под вакуумом при пониженном давлении является менее трудоемким и экономичным способом. В связи с этим целью нашей работы являлось изучение жизнеспособности и вирулентности уредоспор ржавчинных грибов пшеницы (*Puccinia graminis*, *P.triticiana*, *P.striiformis*) при длительном хранении в ампулах, консервированных методом вакуумной сушки.

Материалы и методы Материалами для исследования служили возбудители ржавчинных болезней пшеницы (29 рас *Puccinia graminis*, 16 рас *P.triticiana* и 12 рас *P.striiformis*), хранящиеся в коллекции микроорганизмов НИИПББ. Для повышения жизнеспособности и всхожести уредоспор использовали метод теплового шока, при котором споры прогревают при +45 °С в течение 30 минут с последующим увлажнением во влажной камере [6].

Прорастаемость коллекционных рас возбудителей изучали путем приготовления препарата «висячая капля». Для этого небольшую каплю суспензии спор наносят на покровное стекло, переворачивают его каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с луночкой. Через 20 часов с помощью микроскопа просматривают не менее 300 спор, отмечая число проросших. Число проросших спор выражают в процентах от общего числа просчитанных. Проращивание спор проводили с соблюдением соответствующей

температуры, влажности и света исследуемого патогена (оптимальной температурой для роста стеблевой ржавчины является 30 °С, листовой – 25 °С и желтой – 12-15 °С) [7].

Пораженность пшеницы болезнью определяли стандартными методами оценки вирулентности гриба. С использованием изогенных Sr-, Lr-, Yr-линий и сорто-дифференциаторов устанавливали расовую принадлежность и определяли вирулентность. В результате каждая раса характеризовалась индексом, состоящим из пяти согласных букв английского алфавита от В до Т. Тип поражения листовой ржавчиной определяли по шкале Mains, Jackson, стеблевой ржавчиной – Stakman, Levine, желтой ржавчиной – Gassner, Straib [2].

Результаты и обсуждение В настоящее время доказано, что наиболее распространенным способом поддержания высокой биологической активности спор является вакуумная сушка. Украинские фитопатологи М.П. Лесовой и Г.С. Суворова [8] изучили способы длительного хранения уредоспор возбудителя листовой ржавчины пшеницы. Для этого споры сушили в эксикаторах над серной кислотой, хлористым кальцием и силикагелем, а также в сушильном шкафу. Затем их запаивали в ампулы под вакуумом (0,25 атм.) и хранили в холодильнике при температуре 5-6°С в течение 4-х лет. Исследования показали, что самым оптимальным является режим сушки над силикагелем. Гибель спор в этом варианте не превышала 2,0%. Наиболее губительное действие на споры оказывала сушка их над серной кислотой (14,0%). Их жизнеспособность составила 60,0%. В процессе сушки и четырехлетнего хранения погибло всего 26,0% спор. В вариантах с хлористым кальцием и серной кислотой жизнеспособность уредоспор составляла соответственно 50,0 и 43,0%.

В своих исследованиях индийские ученые V.K.Gupta и K.D. Srivastava [9] определили сохранение биологических свойств спор при способе вакуумной сушки. Различные количества спор листовой и стеблевой ржавчины собирали с предварительно инокулированных растений пшеницы в теплице. Споры сушили на воздухе 48 часов при температуре +30-32°С. Затем проводили вакуумную сушку спор в стеклянной пробирке в течение 2-3 часа до достижения давления 0,5 мм рт. столба с последующей запайкой. Ампулы со спорами хранили в холодильнике при 4°С. После хранения в этих условиях 341, 372 и 396 дней споры теряли 9,7; 10,9 и 11,0% жизнеспособности соответственно. В контрольном варианте потери данного показателя были – 87,3; 87,7 и 90,1%.

В результате наших исследований установлено, что при длительном хранении с применением вакуумного метода сушки споры ржавчинных грибов сохраняют свою жизнеспособность, и изменение биологических свойств было незначительно. Эффективное прорастание, т.е. количество спор, способных прорасти происходило в течение 3 часов у рас листовой и стеблевой, а для желтой ржавчины от 5 часов и более. После 21-35 летнего хранения в ампуле длина ростовой трубки мало отличались от контрольных, уже через 20 часов инкубирования они образовывали ростковую гифу по длине равную или превышающую диаметр споры. Средний процент жизнеспособности и вирулентности составляли для стеблевой ржавчины 65,7% и 55,2% при хранении в течение 23,4 лет; для листовой 62,7% и 56,2%, желтой ржавчины 50,5% и 39,9% длительность хранения которых более 26 лет. Полученные результаты доказывают оптимальность данного метода, при котором в процессе хранения наблюдается постепенное снижение жизнеспособности и инфекционности спор (таблицы 1-3).

Таблица 1- Жизнеспособность и вирулентность коллекционных образцов *P.graminis*

Номер изолята	Название патотипа	Продолжительность хранения спор, лет	Жизнеспособность, %	Вирулентность спор, %
11/1	MNF/C	26	85	51
11	MRC/F	24	64	53
11	PTP/F	22	75	27
11	LGP/D	21	70	53
17/1	CFH/C	27	70	51
17	BCG/B	26	87	63
17	CCQ/B	25	77	63
17	RRR/K	24	88	27
17	BFK/F	23	80	38
17	RTR/T	21	82	14
1	RQR/P	26	52	40
21	RFK/D	26	89	38
21	RTR/F	23	75	25
21	RKH/F	22	80	34
34/1	BCB/B	26	40	85
34	BCR/D	24	70	63
34	BFL/B	23	35	76
34	BGB/B	22	30	87
34/1	BBB/B	21	80	89
40/1,2	BDB/B	26	50	91
40/1,2	LCB/H	26	60	72
40	CCC/D	24	86	68
40	CCH/D	22	79	55
40	RKH/G	21	80	46
117	LCC/B	23	40	70
117	LGB/C	23	35	70
117	PKM/K	23	20	36
117	PHC/F	23	79	55
117	BKH/B	22	37	63
Среднее		23,4	65,7	55,2

Расы коллекционных образцов стеблевой ржавчины отличались высокой жизнеспособностью и вирулентностью. Жизнеспособность рас стеблевой ржавчины пшеницы (*P.graminis*) MNF/C, MRC/F, LGP/D, CFH/C, BCG/B, CCQ/B, BCB/B, BCR/D, BFL/B, BGB/B, BBB/B, BDB/B, LCB/H, CCC/D, CCH/D, LCC/B составляли от 60 до 89% с вирулентностью 55-91. Таким образом, средний процент гибели спор в ампулах изученных 29 рас стеблевой ржавчины, хранившиеся в течение 23 лет составил 35%, вирулентность сохранялась до 65%.

Таблица 2 - Жизнеспособность и вирулентность коллекционных образцов *P.triticiiana*

Номер изолята	Название патотипа	Продолжительность хранения спор, лет	Жизнеспособность, %	Вирулентность спор, %
11-18	TTJ/HS	22	60	75
29-52	TRS/BS	25	70	65
37-30	LKC/HB	24	80	35
125-184	THK/RJ	26	20	70
138-32	TTT/QJ	25	70	80
141-90	TKT/RJ	23	80	70
151-59	TST/MN	21	50	75
154-45	TJC/CD	26	50	40
31-61	JHH/HB	36	80	40
101-3	PBG/HL	31	85	40
249-3	QGR/RB	29	70	45
260-14	SCC/CG	29	60	35
293-47	PSK/HT	29	50	75
336-30	SHG/GJ	28	50	40
345-43	TKT/HG	27	80	65
362-63	TGR/HG	27	50	50
Среднее		26,7	62,7	56,2

Число проросших спор рас листовой ржавчины (*P.triticiiana*) TTJ/HS, TRS/BS, THK/RJ, THK/RJ, TTT/QJ, TKT/RJ, TST/MN, PSK/HT, TKT/HG, TGR/HG, хранившиеся в течение 21-29 лет достигали 50-80%, вирулентность была от 40 до 80%. Жизнеспособность спор листовой ржавчины после 26 лет хранения в ампуле в среднем составляло 62,7%, а вирулентность не превышало 56,2%.

Таблица 3 - Жизнеспособность и вирулентность коллекционных образцов *P.striiformis*

Номер изолята	Название патотипа	Продолжительность хранения спор, лет	Жизнеспособность, %	Вирулентность спор, %
A-8/5	4E196 (NQ/B)	27	50	26,6
31/1,5	6E16 (GG/B)	27	50	40,0
86E16	86E24 (JQ/D)	23	56	40,0
X/1,5	12E18 (DJ/B)	26	60	26,6
31/1,5	102E183 GS/B)	24	60	66,6
86E16	6E136 (JD/B)	22	60	26,6
31/1,5	65E1 (JB/B)	29	40	26,6
A-8/5	7E151 (SS/D)	31	40	53,3
A-8/5	79E187 (JN/B)	26	50	66,6
39E158	37E157	25	45	46,6
31/1,5	4E11	32	45	33,3
A-8/1,5	7E1	25	50	26,6
Среднее		26,4	50,5	39,9

Всхожесть изученных 12 рас желтой ржавчины A-8/5, 7E151 после 33 лет хранения составляли 50-80%, у рас 31/1,5 и X-1/5 (35 лет) этот показатель колебался в пределах 40-60%, вирулентность всех изученных рас *P.striiformis* достигало до 66%. В процессе 26 летнего хранения в ампулах средний процент жизнеспособных спор составлял 50,5%, вирулентность сохранялось до 39,9%.

Литература

1. Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Еремина С.С., Афанасьева Т.И., Озерская С.М. Современные методы длительного хранения грибов. Тезисы докладов второго съезда микологов России «Современная микология в России». – Москва, 2008. – С.110.
2. Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management. – Mexico, D.F.: CIMMYT, 1992. – 81 p.
3. Sharp E.L., Smith F.G. Further study of the preservation of *Puccinia* uredospores. // *Phytopathology* – 1957. – 47. – P.423-429.
4. Loegering W.O., Harmon D.L., Clark W.A. Storage of urediospores of *Puccinia graminis tritici* in liquid nitrogen. // *Plant Dis. Rep.* – 1966. – 50. – P.502-506.
5. Смирнова Л.А., Захряпина Т.Д. Каталог коллекционных культур возбудителей ржавчины хлебных злаков, имеющих в центральном банке патотипов ржавчинных грибов. Московская обл., ВНИИФ, 1988. – С.3-6.
6. Рсалиев Ш.С., Дюсембаева К.К., Мамадалиев С.М. Изучение и сохранение спор ржавчины в Казахстане. Материалы «1-я Центрально-Азиатская конференция по пшенице». – Алматы, 2003. – С.277-285.
7. Практикум по микробиологии/Под редакцией Н.С. Егорова. – Москва, 1996.– 688с.
8. Лесовой М.П., Суворова Г.С. Изучение способов длительного хранения уредоспор возбудителя листовой ржавчины пшеницы // *Захист рослин (укр., рез. рус.)*. – Киев. – 1981. – 28. – С.63-66.
9. Gupta V.K., Srivastava K.D. Preservation of rust urediospores by vacuum drying // *Indian J. Exp. Biol.* – 1973. – 11-4. – P.363-364.

Г.Ә. Жаппарова, Ш.С. Рсалиев

ФИТОПАТОГЕНДІ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРДЫ КРИОКОНСЕРВАЦИЯЛАУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІНІҢ САҚТАЛУЫ

БҚПФЗИ микроорганизмдер коллекциясында сақталған бидайдың тат аурулар патогендерінің (*Puccinia graminis*, *P.tritici* және *P.striiformis*) тіршілікке қабілеттігі мен зәрлілігі зерттелді. Вакуумдық кептіру әдісі арқылы спораларды консервациялау бидайдың саңырауқұлақ аурулар қоздырғыштарының ұзақ уақыт бойы (21-35 жыл) тіршілікке қабілеттілігі мен патогендік қасиеттерін өзгерпей сақталуын қамтамасыз етеді.

G.A. Zhapparova, Sh.S. Rsaliyev

CRYOPRESERVATION AND CONSERVATION OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF PATHOGENIC FUNGI

Studied the viability and virulence of pathogens of wheat rust disease (*Puccinia graminis*, *P.tritici* and *P.striiformis*), stored in the RIBSP collection of microorganisms. Found that preserving the dispute by vacuum drying ensure long-term (21-35 years) preservation of rust fungi in a viable state without changing the pathogenic properties.