

Биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 2. 3. Степанов В.В., Голеневский С.П. Влияние соединений меди на урожайность и элементный состав сельскохозяйственных культур // Агрохимия. – 1991. – № 8. 4. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) тяжелых металлов и мышьяка в почвах. Гигиенические нормативы ГН 2.1.7.020-94. Госкомсанэпиднадзор России.-М., 1995. 5. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1968. – V. 125. – № 1. 6. Bates L.S., Waldern R.P., and

Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. – 1973. – V. 39. – № 1. 7. Методические указания по оценке качества и питательности кормов.-М.: МСХ РФ, 2002. 8. Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства. Издание 2-е.-М.: ЦИНАО, 1992. 9. Временный максимально допустимый уровень – МДУ содержания некоторых хим. элементов и госсипола в кормах для с/х животных и кормовых добавках.-М., 1987, 128. 4/281-6 от 15.04. 1987 г. 10. Минеев В.Г., Ремне Е.Х. Агрохимия, биология и экология почвы.-М.: Росагропромиздат, 1990.

Поступила в редакцию 20.12.10

Goncharova L.I., Tsygvintsev P.N., Gubareva O.S., Manin K.V., Chizh T.V. Effect of copper on the formation of green mass and nutritional quality of feed beans

Based on the data from greenhouse experiment it has been found that not only magnitude but also the direction of the effect depends on the element concentration and duration of exposure. A dose-dependent accumulation of the metal in the green mass and increase in crude protein at Cu pollution levels of soddy-podzolic soil of 100-300 mg/kg is reported.

Защита растений

УДК 632.4:633.13:631.527

ВЫДЕЛЕНИЕ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ СОРТОВ ОВСА, УСТОЙЧИВЫХ К ФУЗАРИОЗУ И НАКОПЛЕНИЮ МИКОТОКСИНОВ В ЗЕРНЕ*

О.П.Гаврилова¹, Т.Ю.Гагкаева¹, кандидаты биологических наук, И.Г.Лоскутов^{2,3}, доктор биологических наук (Представлено академиком Россельхозакадемии М.М.Левитиным)

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин

²Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И.Вавилова, 190000, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург

E-mail: olgavrilova1@yandex.ru

Проведен отбор образцов овса, характеризующихся многокомпонентной устойчивостью к фузариозу зерна, из коллекции ВИР. Устойчивость образцов оценена по трем показателям: проценту зараженных зерен, количеству микотоксинов и содержанию ДНК трихотеценпродуцирующих грибов. Выделено 5 староместных образцов и 2 сорта овса Аргамак (Россия) и Кигоми (Япония), наиболее устойчивых к заражению зерна и накоплению микотоксинов.

Ключевые слова: овес, грибы, *Fusarium*, фузариоз, микотоксины, ДНК, устойчивость

Key words: oat, germplasm, *Fusarium*, disease, mycotoxins, DNA, resistance

Один из факторов, определяющих качество зерна овса для продовольственных и кормовых целей, – инфицированность его патогенной микофлорой. Зерно, зараженное грибами рода *Fusarium*, имеет низкую всхожесть, что значительно ухудшает качество семенного материала. Кроме того, в зараженном зерне накапливаются микотоксины, продуцируемые многими видами грибов этого рода, которые сохраняясь в зерне и продуктах его переработки, при попадании в организм человека и животных приводят к снижению иммунитета и различным патологическим изменениям.

С помощью микотоксикологического анализа зерна овса ежегодно выявляют высокий уровень зараженности фузариевыми грибами и контаминацию микотоксинами во многих регионах РФ [1]. Проведенный нами анализ образцов этой культуры, выращенной на территории Северо-Запада РФ в 2008 г., показал зара-

женность зерна в среднем 17,0 % (предел зараженности – 2-68,6 %); Т-2-токсин (Т-2) обнаружен в 46 % образцов (4-182 мкг/кг), микотоксин дезоксиниваленнол (ДОН) – в 47 % образцов (36-2505 мкг/кг) [2].

Селекция овса на фузариоз по сравнению с другими зерновыми колосовыми культурами осложняется бессимптомным течением инфекционного процесса в поле и трудоемкостью лабораторной оценки зараженности зерна. Это привело к ситуации повсеместного возделывания овса без учета устойчивости сортов к заражению фузариевыми грибами и накоплению микотоксинов.

Задачей настоящего исследования была характеристика образцов овса из коллекции ВИР по признакам устойчивости к заражению, накоплению микотоксинов и содержанию ДНК грибов рода *Fusarium* с целью отбора образцов с многокомпонентной устой-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-13668-офи_ц “Разработать технологию выделения исходного материала для селекции сортов овса, устойчивых к фузариозу метелки и накоплению микотоксинов в зерне”), проекта Nordic Research Board № 090014 “New emerging mycotoxins and toxigenic fungi in Northern Europe”, грантов Финской Академии Наук № 126917 и № 131957.

чивостью к фузариозу зерна. Коллекция ВИР включает все мировое ботаническое и генетическое разнообразие рода *Avena* L. [3]. Анализ такого обширного и генетически разнообразного набора образцов овса по устойчивости к фузариозу зерна проводится впервые не только в России, но и мире.

Методика. Оценивали 197 образцов овса (150 пленчатых и 47 голозерных) из коллекции ВИР по устойчивости к фузариозу зерна. Образцы, представленные видами *A. abyssinica*, *A. byzantina*, *A. strigosa* и *A. sativa* (последний включал как селекционные сорта и линии, так и староместные образцы различного географического происхождения), возделывали в условиях Тосненской экспериментальной станции ВИЗР (Ленинградская область) в 2007–2008 гг. В дополнение к естественному высокому инфекционному фузариозному фону, существующему на участке, растения инокулировали грибом *F. sporotrichioides*. Инокулюм представлял собой зерновую смесь, зараженную 4-мя штаммами этого патогена, которую распределяли по поверхности почвы – 150 г/м².

Устойчивость овса к фузариозу оценивали по следующим параметрам: зараженности зерна грибами рода *Fusarium* (%), количеству ДНК трихотеценпродуцирующих видов грибов рода *Fusarium* (нг/мкл общей ДНК) и количеству накапливаемых микотоксинов – ДОН и Т-2 (мкг/кг).

Зараженность зерна грибами рода *Fusarium* определяли на картофельно-сахарозном агаре после предварительной поверхностной стерилизации зерна. Этот показатель (%) оценивали через 1 нед инкубации при температуре 23°C: у пленчатых образцов – в цветковой пленке и после механического ее удаления с поверхности зерновки.

Суммарное содержание в зерне ДНК комплекса трихотеценпродуцирующих видов грибов, имеющих ген *Tri5* в геноме (праймеры ТМТ_{ri}, f/r), измеряли методом количественной ПЦР (TaqMan–ПЦР с флуоресцентными пробами). К трихотеценпродуцирующим грибам относятся виды *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*. Из каждого образца экстрагировали ДНК, используя СТАВ-метод по протоколу, предложенному European Commission [4].

Анализ содержания Т-2 и ДОН в зерне проводили методом твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем,

характеристики которых приведены в работах [5, 6]. Метод заключается в экстрагировании токсинов из размолотой пробы зерна (10 г), просеянной через мелкоячеистое сито для отделения цветковых пленок, смесью ацетонитрила и воды, с последующим измерением оптической плотности растворов на спектрофотометре (длина волны – 492 нм) и расчетом количества содержания микотоксина.

Результаты и обсуждение. В 2007 г. при благоприятных условиях для грибов рода *Fusarium* зараженность зерна варьировала значительно – от 0 до 100 %, в 2008 г. она была низкой – 0–24 %. Цветковая пленка овса препятствует проникновению патогена в зерновку, поэтому зараженность зерна пленчатых образцов в пленке и после ее удаления различалась существенно: в 2007 г. – в среднем соответственно 17,3 и 9,6 %, в 2008 г. – 8 и 4 % (табл.).

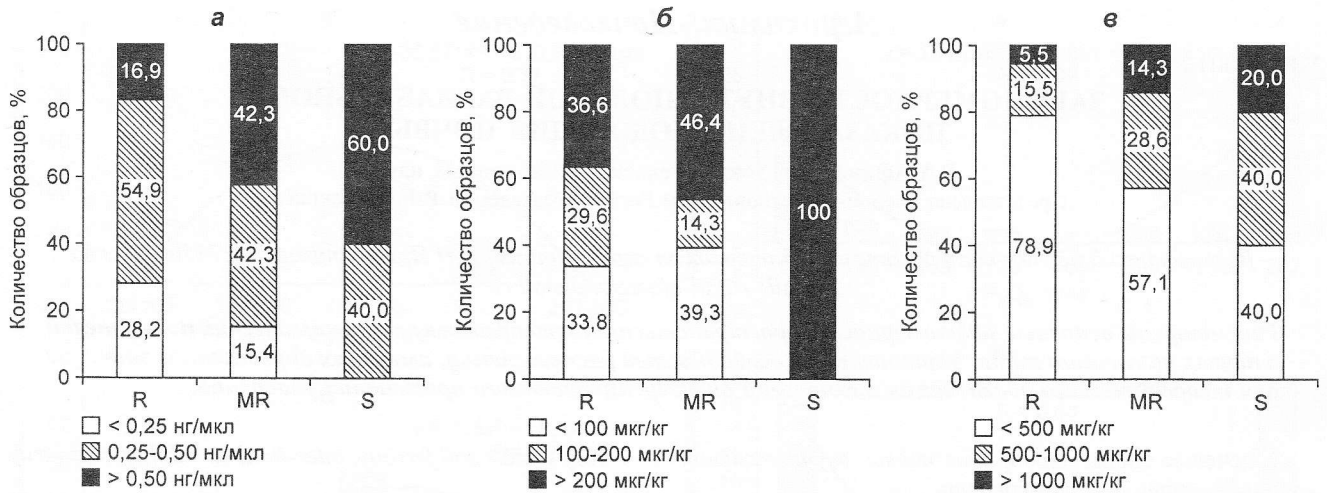
У группы голозерных форм отмечена высокая устойчивость к заражению зерна. Несмотря на отсутствие механического барьера в виде цветковой пленки, покрывающей зерно, зараженность всех голозерных образцов была низкой (в среднем 1,9 % в 2007 г. и 3 % – в 2008 г.); максимальная составила 9 % (к-2299, сорт Polard, Канада, 2008 г.).

Количество ДНК грибов трихотеценпродуцирующих видов рода *Fusarium* в образцах варьировало значительно. У голозерных форм в 2007 г. оно составило 0–0,57 нг/мкл, пленчатых – 0–3,4 нг/мкл; в 2008 г. – соответственно 0,04–1,7 и 0–3,7 нг/мкл. В целом голозерные образцы также накапливали меньше ДНК патогенов и анализируемых микотоксинов, чем пленчатые.

Четкой связи между зараженностью зерна конкретного образца и содержанием в нем ДНК грибов видов *Fusarium* и двух анализируемых микотоксинов не найдено. Причиной этому служит присутствие в микофлоре зерна видов *Fusarium*, не способных продуцировать эту группу химических соединений (например, *F. avenaceum* и *F. tricinctum*). Кроме того, процент зараженности зерна больше отражает распространение заболевания, а не степень поражения зерновки (глубину проникновения патогена). Количество ДНК грибов в образце – более точный показатель зараженности, адекватно описывающий взаимодействие генотипа растения с патогенами. Отсутствие связи между процентом зараженности, количеством ДНК грибов и суммарным содержанием токсинов Т-2 и ДОН у отдельных образцов, возможно, подтверждает мнение о том,

Зараженность зерна, количество микотоксинов и содержание ДНК грибов трихотеценпродуцирующих видов рода *Fusarium* в зерне голозерных и пленчатых форм овса

Форма	Год	Количество образцов, шт.	Зараженность зерна, %	Микотоксины, мкг/кг		ДНК грибов, нг/мкл общей ДНК
				Т-2	ДОН	
в среднем (пределы варьирования параметра)						
Пленчатая:						
в пленке	2007	91	17,3 (0-100)	–	–	–
очищенное			9,6 (0-98)	543 (0-5620)	728 (53-11190)	0,78 (0-3,40)
в пленке	2008	59	8,0 (0-24)	–	–	–
очищенное			4,0 (0-12)	225 (0-2000)	454 (44-4840)	0,77 (0-3,70)
Голозерная	2007	14	1,9 (0-6)	178 (0-774)	346 (57-1256)	0,25 (0-0,57)
	2008	33	3,0 (0-9)	178 (0-1145)	580 (72-3300)	0,38 (0,04-1,70)



Распределение (%) образцов овса по содержанию ДНК грибов р. *Fusarium* (а) и накоплению микотоксинов Т-2 (б) и ДОН (в) в различных группах устойчивости к заражению зерна (устойчивые – R, среднеустойчивые – MR, восприимчивые – S) в 2007 г.

что устойчивость зерновых культур к проникновению и распространению грибов рода *Fusarium*, а также накоплению микотоксинов контролируется различными генами и наследуется независимо [7-9]. Несмотря на отсутствие четкой связи между проанализированными показателями устойчивости, в целом группа более устойчивых к заражению зерна генотипов растений содержала значительно меньшие концентрации ДНК и микотоксинов.

В 2007 г. на основе зараженности зерна образцы распределили на 3 группы: устойчивые – зараженность зерна не более 6%; среднеустойчивые – зараженность 7-40%; восприимчивые – зараженность более 40%. В группе устойчивых генотипов содержание ДНК грибов существенно меньше, чем у восприимчивых (рис. а). Образцы, сгруппированные по зараженности зерна, также различались по количеству накапливаемых микотоксинов (рис. б, в). В 2008 г. на фоне низкого уровня зараженности зерна четкой положительной связи между показателями не выявлено.

За 2 года исследований с использованием показателей устойчивости выделено 7 образцов с многокомпонентной устойчивостью к фузариозу зерна. Большинство из них относится к виду *A. sativa* и является староместными образцами азиатского происхождения (к-2513, к-6963, к-7766, к-7934, к-8479). Сорты Аргамак (к-14648) и Куromi (к-11632) наиболее устойчивы среди проанализированных селекционных сортов.

Существование различных типов устойчивости к проникновению, распространению патогена и накоплению микотоксинов требует использования комп-

лекса количественных показателей оценки. Информация по устойчивости образцов овса к фузариозу необходима селекционерам при создании новых сортов с высоким качеством зерна.

Авторы выражают благодарность доктору Т. Ули-Маттила (Университет города Турку, Финляндия) за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований и кандидату медицинских наук А.А. Буркину (лаборатория микотоксикологии ВНИИВСГЭ, г. Москва) за помощь в определении микотоксинов.

Литература. 1. Кононенко Г.П. Система микотоксикологического контроля объектов ветеринарно-санитарного и экологического надзора / Автореф. докт. дис.-М., 2005. 2. Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю. Опасное заболевание овса – фузариоз метелки и зерна // Сельскохозяйственные вести. – 2008. – 2 (73). – С. 40-41. 3. Лоскутов И.Г. Овес (*Avena L.*): распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. -СПб: ГНЦ РФ ВИР, 2007. 4. European Commission. Community Reference Laboratory for GM Food and Feed. Event-specific for the quantitation of maize line NK603 using real-time PCR, 2005. 5. Burkin A.A., Zorjan V.G., Soboleva N.A., Kononenko G.P. T-2 toxin and roridin A in blood, tissues and excreta of rats after oral administration // Baltic Journal of Laboratory Animal Science. – 2000. – V. 10. – № 1. – P. 26-32. 6. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Опыт разработки и применения иммунореагентов для анализа 12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-онов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – 2. – С. 16. 7. Snijders C.H.A. The inheritance of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat // Euphatica. – 1990. – 50. – P. 9-17. 8. Mesterhazy A. Theory and practice of the breeding for *Fusarium* head blight in wheat // Journal of Applied Genetic. – 2002. – 43A. – P. 289-302. 9. Boutigni A-L., Richard-Forget F., Barreau C. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes // European Journal of Plant Pathology. – 2008. – 121. – P. 411-423.

Поступила в редакцию 23.05.11

Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Loskutov I.G. *The selecting of source of oats resistance to Fusarium Head Blight and accumulation of mycotoxins*

The goal of the research was to identify the resistant to *Fusarium* Head Blight germplasm in *Avena* genus from the collection of N. I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). Assays were based on a combination of three parameters: percent of *Fusarium* infected grain, DNA of trichothecene-producing *Fusarium* fungi and toxin accumulation. The five landraces originated from Asian region and two cultivars Argamak (Russia) and Kuromi (Japan) seems to be suitable genetic resources for resistance to fungal invasion and accumulation of mycotoxins.