

кохитозу, бурой пятнистости и корневым гнилям, высоким содержанием белка и жира; R 2-2 – с высокой семенной продуктивностью, комплексной устойчивостью к патогенам, высокобелковое; R 16-10 – мощное растение с комплексной устойчивостью к патогенам. И хотя не всегда хозяйственно ценные признаки сочетаются в одном растении, особенности селекции люцерны как перекрестно-опыляемой культуры позволяют легко вовлечь все отобранные образцы в селекционный процесс с использованием метода поликросса.

Сибирский научно-исследовательский институт кормов, 630501, Новосибирская область  
Поступила в редакцию 15.02.05

Rozhanskaya O.A. *Comparative analysis of quantitative variability in somaclone and mutant populations of lucerne*

*High effectiveness in using somaclone variability method has been demonstrated to employ this for creating valuable breeding material in lucern. The study in field nursery covered 215 regenerants  $R_0$  obtained in culture in vitro and 144 mutants  $M_1$  after treatment of seeds with ethylmethanesulfonate (EMS). It was found that variability rose in important quantitative and qualitative traits as compares with initial varieties, including productivity of above-ground mass and seeds, resistance to fungus diseases, winter hardiness. Selected forms may be used in breeding process as a source of valuable traits.*

УДК 633.264:631.522/524+631.46.5+579.262

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ОВСЯНИЦЫ ЛУГОВОЙ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР, СОДЕРЖАЩИХ СИМБИОТИЧЕСКИЕ ГРИБЫ-ЭНДОФИТЫ РОДА *NEOTYPHODIUM*

Т.В.Шеленга<sup>1</sup>, А.В.Конарев<sup>1</sup>, Н.И.Дзюбенко<sup>1</sup>, Л.Л.Мальшев<sup>1</sup>, Т.Такап<sup>2</sup>

(Представлено академиком Россельхозакадемии И.А.Тихоновичем)

*Изучены образцы овсяницы луговой из мировой коллекции ВИР на наличие эндофитных грибов рода *Neotyphodium* (= *Acremonium*), продуктов их жизнедеятельности (алкалоидов), а также влияние этих грибов на уровень и характер генетического полиморфизма и морозостойкость растений-хозяев.*

За рубежом уже два десятилетия для создания исходного материала и новых высокоурожайных, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам сортов многолетних кормовых злаковых трав используется их естественная симбиотическая ассоциация с грибами-эндофитами рода *Neotyphodium* (= *Acremonium*) [1, 2]. В такой симбиоз вступают, например, овсяница луговая *Festuca pratensis* Huds. и тростниковидная *F. arundinaceae* Schreb., плевел многолетний (райграс пастбищный) *Lolium perenne* L. [3]. По литературным данным [1-3], 95% образцов овсяницы луговой и тростниковидной в США, более 60% в Новой Зеландии и до 52% в Восточной Европе содержат мицелий гриба рода *Neotyphodium*. При этом значительно повышаются устойчивость растений к стрессовым факторам [4], семенная продуктивность, выход зеленой массы [2]. Наиболее важные продукты жизнедеятельности грибов-симбионтов – алкалоиды, характеризующиеся токсичностью по отношению к насекомым-вредителям [2] и животным [5-7]. В нашей стране систематические исследования симбиотических отношений многолетних злаковых растений и эндофитных грибов не проводились.

Целью настоящей работы было изучение образцов коллекции овсяницы луговой, содержащих гри-

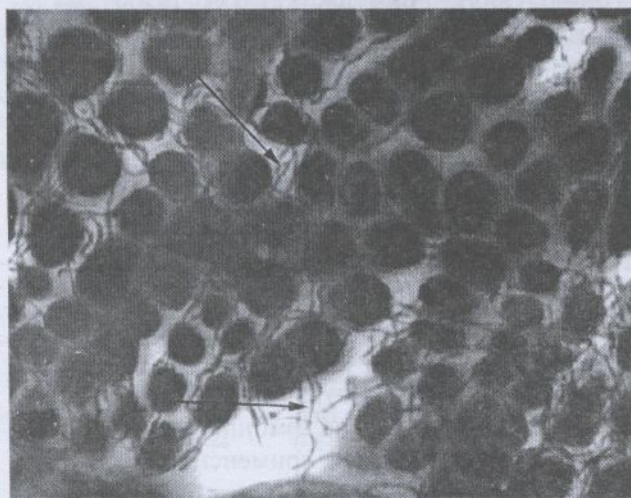
Литература. 1. Гончаров П.Л., Лубенец П.А. Биологические аспекты возделывания люцерны. – Новосибирск, 1985. 2. Гончаров П.Л. Кормовые культуры Сибири: биолого-ботанические основы возделывания. – Новосибирск, 1992. 3. Гончаров П.Л., Гончаров П.П. Методические основы селекции. – Новосибирск, 1993. 4. Karp A. // *Euphytica*. – 1995. – V.85. – P.295-302. 5. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. // *Exp. Cell. Res.*, 1968. – V.50. – P.151-158. 6. Murashige T., Skoog F. // *Physiol. plant.* – 1962. – V.15. – P.473-497. 7. Mariotti D., Acioni S., Perrotti M. // *Plant Sci. Lett.* – 1984. – V.37. 8. Meijer E.G.M., Brown D.C.W. // *Plant Cell Rept.* – 1985. – V.4. – P.285-288. 9. Jbraginova S.S., Smolenskaya S.E. // *Acta Agronomica Hungarica*. – 1997. – V.115 (2). – P.109-116.

бы-эндофиты рода *Neotyphodium*, для дальнейшего использования эндофитсодержащих образцов в селекции этой культуры. В ходе исследований выделяли из коллекции образцы, содержащие (Е+) и не содержащие (Е-) грибы-эндофиты, проводили видовую идентификацию грибов-эндофитов в образцах; изучали в образцах Е+ содержание и состав алкалоидов; определяли степень влияния грибов-эндофитов на морозостойкость растения-хозяина; изучали полиморфизм запасных белков – проламинов у образцов обоих типов.

**Методика.** Объектом исследований были семена 270 образцов овсяницы луговой разных лет репродукции Павловской опытной станции (ПОС) ВИР и оригинальные образцы, собранные экспедициями ВИР в разных регионах России и мира. Для первичной диагностики грибов-эндофитов в семенах использовали метод световой микроскопии [8]. Для определения видовой принадлежности гриба-эндофита по характеру роста его мицелия (гиф) применяли стерео- и трансмиссионную электронную микроскопию [3]. Изучали колонии гриба, полученные из листовых влагалиц 10-дневных проростков образцов Е+ [3]. Содержание и состав алкалоидов в семенах анализировали методами газожидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной

хроматографии [5-7]. Морозостойкость оценивали в условиях температуры, при которой погибало 50% растений тестируемого образца – LT50 [4]. На устойчивость к воздействию отрицательных температур исследовали 76 образцов: 38 E+ и 38 E-, которые отбирали парами и с учетом одинакового географического происхождения – 29 российского и 9 зарубежного с разным содержанием грибов-эндофитов – от 4 до 100%. Электрофорез запасных белков семян – проламинов и запись формул белковых спектров проводили по методам, принятым в ВИР [9]. Использовали по 100 зерновок 11 оригинальных образцов E+ и 11 E-. Результаты обработаны методами многомерной статистики с помощью программы Statistica 6,0.

**Результаты и обсуждение.** Методом световой микроскопии у образцов E+ обнаружены гифы гриба-эндофита в виде полупрозрачных извитых тяжей с редкими ответвлениями, расположенными между алейроновыми зернами. Эти морфологические особенности характерны для мицелия грибов *N. uncinatum* (рис.) [3]. При изучении колоний гриба с использованием стереомикроскопа и электронной эмиссионной микроскопии подтверждена принадлежность обнаруженного в семенах мицелия грибу-эндофиту этого вида [1, 3]. Он присутствовал в семенах 53 образцов, или 20% общего числа изученных. Процент семян в образце, содержащих мицелий гриба, варьировал от 2 до 100. Анализ распределения образцов E+ по природным зонам показал, что большинство (78%) происходило из таежной, лесной и лесостепной зон. Из 53 этих образцов 31 относился к дикорастущим и 22 – к культурным; 39 имели оригинальное происхождение, 14 репродуцированы на ПОС ВИР. За исключением к-25237, сорта Хибинская из Мурманской области (субарктическая климатическая зона), все образцы произрастали в природных зонах с умеренным климатом.



Мицелий гриба *N. uncinatum* между алейроновыми зернами в семени образца E+ овсяницы луговой (световая микроскопия,  $\times 200$ ).

В семенах образцов E+ содержалось значительное количество (0,11-2,32 мкг/г сухой массы семян) лоллина – алкалоида, наиболее характерного для *N. uncinatum* [5-7]. В семенах образцов E- лоллина не обнаружено. Концентрация других алкалоидов – лолитрема В и эрговалина у образцов E+ была менее соответственно 0,5 и 0,7 мкг/г, что существенно ниже порогового уровня токсичности для травоядных животных (1,8-2 мкг/г) [5, 6]. При этом количество алкалоида не зависело от содержания гриба-эндофита в образце [3].

Значения LT50 у образцов E+ составляли  $-6,2 \pm 19,5^\circ\text{C}$  и были несколько ниже (в среднем на  $2,5^\circ\text{C}$ ), чем у контрольных образцов E- ( $-4,2 \pm 18,0^\circ\text{C}$ ). Средние значения у этих образцов достигали соответственно  $-13,6^\circ\text{C}$  (стандартное отклонение 3,6) и  $-11,1^\circ\text{C}$  (стандартное отклонение 3,3). Минимальная разница между показателями LT50 у парных образцов была  $0,1^\circ\text{C}$ , максимальная –  $7,4^\circ\text{C}$  (между образцом E+ к-39144 из Пензенской области с LT50 =  $-14,0^\circ\text{C}$  и образцом E- к-41223 также из Пензенской области с LT50 =  $-6,5^\circ\text{C}$ ). Таким образом, образцы E+ проявляли в целом большую устойчивость к воздействию отрицательных температур. Статистическая обработка данных показала, что на уровень морозостойкости достоверно влиял только один фактор – присутствие гриба-эндофита в растении ( $F = 102,94; P = 0,05$ ).

Образцы овсяницы луговой различались по типам спектров проламина. Для образцов E+ наиболее характерны следующие типы спектров – **г1 в3 в2 66 65 62; г3 г1 в3 в2 66 65 62; г3 г1 в2 66 62; г1 в3 в2 67 62 61 и г3 г1 в3 67 65 62**, для образцов E- – **г3 в3 в2 67 62 и г3 г2 в3 в2 67 62**. Кроме того, образцы E+ оказались более полиморфными по типам спектра – у них выявлено 106 типов, у образцов E- – 82. Очевидно, присутствие грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* влияет на характер и степень генетического полиморфизма образцов овсяницы луговой. С одной стороны, эти грибы-эндофиты могут иметь большее сродство с определенными генотипами растения-хозяина, идентифицируемыми по спектрам проламина, с другой – их присутствие может способствовать «выживанию» определенных генотипов, которые без гриба не сохранились бы в популяции, о чем свидетельствуют и данные литературы [1-3]. Нельзя исключать также возможность эпигенетического эффекта: эндофит способен индуцировать экспрессию «молчащих» генов овсяницы. Согласно существующему мнению, в ходе симбиотических взаимоотношений происходит «тонкая перекрестная регуляция» генов микроорганизма (гриба-эндофита) и растения-хозяина [1, 2, 10]. При этом микроорганизмы-симбионты (при мутуалистическом сообществе) тесно связаны с растением-хозяином и взаимодействуют с ним на всех этапах симбиоза, в том числе и в начале развития инфекции [1-3, 10].

Результаты исследований свидетельствуют об актуальности и целесообразности изучения имеющегося в России генофонда многолетних кормовых злаковых трав в связи с их симбиотическими отношениями с грибами-эндофитами для более широкого использования этого феномена в отечественной селекции. Симбиотическую селекцию, направленную на использование потенциала микробно-растительных взаимодействий, очевидно, следует осуществлять в направлении поиска оптимальных сочетаний генотипов гриба и растения-хозяина [10]. При этом для идентификации и характеристики таких генотипов следует применять весь комплекс методов – от классических до молекулярных.

**Литература.** 1. Christensen M., Hopcroft D., Rowan D., Tapper B. // In: Proc. 2nd. Int. Symp. Acremonium/Grass interaction, Palmerston North. – 1993. 2. Sharld C., Philips T. // J. Phytopath. – 1997 – V. 81. 3. Christensen M., Latch G., Tapper B. // Mycol. Res. – 1991 – P.918-923. 4. Nemoto N., Myazawa S., Kume H., Abe M. // J. Technic. Res. Conf. Medi. and Biol. Electron. Microscop.– 1992. 5. Gallanger R., Hawkes A., Stewart J. // J. Chrom. – 1984 – V.321. 6. Rottinghaus G., Garner G., Cornell C., Ellis J. // J. Agric. Food Chem. – 1991 – V.39. 7. Yates S., Petroski R., Powell R. // J. Agric. Food Chem. J. Phytopath. – 1990 – V. 38. 8. Saha, D., Jackson M., Johnson-Cicalese J. // J. Phytopath. – 1988 – V. 78. 9. Конярев А.В., Введенская И.О., Насонова Е.А., Перчук И.Н. // В сб.: Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. – СПб.: ВИР. – 2000. – С. 60-69. 10. Проворов Н.А., Тихонович И.А. // С.-х. биология. – 2003. – N 3.

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И.Вавилова, 190000, Санкт-Петербург  
<sup>2</sup>Хоккайдская государственная сельскохозяйственная опытная станция, Саппоро, Япония  
Поступила в редакцию 04.04.05

Shelenga T.V., Konarev A.V., Dzubenko N.I., Malyshev L.L., Takai T. *Study of meadow fescue (Festuca pratensis Huds.) accessions (from N.V.Vavilov institute collection) containing the endophyte fungi of genus Neotyphodium (=Acremonium)*

*Meadow fescue (Festuca pratensis Huds.) accessions (from the N.V. Vavilov Institute collection) were investigated for the presence of endophyte fungi (genus Neotyphodium =Acremonium) and their metabolic products (alkaloids). The effect of endophyte fungi on the level and nature of genetic polymorphism and frost resistance of host plants was explored.*

УДК 633.11:577.213/217

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПАТОГЕННОЙ И АССОЦИАТИВНОЙ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

С.И.Волощук, Р.Н.Капля, Н.Г.Бойко, А.Д.Волощук, В.С.Гирко  
(Представлено академиком Россельхозакадемии В.С.Шевелухой)

*Проведен анализ коллекции моноспоровых изолятов F.graminearum и F.culmorum, определены наиболее вирулентные и авирулентные изоляты – соответственно 54/14 и 104/1, 2/19 и 89/2. Исследованы взаимодействия между ними и ассоциативными diaзотрофами (штаммы 10702, К-9, 32-3, Agr), фосфомобилизующим штаммом Bacillus subtilis 5, антигрибными препаратами Trichoderma viride и Pseudomonas aureofaciens. Выявлен разный уровень антагонизма штаммов по отношению к изолятам Fusarium.*

Важное условие биологизации современного земледелия – увеличение доли в производственном процессе всех биологических компонентов агроценозов, включая и грунтовую микрофлору [1]. Разработаны и используются биопрепараты на основе штаммов азотфиксирующих микроорганизмов, интенсивно развивается направление «ассоциативная азотфиксация» [2]. В связи с этим большое значение имеют пути управления микроорганизмами, размещенными на корнях и в прикорневой зоне. Перспективными могут быть селекция штаммов на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды (перепадам температуры и влажности, высокой кислотности и засолению почв, загрязнению их пестицидами и др.), а также некоторым биотическим факторам (корневым выделениям растения-хозяина, флавоноидам, ряду почвенных микроорганизмов-антагонистов) и поиск микроорганизмов-синергистов [3]. Причем адаптивная селекция способна повысить эффективность процессов азотфиксации [4].

Использование препаратов азотфиксирующих микроорганизмов под злаковые и овощные культуры позволяет увеличить урожай и уменьшить на 25-55% количество азотных удобрений [1]. Ассоциативные азотфиксаторы [5] и фосфомобилизующие бактерии [6] могут повысить иммунитет злаковых к болезням. По данным наших исследований и Е.А.Клечковской [7], слабопатогенные штаммы возбудителей болезней, в частности F.graminearum, оказывают определенный стимулирующий эффект на рост растений пшеницы и могут быть компонентом микоризы. Кроме того, эндомикоризные грибы, например Glomus, могут стимулировать симбиотическую азотфиксацию [8] или мутуалистические взаимоотношения с diaзотрофами [9], поэтому важно выявить синергические комбинации микроорганизмов для практического применения.

Целью работы было исследование взаимодействия штаммов слабопатогенных грунтовых фузариев, которые повышают общую устойчивость растений к стрессовым факторам среды и при первич-