

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ ПАССИВНОГО ИММУНИТЕТА ЛИСТА СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBES NIGRUM L.*) В СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ

**А.Г. ЧЕРНЕЦКАЯ, Т.В. КАЛЕНЧУК**

Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь, [chrysanthemum@list.ru](mailto:chrysanthemum@list.ru)

**Введение.** Проблема иммунитета растений к инфекционным заболеваниям является фитопатологической проблемой, так как ее задачей является устранение массовых заболеваний растений – эпифитотий. Изучение иммунитета проводится в различных направлениях – агротехническом, биохимическом, физиологическом, генетическом, селекционном.

В настоящее время накоплены многочисленные экспериментальные данные, характеризующие защитные реакции растений при различных заболеваниях. Попытки отдельных исследователей обобщить полученные результаты и на этой основе создать общую теорию иммунитета растений ещё не увенчались успехом. Это объясняется многообразием паразитарных организмов и растений, характеризующихся на разных этапах развития инфекции разнообразными механизмами взаимоотношений.

Выделяют типы (категории) иммунитета. Категорий врожденного (естественного) иммунитета две: пассивный – иммунитет, связанный с конституционными свойствами растений; активный – иммунитет, индуцированный патогенами [1].

Огромное число патогенов не способно преодолеть механизмы пассивного иммунитета, обусловленные анатомо–морфологическими особенностями растений. К факторам, повышающим устойчивость к заболеваниям, относятся: общий габитус растения, структура поверхности, строение покровных тканей, ритм работы устьиц, анатомические особенности растений.

К структурным элементам поверхности, которые играют существенную роль в защите от инфицирования растений, относятся:

- ✓ особенности воска и кутикулы, покрывающие эпидермальные клетки;
- ✓ структура стенок эпидермальных клеток;
- ✓ форма, ритм работы и количество устьиц и чечевичек.

В структурно–функциональном взаимодействии патогенных грибов с растениями можно выделить два последовательных этапа. На первом этапе грибы проникают в ткани растений и распознают клетки хозяина, на втором – устанавливают с ним паразитические отношения и поддерживают их [4].

Сравнение этих этапов позволило выявить значительное структурное и функциональное сходство, особенно в период прохождения биотрофными грибными патогенами первого этапа взаимодействия. У грибов это сходство проявляется на стадии дифференциации инфекционных структур (аппрессория, инфекционного выроста и инфекционного пузырька).

При мучнисторосяной инфекции проникновение гриба *Sphaerotheca mors–uvae* в клетку хозяина осуществляется непосредственно через наружную стенку эпидермальных клеток растений. При этом гаустории формируются только в эпидермальном слое растения. Ключевым моментом в онтогенезе является образование инфекционного пузырька, который у возбудителя мучнистой росы дифференцируется в гаусторий, обеспечивающий ему биотрофный способ питания в эпидермальной клетке.

Инфекционный пузырек эктофитного биотрофа *Sphaerotheca mors–uvae* локализуется в эпидермальной клетке хозяина – смородине, затем трансформируется в гаусторий – структурное образование, с помощью которого гриб использует растение не только в качестве среды обитания, но и как источник питания, посредством которого он регулирует свои отношения с этой внешней (растительной) средой. Процесс формирования гаусториев связан с изменением функции инфекционного пузырька.

У *Sphaerotheca mors–uvae* он включает прямую трансформацию кончика аппрессориального выроста в гаусторий. Конидии прорастают на поверхности эпидермиса вначале очень короткой ростковой трубкой (1–5 мкм), а через несколько часов – более длинной, вторичной трубкой, которая спустя 10–15 ч формирует аппрессорий.

Инфекционные выросты проникают прямо в эпидермальную стенку либо в устьичную щель, затем расширяются в небольшой грушевидный инфекционный пузырек, а затем приобретает лопастную форму с характерными пальцевидными выростами, которые никогда не выходят за пределы экстрагаусторального матрикса и экстрагаусторальной мембраны. Функциональное назначение инфекционного пузырька состоит в том, чтобы установить постоянные стабильные связи с растением–хозяином и сохранить его клетки живыми в течение всего онтогенеза. Поэтому отношения между партнерами данной фитопатосистемы носят обязательный (облигатный) характер. Образования инфекционного гаусторального пузырька в клетке эпидермиса вполне достаточно, чтобы длительное время поддерживать в состоянии равновесия паразитические отношения между организмами в системе смородина–возбудитель мучнистой росы [3,5].

**Методика и объекты исследования.** Лабораторные исследования проводились на базе лаборатории кафедры биологии УО «Полесский государственный университет», использовался сортовой материал отдела ягодных культур Республиканского научно–производственного дочернего унитарного предприятия «Институт плодородства» (поселок Самохваловичи Минской области). Полевые исследования по определению развития мучнистой росы проведены на участке отдела ягодных культур Республиканского научно–производственного дочернего унитарного предприятия «Институт плодородства». Экспериментальный участок расположен в центральной части Беларуси, на расстоянии 17 километров от г. Минска. Рельеф холмисто–равнинный. Почва опытного участка – дерново–подзолистая, развитая на мощном лессовидном суглинке. Агротехнические мероприятия соблюдались в соответствии с общепринятыми методиками и указаниями. По почвенно–климатическим условиям участок находится в Центральной производственно–садоводческой зоне. Метеорологические условия района проведения исследования благоприятны для роста и развития смородины черной. В связи с повышенным количеством осадков в первой декаде июля (107,5 мм) и последней декаде августа (67,8 мм) 2012 год был эпифитотийным. В целом климат Республики Беларусь способствует распространению и развитию возбудителя мучнистой росы.

Изучались образцы смородины черной с различной степенью устойчивости к мучнистой росе. Исследования проводились на 7 сортах белорусской селекции: Памяти Вавилова – ранее считался иммунным, в данное время относительно устойчивый к возбудителю мучнистой росы; Церера – относительно устойчивый; Купалинка, Катюша, Клуссоновская, Волшебница – среднепоражаемые. Сорт Минай Шмырев (контроль) взят как сильнопоражаемый возбудителем мучнистой росы.

Исследования включали изучение анатомо–морфологического строения листьев смородины черной. Листья брались от верхушечной почки до 6–10 листа (именно они подвергаются заражению), срезы проводились в середине полупластинки листа в 20–кратной повторности на естественном инфекционном фоне. Для анатомических исследований использовались «Методы анатомо–гистохимических исследований растительных тканей» (1979) и «Анатомические методы исследований культурных растений: методические указания ВАСХНИЛ, ВНИИ растений им. Н.И. Вавилова» (1989). Для микроскопического исследования строения листьев смородины черной использовался бинокулярный микроскоп Миксмед. Измерения отдельных элементов анатомического строения листа проводились при увеличении 40 x 0,65, подсчет количества эпидермальных клеток и устьиц – при увеличении 9 x 0,20. При анатомо–морфологическом исследовании листа смородины черной учитывалось 20 параметров.

Оценка сортов на устойчивость к американской мучнистой росе проводилась на естественном инфекционном фоне по методике ВИР (1972 г.) по каждому сорту учитывалось в среднем 16 кустов. Развитие болезни и средний балл поражения вычисляли по общепринятым в фитопатологии формулам.

Полученный в результате полевых и лабораторных исследований материал обрабатывали с помощью методов математической статистики. Обработку экспериментальных данных осуществляли по стандартным статистическим программам Excel. Для каждого вариационного ряда вычисляли стандартные статистические показатели: среднее арифметическое ( $\bar{X}$ ), его ошибку ( $S_x$ ), стандартное отклонение ( $\sigma$ ), коэффициент вариации ( $V$ ). Для установления достоверности различий между сравниваемыми одноименными признаками использовался  $t$ –критерий Стьюдента. Для выявления связи устойчивости растений смородины черной к мучнистой росе с признаками морфо–анатомической структуры листа был проведен однофакторный дисперсионный анализ. Для оценки значимости различий между средними значениями возрастных групп по каждому из признаков использовали  $F$ –критерий (критерий Фишера). Чтобы выявить признаки, максимально связанные с устойчивостью к мучнистой росе, проводили корреляционный анализ. Количественные взаимосвязи между болезнестойкостью и анатомическими признаками описывали с помощью регрес-

сионных моделей. Для построения регрессионных моделей использовали метод наименьших квадратов.

**Результаты и их обсуждение.** Для изучения влияния значений морфо–анатомических признаков листа на устойчивость к мучнистой росе был проведен однофакторный дисперсионный анализ. Группирующей (независимой) переменной была степень устойчивости растений смородины черной к американской мучнистой росе. Изученные образцы смородины черной были разделены на три группы в зависимости от степени их устойчивости: относительно устойчивые (Церера, Памяти Вавилова) – 1 группа, среднепоражаемые и слабопоражаемые (Купалинка, Катюша, Клуссоновская, Волшебница) – 2 группа, сильнопоражаемый (Минай Шмырев) – 3 группа.

Зависимыми переменными были признаки морфо–анатомической структуры листа смородины черной, которые можно использовать в качестве диагностических на устойчивость к мучнистой росе, то есть с незначительной и средней степенью изменчивости.

По результатам исследований такими признаками являются: длина и ширина замыкающих клеток устьиц нижнего эпидермиса, коэффициент полисадности, число основных клеток и устьиц нижнего эпидермиса на единицу площади, высота клеток (толщина) верхнего и нижнего эпидермиса, толщина столбчатого и губчатого мезофилла.

Не рассматривались у образцов смородины черной признаки со значительным коэффициентом вариации: количество трихом на единицу площади и их длина, глубина извилин оболочек эпидермальных клеток, ширина проводящих пучков.

Изучение отношения того или иного признака к болезнеустойчивости осуществлялось в трех возрастных стадиях растений смородины черной: одного года, четырех лет, восьми лет. В ходе анализа была изучена связь устойчивости растений смородины черной к мучнистой росе с 16 признаками морфо–анатомической структуры листа в трех возрастных фазах (48 зависимых переменных по каждому сорту).

Достаточно постоянными показателями листа смородины черной во все возрастные периоды являются: площадь эпидермальных клеток, длина и ширина замыкающих клеток устьиц, ширина устьичной щели, толщина верхнего эпидермиса.

Далее были проведены апостериорные сравнения средних для того, чтобы оценить значимость различий между средними конкретных групп.

Таким образом, определились 4 показателя, средние значения которых, во–первых, в относительно устойчивой и среднепоражаемой группах значимо отличаются друг от друга; во–вторых, среднепоражаемая группа занимает или промежуточное положение между двумя другими, или недостоверно отличается от одной из них.

Толщина нижнего эпидермиса у относительно устойчивых образцов достоверно больше, чем у среднепоражаемых и сильнопоражаемых, и в среднем составляет 1,09 мкм. Толщина нижнего эпидермиса у среднепоражаемых 0,89 мкм, у сильнопоражаемых 0,61 мкм.

Длина и ширина замыкающих клеток устьиц на нижнем эпидермисе иммунной группы (1,84 мкм и 0,42 мкм соответственно) также значимо превышает длину и ширину замыкающих клеток устьиц у среднепоражаемых – 2,20 мкм и 0,52 мкм, у сильнопоражаемых – 2,42 мкм и 0,61 мкм.

Таким образом, устойчивость растений смородины черной к мучнистой росе связана с морфо–анатомической структурой листа.

К признакам, влияющим на устойчивость, по результатам однофакторного дисперсионного анализа, относятся: толщина нижнего эпидермиса и размеры устьиц.

Выявлено, что относительно устойчивые образцы обладают большей толщиной клеток нижнего эпидермиса. Размеры устьиц и устьичной щели на нижнем эпидермисе у сильнопоражаемых образцов больше, чем у устойчивых [2].

Влияние морфо–анатомической структуры листа смородины черной на устойчивость растений к мучнистой росе выявлено, главным образом, у однолетних растений.

Однако связь устойчивости с некоторыми морфо–анатомическими признаками строения листа смородины черной определяется и в более позднем возрасте, в том числе у сортообразцов четырехлетнего возраста.

Для установления зависимости устойчивости к американской мучнистой росе от особенностей анатомической структуры листа был проведен корреляционный анализ. Была изучена связь между устойчивостью смородины черной к мучнистой росе и всеми изученными морфо–анатомическими признаками листа смородины черной.

Установлено, что, начиная с растений однолетнего возраста до растений восьми лет, начинает выделяться группа признаков, коррелирующих с устойчивостью к мучнистой росе: толщина ниж-

него эпидермиса (у однолетних растений коэффициент корреляции равен  $-0,94$ ; у четырехлетних  $-0,97$ ; у восьмилетних  $-0,98$ ) и размеры устьиц (длина и ширина замыкающих клеток устьиц, ширина устьичной щели) (у однолетних растений коэффициенты корреляции соответственно равны  $0,96$ ,  $0,92$  и  $0,95$ ; у четырехлетних  $-0,91$ ,  $0,88$  и  $0,90$ ; у восьмилетних  $-0,96$ ,  $0,97$  и  $0,98$ ). Мы отмечаем также, что связь между толщиной нижнего эпидермиса, с одной стороны, и развитием болезни, с другой, носит отрицательный характер (обратную корреляцию). А связь между размерами устьиц и развитием болезни – положительна (прямая корреляция) [2].

Таким образом, корреляционный анализ подтверждает наличие связи между устойчивостью растений смородины черной к мучнистой росе и морфо–анатомической структурой листа. В ходе корреляционного анализа выявлена линейная отрицательная зависимость между развитием болезни и толщиной клеток нижнего эпидермиса и линейная положительная зависимость между развитием болезни и размерами устьиц (длиной и шириной) и шириной устьичной щели на нижнем эпидермисе.

На основании проведенных исследований разработан метод диагностики сортов смородины черной на устойчивость к мучнистой росе.

Метод позволяет определить устойчивость того или иного сорта за один вегетационный период в полевых условиях при отсутствии возбудителя болезни и условий, необходимых для искусственного заражения.

Метод основан на использовании некоторых анатомических структур листа в качестве диагностических признаков при оценке на устойчивость к мучнистой росе (таблица).

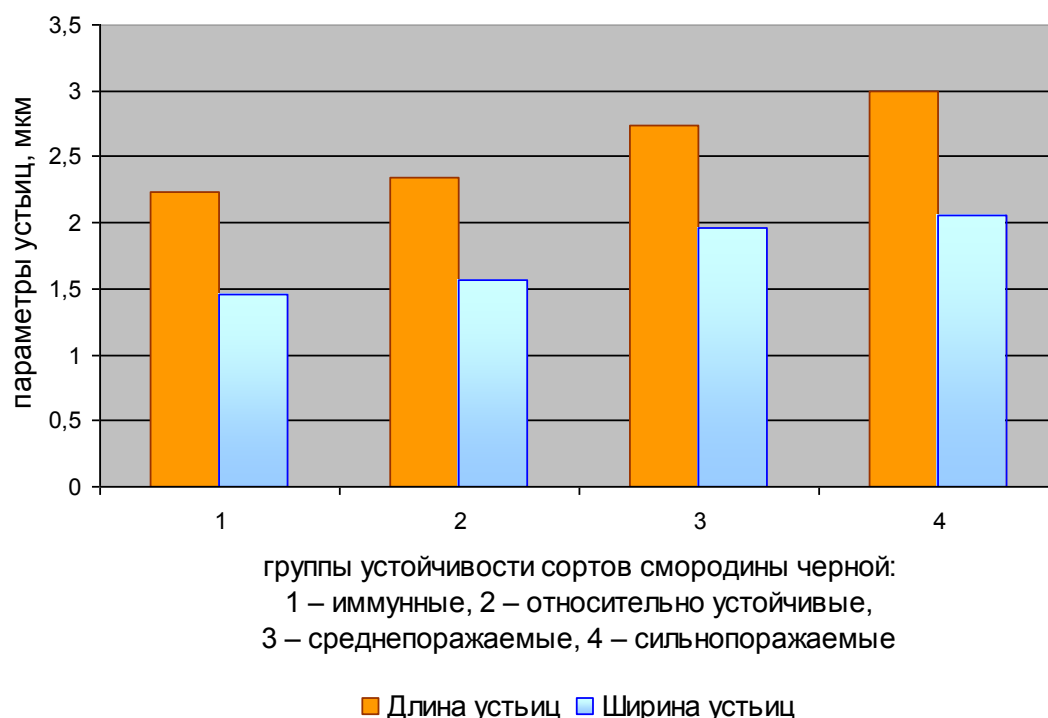
К группе относительно устойчивых к мучнистой росе (развитие болезни до 10%) относятся сорта смородины черной с длиной устьиц на нижнем эпидермисе ниже  $2,34$  мкм, шириной ниже  $1,56$  мкм, толщиной нижнего эпидермиса более  $0,89$  мкм.

К среднепоражаемой группе устойчивости (развитие болезни до 50%) относятся сорта смородины черной с длиной устьиц на нижнем эпидермисе в пределах от  $2,35$  до  $2,74$  мкм, шириной в пределах от  $1,56$  до  $1,96$  мкм, толщиной нижнего эпидермиса в пределах от  $0,48$  до  $0,88$  мкм.

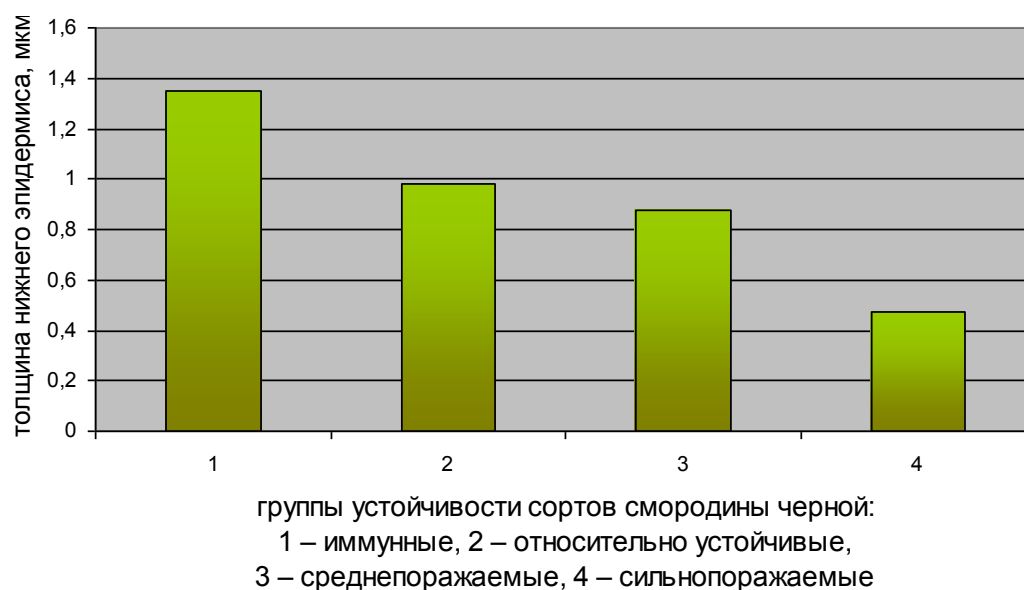
К сильнопоражаемой группе устойчивости (развитие болезни более 50%) относятся сорта смородины черной с длиной устьиц на нижнем эпидермисе больше  $2,75$  мкм, шириной больше  $1,97$  мкм, толщиной нижнего эпидермиса менее  $0,47$  мкм.

Таблица – Параметры листа смородины черной как диагностические признаки устойчивости к мучнистой росе

Параметры устьиц нижнего эпидермиса листа, мкм		Толщина нижнего эпидермиса листа, мкм	Группа устойчивости
Длина устьиц, мкм	Ширина устьиц, мкм		
1,50 – 2,24	1,20 – 1,46	0,99 – 1,35	Иммунные (предположительно)
2,25 – 2,34	1,47 – 1,56	0,89 – 0,98	Относительно устойчивые
2,35 – 2,74	1,57 – 1,96	0,48 – 0,88	Среднепоражаемые
2,75 – 3,00	1,97 – 2,05	0,23 – 0,47	Сильнопоражаемые



**Рисунок 1 – Шкала параметров устьиц листа смородины черной как диагностических признаков устойчивости к мучнистой росе**



**Рисунок 2 – Шкала параметров толщины нижнего эпидермиса листа смородины черной как диагностического признака устойчивости к мучнистой росе**

Параметры количественно–анатомических признаков, обеспечивающие устойчивость к проникновению возбудителя: длина замыкающих клеток устьиц 2,24 мкм и меньше, ширина – 1,46 мкм и меньше на нижнем эпидермисе (рисунок 1). Для селекции на устойчивость к мучнистой росе рекомендуем использовать образцы с толщиной нижнего эпидермиса 0,99 мкм и выше (рисунок 2).

**Выводы.** Селекционные учреждения могут учитывать следующее:

1. Параметры количественно–анатомических признаков листа смородины черной, обеспечивающие устойчивость к проникновению возбудителя мучнистой росы: длина замыкающих кле-

ток устьиц 2,24 мкм и меньше, ширина – 1,46 мкм и меньше на нижнем эпидермисе. Для селекции на устойчивость к мучнистой росе рекомендуем использовать образцы с толщиной нижнего эпидермиса 0,99 мкм и выше.

2. Для оценки селекционного материала смородины черной на устойчивость к мучнистой росе рекомендуется использовать разработанный анатомический метод диагностики определения устойчивости растений смородины черной к американской мучнистой росе наряду с другими селекционными методами.

3. Результаты исследований также можно использовать при разработке методических указаний и учебных пособий в учреждениях образования, ведущих подготовку специалистов по сельскохозяйственным и биологическим специальностям и специализациям.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Деверол, Б.Д. Защитные механизмы растений / Б.Д.Деверол. – Москва: Колос, 1980. – 128 с.
2. Чернецкая, А.Г. Метод ранней диагностики сортов черной смородины на устойчивость к мучнистой росе: методические рекомендации / А.Г.Чернецкая. – Мозырь: Изд-во УО МГПУ, 2005. – 22 с.
3. Яковлева, Р.С. Биологические особенности и специализация мучнистой росы на смородине / Р.С. Яковлева // Научные труды ВНИИ садоводства им. И.В.Мичурина – Мичуринск, 1973. – Вып. 18. – С. 308–309.
4. Bonfig, G. Mogliche Wechselwirkungen zwischen Schadorganismenarten in Weizenanbausystemen / G.Bonfig // Mitting Biological Bundesanstalt Land – Forstwirtschaft. – Berlin, 2011. – № 203. – P. 65–66.
5. Dorfelt, H. Die Welt der Pilze / H. Dorfelt; H.Gorner. – Leipzig, 1989. – S. 106.

### THE INCLUSION OF PASSIVE IMMUNITY SHEET BLACK CURRANT (*RIBES NIGRUM L.*) IN BREEDING FOR RESISTANCE TO POWDERY MILDEW

*A.G. CHERNECKAYA, T.V. KALENCHUK*

#### *Summary*

For the first time in the conditions of Belarus anatomical specialities of blackcurrant leaf of belarussian selection were studied in connection to resistance to powdery mildew in dynamics of three age groups of plants according to 20 anatomical signs. The connection between anatomical specialities of blackcurrant leaf structure and resistance to powdery mildew was investigated and analysed, anatomical criterions of blackcurrant resistance to agent of powdery mildew were shown with help of different variants of statistic processing. Anatomical method of diagnostics of resistance to powdery mildew of blackcurrant sorts, based on the dependence of development of disease from the sizes of stoma in low epidermis and low epidermis thickness of blackcurrant leaf was developed for the first time in the world practice.

**Key words:** American powdery mildew (*Sphaerotheca mors uvae (Schw) Berk, et Gurt*), blackcurrant (*Ribes nigrum L.*), morpho-anatomical leaf structure, epidermis, stoma, variability of leaf characters, correlation, resistance criterions, selection, diagnostics.

© Чернецкая А.Г., Каленчук Т.В.

*Поступила в редакцию 14 октября 2014г.*