

## ВЛИЯНИЕ ЗАТЕНЕНИЯ И ОБРЕЗАНИЯ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА НА РАЗВИТИЕ КЛЕВЕРНОЙ НЕМАТОДЫ

Изучение взаимоотношений между фитопаразитическими нематодами и их растениями-хозяевами помогает решить вопросы вирулентности паразитов и восприимчивости растений к ним. Наряду с изучением генетически детерминированных восприимчивости и устойчивости представляет интерес также исследование роли физиологического состояния растения-хозяина в определении его восприимчивости к паразитарным заболеваниям. Среди многих экспериментальных воздействий затенение и обрезание надземной части растений оказались хорошими методическими приемами для регулирования метаболической активности корней (Рийспере, 1979). Кроме метаболической активности от обеспеченности ассимилятами зависят также биохимический состав и анатомическое строение корней. С точки зрения питания нематод обеспеченность питающей ткани ассимилятами имеет существенное значение. Углеводы необходимы в качестве субстрата для синтетических процессов и поддержания энергетического уровня в питающей ткани. Не менее важной является их роль в поддержании восстановительного потенциала в клетках инвазированной ткани и в обеспечении физиологического гомеостаза, от чего зависит питание биотрофного паразита (Бумбу, 1970; Мюге, 1971). Влияние обеспеченности изолированных корней углеводами, а также декапитации растений и регулирования светового режима изучено на разных наиболее распространенных видах паразитических фитонематод (картофельная, свекловичная и галловая нематоды, проникающий пратиленх) (Kämpfe, Kerstan, 1964; Mac Donald, 1966; Mc Clure, Viglierchio, 1966; Kerstan, 1969; Trudgill, 1967; Johnson, Viglierchio, 1969). Выяснилось, что изученные виды нематод характеризуются различной потребностью в обеспечении питательной ткани углеводами (ассимилятами), что, в свою очередь, характеризует зависимость питания от синтеза необходимых компонентов хозяином. Цель настоящей работы — выяснение роли физиологического состояния растений различных видов и сортов клевера и метаболической активности их корней в восприимчивости к клеверной нематодe (*Heterodera trifolii*), а также изучение зависимости развития этого паразита от содержания углеводов в питающей ткани.

### Методика

Опыты проводили в вегетационном домике на песчаных культурах. В качестве питательного раствора использовали смесь Роббинса в 0,5%-ной концентрации (Robbins, 1946). Растениями-хозяевами служили высоковосприимчивый сорт белого клевера 'Йыгева 4', слабовосприимчивые сорта 'Н. 3' и 'Киви' и устойчивый к клеверной нематодe гибридный 'Йыгева 2'. Растения двухнедельного возраста были обработаны суспензией инвазионных личинок, вылупившихся из цист, в 0,03 мМ флавиановой кислоте (инвазионная нагрузка — 300 личинок

на одно растение). После заражения растений в зависимости от варианта опыта подвергали следующим обработкам: 1) затенение двумя слоями белой капроновой сети (освещенность растений — 50% полной освещенности), 2) затенение двумя слоями черной капроновой сети (освещенность растений — 20% полной освещенности), 3) обрезание надземной части один раз и 4) обрезание надземной части два раза в течение опыта. После трехнедельного выращивания зараженные растения вымывали из песка, взвешивали, корни фиксировали в смеси этанол—уксусная кислота—формалин—вода (15:1:6:40) и окрашивали в 0,05%-ном растворе кислого фуксина в лактофеноле для выявления инвазированных нематод. В каждом варианте опыт проведен на десяти растениях; отдельно проанализированы и подсчитаны все инвазированные нематоды по стадиям развития. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа.

Для определения характера изменений, вызываемых в растениях применяемыми обработками, параллельно с зараженными растениями выращивали незараженные. В качестве показателей физиологического состояния растений и метаболической активности корней служили величина адсорбирующей поверхности корней и содержание растворимых сахаров и белков в них. Кроме того, в корнях определяли активность пероксидазы как «аварийного энзима», указывающего на стрессовое состояние тканей (Рубин, Ладыгина, 1974), и ее изозимный состав. Адсорбирующую поверхность корневых систем определяли с помощью метиленового синего по методу Сабинина и Колосова, содержание растворимых сахаров и белков устанавливали в замороженных в жидком азоте корнях. Концентрацию сахаров измеряли в спиртовой вытяжке колориметрически по реакции с антроном. Белки экстрагировали в боратном буфере при pH 10, после осаждения 5%-ной трихлоруксусной кислотой их содержание определяли колориметрически по методу Лоури. Определение активности пероксидазы проводили в свежих корнях. Энзим экстрагировали в ацетатном буфере при pH 6,6, активность определяли колориметрически по скорости окисления гваякола в присутствии  $H_2O_2$  (Яска, 1971). Гельэлектрофорез белков для определения изоэнзимного состава пероксидазы проводили по методу Дэвиса (Davis, 1964) с использованием только мелкопористого геля. Субстратом для выявления пероксидазной активности отдельных фракций служил бензидин.

### Результаты опытов и их обсуждение

Как показывают данные табл. 1, сильное затенение и двукратное обрезание надземной части растений улучшали условия обитания нематод в корнях. В корнях высоковосприимчивого белого клевера 'Йыгева 4' число нематод увеличилось и их развитие ускорило, что указывает на улучшение условий питания этого паразита. В корнях слабовосприимчивых сортов 'Н. З.' и 'Киви' также увеличилось число выживших нематод и среди них число более развитых особей, хотя общая зараженность оказалась значительно ниже по сравнению с зараженностью высоковосприимчивого 'Йыгева 4'. В устойчивом гибридном клевере, несмотря на увеличение общего числа нематод в корнях, адульных особей не образовалось. На основе этого можно заключить, что генетически детерминированная устойчивость гибридного клевера не связана с физиологическим состоянием растений.

Анализ незараженных растений показал, что в результате затенения и обрезания общая и рабочая адсорбирующая поверхность корневых систем уменьшилась и содержание растворимых сахаров и белков в корнях понизилось (табл. 2), что свидетельствует о понижении мета-

Влияние затенения и обрезания растений на развитие клеверной нематоды

Вариант опыта	Количество нематод в 10 растениях					Процент от общего количества			
	Личинки			Молодые самки	Всего	Личинки			Молодые самки
	II стадия	III стадия	IV стадия			II стадия	III стадия	IV стадия	
'Иыгева 4'									
Контроль	357	666	660	47	1730	20,6	38,5	38,1	2,7
Слабое затенение	437	544	748	46	1775	24,6	30,6	42,1	2,6
Сильное затенение	314	672	1225*	124*	2335	13,4	28,8	52,4	5,3
Обрезание 1 раз	386	446	503	26	1361	28,4	32,8	36,9	1,9
Обрезание 2 раза	371	757	1012*	55	2193	16,9	34,5	46,1	2,5
'Иыгева 2'									
Контроль	222	373	137	13	745	29,8	50,0	18,4	1,7
Слабое затенение	435	314	115	—	864	50,3	36,3	13,3	—
Сильное затенение	393	602	287*	8	1290	30,4	46,7	22,2	0,6
Обрезание 1 раз	248	339	103	—	690	35,9	49,1	14,9	—
Обрезание 2 раза	276	492	566*	4	1338	20,6	36,7	42,3	0,3
'Н. 3.'									
Контроль	105	204	96	5	410	25,6	49,7	23,4	1,2
Слабое затенение	108	236	258	27*	629	17,2	37,5	41,0	4,3
Сильное затенение	151	314	323*	15*	803	18,8	39,1	40,2	1,9
Обрезание 1 раз	110	183	161	45*	499	22,0	36,8	32,2	9,0
Обрезание 2 раза	120	196	189*	9	514	23,3	38,1	36,7	1,8
'Киви'									
Контроль	182	260	224	34	700	26,0	37,1	32,0	4,8
Слабое затенение	232	250	400	18	900	25,8	27,8	44,4	2,0
Сильное затенение	136	208	421	51	816	16,7	25,5	51,6	6,2
Обрезание 1 раз	206	305	357	28	896	22,9	34,0	39,8	3,1
Обрезание 2 раза	153	290	387	73	903	16,9	32,1	42,8	8,1

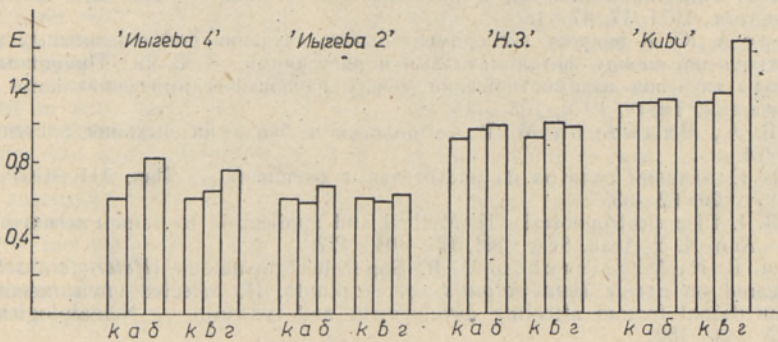
\* Различия статистически достоверно на 5%-ном уровне значимости по критерию Фишера.

большинства корней. Наибольшее подавляющее действие имело сильное затенение растений (до 20% полной освещенности). В корнях клевера 'Иыгева 4' под влиянием затенения и обрезания растений повысилась активность пероксидазы, что также указывает на замедление синтеза и на накопление интермедиатов в тканях (Рубин, Ладыгина, 1974). У других подопытных сортов эта закономерность проявилась менее заметно (рисунок). Разделение энзимного белка путем гелеэлектрофореза показало, что затенение и обрезание растений не влияли на изозимный состав пероксидазы.

Таким образом, наши данные подтверждают, что, кроме генетически определяемой совместимости или несовместимости с данным паразитом, растения обладают неспецифической физиологической устойчивостью, ограничивающей действие паразита. Подавление метаболической активности в питающей ткани позволяет паразиту развиваться более успешно. Улучшение условий питания нематод при низком уровне метаболизма, по всей вероятности, состоит в доступности пищи. Изве-

Влияние затенения и обрезания растений клеверов  
на адсорбирующую поверхность корней и содержание в них  
растворимых сахаров и белков

Вариант опыта	Адсорбирующая поверхность корней одного растения, см <sup>2</sup>		Содержание растворимых сахаров, мг/г	Содержание растворимого белка, мг/г
	общая	рабочая		
'Иыгева 4'				
Контроль	516	220	10,38	3,16
Слабое затенение	308	103	9,60	1,95
Сильное затенение	174	61	3,25	1,78
Обрезание 1 раз	303	142	6,30	2,49
Обрезание 2 раза	351	127	3,98	1,71
'Иыгева 2'				
Контроль	320	105	11,38	2,25
Слабое затенение	286	120	7,55	2,33
Сильное затенение	193	90	4,35	1,00
Обрезание 1 раз	259	122	5,00	1,82
Обрезание 2 раза	240	100	3,25	1,74
'Н. 3.'				
Контроль	498	212	6,40	1,20
Слабое затенение	359	134	4,75	1,09
Сильное затенение	244	95	3,05	0,69
Обрезание 1 раз	330	122	6,20	0,95
Обрезание 2 раза	244	93	1,80	0,86
'Киви'				
Контроль	554	184	5,50	1,25
Слабое затенение	693	292	4,65	0,97
Сильное затенение	271	103	3,04	0,78
Обрезание 1 раз	513	234	3,80	1,03
Обрезание 2 раза	359	134	2,00	0,98



Влияние обрезания надземной части и затенения растений клевера на активность пероксидазы в корнях, выраженной изменением оптической плотности реакционной смеси в течение 3 мин. К — контроль, а — обрезание 2 раза, б — обрезание 1 раз, в — слабое затенение, г — сильное затенение; E — оптическая плотность.

стно, что при низкой интенсивности процессов синтеза в клетках накапливаются метаболиты и интермедиаты, которые при высокой интенсивности почти отсутствуют. Кроме того, при низком уровне мета-

близма ослабляется конформационное состояние белковых глобул, что делает их более доступными лизирующему действию экзоэнзимов нематод. При ослабленном функциональном состоянии растений в тканях подавлена и реакция на раздражающее действие паразита, выражающаяся в активизации метаболизма в инвазированной и в прилегающих клетках и ограничивающая распределение действия экзоэнзимов.

Представляет интерес, что развитие нематод в наших опытах не зависит от содержания в тканях корней растворимых сахаров. Из этого можно заключить, что доступность углеводов не имеет в питании клеверной нематоды первостепенного значения.

Для сельскохозяйственной практики на основе полученных данных можно сделать вывод, что в полевых условиях на культурных пастбищах, зараженных клеверной нематодой, частые укосы и интенсивное использование их повышают поражаемость клевера и содействуют размножению нематод.

### Заключение

Результаты опытов показывают, что условия питания клеверной нематоды улучшаются при низком уровне метаболизма в тканях растения-хозяина. Это говорит о значительной роли физиологического состояния растений в ограничении инвазии и поражающего действия паразита, особенно в восприимчивых растениях. Видовая устойчивость гибридного клевера не связана с физиологическим состоянием растений, понижение метаболической активности в корнях не вызывает потери устойчивости. Слабая восприимчивость сортов белого клевера 'Н. З.' и 'Киви' также объясняется не только физиологической устойчивостью растений, но и, как и видовая устойчивость, структурными свойствами питающей ткани.

### ЛИТЕРАТУРА

- Бумбу И. В. Дегидрогеназная активность растительных тканей, пораженных фитогельминтозами. — В кн.: Паразиты животных и растений, 5. Кишинев, 1970, 130—132.
- Мюге С. Г. Адаптация нематод к питанию в растениях. — Тр. Всес. ин-та гельминтол., 1971, 17, 47—48.
- Рийспере А. Ю. К вопросу экспериментального изучения постинвазионных взаимоотношений между фитонематодами и растениями. — В кн.: Принципы и методы изучения взаимоотношений между паразитическими нематодами и растениями. Тарту, 1979, 105—115.
- Рубин Б. А., Ладыгина М. Е. Физиология и биохимия дыхания растений. М., 1974.
- Яаска В. О влиянии гуматов на растительные оксидазы. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1971, 20, 62—65.
- Davis, B. I. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404—427.
- Johnson, R. N., Viglierchio, D. R. Sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*) reared on axenic *Beta vulgaris* root explants. II. Selected environmental and nutritional factors affecting development and sex-ratio. — Nematologica, 1969, 15, 144—152.
- Kerstan, U. Die Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses in der Gattung *Heterodera*. II. Minimallebensraum-selektive Absterberate der Geschlechter — Geschlechterverhältnis (*Heterodera schachtii*). — Nematologica, 1969, 15, 210—228.
- Kämpfe, L., Kerstan, U. Die Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses in der Gattung *Heterodera* Schmidt. I. Einfluss des physiologischen Zustandes der Wirtspflanze auf *H. schachtii* Schmidt. — Nematologica, 1964, 10, 388—398.
- Mac Donald, D. H. Some relationships between the mineral nutrition of the host and the buildup of *Pratylenchus penetrans*. — Dissertation Abstracts, 1966, 26, 6286—6287.
- Mc Clure, M. A., Viglierchio, D. R. The influence of host nutrition and intensity of infection on the sex ratio and development of *Meloidogyne incognita* in

sterile agar cultures of excised cucumber roots. — *Nematologica*, 1966, 12, 248—258.

Robbins, W. R. Growing plants in sand cultures for experimental work. — *Soil Sci.*, 1946, 62, 3—22.

Trudgill, D. L. The effect of environment on sex determination in *Heterodera rostochiensis*. — *Nematologica*, 1967, 13, 263—272.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
20/XII 1981

Ene ROOSMA

### TAIMEDE VARJUTAMISE JA MAAPEALSETE OSADE KÄRPIMISE MÕJU RISTIKU-KIDUSSI ARENGULE

Artiklis on käsitletud ristiku-kiduussi (*Heterodera trifolii*) arengu sõltuvust peremees-taimede metaboolsest aktiivsusest, mida kirjeldatud katsetes reguleeriti taimede varjuta-mise ja assimilatsioonipinna vähendamise teel. Taimede füsioloogilise seisundi osa sel-gitamiseks nende nematoodiresistentsuse määramisel kasutati erineva vastuvõtlikkusega peremeestaimi: kõrge sustseptiilsusega valge ristiku sorti 'Jõgeva 4', madala sustseptiil-susega valge ristiku sorte 'N. Z.' ja 'Kivi' ning resistentset roosat ristikut 'Jõgeva 2'.

Katsetest selgus, et peremeestaimede ainevahetuse madal intensiivsus soodustas nema-toodi toitumist. Nematoodide arvukus ja arengu kiirus suurenesid ka kõrge sustseptiil-susega taimedes. Madala sustseptiilsusega ristikutest põhjustas taimede nõrgestamine samuti juurenakkuse suurenemist, kuid kõrgelt sustseptiilse sordiga võrreldes jäi see tunduvalt madalamaks. Resistentsse roosa hübriidristiku ainevahetuse intensiivsuse pidur-damine tõi kaasa mõningase paranemise nematoodi toitumises, kuid sellele vaatamata ei suutnud nad areneda adultideks, mis näitab selle resistentsusliigi sõltumatust taime füsioloogilisest seisundist.

Ene ROOSMA

### THE INFLUENCE OF SHADING AND PRUNING THE HOST PLANT ON THE DEVELOPMENT OF CLOVER CYST NEMATODE

Experiments with the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) were carried out in sand cultures with host plants of different susceptibility to clover cyst nematode: with the highly susceptible white clover variety 'Jõgeva 4', with the less susceptible white clover varieties 'N. Z.' and 'Kivi', and the resistant hybrid clover variety 'Jõgeva 2'. The results of the experiments indicated that the feeding conditions for nematodes had improved in both the shaded and the pruned host plants. In the highly susceptible variety of white clover, the intensity of infection and the rate of the development of nematodes had considerably increased. In the less susceptible host plants, the increase of the invasion of nematodes and the rate of development were lower than those in the highly susceptible host. In the roots of the resistant hybrid clover the number of nematodes also increased, but the invaded individuals did not develop to adult stage. The latter fact suggests the independence of such kind of resistance from the metabolic activity of the host. The results of biochemical tests indicate that the rate of the development of clover cyst nematode is inversely proportional to the sucrose content in the roots.