

УДК 57.084.1

## ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Н.В. ОСОКИНА, Е.А. КАЛАШНИКОВА, А.Н. КНЯЗЕВ, Н.П. КАРСУНКИНА

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

*В наши дни для борьбы с грибными болезнями, которые значительно снижают урожайность и качество сельскохозяйственной продукции значимых культур, широко применяют химические препараты. Альтернативным решением этой проблемы может стать применение регуляторов роста. В работе изучали грибы рода Fusarium: F. culmorum, F. sporotrichioides, F. oxysporum и F. avenaceum. В качестве регуляторов роста применяли препараты Черказ 1, Черказ 2, Иммуноцитопит, Оберегъ, арахидоновая кислота животного происхождения, а также на основе морских водорослей. Установлено, что препараты Иммуноцитопит (в концентрации 7,5 мл/л) и арахидоновая кислота на основе морских водорослей (в концентрации 1мл/л) оказывают ингибирующее действие на развитие поверхностного мицелия всех исследуемых патогенов. В вариантах совместного культивирования патогена и зерновок тритикале действие регуляторов роста усиливается.*

*Ключевые слова: регуляторы роста, арахидоновая кислота, тритикале, фузариоз, in vitro.*

Основной целью селекционных программ в настоящее время является повышение урожайности сельскохозяйственных культур, создание новых сортов и гибридов, обладающих улучшенными качествами продукта, комплексной устойчивостью к болезням, вредителям и стрессовым факторам среды.

Особую значимость урожайность сельскохозяйственных культур имеет в связи с ростом населения, который влечет за собой увеличение потребности в продуктах питания. Следовательно, необходимо искать способы его интенсивного производства.

Зерновые культуры вносят наибольший вклад в обеспечение населения земного шара продуктами питания. Среди этих культур особое место отводится амфидиплоиду тритикале, который совмещает ценные качества родительских форм — пшеницы и ржи. Тритикале привлекает к себе особое внимание в связи с тем, что по ряду таких важнейших показателей, как урожайность, питательная ценность продукта и др., эта культура способна во многих сельскохозяйственных районах мира превосходить обоих родителей. При этом по устойчивости к неблагоприятным почвенно-климатическим условиям и к наиболее опасным болезням, превосходя пшеницу, она не уступает ржи [11]. По содержанию белка зерно тритикале часто превосходит не только рожь, но и пшеницу, больше в ее зерне и лизина (на 16–20%) [2].

К другим достоинствам тритикале следует отнести ее высокую приспособляемость к различным типам почв. Растет она на всех почвах, в том числе на кислых

и переувлажненных. Растения тритикале устойчивы ко многим болезням, свойственным хлебам, но даже эта культура часто подвергается различным инфекциям, вредителям и т.д.

Увеличение площадей сельскохозяйственных культур и преобладание в посевах в основном одних и тех же сортов способствуют широкому распространению у растений болезней, в частности, вызываемых грибами. Это приводит к недобору урожая и снижению качества продукции. В связи с этим проблема устойчивости растений к заражению грибами является актуальной, в т. ч. в экономическом, медико-токсикологическом и экологическом аспектах [3].

Однако несмотря на это, до сих пор болезни зерновых культур, особенно тритикале, слабо изучены. Одной из самых распространенных и вредоносных болезней является фузариоз. Возбудители фузариоза — грибы рода *Fusarium*. Его проявление самое разнообразное: гниение семян в почве при прорастании, гниение прикорневой части стебля, заражение семян микотоксинами, пустоколосье, снижение технологических качеств зерна при хранении и элементов продуктивности растений [9].

Особый вред грибы наносят в годы с относительной влажностью воздуха более 70% и среднесуточной температурой 22–25°C во второй половине вегетации зерновых. Ущерб выражается как прямыми потерями (снижением выхода зерна), так и косвенными (снижением качества готовой продукции). Кроме того, пораженное зерно содержит микотоксины, которые при превышении определенных допустимых значений негативно влияют на здоровье человека и животных: понижают общий иммунитет, вызывают повреждения внутренних органов, приводят к отравлениям, гипермальным некрозам и др. [4, 6].

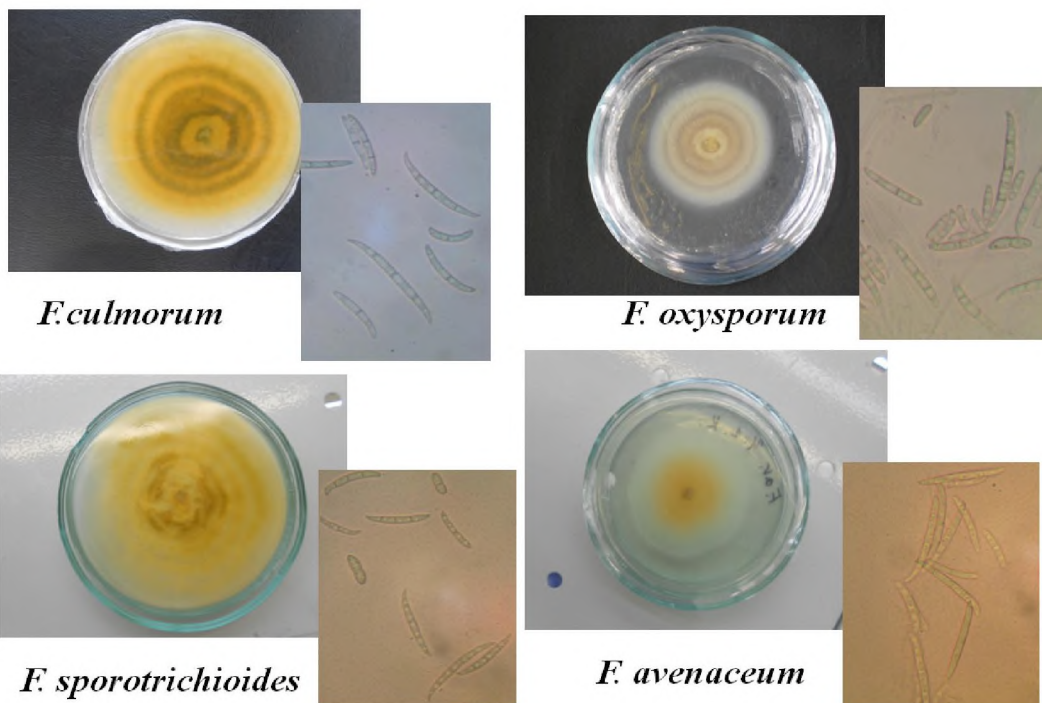
Для решения задач по устойчивости растений к болезням, часто используют химические средства, которые являются необходимыми до тех пор, пока не будут найдены безопасные альтернативные пути. Поэтому наиболее эффективной мерой борьбы с патогенами с экологической, практической и экономической точек зрения является использование регуляторов роста. По данным литературы, такие соединения в определенной концентрации влияют на устойчивость растений к патогенам, ответом на которые является повышение синтеза фенольных соединений в растении [8]. Для тритикале работы, связанные с применением регуляторов роста при борьбе с болезнями, отсутствуют.

## Материалы и методы

Объектом исследований были выбраны грибы рода *Fusarium*: *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichoides*, *F. oxysporum*, которые являются основными возбудителями фузариоза у растений тритикале [1] (рис. 1). Размножение чистой культуры патогенов проводили на безгормональной агаризованной питательной среде Мура-сига и Скуга в условиях световой комнаты, где поддерживалась температура 25°C, 16-часовой фотопериод, интенсивность света 3000 лк. Пассирование чистой культуры осуществляли при необходимости в установленные сроки.

На первом этапе проводился скрининг 6 различных регуляторов роста (в 5 разных концентрациях) по их воздействию на развитие грибов рода *Fusarium*.

В работе были исследованы различные регуляторы роста, отличающиеся по своему спектру действия: Черказ-1, Черказ-2, Иммуноцитифит, арахидоновая кислота животного происхождения, Оберегъ и арахидоновая кислота на основе морских водорослей. Исследуемые препараты испытывали в концентрациях 150 мг/л, 75 мг/л,



**Рис. 1.** Визуальная оценка разновидностей грибов рода *Fusarium*, культивируемых на питательной среде и при микроскопировании

30 мг/л, 15 мг/л либо в соответствующих, рекомендованных инструкцией, пропорциях действующего вещества. Растворы регуляторов роста подвергали холодной стерилизации путем пропускания их через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный стерильный раствор добавляли в заранее проавтоклавированную питательную среду. В экспериментах учитывали диаметр развития мицелия патогена на поверхности питательной среды, сформировавшегося на 7 и 14 сут. культивирования.

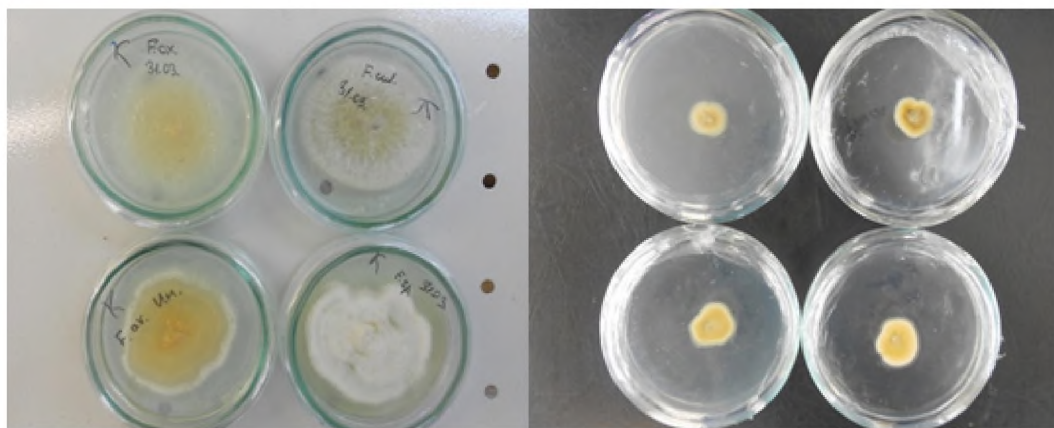
Стерилизацию питательных сред, посадочного материала и работу в асептических условиях проводили согласно методикам, разработанным на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева [5].

Во второй части эксперимента было изучено влияние регуляторов роста на развитие патогена в присутствии зерновки. Для исследований были выбраны следующие сортообразцы тритикале: Дублет, Укро, С95, различающиеся по своей восприимчивости к поражению фузариозом. Зерновки располагали по периметру чашки Петри, в центр которой помещали кусочек агара (0,5 × 0,5 см), содержащий  $10^8$  шт. конидий изучаемого патогена. На 7-е сут. оценивали биотметрические показатели проростков: длина корневой системы (см) и длина первого листа (см).

## Результаты исследований

Действие регуляторов роста, как и фитогормонов, довольно разнообразно. Одни повышают всхожесть и энергию прорастания семян или ускоряют пробуждение глазков и спящих почек на клубнях и луковицах, другие стимулируют рост корней и, соответственно, обеспечивают хорошее укоренение рассады и лучшую приживаемость саженцев, а при применении, например, гиббереллинов улучшается опыление цветков и уменьшается опадение завязей [7]. Существует и другая группа регуляторов роста, которая повышает иммунитет растений к действию абиотических и биотических факторов окружающей среды. К таким регуляторам роста относятся вещества, обладающие комплексным действием: бережно защищают растения от стрессов на всех этапах развития, повышают устойчивость к одному или нескольким заболеваниям, ускоряют созревание плодов и семян, увеличивают урожайность, улучшают внешний вид, качество продукции, а также ее хранение и лежкость [10]. Включение такого приема в технологию возделывания зерновых культур и, в частности, тритикале, позволит сохранить экологическое равновесие за счет применения пестицидов в меньших количествах и концентрациях.

Исследования показали, что регуляторы роста в различных концентрациях оказывают видоспецифическое влияние на развитие мицелия изучаемых грибов в условиях *in vitro*. Установлено, что во всех исследуемых вариантах только препарат Иммуноцитопит и арахидоновая кислота растительного происхождения оказывают стабильный ингибирующий эффект на развитие мицелия грибов. Во всех вариантах данные препараты в оптимальной концентрации (Иммуноцитопит — 7,5 мг/л, арахидоновая кислота на основе морских водорослей — 1 мг/л) уменьшают интенсивность развития мицелия в 1,5–2 раза относительно контроля, не зависимо от видовой принадлежности грибов рода *Fusarium* (рис. 2) (табл. 1).



**Рис. 2.** Влияние препарата Иммуноцитопит на развитие исследуемых грибов рода *Fusarium*: контрольный вариант (слева), препарат в концентрации 7,5 мг/л (справа)

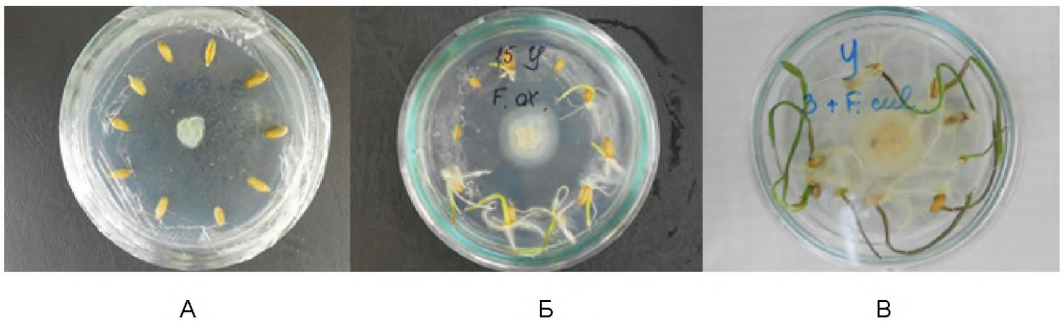
Таким образом, препараты Иммуноцитопит и арахидоновая кислота на основе морских водорослей были выбраны для проведения дальнейших исследований.

На втором этапе было изучено влияние препаратов на рост мицелия грибов рода *Fusarium* в присутствии зерновки (рис. 3).

**Влияние различных регуляторов роста на развитие мицелия (d, мм) грибов рода *Fusarium***

Препарат	<i>F. culmorum</i>		<i>F. avenaceum</i>		<i>F. sporotrichoides</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	контроль	опт. конц.	контроль	опт. конц.	контроль	опт. конц.	контроль	опт. конц.
Черказ-1	31,8 ± 1,6	31,4 ± 1,5	50,2 ± 2,5	42,2 ± 2,1	26,5 ± 1,3	19,7 ± 1	53,3 ± 2,7	30,8 ± 1,5
Черказ-2	30,3 ± 1,5	20,2 ± 1,1	45,5 ± 2,2	44,3 ± 2,2	24,3 ± 1,2	21,5 ± 1,1	50,9 ± 2,5	36,4 ± 1,8
Иммуноцитотифит	49,2 ± 2,5	29,5 ± 1,5	55,3 ± 2,7	28,4 ± 1,3	49,1 ± 2,5	20,3 ± 1,1	46,2 ± 2,2	26,6 ± 1,3
Арх. к. р.*	40,8 ± 2,0	18,2 ± 1,0	51,4 ± 2,6	37,1 ± 1,8	35,4 ± 1,8	18,3 ± 1	64,6 ± 3,2	30,5 ± 1,5
Арх. к. ж.*	32,8 ± 1,7	28,3 ± 1,4	52,8 ± 2,6	36,2 ± 1,8	35,3 ± 1,8	20,8 ± 1,1	65,6 ± 3,2	48,4 ± 2,3
Оберегъ	30,1 ± 1,4	23,1 ± 1,2	68,0 ± 3,4	68,3 ± 3,4	26,4 ± 1,3	27,4 ± 1,3	52,2 ± 2,6	42,9 ± 2,2

*Примечание.* Арх. к. р. — арахидоновая кислота растительного происхождения (на основе морских водорослей). Арх. к. ж. — арахидоновая кислота животного происхождения.



**Рис. 3.** Влияние препарата на развитие гриба в присутствии зерновки: А — 1-е сут. эксперимента; Б — 3-и сут. эксперимента; В — 7-е сут. эксперимента

В результате исследований было установлено, что совместное культивирование в питательной среде одновременно зерновки тритикале и препарата приводит к существенному замедлению роста исследуемых штаммов грибов. Оптимальной (оказывающей отрицательное действие на развитие патогенов), как и в предыдущих опытах с Иммуноцитотифитом, являлась концентрация 7,5 мг/л (рис. 4).

Другим немаловажным показателем эффективности применения препарата Иммуноцитотифит являются биометрические показатели проростков, в частности, длина надземной и подземной частей растения, развивающихся в контрольном и стрессовых условиях (рис. 5).

Экспериментально было установлено, что во всех повторностях Иммуноцитотифит оказывал положительное влияние на проростки тритикале. Наилучшее развитие и максимальный рост вегетативной части наблюдались у опытных образцов

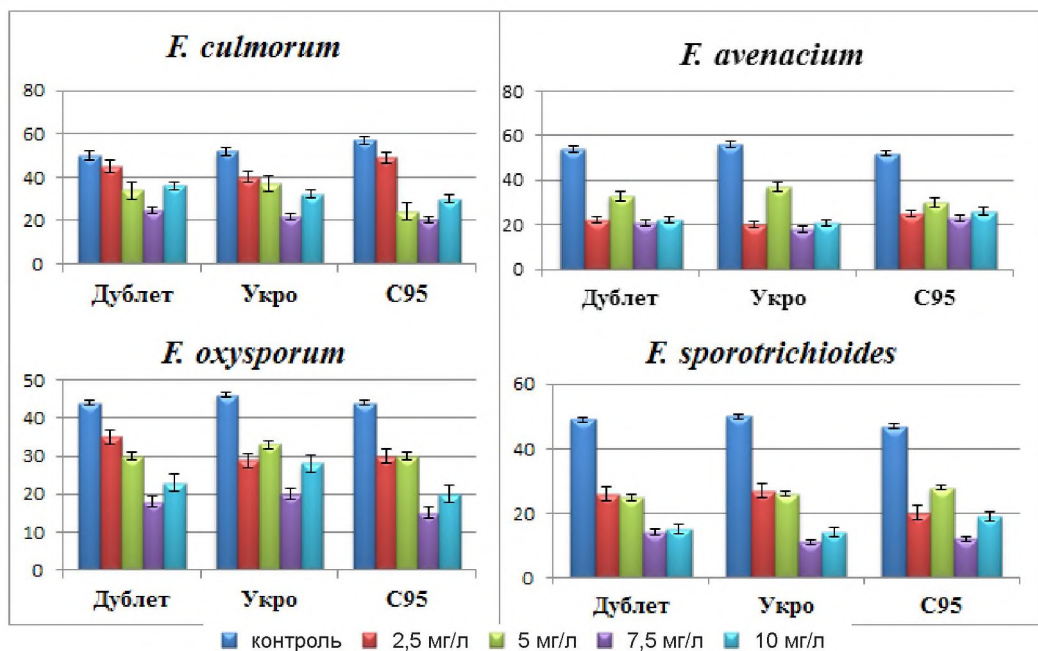


Рис. 4. Влияние препарата Иммуноцитозит на развитие мицелия (d, мм) гриба при совместном культивировании с зерновкой тритикале

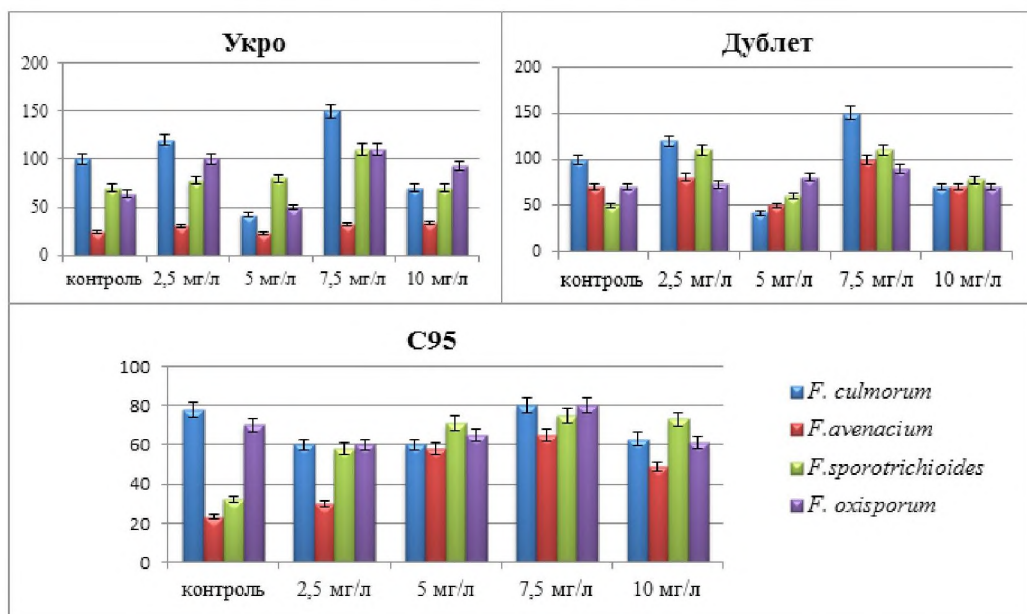
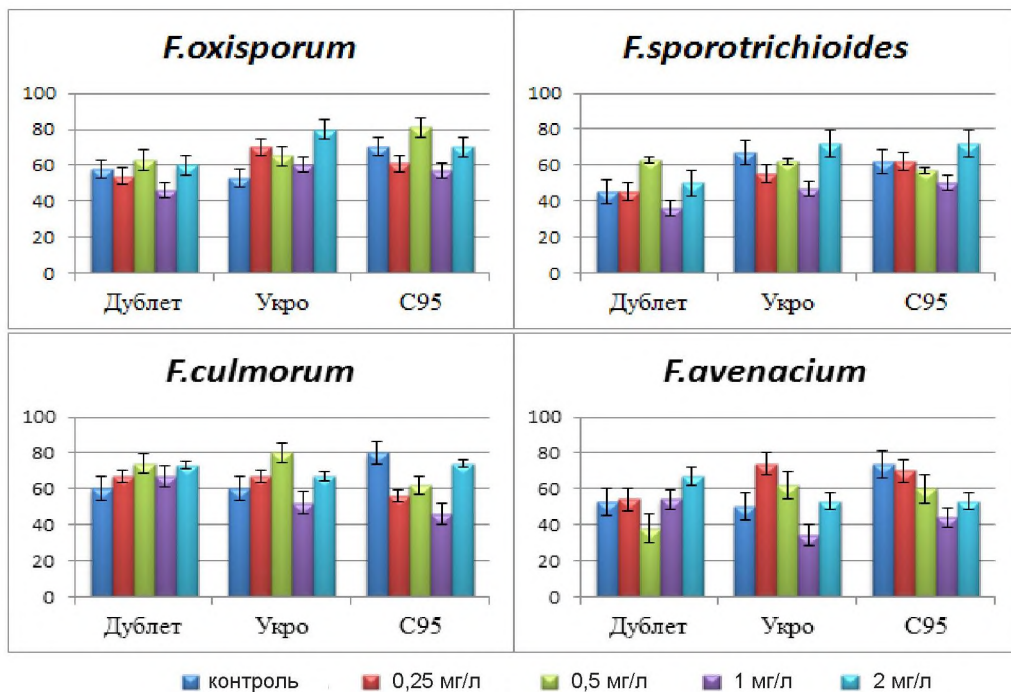


Рис. 5. Влияние препарата Иммуноцитозит на биометрические показатели проростков тритикале (мм) в стрессовых условиях

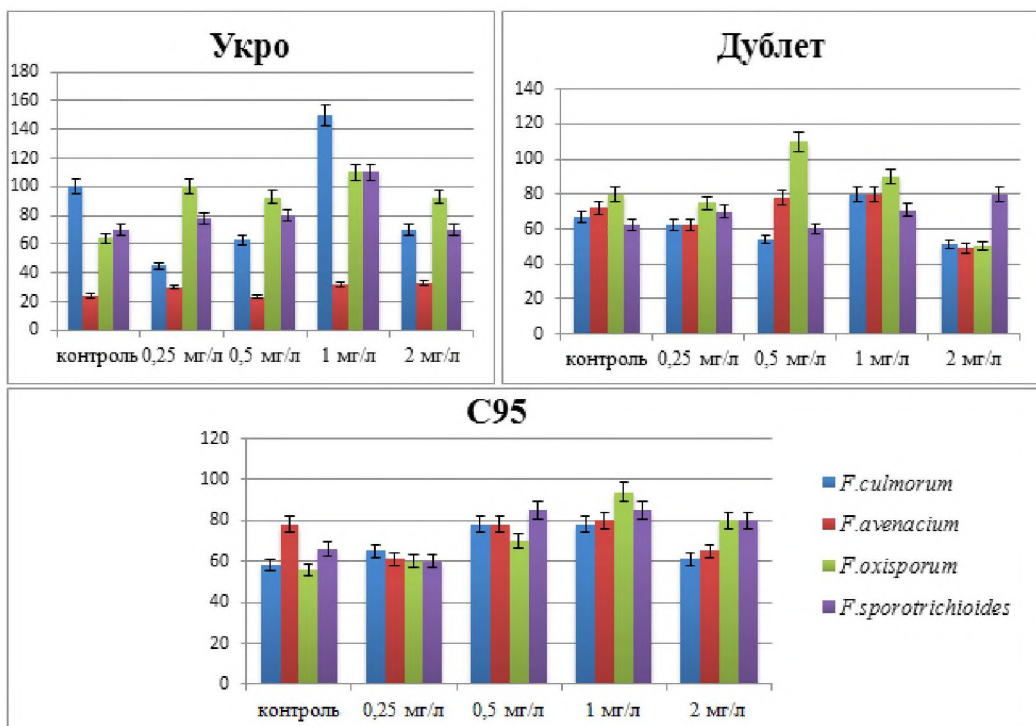
с концентрацией препарата 7,5 мг/л. Практически все обработанные зерновки по развитию превышали контрольный вариант. На развитие корневой части обработка препаратом не оказала влияние, и во всех концентрациях учитываемые показатели оставались на уровне контроля.

В эксперименте с арахидоновой кислотой на основе морских водорослей также было установлено, что добавление в питательную среду данного препарата в концентрации 1 мг/л благоприятно влияет на развитие проростков тритикале и улучшает их биометрические показатели, но в то же время значительно ингибирует рост грибного мицелия относительно контроля (рис. 6, 7).



**Рис. 6.** Влияние Арахидоновой кислоты растительного происхождения на развитие диаметра (мм) мицелия гриба при совместном культивировании с зерновкой

Анализируя данные, полученные в ходе эксперимента, можно предположить, что зерновка является своего рода синергистом регуляторов роста (усиливает его действие) за счет синтеза вторичных метаболитов, выполняющих защитную функцию в интактных растениях. К таким веществам относятся фенольные соединения, синтез которых усиливается в ответ растений на стресс. Можно предположить, что регуляторы роста в определенных концентрациях в стрессовых для растения условиях активируют его защитные механизмы, улучшая тем самым их невосприимчивость к болезням или инфекциям. Благодаря этому появляется возможность частичной борьбы или предотвращения заражения растений фузариозом с помощью данных препаратов.



**Рис. 7.** Влияние арахидоновой кислоты растительного происхождения на биометрические показатели проростков тритикале (мм) в стрессовых условиях

### Заключение

На сегодняшний день изучение данной проблемы является актуальным направлением исследований, которое имеет, несомненно, большую практическую значимость, так как большие площади посевов зерновых культур страдают именно от фузариоза. Применение химических фунгицидов, с одной стороны, приносит пользу сельскому хозяйству, с другой стороны — наносит вред экологической обстановке и здоровью человека. Использование же регуляторов роста для борьбы с вредоносными грибными заболеваниями поможет решить сразу несколько проблем: 1) снижение фунгицидной и пестицидной нагрузки на растение и почву; 2) стимулирование роста и развитие самого растения; 3) повышение урожайности культур.

Следует отметить, что в отличие от химических фунгицидов регуляторы роста — вещества природного происхождения, поэтому не несут никакого вреда для здоровья человека и животных, а также не наносят ущерба экологической среде. Поэтому исследования в данной области необходимо продолжать и развивать, что позволит использовать регуляторы роста сразу по нескольким направленностям функций.



## Библиографический список

1. Билай В.И. Фузариин. Киев: Наукова Думка, 1977. С. 364–373.
2. Васильченко С.А. Исследование тритикале для переработки в хлебопекарную муку // Мукомольно-элеваторная и комбикормовая промышленность, 1980. Вып. 5. С. 372–384.
3. Гагкаяева Т.Ю. Фузариоз зерновых культур. СПб.: 2011. 212 с.
4. Захаренко В.А. Микотоксины // Защита растений, 1993. Вып. 9. С. 61–62.
5. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миорнова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006. 162 с.
6. Кононенко Г.П., Малиновская Л.С., Пирязева Е.А. и др. Рекомендации по микотоксикологическому контролю фузариозного зерна фуражного назначения // Ветеринарный консультант. 2005. Вып. 23/24. С. 3–10.
7. Мельников Н.Н., Новожилов К.В., Белан С.Р. Пестициды и регуляторы роста растений: Справочник. М.: Химия, 1995. 575 с.
8. Радцева Г.Е. Физиологические аспекты действия химических регуляторов роста растений. М.: Колос, 1982. 147 с.
9. Степанова М.Б. Род Фузариум (*Fusarium*) // Мир растений: В 7 т. М.: Просвещение, 1991. 400 с.
10. Шаповал О.А., Вакуленко В.В., Прусакова Л.Д., Можарова И.Д. Регуляторы роста растений в практике сельского хозяйства. М.: Колос, 2009, 130 с.
10. Шульгин А.Ф. Тритикале — новая зерновая и кормовая культура. Киев: Урожай, 1981. 30 с.

## INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE CHARACTERISTICS OF THE DEVELOPMENT OF FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM TRITICALE IN VITRO*

N.V. OSOKINA, E.A. KALASHNIKOVA, A.N. KNYAZEV, N.P. KARSUNKINA

(Russian Timiryazev State Agrarian University)

*The genus Fusarium comprises many plant-pathogenic species, causing diseases in the most important agricultural crops, and also can be harmful for humans and animals since many of species produce biologically active secondary metabolites (e.g., phytotoxins and mycotoxins) with an extraordinary chemical diversity. The economic importance of Fusarium species is high due to both their impact on crop yields and accumulation of mycotoxins in the colonized crops, which can make food commodities unacceptable for marketing or consumption.*

*Research on Fusarium, carried out globally, concentrates the efforts of thousands of scientists and experts in different fields of science: mycology, plant pathology, genetics, agronomy, ecology, chemistry, biochemistry, and toxicology. Despite the efforts of the scientific community, many problems in this area are still not solved.*

*Nowadays, to combat fungal diseases of important crops chemicals are widely used, which is harmful to human and animal health. In certain concentrations plant growth regulators are capable of inhibiting the development of fungi and can be considered as an alternative solution. The paper analyzes the influence of growth regulators on the development of Fusarium triticales.*

*Triticale is a crop characterized by high yield, high protein and essential amino acids content that defines its food and fodder importance. Grain triticale is used in baking and confectionery*

industry, as well as for alcohol and industrial starch production. Also triticale is a valuable crop as the grain and green mass is used for feeding of farm animals.

For the study the species of *Fusarium* fungi were used, which are most oftenly found on the crops of our region, they are: *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* and *F. avenacium*. The research was focused on their correlation with different concentrations of growth regulators dissolved in nutrient medium.

These drugs are environmentally friendly, which is very important when using triticale for human nutrition and animal feed.

The experiments showed that concentrations in some medications can have an inhibitory effect on the development of the fungi and inhibit the development of *Fusarium*.

*Key words:* growth regulators, arachidonic acid, triticale, *Fusarium*, *in vitro*.

**Осокина Наталья Васильевна** — асп. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-40-72; e-mail: natali5-13@mail.ru).

**Калашникова Елена Анатольевна** — д. б. н., проф. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-40-72; e-mail: kalash0407@mail.ru).

**Князев Андрей Николаевич** — к. б. н., доц. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-40-72; e-mail: agrofak@gmail.com).

**Карсункина Наталья Петровна** — к. б. н., доц. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-40-72).

**Osokina Natalya Vasilyevna** — PhD-student of the Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: +7(499) 976-40-72; e-mail: natali5-13@mail.ru).

**Kalashnikova Elena Anatolyevna** — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding and Seed Production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: +7 (499) 976-40-72, e-mail: kalash0407@mail.ru).

**Knyazev Andrey Nikolaevich** — PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding and Seed Production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: +7 (499) 976-40-72 e-mail: agrofak@gmail.com).

**Karsunkina Natalya Petrovna** — PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding and Seed Production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: +7 (499) 976-40-72).