

Научная статья

УДК 633.854.78:575:631.52

DOI: 10.25230/2412-608X-2023-1-193-67-72

Сохранение агрессивности штаммов грибов из рода *Fusarium*, поражающих подсолнечник, в культуре на разных субстратах и температурных режимах

Светлана Леонидовна Саукова
Татьяна Сергеевна Антонова
Нина Михайловна Арасланова
Мария Вячеславовна Ивебор

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
saukova-s@mail.ru

Аннотация. Виды рода *Fusarium* Link. являются наиболее распространенными грибами, поражающими сельскохозяйственные культуры, в том числе и подсолнечник. Селекция на устойчивость способствует снижению распространения и развития болезней, но для отбора селекционного материала необходимо применять наиболее агрессивные штаммы патогенов. Цель исследований – провести сравнительный анализ сохранения в чистой культуре на разных растительных субстратах и температурных режимах агрессивности штаммов двух видов грибов из рода *Fusarium*, поражающих подсолнечник. Материалом исследований служили виды *F. sporotrichioides* Sherb. и *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans. var. *orthoceras* (Appl. et Wr.) Bilai., выделенные из пораженных фузариозом корней подсолнечника. Представлена амплитуда изменчивости агрессивности штаммов указанных видов грибов при температуре хранения +4 °C и +22–28 °C на стерильных семянках, лузге и фрагментах стеблей подсолнечника в течение пяти месяцев. При хранении штаммов обоих видов гриба в условиях температуры +22–28 °C на семянках существенное снижение агрессивности отмечено на 3-й, а на лузге – на 4-й месяц. При пониженной температуре хранения +4 °C агрессивность *F. sporotrichioides* в течение пяти месяцев незначительно снижалась на фрагментах стеблей и лузге подсолнечника, у *F. oxysporum* var. *orthoceras* существенное снижение выявлено на 4-й месяц. Установлено, что более агрессивный вид *F. sporotrichioides* сохраняет высокую агрес-

сивность на протяжении более длительного периода времени (пять месяцев), чем *F. oxysporum* var. *orthoceras*.

Ключевые слова: подсолнечник, фузариоз, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* var. *orthoceras*, агрессивность, хранение, чистая культура, субстрат, температура

Для цитирования: Саукова С.Л., Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Ивебор М.В. Сохранение штаммов грибов из рода *Fusarium*, поражающих подсолнечник, в культуре на разных субстратах и температурных режимах // Масличные культуры. 2023. Вып. 1 (193). С. 67–72.

UDC 633.854.78:575:631.52

Preserving of the aggressiveness of strains of fungi from a genus *Fusarium* infecting sunflower in a culture on the different substrates and temperature regimen

Saukova S.L., senior researcher, PhD in biology

Antonova T.S., head of the lab., chief researcher, doctor of biology

Araslanova N.M., leading researcher, PhD in agriculture

Ivebor M.V., leading researcher, PhD in agriculture

V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

17 Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia
saukova-s@mail.ru

Abstract. Species of a genus *Fusarium* Link. are the most spread fungi infecting agricultural crops including sunflower. Breeding for the resistance promotes the decrease in spreading and development of diseases but to choose breeding material it is necessary to use the most aggressive strains of pathogen. The purpose of the research was to conduct a comparative analysis of preserving of aggressiveness of strains of two species from the genus *Fusarium* infecting sunflower in a clear culture on the different vegetal substrates. The object of the research was species *F. sporotrichioides* Sherb. and *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans. var. *orthoceras* (Appl. et Wr.) Bilai., isolated from the sunflower roots infected with fusariosis. There is presented a range of variability of these strains aggressiveness at preserving temperature +4 °C and +22–28 °C on sterile sunflower seeds, husks, and fragments of plants du ring five months. When preserving the strains of both species at a temperature of +22–28 °C on seeds the significant decrease of the aggressiveness was stated on the third month and on husks – on the forth one. At lowered temperature of +4 °C the aggressiveness of *F. sporotrichioides* was decreasing insignificantly on sunflower stems and husks during five months, the important decrease of the aggressiveness of *F. ox-*

ysporum var. *orthoceras* was stated on the fourth month. We estimated the more aggressive species *F. sporotrichioides* preserve the high aggressiveness during longer time (five month) than *F. oxysporum* var. *orthoceras*.

Key words: sunflower, fusariosis, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* var. *orthoceras*, aggressiveness, preserving, clear culture, substrate, temperature

Введение. Грибы рода *Fusarium* Link. широко распространены в природе и являются возбудителями болезней более 200 видов культурных растений (хлебные злаки, технические и овощные культуры, а также древесные породы), вызывая их увядание, гнили и гибель. Грибы этого рода относятся к группе факультативных полифаговых паразитов с различной степенью паразитизма, среди них имеются достаточно резко выраженные паразиты растений, полупаразиты и сапрофиты [1]. Поражение ими растений не только снижает урожай [2; 3; 4; 5; 6], но и значительно ухудшает его качество [7]. Одним из факторов вредоносности грибов рода *Fusarium* являются продуцируемые в процессе жизнедеятельности токсичные вторичные метаболиты – микотоксины (фузариотоксины), которые накапливаются в органах вегетирующего растения, в результате чего, например, у злаковых культур, зерно становится непригодным для использования в пищу и на корм скоту [8]. Симптомы поражения подсолнечника, вызываемые возбудителем различных видов фузария, включают гниль корней и корзинки, увядание и пятнистость [2]. Искусственное заражение растений подсолнечника для селекции устойчивых форм предполагает необходимость длительного хранения инфекционного начала возбудителей фузариоза в лабораторных условиях с сохранением их агрессивных свойств. Разработка подходов к поддержанию коллекций чистых культур штаммов микромицетов ведется уже давно во многих странах мира, и к настоящему времени существуют несколько различных методов как кратковременного, так и долгосрочного хранения [9; 10]. На данный момент все

большее распространение получают методы криоконсервации [11; 12]. При этом микроорганизмы не утрачивают жизнеспособность в течение десятилетий. Тем не менее методы непродолжительного хранения являются одними из самых простых, не требующих дорогостоящего оборудования и в то же время незаменимых в повседневной работе с микроорганизмами [13]. Однако при многократных посевах повышается вероятность реверсии и потери активности микроорганизма, а также увеличивается риск контаминации культур и вырождения исходных изолятов [14]. При этом для использования в селекции необходимо применять наиболее агрессивные штаммы патогенов. Таким образом, совершенствование методов хранения рабочей коллекции возбудителей болезней не теряет актуальности.

Цель исследований – провести сравнительный анализ сохранения в чистой культуре на разных субстратах и температурных режимах агрессивности штаммов двух видов грибов из рода *Fusarium*, поражающих подсолнечник.

Материалы и методы. Объектами служили штаммы *Fusarium sporotrichioides* Sherb. и *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans. var. *orthoceras* (Appl. et Wr.) Bilai, выделенные в чистую культуру на питательную среду (сусловый агар) из пораженных корней растений подсолнечника. Выделение в чистую культуру и идентификацию возбудителей фузариоза проводили в соответствии с систематикой и методами Билай В.И. и Шипиловой Н.П., Иващенко В.Г. [1; 15].

Для получения среды на стерильной растительной основе (лузга, семечки и фрагменты стеблей подсолнечника) в колбы объемом 200 мл помещали равное количество поверхностно промытого под проточной водой и подсушенного субстрата (100 г). Колбы закрывали фольгой, сверху пергаментной бумагой, фиксировали резинкой и стерилизовали в течение 40 минут при давлении 1,2 атм. и температуре 120 °С. После стерилизации в емкости высевали агаровые блоки размером 1 × 1 см, высеченные из 14-дневных ко-

лоний чистых культур видов возбудителей фузариоза. Закрытые колбы со стерильными субстратами и высевными на них агаровыми блоками чистых культур инкубировали в термостате 30 дней при температуре 23 °С. Затем покрытый мицелием субстрат в колбах оставляли на хранение в течение пяти месяцев при двух температурных режимах. Для штаммов *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* и *F. sporotrichioides* использовали семянки и лузгу и культивировали при температуре 22–28 °С, при +4 °С – фрагменты стеблей и лузгу. По каждому субстрату выборка составляла по 20 проростков в трехкратной повторности.

После каждого месяца хранения фузарию пересевали на поверхность питательной среды – сусловый агар в чашки Петри и культивировали при температуре 23 °С в течение 14 дней до полного заполнения всей поверхности агара колонией гриба. Далее определяли степень агрессивности культуры: крышку чашки Петри заменяли на перфорированную с 20-ю сквозными отверстиями, в которые помещали двухдневные очищенные от лузги проростки подсолнечника сорта ВНИИМК 8883 так, чтобы кончик корня был погружен в колонию гриба. После 6-часовой экспозиции крышку с зараженными проростками переносили на чашку Петри, дно которой было выстлано фильтровальной бумагой, смоченной стерильной водой, и накрывали полиэтиленовой пленкой, создавая влажную камеру при комнатной температуре. Через три дня проводили визуальную оценку иммунологической реакции растения по распространению поражения на корневую шейку и гипокотиль по иммунологической 5-балльной шкале (рис. 1) [16]:

- 0 баллов – здоровые проростки;
- 1 балл – сгнил кончик корня;
- 2 балла – перетяжка гнили в середине корня или сгнило 50 % корня;
- 3 балла – сгнил корень до корневой шейки;
- 4 балла – сгнил корень и гипокотиль.



Рисунок 1 – Проростки подсолнечника сорта ВНИИМК 8883 после искусственного заражения возбудителем фузариоза, распределенные в соответствии с баллами иммунологической шкалы

По интенсивности поражения проростков подсолнечника фузариозом определяли развитие болезни по формуле [17]:

$$R = \frac{\sum(a \cdot b)}{\sum(N \cdot k)} 100 \%,$$

где R – развитие болезни, %;

$\sum(a \cdot b)$ – сумма произведений числа растений на соответствующий им балл поражения;

N – общее число учетных растений (здоровые и больные);

k – высший балл шкалы учета.

Результаты экспериментов анализировали методом дисперсионного анализа в компьютерной обработке [18].

Результаты и обсуждение. В процессе хранения штаммов обоих видов, как *F. sporotrichioides*, так и *F. oxysporum* var. *orthoceras*, на каждом субстрате (лузге, семянках и фрагментах стеблей) происходил обильный рост воздушного мицелия и спорообразование. По мере старения культур наблюдалось образование многочисленных толстостенных покоящихся хламидоспор в мицелии (гифах грибницы) и утолщение оболочек микро- и макроконидий. Как известно, большин-

ство фузариевых грибов могут существовать как сапрофиты на растительных остатках не один год. Они играют важную роль в биоценоотическом круговороте, участвуя в процессах деградации целлюлозы, лигнина и других субстратов [8]. Поэтому растительные остатки являются одним из основных источников инфекции. При попадании в благоприятные условия инфекционное начало гриба прорастает новым мицелием и способно проникать и развиваться в сосудистой системе многих растений.

В результате реизоляции изучаемых видов гриба из исследуемых субстратов на агаризованное пивное сусло через каждый месяц хранения установлено, что анализируемые штаммы не утрачивали свою жизнеспособность, а микроморфологические и морфолого-культуральные признаки сохраняли стабильность. Степень поражения корневой системы проростков подсолнечника сорта ВНИИМК 8883 при инокуляции пропагулами гриба в чашках Петри изменялась, в зависимости от субстрата, температуры и сроков хранения патогена. При хранении культур *F. sporotrichioides* в колбах при температуре +22–28 °С в течение пяти месяцев агрессивность их снижалась на семянках от 67,5 до 47,2 %, на лузге – от 62,7 до 42,2 %. Интенсивность развития болезни существенно снизилась на 3-й месяц на семянках и составила 52,5 %, на 4-й месяц на лузге – 46,1 % (рис. 2). Аналогичные данные наблюдали при хранении в течение пяти месяцев менее патогенного штамма *F. oxysporum* var. *orthoceras*: агрессивность снижалась от 36,9 до 20,0 % на семянках, от 31,2 до 5,5 % на лузге. Достоверные изменения произошли на семянках: на 3-й месяц интенсивность развития болезни составила 21,2 %, на лузге – на 4-й месяц 17,5 % при наименьшей существенной разности 11,4.

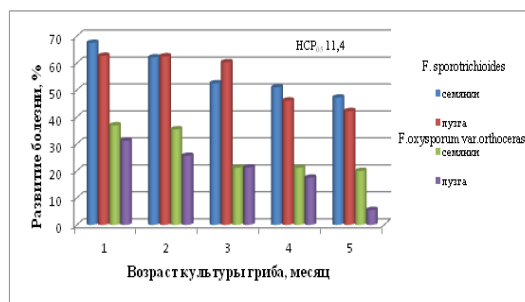


Рисунок 2 – Агрессивность для проростков подсолнечника штаммов *F. sporotrichiella* var. *sporotrichioides* и *F. oxysporum* var. *orthoceras*, хранившихся на стерильных семянках и лузге, в зависимости от сроков хранения при температуре +22–28 °С

Хранение штамма *F. sporotrichioides* на фрагментах стеблей и лузге подсолнечника в колбах при низкой температуре +4 °С показало, что после пяти месяцев агрессивность существенно не изменялась (при $P < 0,05$) (рис. 3). Интенсивность поражения корневой системы проростков подсолнечника при контакте с колонией гриба, посеянной с лузги, составила 58,3 % в сравнении с первым месяцем хранения (66,9 %), с фрагментов стеблей – 60,0 % при начальном значении 69,9 %. Агрессивность штамма *F. oxysporum* var. *orthoceras* снизилась через четыре месяца хранения на двух субстратах и составила: с лузги – 23,8 %, с фрагментов стеблей подсолнечника – 24,6 % в сравнении со значениями первого месяца хранения 38,0 % при наименьшей существенной разности 12,4.

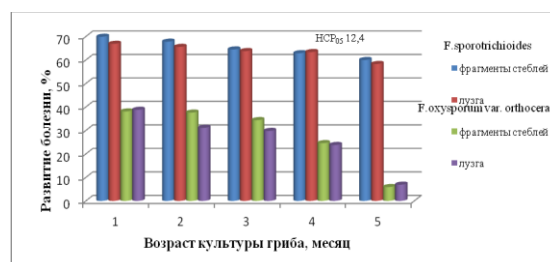


Рисунок 3 – Агрессивность для проростков подсолнечника штаммов *F. sporotrichioides* и *F. oxysporum* var. *orthoceras*, хранившихся на стерильных фрагментах стеблей и лузге, в зависимости от сроков хранения при температуре +4 °С

Таким образом, полученные данные показали возможность сохранять и поддерживать чистоту штаммов возбудителей фузариоза подсолнечника, их агрессивность на доступных субстратах, что сокращает частоту пересевов и позволяет продолжительно проводить иммунологические и другие исследования.

Заключение. Хранение штаммов *F. sporotrichioides* и *F. oxysporum* var. *orthoceras* без потери их агрессивных свойств в условиях культивирования +22–28 °С на семянках и лузге подсолнечника возможно в течение трех месяцев. Температура +4 °С позволяет сохранять агрессивность культур указанных видов на фрагментах стеблей и лузге в течение 4–5 месяцев. При этом штамм более агрессивного вида *F. sporotrichioides* не утрачивает своих патогенных свойств на протяжении более длительного времени (пять месяцев).

Список литературы

1. Билай В.И. Фузариоз: монография. – Изд. 2-е доп. и перераб. – Киев: Наукова думка, 1977. – 442 с.
2. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Саукова С.Л. Распространение фузариоза подсолнечника в Краснодарском крае // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2002. – № 3. – С. 6–8.
3. Gontcharov S.V. Dynamics of hybrid sunflower disease resistance // *Helia*. – 2014. – (37). – P. 99–104. DOI: 10.1515/helia-2014-0008.
4. Маслиенко Л.В., Курилова Д.А. Штамм гриба Хк-1 *Chaetomium olivaceum* Cook et Ellis – продуцент микробиопрепарата для снижения вредоносности фузариоза на сое // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2016. – Вып. 2 (166). – С. 73–84.
5. Трубина В.С., Сердюк О.А., Горлова Л.А., Шипиевская Е.Ю. Влияние фузариоза на структуру урожая горчицы белой (*Sinapis alba* L.) // Труды Кубанского аграрного университета. – 2019. – № 81. – С. 215–219. DOI: 10.21515/1999-1703-81-215-219.
6. Курилова Д.А., Бушнев А.С., Подлесный С.П. Поражённость масличного льна фузариозом в зависимости от приёмов возделывания в условиях центральной зоны Краснодарского края // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2018. – Вып. 2 (174). – С. 112–119. DOI: 10.25230/2412-608X-2018-2-174-112-119.
7. Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю., Орина А.С., Гогина Н.Н. Разнообразие грибов рода *Fusarium* и их микотоксинов в зерне из азиатской части России // Микология и фитопатология. – 2022. – Т. 56. – № 3. – С. 194–206. DOI: 10.31857/S0026364822030035.
8. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Орина А.С., Гогина Н.Н. Чрезвычайная ситуация 2019 г. и болезни зерна в Амурской области // Защита и карантин растений. – 2020. – № 8. – С. 19–21.
9. Uzunova-Donova T., Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms // Journal of culture collections. – 2005. – V. 4. – № 1. – P. 17–28.
10. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Демушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Медицинские науки. – 2009. – Вып. 4 (12). – С. 99–121.
11. Седякина Т.М. Консервация микроорганизмов. – Пушкино: ОНТИ НЦБИ. – 1985. – 63 с.
12. Тутова Э.Г., Идельчик М.С. Консервация микробиологических препаратов и штаммов-продуцентов. – М.: НИИТЭХИМ, 1986. – Вып. 10 (197). – 84 с.
13. Утепешева А.А. Подбор методов длительного хранения коллекционных штаммов микромицетов и дрожжей // Экобиотех. – 2019. – Т. 2. – № 4. – С. 494–498. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-494-498.
14. Ярмеева М.М., Белосохов А.Ф., Еланский С.Н. Новые подходы к хранению рабочей коллекции чистых культур микромицетов в пробирках с использованием полиакрилата натрия // Современная микология в России. – 2020. – Т. 8. – С. 54.
15. Шипилова Н.П., Иващенко В.Г. Систематика и диагностика грибов рода *Fusarium* на зерновых культурах. – СПб, 2008. – 84 с.
16. Антонова Т.С., Саукова С.Л. Способ определения устойчивости подсолнечника к фузариозу: – патент РФ на изобретение № 2206981; заявл. 10.04.2001; опубл. 27.06.2003. Бюл. № 18. – 10 с.
17. Лукомец В.М., Пивень В.Т., Тишков Н.М. Болезни подсолнечника // Агрорус. – 2011. – 210 с.
18. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обра-

ботки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

References

1. Bilay V.I. Fuzarii: monografiya. – Izd. 2-e dop. i pererab. – Kiev: Naukova dumka, 1977. – 442 s.
2. Antonova T.S., Araslanova N.M., Saukova S.L. Rasprostranenie fuzarioza podsolnechnika v Krasnodarskom krae // Doklady Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk. – 2002. – № 3. – S. 6–8.
3. Gontcharov S.V. Dynamics of hybrid sunflower disease resistance // Helia. – 2014. – (37). – R. 99–104. DOI: 10.1515/helia-2014-0008.
4. Maslienko L.V., Kurilova D.A. Shtamm griba Xk-1 *Shaetomium olivaceum* Cook et Ellis – produtsent mikrobiopreparata dlya snizheniya vredonosnosti fuzarioza na soe // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2016. – Vyp. 2 (166). – S. 73–84.
5. Trubina V.S., Serdyuk O.A., Gorlova L.A., Shipievskaya E.Yu. Vliyanie fuzarioza na strukturu urozhaya gorchitsy beloy (*Sinapis alba* L.) // Trudy Kubanskogo agrarnogo universiteta. – 2019. – № 81. – S. 215–219. DOI: 10.21515/1999-1703-81-215-219.
6. Kurilova D.A., Bushnev A.S., Podlesnyy S.P. Porazhennost' maslichnogo l'na fuzariozom v zavisimosti ot priemov vozdel'yvaniya v usloviyakh tsentral'noy zony Krasnodarskogo kraya // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2018. – Vyp. 2 (174). – S. 112–119. DOI: 10.25230/2412-608X-2018-2-174-112-119.
7. Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Orina A.S., Gogina N.N. Raznoobrazie gribov roda *Fusarium* i ikh mikotoksinov v zerne iz aziatskoy chasti Rossii // Mikologiya i fitopatologiya. – 2022. – T. 56. – № 3. – S. 194–206. DOI: 10.31857/S0026364822030035.
8. Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Orina A.S., Gogina N.N. Chrezvychaynaya situatsiya 2019 g. i bolezni zerna v Amurskoy oblasti // Zashchita i karantin rasteniy. – 2020. – № 8. – S. 19–21.
9. Uzunova-Doneva T., Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms // Journal of culture collections. – 2005. – V. 4. – № 1. – P. 17–28.
10. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. Metody dlitel'nogo khraneniya kolleksiionnykh kul'tur mikroorganizmov i tendentsii razvitiya // Meditsinskie nauki. – 2009. – Vyp. 4 (12). – S. 99–121.
11. Sedyakina T.M. Konservatsiya mikroorganizmov. – Pushchino: ONTI NTsBI. – 1985. – 63 s.
12. Tutova E.G., Idel'chik M.S. Konservatsiya mikrobiologicheskikh preparatov i shtammov-produtsentov. – M.: NIITEKhim, 1986. – Vyp. 10 (197). – 84 s.
13. Utepesheva A.A. Podbor metodov dlitel'nogo khraneniya kolleksiionnykh shtammov mikromitsetov i drozhzhey // Ekobiotekh. – 2019. – T. 2. – № 4. – S. 494–498. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-494-498.
14. Yarmeeva M.M., Belosokhov A.F., Elanskiy S.N. Novye podkhody k khraneniyu rabochey kolleksii chistyykh kul'tur mikromitsetov v probirkakh s ispol'zovaniem poliakrilata natriya // Sovremennaya mikologiya v Rossii. – 2020. – T. 8. – S. 54.
15. Shipilova N.P., Ivashchenko V.G. Sistematika i diagnostika gribov roda *Fusarium* na zernovykh kul'turakh. – SPb, 2008. – 84 s.
16. Antonova T.S., Saukova S.L. Sposob opredeleniya ustoychivosti podsolnechnika k fuzariozu: – patent RF na izobretenie № 2206981; zayavl. 10.04.2001; opubl. 27.06.2003. Byul. № 18. – 10 s.
17. Lukomets V.M., Piven' V.T., Tishkov N.M. Bolezni podsolnechnika // Agrorus. – 2011. – 210 s.
18. Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy). – M.: Agropromizdat, 1985. – 351 s.

Сведения об авторах

С.Л. Саукова, ст. науч. сотр., канд. биол. наук
Т.С. Антонова, зав. лаб., гл. науч. сотр., д-р биол. наук
Н.М. Арасланова, вед. науч. сотр., канд. с.-х. наук
М.В. Ивевор, вед. науч. сотр., канд. с.-х. наук

Получено/Received
20.01.2023

Получено после рецензии/Manuscript peer-reviewed
26.01.2023

Получено после доработки/Manuscript revised
03.02.2023

Принято/Accepted
23.03.2023

Manuscript on-line
30.05.2023