

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ МИКОЛОГИИ**  
**ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ**

---

# **СОВРЕМЕННАЯ МИКОЛОГИЯ В РОССИИ**

ТОМ 5

МАТЕРИАЛЫ III МЕЖДУНАРОДНОГО  
МИКОЛОГИЧЕСКОГО ФОРУМА

Москва  
2015

ББК 28.591  
УДК 58-616.5  
С56

**Главный редактор**

Ю.Т. Дьяков

**Заместитель главного редактора**

Ю.В. Сергеев

**Редакционная коллегия**

Белозерская Т.А.	Марфенина О.Е.
Бибикова М.В.	Мокеева В.Л.
Биланенко Е.Н.	Озерская С.М.
Бурова С.А.	Сергеев А.Ю.
Бондарцева М.А.	Сидорова И.И.
Воронина Е.Ю.	Ткаченко О.Б.
Гагкаева Т.Ю.	Тремасов М.Ю.
Еланский С.Н.	Толпышева Т.Ю.
Журбенко М.П.	Феофилова Е.П.
Коваленко А.Е.	Шнырева А.В.
Кураков А.В.	Чекунова Л.Н.
Левитин М.М.	Чернов И.Ю.

Современная микология в России. Том 5. Ред.: Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев.  
Материалы III Международного микологического форума.  
Москва, 14 – 15 апр. 2015 г. М.: Нац. акад. микол. 2015. Том 5. 432 с.

УДК 58-616.5  
ББК 28.591

*Издано в Российской Федерации в рамках программы  
Национальной академии микологии*



**Национальная академия микологии**  
ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

## **СОВРЕМЕННАЯ МИКОЛОГИЯ В РОССИИ**

Current Mycology in Russia

Том 5

Выпуск 4.

**Сельскохозяйственная  
микология—I**

Глава 10.

**Фитопатогенные грибы**

Volume 5

Issue 4.

**Fungal problems in agriculture  
Part I**

Chapter 10.

**Fhytopathogenic fungi**

DOI:10.14427/cmr.2015.v.10

## Содержание Выпуска 4

## Глава 10. Фитопатогенные грибы

ИЗМЕНЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛИСТОВЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЯЧМЕНЯ В РОССИИ И БЕЛАРУСИ Афанасенко О.С., Мироненко Н.В., Анисимова А.В., Баранова О.А. Зубкович А.А., Марчук О.В., Батакова О.Б., Муругова Г.А.....	5
ИСПЫТАНИЕ СОРТОВ И ЛИНИЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА (АКМОЛИНСКАЯ ОБЛАСТЬ) Ахметова А.К., Каратаева Р.К., Сулейменов Р.М., Зеленский Ю.И., Моргунов А.И., Жапаев Р.К., Карабаев М.К.....	7
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФОМОЗА ПОДСОЛНЕЧНИКА В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ Арасланова Н.М., Саукова С.Л., Ивебор М.В., Антонова Т.С.....	9
ОСОБЕННОСТИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ <i>BIPOULARIS SOROKINIANA</i> (Sacc.) Shoemaker Ашмарина Л.Ф. ....	11
КРАТКОВРЕМЕННОЕ ОСВЕЩЕНИЕ СПОР <i>MAGNAPORTHE ORYZAE</i> ПОВЫШАЕТ ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ И АГРЕССИВНОСТЬ Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Пасечник Т.Д., Baker С.Ж.....	14
ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ОБРАЗОВАНИЕ ГАЛО ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ МУЧНИСТОРОСЯНОГО ПАТОГЕНА С КЛЕТКАМИ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ Аветисян Г.А., Бабоша А.В., Аветисян Т.В. ....	15
ПРЕОБЛАДАНИЕ ПРОДОЛЬНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО ОСИ ЛИСТА У ПЕРВИЧНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ СТРУКТУР ВОЗБУДИТЕЛЯ МУЧНИСТОЙ РОСЫ ПШЕНИЦЫ ПРИ ПРОРАСТАНИИ НА ЛИСТЬЯХ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЗЛАКОВ Бабоша А.В., Рябенко А.С., Аветисян Т.В. ....	17
СПЕКТР БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПАТОГЕНОВ АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ Берестецкий А.О., Шиповская Е.А., Гасич Е.Л. ....	19
РАЗВИТИЕ ЭНДОФИТНОГО МИЦЕЛИЯ ВНУТРИ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА Благовещенская Е.Ю., Попкова Е.Г. ....	19
МИКОЦЕНОЗ ЛЮЦЕРНЫ В ЗИМНИЙ ПЕРИОД В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ Бондаренко И.И.....	21
ГРИБЫ-МАКРОМИЦЕТЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ СТЕЛОВЫЕ И КОРНЕВЫЕ ГНИЛИ В ЛЕСАХ ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ Булгаков Е.А. ....	22
ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ РОДА <i>DOTHISTROMA</i> В РОССИИ И ПРИЛЕГАЮЩИХ СТРАНАХ: ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ И СОВРЕМЕННЫЕ СВЕДЕНИЯ Булгаков Т.С., Мусолин Д.Л. ....	23
СТРЕПТОМИЦЕТЫ ПОЧВ МОЛДОВЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ Бурцева С.А., Бырса М.Н., Березюк Ю. Н., Пойрас Н.А.....	25
ВСПЫШКА АНТРАКНОЗА ЗЕМЛЯНИКИ В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ Дудченко И.П., Скрипка О.В., Копина М.Б.....	28
СОРТОВАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ОЗИМОГО ТРИТИКАЛЕ К БУРОЙ ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ Ефремова И.В., Мелькумова Е.А., Дедаев В.Г. ....	29
ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВЛАЖНОСТИ НА ПОРАЖЕНИЕ ГИБРИДОВ ПРИМУЛЫ ( <i>PRIMULA</i> ) ПОЛЬСКОЙ СЕЛЕКЦИИ <i>VOTRYTIS CINEREA</i> PERS. ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ ВЫРАЩИВАНИЯ Егорова Е.В. ....	31
ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ОИДИУМА ВИНОГРАДА ( <i>UNCINULA NECATOR</i> BURR) К СТРОБИЛУРИНАМ В УСЛОВИЯХ ЮЖНОГО БЕРЕГА КРЫМА Галкина Е.С., Алейникова Н.В.....	33

ПАТОГЕННОСТЬ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ИНОКУЛЮМА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АЛЬТЕРНАРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ КУЛЬТУР Гасич Е.Л., Ганнибал Ф.Б., Хлопунова Л.Б., Левитин М.М. ....	35
ЭЛЕМЕНТЫ МИКОБИОТЫ НАДЗЕМНЫХ ПОБЕГОВ И КЛУБНЕЙ УВЯДАЮЩЕГО КАРТОФЕЛЯ Приходько Е.С., Белошапкина О.О., Смирнов А.Н. ....	38
К МИКОБИОТЕ СОРНЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ ПСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ Гасич Е.Л., Ганнибал Ф.Б., Берестецкий А.О., Казарцев И.А., Хлопунова Л.Б., Бильдер И.В. ....	39
ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОЗА ЛЮЦЕРНЫ ХМЕЛЕВИДНОЙ ( <i>MEDICAGO LUPULINA</i> ) С ГРИБОМ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ <i>GLOMUS INTRARADICES</i> Гапеева Н.Е., Юрков А.П., Степанова Г.В., Якоби Л.М. ....	41
ПАТОГЕННАЯ МИКОБИОТА КОЛЛЕКЦИИ ТРОПИЧЕСКИХ И СУБТРОПИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН АЗЕРБАЙДЖАНА Гасымов Ш.Н., Велиева С.С., Тахмазова Д.Н. ....	43
ВЛИЯНИЕ ЦВЕТКОВОЙ ПЛЕНКИ НА МИКОБИОТУ ГЕНОТИПОВ ОВСА Гаврилова О.П., Грибченко Э.С., Лоскутов И.Г., Гагкаева Т.Ю. ....	44
СОСТАВ ПАТОГЕННОЙ МИКОБИОТЫ СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА ПШЕНИЦЫ Глинушкин А.П., Белошапкина О.О., Акимов Т.А. ....	46
РАСОВЫЙ СОСТАВ <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F.SP. VASINFECTUM (FOV) В ОТДЕЛЬНЫХ ОБЛАСТЯХ УЗБЕКИСТАНА Глухова Л.А., Шералиев А.Ш., Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И.Б., Абдуллаев А.А., Шеримбетов А.Г., Зохидов А.А. ....	48
ЭЛИМИНИРОВАНИЕ МИКОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ ТЮЛЬПАНА ПРИ ВЫГОНКЕ В ЗАЩИЩЕННОМ ГРУНТЕ БИОПРЕПАРАТОМ ФУНГИЛЕКС, Ж Головченко Л.А., Рыженкова Ю.И., Войтка Д.В., Юзефович Е.К. ....	50
ОСОБЕННОСТИ БИОЭКОЛОГИИ МИКРОМИЦЕТА <i>PYRENOPHORA TERES</i> (SACC.) SHOEM. В ЦЕНОЗЕ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ Горьковенко В.С., Соловьева А.Ю., Орловская Е.Н., ....	52
МИКРОМИЦЕТ <i>GIBELLINA CEREALIS</i> PASS. В АГРОЦЕНОЗЕ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ: ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА Горьковенко В.С., Монастырская Э.И., Богословская Н.Б., ....	53
ВЕГЕТАТИВНАЯ НЕСОВМЕСТИМОСТЬ ИЗОЛЯТОВ <i>CRYPTHONECTRIA</i> <i>PARASITICA</i> ИЗ ТУРЦИИ И СЕВЕРНОГО КAVKAZA Гринько Н.Н. ....	55
ВИРУЛЕНТНОСТЬ ГРИБА <i>PUCCINIA TRITICINA</i> ERIKS. НА ТЕТРАПЛОИДНЫХ ВИДАХ ПШЕНИЦЫ Гультияева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Косман Е., Ахметова А.К., Гончаров Н.П. ....	58
МЕЛКОСПОРОВЫЕ ВИДЫ <i>ALTERNARIA</i> НА ПОДСОЛНЕЧНИКЕ Ивевор М.В., Саукова С.Л., Арасланова Н.М., Антонова Т.С., Рамазанова С.А. ....	61
ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ КАРТОФЕЛЯ: ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ПОИСК АНТАГОНИСТОВ Карамова Н.С., Сташевски З., Илюхина Д.Л., Хадиева Г.Ф., Марданова А.М. ....	62
ВЛИЯНИЕ АЛЬТЕРНАРИОЗА НА ВОДНЫЙ РЕЖИМ КАРТОФЕЛЬНОГО РАСТЕНИЯ Кинчарова М.Н. ....	64
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛИСТОВЫХ ПЯТНИСТОСТЕЙ КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТА Кокаева Л.Ю., Еланский С.Н., Берёзов Ю.И.	
ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЦИЛИНДРОКЛАДИОЗА В СОЧИНСКОМ НАЦИОНАЛЬНОМ ПАРКЕ Колганихина Г.Б. ....	67
ВИДОВАЯ И ВНУТРИВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГРИБОВ РОДА <i>FUSARIUM</i> ПО ПАТОГЕННЫМ И ТОКСИНОГЕННЫМ СВОЙСТВАМ Коломиец Т.М., Панкратова Л.Ф. ....	68
БОЛЕЗНИ ЖЕНЫШЕНА В ПРОМЫШЛЕННОЙ КУЛЬТУРЕ И НА ПРИУСАДЕБНЫХ УЧАСТКАХ Кориняк С. И. ....	70
ПОСЛЕДСТВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕРБИЦИДОВ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ФИТОПАТОГЕНОВ В ЧЕРНОЗЕМНЫХ ПОЧВАХ Коробова Л.Н. ....	71
ВИДЫ ГРИБОВ РОДА <i>FUSARIUM</i> НА ПОДСОЛНЕЧНИКЕ Котлярова И.А., Терещенко Г.А. ....	74
ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> НА АРБУСКУЛЯРНУЮ МИКОРИЗУ РАСТЕНИЙ Курамшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М., Саттарова Л.Р. ....	76

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ СОРТА КАРТОФЕЛЯ НА АГРЕССИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ <i>RHYZOPHTHORA INFESTANS</i> (MONT.) DE BARY Кузнецова М.А., Спиглазова С.Ю., Рогожин А.Н., Сметанина Т.И., Морозова Е.В., Филиппов А.В. ....	78
ШТАММЫ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЗАЩИТЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР ОТ БОЛЕЗНЕЙ, ВЫЗВАННЫХ ФИТОПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ Кузнецова Н.И., Кузин А.И., Николаенко М.А., Азизбекян Р.Р. ....	81
ВЛИЯНИЕ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ СЕМЯН НА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПРОРОСТКИ ЯРОВОЙ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ Лукьянцев В.С., Глинушкин А.П., Сударенков Г.В., Соловых А.А. ....	82
ВИДОВОЙ СОСТАВ И ВРЕДНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ УКРОПА ПАХУЧЕГО ( <i>ANETHUM GRAVEOLENS</i> L.) Макаренко Е.В. ....	85
ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГИБРИДОВ ХЛОПЧАТНИКА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ Мамедова Н.Х., Шихлинский Г.М. ....	86
ИСПЫТАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ КЛЯСТЕРОСПОРИОЗА СЛИВЫ Маслиенко Л.В., Якуба Г.В., Мищенко И.Г., Ковчигина М.А. ....	88
ВЛИЯНИЕ СОРТА И МЕТЕОУСЛОВИЙ ГОДА НА ЗАРАЖЕННОСТЬ СЕМЯН СОРГО ГРИБАМИ РОДА <i>FUSARIUM</i> И <i>ALTERNARIA</i> В ЛЕСОСТЕПИ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ Матвиенко Е.В. ....	89
ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПОСЕВА (С ПОЛИВОМ И БЕЗ ПОЛИВА) И ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН СОРГО ПРЕПАРАТАМИ НА РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ИНТЕНСИВНОСТЬ РАЗВИТИЯ АЛЬТЕРНАРИОЗА В ЛЕСОСТЕПИ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ Матвиенко Е.В. ....	90
СТРУКТУРА СЕВЕРОКАВКАЗСКОЙ И СЕВЕРОЗАПАДНОЙ ПОПУЛЯЦИЙ <i>RYZENOPHTHORA TRITICI-REPENTIS</i> ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ДНК-МАРКЕРАМ Мироненко Н. В., Михайлова Л.А., Баранова О.А., Коваленко Н.М. ....	92
ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ АМИНОСУЛЬФИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ЗАЩИТЫ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ФУЗАРИОЗНОЙ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ Набеева Р.А., Фархутдинов Р.Г., Хайруллина Р.Р., Ямалеева А.А. ....	95
РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГРИБОВ РОДА <i>ASPERGILLUS</i> НА ЗЕРНЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР Нечай Н.Л. ....	97
МИКРОМИЦЕТНЫЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМОВ НА КОРНЕВОЙ СИСТЕМЕ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ В ПОСЕВАХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ Осетрова Е.П., Марьин Г.С. ....	99
ГРИБЫ РОДА <i>FUSARIUM</i> НА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУРАХ: ВИДОВОЙ СОСТАВ И ВНУТРИВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ Овсянкина А.В. ....	101
ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ В АГРОЦЕНОЗАХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ Герасимов С.В., Овсянкина А.В. ....	104
ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПТОРИОЗА НА ПОСЕВАХ ПШЕНИЦЫ В РФ Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н., Акимова Е.А., Санина А.А. ....	107
ХРАНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПТОРИОЗА ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н., Куркова Н.А., Санина А.А. ....	108
ПОРАЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ <i>ALCEA ROSEA</i> L. ГРИБОМ <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> (LIB.) DE BARY Пиковский М.И., Кирик Н.Н. ....	110
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ В СЕНАЖЕ ГРИБОВ РОДОВ <i>ASPERGILLUS</i> И <i>PENICILLIUM</i> Пирязева Е.А. ....	111
ПОРАЖАЕМОСТЬ КЛЕНА ОСТРОЛИСТНОГО ( <i>ACER PLATANOIDES</i> L.) ПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ В ЛЕСНЫХ СО- ОБЩЕСТВАХ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ Волков Д.Э., Мелькумов Г.М., Сигитова О.М. ....	112

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СОСТАВ МЕТАБОЛИТНОГО КОМПЛЕКСА И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГРИБА <i>RYZENOPHORA TRITICI-REPENTIS</i> – ВОЗБУДИТЕЛЯ ЖЕЛТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ Полуэктова Е.В., Мусаева Т.Д., Мушенко В.М., Шимирбекова Б.А. Мироненко Н.В., Берестецкий А.О.....	114
ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ НА БИОЛОГИЮ ГРИБНЫХ ПАТОГЕНОВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР Маслова М.В. ....	114
ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ТОМАТА ИНДУКТОРАМИ УСТОЙЧИВОСТИ И ДРУГИМИ БАВ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СФЕРУ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ Поликсенова В.Д. ....	116
ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФИТОФТОРОЗА И АЛЬТЕРНАРИОЗА ТОМАТА Райчук Т.Н.....	118
ИЗУЧЕНИЕ ФИТОПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ ГРИБА <i>SEPTORIA NODORUM</i> Райзер О.Б., Горбуля В.С., Хапилина О.Н. ....	119
МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КОРМОВЫХ КУЛЬТУР НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ Разгуляева Н.В., Костенко Н.Ю., Пуца Н.М.....	120
ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ <i>PUCCINIA TRITICINA</i> ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ И SSR-МАРКЕРАМ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ РФ Шайдаук Е.Л., Е.И. Гульятыева, Казарцев И.А. ....	122
ПРОБЛЕМЫ ФУЗАРИОЗОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В УЗБЕКИСТАНЕ И ИХ РОЛЬ В МИКОТОКСИКОЗАХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ Шеримбетов А.Г., Захидов А., Шералиев А.Ш., Глухова Л.А., Хайтбаева Н., Рахмонов Ж.Х., Хакимов А.А., Сайитганиева З.Т. ....	123
ТЕСНАЯ СВЯЗЬ ОРХИДЕЙ С ГРИБАМИ-МИКОРИЗООБРАЗОВАТЕЛЯМИ Шейко Е.А., Крупа Н.Н. ....	124
МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ГНИЕНИЕ КОРНЕЙ ВИНОГРАДА, ПОРАЖЕННЫХ ФИЛЛОКСЕРОЙ В ТОВУЗСКОМ И ГАЗАХСКОМ РАЙОНАХ АЗЕРБАЙДЖАНА Шихлинский Г.М., Мамедова Н.Х. ....	126
ВЛИЯНИЕ ХРАНЕНИЯ НА ЗАРАЖЕННОСТЬ СЕМЯН ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ГРИБАМИ РОДА <i>FUSARIUM</i> Шипилова Н. П. ....	128
ПОРАЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ БОЛЕЗНЯМИ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ Шпанев А.М., Смук В.В.....	129
ПОРАЖЕНИЕ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ ГРИБНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ НЕЧЕРНОЗЕМЬЯ Шпанев А.М., Рогожникова Е.С.....	131
ДИВЕРГЕНЦИЯ ВИДА <i>PUCCINIA GRAMINIS PERS.</i> , ВОЗБУДИТЕЛЯ СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЫ ЗЛАКОВ Сколотнева Е.С., Коломиец Т.М. ....	132
ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКОБИОТЫ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЙ АРМЕНИИ Согоян Е.Ю., Нанагюлян С.Г. ....	134
ЭНДОФИТНЫЙ ШТАММ <i>V. SUBTILIS</i> 26Д СТИМУЛИРУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ПАТОГЕНАМ И ВРЕДИТЕЛЯМ, АКТИВИРУЯ ТРАНСКРИПЦИЮ ЖАСМОНАТ-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ Сорокань А.В., Абизгильдина Р.Р., Юлдашев Р.А., Китаев К.А., Максимов И.В. ....	136
ИЗУЧЕНИЕ РОССИЙСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА ЗЕРНА С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИЛОКУСНОГО ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА Стахеев А.А., Завриев С.К. ....	139
ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ <i>FUSARIUM CULMORUM</i> В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР Стахеев А.А., Щербакова Л.А., Завриев С.К. ....	141
ВЛИЯНИЕ ФОРМ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА И НЕКОТОРЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА <i>FUSARIUM CULMORUM</i> Струнникова О.К., Вишневская Н.А., Бородина Е.В., Шондина О.В. ....	144
ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В РИЗОСФЕРЕ ТРАНСГЕННОГО ТАБАКА Широких А.А., Назарова Я.И., Рябова О.В., Широких И.Г. ....	146
ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ <i>PUCCINIA TRITICINA</i> ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ И SSR-МАРКЕРАМ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ РФ Шайдаук Е.Л., Е.И. Гульятыева, Казарцев И.А. ....	148

ВОЗМОЖНОСТЬ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОКОНТРОЛЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ИНФИЦИРУЮЩИХ РАСТЕНИЯ ПРИ Пониженных Температурах, С ПОМОЩЬЮ ПСИХРОФИЛЬНЫХ АНТАГОНИСТОВ Шербакова Л.А., Шумилина Д.В., Сметанина Т.И., Супрунова Т.П., Кузнецова М.А. ....	149
ВИДОВОЙ (ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ) СОСТАВ ГРИБОВ-ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ДЕКОРАТИВНЫХ ДРЕВЕСНО-КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЙ В ПИТОМНИКАХ БЕЛАРУСИО Тимофеева В.А., Головченко Л.А., Войнило Н.В., Линник Л.И. ....	150
ВОЗБУДИТЕЛИ СНЕЖНЫХ ПЛЕСЕНЕЙ И КОНТРОЛЬ ИХ ЧИСЛЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ Ткаченко О.Б., Шуковская А.Г. ....	152
НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ ФИТОПАТОГЕНННОГО ГРИБА <i>VERTICILLIUM DANTLAE</i> , РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ, И ИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С РАСТЕНИЯМИ ХЛОПЧАТНИКА Власова Т.А., Агеева И.В., Братковская Л.Б. ....	153
ВИДОВОЕ И ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФИТОПАТОГЕНОВ ОЗИМЫХ КОЛОСОВЫХ КУЛЬТУР НА ЮГЕ РОССИИ Волкова Г.В., Кремнева О.Ю., Шумилов Ю.В., Синяк Е.В., Ваганова О.Ф., Данилова А.В., Трофимова И.А. ....	155
МИКОБИОТА ЗЕРНА ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ Волкова Т.Н., Селина И.В., Созинова М.С., Осипов В.В. ....	156
АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ УСТОЙЧИВОСТИ ИВ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ Воробьева И.Г., Томошевич М.А. ....	158
ВИРУЛЕНТНОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ <i>RUSSINIA TRITICINA</i> ERIKSS. НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО И СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО РЕГИОНОВ РОССИИ В 2013 ГОДУ Жемчужина А.И., Афолина С.В. ....	158
КРОСС-АДАПТАЦИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ СВЕРХ СИЛЬНЫХ СТРЕССОРОВ Юшкевич Т.И. ....	160
ЛОЖНАЯ МУЧНИСТАЯ РОСА – РАСПРОСТРАНЁННАЯ И ВРЕДНОСНАЯ БОЛЕЗНЬ ПОДСОЛНЕЧНИКА В РОССИИ Якуткин В.И. ....	161
ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПО АГРЕССИВНОСТИ ШТАММОВ <i>RHYTORHIZA INFESTANS</i> (MONT) DE VARY НА ФОРМИРОВАНИЕ ЗАЩИТНОГО ОТВЕТА В РАСТЕНИЯХ <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> Яруллина Л.М., Новоселова Е.И., Умаров И.А., Ибрагимов Р.И. ....	162
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ СЕМЯН ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ СОРТА УЧИТЕЛЬ В БОРЬБЕ С КОРНЕВЫМИ ГНИЛЯМИ В ОРЕНБУРГСКОМ РАЙОНЕ Яфаров С.Ф. ....	164
АРОМАТНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ГРИБОВ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИХ БИОСИНТЕЗА Власенко Е. Н. ....	166



## Глава 10. ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ

doi: 10.14427/cmr.2015.v.10

### ИЗМЕНЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛИСТОВЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЯЧМЕНЯ В РОССИИ И БЕЛАРУСИ

Афанасенко О.С.<sup>1</sup>, Мироненко Н.В.<sup>1</sup>, Анисимова А.В.<sup>1</sup>, Баранова О.А.<sup>1</sup>,  
Зубкович А.А.<sup>2</sup>, Марчук О.В.<sup>2</sup>, Батакова О.Б.<sup>3</sup>, Муругова Г.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин

<sup>2</sup>Научно-практический центр НАНБ по земледелию, Жодино, Беларусь;

<sup>3</sup>Архангельский НИИСХ, Котлас, Россия;

<sup>4</sup>Приморский НИИ сельского хозяйства, п. Тимирязевский

В связи с изменениями климата, способов обработки почвы, нарушениями севооборотов, изменением генетической устойчивости промышленных сортов и бесконтрольной интродукции семенного материала происходит изменение видового состава возбудителей болезней с.-х. культур. Особенно это заметно на листовых пятнистостях злаков.

**Цель исследования** – определение видового состава возбудителей листовых пятнистостей ячменя в России и Беларуси.

**Материалы и методы.** Обследования посевов ячменя проведены в 2014 г. в 5 областях Беларуси и на территории Европейской части России: Северного Кавказа, Центрального района и Северо-Запада, а также в Приморском крае. Инфекционный материал в виде пораженных пятнистостями листьев собирали на производственных посевах ячменя, опытных делянках Государственных сортоучастков и в коллекционных посевах. Изоляцию грибов из пораженных листьев проводили по общепринятым методикам, с использованием модифицированной агаровой среды Чапека (ЧЛИМ) следующего состава: KCl – 0,5 г, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5 г, MgSO<sub>4</sub> – 0,5 г, мочевины – 1,2 г, лактоза – 20 г, агар-агар – 20 г на 1 л водопроводной воды. Моноспоровые изоляты были получены путем переноса отдельных конидий на свежую среду ЧЛИМ. Диагностику проводили как традиционными фитопатологическими методами – путем изучения морфолого-культуральных и микроскопических особенностей, так и с использованием молекулярной диагностики патогенов. ДНК изолятов грибов выделяли известным методом (MurRAY, Thompson, 1980).

Диагностику *Pyrenophora teres f. teres* (РТТ) и *P. teres f. maculata* (РТМ) проводили методом мультиплексной ПЦР с помощью специфичных праймеров, дающих в одной ПЦР оба диагностических фрагмента: 378 п. н для РТТ и 411 п. н. для РТМ (Williams et al, 2001).

Для идентификации *Ramularia collo-cygni* проводили ПЦР-тест со специфическими праймерами (Navis et al, 2006). В варианте «прямой» ПЦР: в реакционную смесь для ПЦР добавляли фрагмент

зараженного листа размером 0,5 × 0,5 мм. Для предотвращения ингибирования ПЦР использовали ДНК-полимеразу: КАРА Таq (КАРА Biosystems), диагностический фрагмент – 120 п. н.

**Результаты и обсуждение.** Основными возбудителями листовых пятнистостей ярового и озимого ячменя на территории Беларуси в 2014 г. были – *Pyrenophora teres f. teres*, *Cochliobolus sativus*, второстепенными *Blumeria graminis* и *Rhynhospodium secalis*. Методом молекулярной диагностики в ПЦР анализе было установлено, что в отдельных случаях симптомы округлой пятнистости на ячмене вызваны грибом *P. teres f. maculata*. Этот патоген был обнаружен в Ивановском районе Брестской обл., на промышленных посевах, импортированными из стран ЕС семенами ярового ячменя сорта Kangoos и сортах озимого ячменя Isocel, Salamandra, Nectaria. На основании того, что *Pyrenophora teres f. maculata* обнаружена только в посевах ярового и озимого ячменя интродуцированных из Западной Европы сортов, можно предположить, что импортные семена послужили «переносчиком» новой формы очень вредоносной болезни ячменя.

Новый для Краснодарского края патоген *P. teres f. maculata*, впервые обнаруженный нами в 2010 г. в коллекционных посевах опытного поля Краснодарского НИИ сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко (Анисимова и др., 2011), был выявлен повторно в этом же регионе в 2012 и 2013 гг. на интродуцированных сортах Escape (Дания) и Uschi (Германия).

В 2014 г. появилось первое упоминание о наличии в коллекционных посевах ячменя Приморского края spot-формы возбудителя сетчатой пятнистости *P. teres f. maculata* (Калантаевская, Муругова, 2014). Однако это утверждение было основано только на визуальной диагностике симптомов болезни. Проведение молекулярной диагностики показало, что изоляты гриба, выделенные из отдельных пятен округлой формы, симптоматически сходных с поражениями, вызываемыми *P. teres f. maculata*, из листьев сортов Приморский 189 и Приморский 207 представляют смесь двух форм патогена – *P. teres f. maculata* и *P. teres*

*f. teres*. Таким образом, подтверждена информация о наличии *P. teres f. maculata* в условиях Приморского края РФ. При молекулярном тестировании 90 изолятов *P. teres* из популяций Северо-запада России spot-форма *P. teres* не обнаружена.

В настоящее время возбудитель spot-формы *P. teres* не является преобладающим патогеном ячменя в исследуемых районах России и Беларуси. Однако наличие в патогенной микофлоре данного возбудителя представляет опасность его распространения, адаптации и усиления вредоносности. Примером такого сценария является изменение патогенного комплекса ячменя в Австралии (McLean et al., 2010). До конца прошлого века преобладающим патогеном юго-востока Австралии являлась net-форма *P. teres*.

В связи с тем, что ячмень занимает значительную долю в общем производстве зерновых культур, а основным лимитирующим фактором являлась сетчатая пятнистость, сортовая политика была направлена на возделывание устойчивых сортов. Однако это привело к значительному снижению запаса инокулюма *P. teres f. teres* и возрастанию экономического значения *P. teres f. maculata* (Hollaway, McLean, 2009). Потери урожая ячменя от этой формы патогена могут достигать 44% (Jayasena et al., 2007).

В виду различной генетической детерминации устойчивости ячменя к net- и spot- формам, выявление в промышленных посевах *P. teres f. maculata* предполагает необходимость проведения комплексных исследований по изучению генетического разнообразия устойчивости ячменя для обеспечения селекции эффективными в условиях России и Беларуси донорами устойчивости.

В 2011 г. эпифитотийное развитие пятнистости неизвестной этиологии мы наблюдали на озимых сортах ячменя Платон и Cinderella в Краснодарском крае. Проведение фитопатологической и молекулярной диагностики показало, что причиной сильного поражения ячменя являлся возбудитель рамуляриоза несовершенный гриб *Ramularia collo-cygni* Sutton & Waller. (Афанасенко и др., 2012).

Впервые как вредоносное заболевание рамуляриоз ячменя был описан в 1987 г. в Австрии (Huss et al., 1987), затем появились сообщения о сильном поражении ячменя в других Европейских странах, таких как Германия (Sachs, 1999), Шотландия (Oxley et al., 2004), Чехия (Minarikova et al., 2004), Швеция (Djurle, Rasmussen, 2006). В настоящее время рамуляриоз ячменя относится к числу экономически значимых болезней в Европе (Pinnschmidt, Novmoller, 2004) и Новой Зеландии (Crome et al., 2002). Потери урожая на восприимчивых сортах могут достигать 10 ц/га и выше (Reitan, Salamati, 2006).

Особенностью инфекционного процесса рамуляриоза ячменя является отсутствие симптомов болезни до фазы выколашивания. После выколашивания верхние листья сначала желтеют, а затем очень быстро отмирают. Поскольку для *R. collo-cygni* характерно наличие длительного бессимптомного периода развития от кущения до начала колошения, а вызы-

ваемую этим патогеном пятнистость легко спутать с физиологической, молекулярная диагностика особенно актуальна.

Кроме известного ПЦР-теста (Navis et al., 2006), мы использовали ПЦР диагностику *R. collo-cygni* в тканях больного растения методом «прямой» ПЦР, т.е. без выделения патогена в чистую культуру, путем добавления в реакционную смесь фрагмента зараженного листа. В образцах из Архангельской обл. было доказано наличие возбудителя в пораженных растениях; в условиях Беларуси *R. collo-cygni* не выявлен. По-видимому, в Архангельскую обл. инфекция была занесена с семенным материалом, а аномально жаркое лето 2013 г. в этом регионе привело к проявлению болезни. Зарубежный опыт исследований свидетельствует, что основными способами защиты ячменя от этой болезни являются возделывание устойчивых сортов и своевременное использование эффективных фунгицидов.

**Выводы.** Таким образом, выявленная впервые на территории РФ в Краснодарском крае и Приморье, а также Беларуси spot-форма *P. teres f. maculata* и на территории Краснодарского края и Архангельской обл. *R. collo-cygni* являются новыми для России и Беларуси болезнями ячменя, по-видимому, интродуцированными с зараженными семенами из Европы. Эти патогены могут явиться причиной эпифитотийного развития пятнистостей ячменя при благоприятных для развития болезней условий.

*Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-04-90039 Бел\_а, БРФФИ № Б14Р-137 и № 14-04-00399\_а.*

#### Список литературы

1. Murray HG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucl Acids Res. 1988; 16: 4321-5.
2. Williams KJ, Smyl C, Lychon A et al. Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens causing spot form and net form of net blotch of barley. Australasian Plant Pathol. 2001; 30: 37-44.
3. Navis ND et al. Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. FEMS Microbiol Lett. 2006; 256: 217-23.
4. Анисимова А.В., Мироненко Н.В., Левштанов С.А. Первая находка гриба *Pyrenophora teres f. maculata* в Краснодарском крае. Вестн. защ. раст. 2011; 3: 53-56.
5. Калантаевская О.Т., Муругова Г.А. Исходный материал ярового ячменя, устойчивый к сетчатому гелиминтоспориозу в условиях Приморского края. Вестн. защ. раст. 2014; 2: 64-6.
6. McLean MS, Howlet BJ, Hollaway GJ. A spot form of net blotch, caused by *Pyrenophora teres f. maculata*, is the most prevalent foliar disease of barley in Victoria, Australia. Australasian Plant Pathol. 2010; 39: 46-9.
7. Hollaway GJ, McLean MS. Net blotches of barley. Agriculture. Notes. 2009 (Department of Primary Industries: Horsham).

8. Jayasena KW, Van Burgel A, Tanaka K et al. Yield reduction in barley in relation to spot-type net blotch. Austral Pl Pathol. 2007; 36: 429-33.
9. Афанасенко О.С., Хэвис Н., Беспалова Л.А., Аблова И.Б., Марьенко В.И. Рамуляриоз – новая для России болезнь ячменя. Защ. карантин раст. 2012; 1: 11-3.
10. Huss H, Mayerhofer H, Wetschnig W. Ophiocladium hordei CAV (Fungi imperfecti), ein fur Osterreich neuer parasitischer Pilz der Gerste. Der Pflanzenarzt. 1987; 40: 167-9.
11. Oxley SJP, Havis ND. The development of Ramularia collo-cygni on spring barley and its impact on yield. The Dundee Conf Crop Protect in Northern Britain. 2004: 147-52.
12. Minarikova V, Marik P, Stemberkova L. Occurrence of a new fungal pathogen on barley, Ramularia collo-cygni, in the Czech Republic. Proc 2nd Intern Workshop on Barley Leaf Blights, ICARDA, Aleppo, Syria, April 2002. 2004: 360-4.
13. Djurle A, Rasmussen M. Ramularia leaf spot in barley. A new disease in Sweden? Proceed 1st Europ Ramularia Workshop. March 2006, Gottingen, Germany. 2006: 45.
14. Pinnschmidt HO, Hovmoller MS. Ramularia, a new disease of barley – a review of present knowledge. DJF Rep. 2004; 89: 313-21.
15. Cromeley MC, Harvey IC, Sheridan JE, Grbavac N. Occurrence, importance and control of Ramularia collo-cygni in New Zeland. Proceed 2nd Intern Workshop on Barley Leaf Blights, ICARDA, Aleppo, Syria, April 2002. 2004: 337-42.
16. Reitan L, Salamati S. Field screening in Norway for resistance to Ramularia collo-cygni in old and new barley material. Proc 1st Eur Ramularia Workshop. March 2006, Gottingen, Germany. 2006: 73-82.

## ИСПЫТАНИЕ СОРТОВ И ЛИНИЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА (АКМОЛИНСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Ахметова А.К.<sup>1,2</sup>, Каратаева Р.К.<sup>2</sup>, Сулейменов Р.М.<sup>2</sup>, Зеленский Ю.И.<sup>1</sup>, Моргунов А.И.<sup>1</sup>,

Жапаев Р.К.<sup>1</sup>, Карабаев М.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Международный центр улучшения пшеницы и кукурузы (СИММИТ), Мексика

<sup>2</sup>НПЦ зернового хозяйства им. А.И.Бараева, Акмолинская область, Казахстан

Урожайность зерна яровой твердой пшеницы в Северном Казахстане значительно зависит от влияния абиотических и биотических факторов. Исследователи неоднократно устанавливали потери зерна в результате поражения посевов пшеницы листовой ржавчиной (*Puccinia triticina*) [1]. Возделываемые сорта имеют тенденцию к поражению казахстанскими расами листовой ржавчины и создание высокоурожайных, устойчивых к болезням сортов является важнейшей задачей устойчивого растениеводства [2].

В рамках двухлетних исследований (2013–2014 гг.) испытывался селекционный материал твердой пшеницы, состоявший из 17 линий конкурсного сортоиспытания (КСИ, лаб. твердой пшеницы, НПЦЗХ), 36 образцов экологического сортоиспытания (ЭК) из Казахстана, России, Италии, Канады и 12-го питомника Казахстанско-Сибирской сети по улучшению пшеницы (КАСИБ). Инокулюм ржавчины представлен НИИ проблем биологической безопасности (п. Гвардейский, Жамбылская область, Казахстан) в виде 6 определенных патотипов и одной не идентифицированной популяцией (табл. 1).

Все образцы высевались в оптимальные для данного региона сроки на полевом участке НПЦЗХ в условиях искусственного инфекционного фона. Инокуляция проводилась в фазе трубкования–начало колошения путем смешивания патотипов с последующей оценкой через 10–12 сут. За сезон проводилось

по 2 оценки с интервалом 8–10 сут. Тип и интенсивность поражения проводились, соответственно, по шкалам Майнса и Джексона [3] и Петерсона [4].

В результате этих исследований выявлена устойчивость ко всем использованным патотипам в двухлетнем периоде у 76,5% линий яровой твердой пшеницы КСИ против 23,5% неустойчивых. У выделенных образцов в стадии взрослых растений в 2013–2014 гг. две линии (249-02, 143-00-1) продемонстрировали высокую резистентность с типом реакции «0». У остальных образцов наблюдалось «замедленное развитие» болезни от очень устойчивого типа реакции до умеренно устойчивого, то есть, от 0 до 2 с интенсивностью поражения 5–10%.

Жесткий инфекционный фон, состоящий из изолятов листовой ржавчины, позволил идентифицировать авирулентность к генам устойчивости, локализованных у большей половины образцов экологического сортоиспытания. У 24 сортов и линий типы реакции варьировали от 0 до 2. Интенсивность поражения листовой поверхности достигала лишь 10%. Гены устойчивости в образцах твердой пшеницы питомника 12-го КАСИБ оказались наиболее эффективно работающими против данных изолятов. В питомнике выделилось 11 образцов из 12 изучаемых (табл. 2).

Выделенные в результате проведенных испытаний 48 сортов и линий твердой пшеницы можно

Таблица 1. Устойчивые образцы твердой пшеницы к казахстанским изолятам листовой ржавчины в период 2013–2014 гг.

Образцы		Типы реакции, интенсивность поражения	
		ТНК/RJ, QBQ/GB ТТТ/QJ,	Раса 77, КТР/С, ТЈС/CD и не идентифицированная популяция с территории Казахстана
		Двукратная оценка	Однократная оценка
Конкурсное испытание	Линии 256-93-1, 257-97, 294-97-3, Эк 1458, 249-02, 21-04-1, 240-03-2, 54-02-2л, 54-03-3л, ЭК1474 htяр, 235-02-1, ЭК1458 h, 143-00-1 (Казахстан)	от 0 до 2/10	
Экологического сортоиспытания	Кустанайская 52, Асангали, Актобе 1, Актобе 2, Актобе 3, Актобе 6, Актобе 7, Актобе 8, Дамсинская 40, Сид 88 (Казахстан); Омский ко-рунд, Светлана (Россия); Maestrале, Saragolla, Meridiano, Levante (Италия); Candura (Канада); и др. Г 256 к/с, Az-2, 97-108-5, 98-21-5, 96-188-5, 94-25-6, Д-20-65	от 0 до 2/10	
КАСИБ	Гордеиформе 113/01, Л 18404, Гордеиформе 98-42-5, Каргала 1671, Гордеиформе 00-96-8, Каргала 1538 (Казахстан); Гордеиформе 616, 688д-4, Гордеиформе 677, 653д-44, Омский изумруд (Россия)	от 0 до 2/10	

Таблица 2. Соотношение селекционного материала – «устойчивые / восприимчивые» в питомниках КСИ, ЭКО и КАСИБ

Питомник	Страна-происхождение	Общее количество образцов, шт	Устойчивых		Восприимчивых	
			шт.	%	шт.	%
КСИ	Казахстан	19	13	68,4	6	31,5
ЭС	Казахстан	31	24	77,4	7	22,5
	Россия					
	Италия					
	Канада					
	Другие					
КАСИБ	Казахстан, Россия	12	11	91,7	1	8,3

рекомендовать для использования в селекционном процессе. Целесообразно идентифицировать Lg-генов устойчивости с целью контроля вирулентности патотипов листовой ржавчины к генам устойчивости в Акмолинской области, Северный Казахстан.

#### Список литературы

1. Койшыбаев М.К. Интегрированная защита зерновых культур от основных болезней в Северном Казахстане. Сб. тез. XV Межд н.-практ. конф. «Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана и Болгарии». г. Петропавловск. 2012: 365-7
2. Рсалиев Ш.С. Испытание и отбор сортов пшеницы, устойчивых к биотическим стрессам в условиях Казахстана и создание Интродукционно-карантинного питомника по зерновым культурам. Мат. н.-практ. совещ. «Итоги выполнения РНТП Ц0252 «Научно-техническое обеспечение и организация производства биотехнологической продукции в Республике Казахстан» 2001–2005 гг.». Астана. 2005: 256 с.
3. Mains EB, Jackson UC. Phytopathology. 1962; 16(1): 89-120
4. Peterson RF, Campbell AB, Hannah A. Diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. Can J Res Sect. 1948: 496-500.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФОМОЗА ПОДСОЛНЕЧНИКА В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Арасланова Н.М., Саукова С.Л., Ивевбор М.В., Антонова Т.С.  
Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур, Краснодар

Сведения о поражении подсолнечника грибами рода *Phoma* появились ещё в конце XIX века (Saccardo, 1880). В России впервые Алексеевой С.П. (1966), было установлено, что фомоз поражает листья, черешки, стебли и корзинки подсолнечника. Ею возбудитель болезни был идентифицирован как несовершенный гриб *Phoma helianthi* Алексеева (Алексеева, 1969). На других культурах М.В. Горленко и Д.В. Соколов в 1976 г. описали род *Phoma* как представителя класса Deuteromycetes, порядка Sphaeropsidales, генетически связанного с аскомицетами из родов *Leptosphaeria* и образующего в жизненном цикле телеоморфную и анаморфную стадии развития.

Сведения, появляющиеся в литературе, в основном, касались возбудителей фомоза других сельскохозяйственных культур. Упомянулось также и о наличие гриба на сухих стеблях подсолнечника. Анаморфы, поражающие подсолнечник в странах, его возделывающих, были отнесены разными авторами к разным видам.

Редкие сведения о видовой принадлежности возбудителя фомоза, поражающего вегетирующий подсолнечник, в разных странах разноречивы. Voerema et al. (2004) установили, что ранее известные анаморфы ошибочно были отнесены к *Phoma oleraceae* var. *helianthi-tuberosi* Sacc., являющимся синонимом вездесущего сапрофита *Phoma herbarum* Westend., sect. *Phoma*. Согласно систематике Voerema et al. (2004)

в настоящее время род *Phoma* включает 9 секций. *Phoma macdonaldii* относится к секции *Plenodomus*. Род связан с тремя различными телеоморфными родами: *Didymella*, *Leptosphaeria*, *Pleospora*.

Фомоз в посевах подсолнечника регионов РФ всегда был довольно частым явлением, также как во всех странах, возделывающих эту культуру. Так, в Белгородской области поражение подсолнечника фомозом в конце вегетации составляло 100 % с ограниченным развитием – до 10%. (Якуткин, 2005). В Краснодарском крае распространённость этой болезни отмечалась ежегодно и за период 1992–2004 гг. колебалась от 3 до 44 % (Бородин, Котлярова, 2006).

В 2012–2013 гг. нами было собрано более 500 образцов корней, черешков, листьев и стеблей на вегетирующих растениях подсолнечника с признаками фомоза. Возбудителя болезни выделяли в чистую культуру по общепринятой методике. Изучали культурально-морфологические признаки выделенных изолятов на питательной среде овсяный агар. Идентификацию проводили согласно систематике Voerema et al. (2004).

В годы исследований фомоз начал проявляться на растениях подсолнечника имеющих 3–4-х пары настоящих листьев. На вершине листа появлялось угловатое черное пятно, окаймленное желтым ореолом. Пятно увеличивалось и распространялось по листовой пластинке к черешку (рис. 1).



Рисунок 1. Симптомы поражения подсолнечника фомозом (ориг):  
а – поражение листа; б – стебля; в – фрагмент стебля с разрушенной грибом сердцевиной.

Пораженный лист подсолнечника засыхал, оставаясь на стебле. С черешка поражение переходило на стебель, на этом месте позднее (конец июля, начало августа) появлялись пикниды, которые располагались концентрическими кругами возле черешка под эпидермисом. Пятно увеличивалось вдоль стебля, достигая в длину 10–15 см, иногда опоясывая нижнюю часть стебля, повреждая только поверхностные ткани. При сильном поражении подсолнечника

сердцевина стебля полностью разрушалась. В сентябре некоторые пятна становились сероватыми (белесыми). Таковую окраску создавали гифы мицелия, которые находились как на поверхности, так и внутри стеблей. При продольном разрезе пораженных стеблей подсолнечника паренхима выглядела черной и рыхлой, вся была пронизана гифами мицелия. При помещении во влажную камеру таких стеблей через пять дней на мицелии появлялись пикниды.

Мицелий чистой культуры гриба на овсяном агаре в зависимости от изолята был нитевидный, по краю уплотненный, а реверс чашки Петри окрашен от светло серого до темно-оливкового цвета.

Пикниды на поверхности гиф мицелия появились на 3-й день после посева. Диаметр пикнид варьировал от 60–170 мкм. При повышенной влажности слизистое вещество внутри пикниды набухло и пикноспоры выходили из вместилищ в виде узкой ленты

белого, розового, серого (дымчатого) цвета. Лента из конидий, склеенных слизью, изгибалась, напоминая завитки спирали. Конидии эллипсоидные, яйцевидные одноклеточные прозрачные (бесцветные), располагались над пикнидой в капле экссудата (рис. 2). Размеры конидий от (4,5 – 10)×(1,5 – 4) мкм.

Телеоморфную стадию получали после хранения собранных с поля пораженных фомозом фрагментов стеблей подсолнечника в морозильной камере с тем-

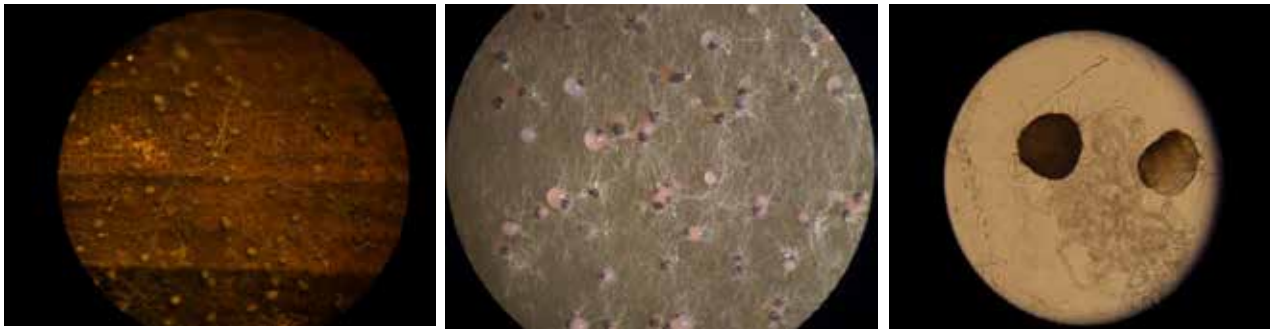


Рисунок 2. Пикниды и выход пикноспор *Phoma macdonaldii* Воерема (2004) (ориг):  
а – на пораженном стебле подсолнечника; б – в чистой культуре гриба на среде ОА;  
в – выход из пикниды пикноспор в виде узкой ленты

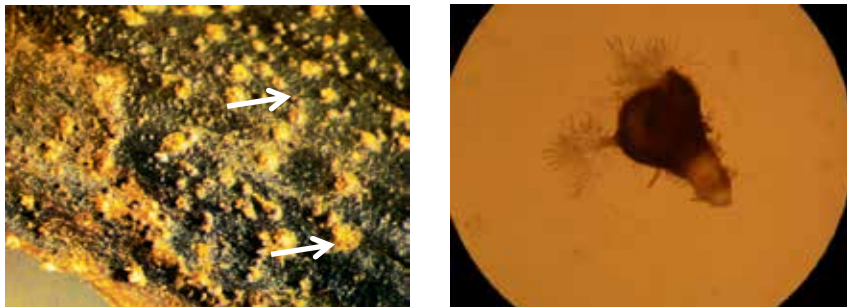


Рис. 3. Псевдотеции (указаны стрелками) на стебле подсолнечника (а);  
выход сумок и аскоспор (б) (ориг.)

пературой –18 °С. Через 3 мес отмывали поверхность стеблей стерильной водой и щеткой, раскладывали во влажную камеру и выдерживали в течение месяца. Псевдотеции образовывались очагами на фрагментах стебля и имели кувшинообразную форму размером 130–230 мкм; при их созревании выходили аски с аскоспорами (рис. 3). В каждой аске было 8 аскоспор, которые располагались однорядно с одной

или двумя перегородками. Парафизы находились между асками.

Культуральные признаки, полученные нами, соответствуют телеоморфной стадии *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi. Таким образом, все изученные изоляты возбудителя фомоза подсолнечника в Краснодарском крае представляют собой род *Phoma* вид *macdonaldii* Воерема с телеоморфной стадией *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi.

## ОСОБЕННОСТИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ *BIPOLARIS SOROKINIANA* (Sacc.) Shoemaker

Аимарина Л.Ф.

Сибирское отделение аграрной науки, пос. Краснообск. Новосибирская область

Для существования в природе в популяции возбудителей корневой гнили выработана адаптация к внешним факторам окружающей среды, т.е. совокупность свойств и признаков, обеспечивающих им возможность жизнедеятельности в определенных условиях. Этот процесс осуществляется посредством адаптивных стратегий жизненного цикла, в которых выделяют три наиболее важные тактики: размножения (Р), выживания (В) и трофических связей (Т) [1].

Основной возбудитель корневой гнили гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker относится к факультативным сапротрофам. Совершенная стадия в его цикле не имеет большого значения [2]. Гриб размножается и сохраняется в природе конидиями, которые образуются на развитых конидиеносцах и сохраняются в почве до 3–5 лет (рис. 1).

В жизненном цикле гриба паразитическая фаза связана с пребыванием его на растении-хозяине

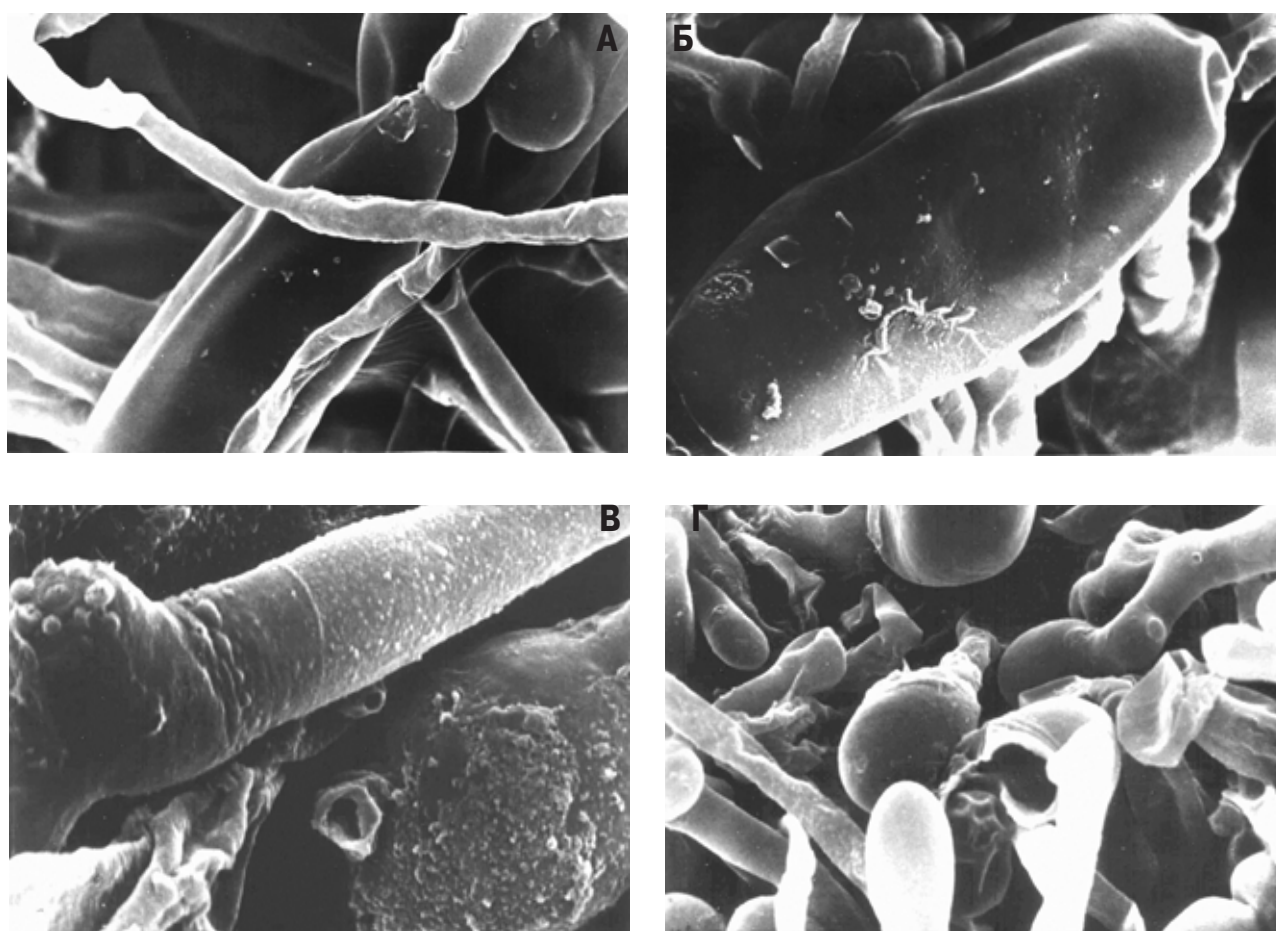


Рисунок 1. Морфология гриба *B. sorokiniana*. (сканирующий микроскоп):

А – конидия на конидиеносце,  $\times 200$ ; В – конидия гриба,  $\times 3800$ ;

С – конидиеносец  $\times 4200$ ; Д – молодые конидии с конидиеносцами,  $\times 3600$

(яровая пшеница, ячмень и др.). Для регулирования численности вредных организмов в агроэкосистемах решающее значение имеет выяснение источников массового воспроизводства, т.е. объекта, который служит местом естественного выработанного в процессе эволюции, размножения, из которого они выделяются жизнеспособными во внешнюю среду.

С этой целью нами в агроценозе и естественном фитоценозе лесостепи Западной Сибири проведено

изучение динамики споруляции гриба *B. sorokiniana* для уточнения тактик его размножения.

Установлено, что интенсивность споруляции патогена на разных органах яровой пшеницы была в течение вегетации различной. Наиболее обильное спороношение гриба было на влагилицах и листовых пластинках прикорневых листьев. На этих органах формировалось в среднем 91,2% спор от числа всей популяции возбудителя на растении пшеницы [3].

Эта тенденция подтвердилась во все годы исследования. Среднее количество спор в 1 г сухой массы субстрата прикорневых листьев составило в среднем  $91,5 \times 10^3$  спор. На первичных и вторичных корнях гриб спорулировал слабее, средняя численность конидий составляла 3,5% от общего числа. Самое минимальное число спор зарегистрировано на узле кущения и стебле. В течение вегетации наблюдалось нарастание споруляции гриба, достигающей максимума в июле–августе.

Переход гриба из вегетирующего состояния к массовому образованию спор является следствием истощения растительного субстрата, что связано с отмиранием органов у растений. Прикорневые влагища и листья раньше заканчивают свои физиологические функции, и на них гриб начинает реализацию накопленных веществ в конидии. Полученные нами данные о споруляции гриба *B. sorokiniana* в основном на надземных органах (прикорневые влагища и листья), полностью согласуются с результатами исследований Н.Н. Ждановой и А.И. Василевской [4], которые установили, что освещение темноокрашенных гифомицетов стимулирует спорообразование.

Поскольку гриб содержит пигмент меланиновой природы, обладающий фотозащитным действием по отношению к УФ-лучам, поэтому тот факт, что максимальное образование конидий гриба *B. sorokiniana* происходит на органах, подвергающихся естественному облучению, становится понятным и экологически обоснованным.

Установлена характерная циркуляция нарастания и спада численности конидий гриба в почве [5–6]. Эта закономерность прослежена нами в течение всех исследуемых лет. Пики нарастания численности конидий гриба в почве совпадали с максимальной споруляцией его на влагищах и листовых пластинках прикорневых листьев в этот период. Наибольшая численность отмечена нами в конце июля–августа и достигала 100 конидий в 1 г воздушно-сухой почвы, в то время в почве естественного ценоза численность возбудителя не превышала 10 конидий. Затем численность патогена в почве снижалась. Аналогичные данные получены SH Chinn [7], проводившим исследование в Саскачеване.

В начале вегетации в среднем за годы исследований численность возбудителя в агроценозе на глубине 3–20 см была в 1,3 раза ниже, чем в поверхностном слое. Это связано с тем, что в более глубоких слоях почвы конидии патогена подвергаются действию различных отрицательных факторов. Одним из них является наследственная способность конидий *B. sorokiniana* к прорастанию и последующему лизису. Конидии гриба, попадающие на почву и находящиеся в стадии покоя, частично погибают за счет действия микрофлоры почв [8]. Проведенное изучение качественного состояния конидий в почве, подтверждает это предположение (рис. 2).

Наибольшее число конидий в почве отмечено в августе месяца, что связано с интенсивной споруляцией патогена в это время на прикорневых листьях.

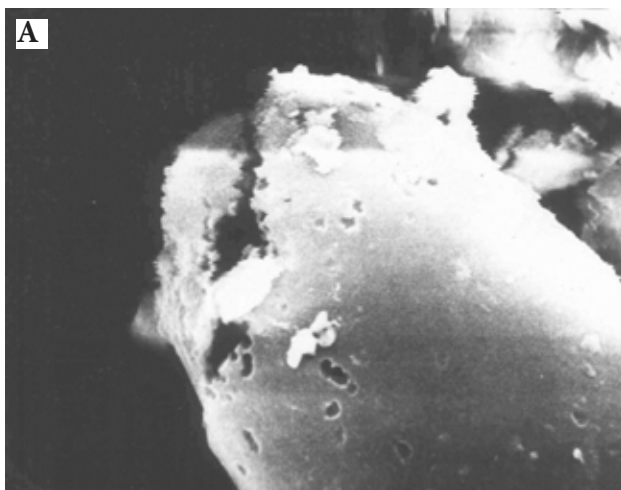


Рисунок 2. Состояние конидий гриба *B. sorokiniana* в почве:  
А – перфорированная конидия,  $\times 4200$ ; Б – разложившиеся конидии,  $\times 3200$

Коэффициент корреляции между численностью патогена в почве и интенсивностью споруляции на прикорневых листьях был достоверно высоким ( $r = 0,99$ ). В конце вегетации отмечено преобладание числа спор гриба в поверхностном слое, за счет попадания в осенний период на поверхности почвы инфицированных прикорневых листьев. Полученные результаты свидетельствуют, что гриб *B. sorokiniana* относится к патогенам с низким потенциалом размножения

в течение вегетационного периода, что установлено впервые в отношении этого возбудителя.

Важным моментом в жизненном цикле *B. sorokiniana* является существование его на растительных остатках в сапротрофной фазе. Обладая слабой конкурентной способностью, патоген заметно вытесняется в почве грибами и особенно бактериями [9]. С целью выяснения роли растительных остатков, как фактора передачи инфекции была изучена динамика



их зараженности в агро- и естественных фитоценозах. Проведенные исследования показали, что уровень заселенности пожнивных растительных остатков грибом *B. sorokiniana* был высокий и составлял от 40 до 71,5% [10].

Учитывая высокий уровень зараженности растительных остатков осенью, была изучена скорость их разложения в почве. Установлено, что разложение растительных остатков, помещенных весной в почву агро- и естественного ценозов, составило к концу вегетации 30% от исходного уровня. Изучение микробиологической активности исследуемых почв показало, что она ниже по сравнению с европейскими, что и привело к слабому разложению растительных остатков. Доказательством последнего также служит тот факт, что в агроценозе не произошло вытеснение гриба *B. sorokiniana* с естественно зараженных растительных остатков микрофлорой почвы, т.к. уровень заселенности грибом составил 19% (при исходной 17%). Это подтверждает роль растительных остатков как факторов передачи инфекции.

Основным источником передачи основного возбудителя гриба *B. sorokiniana* является почва. В агроценозе, в отличие от естественного ценоза, происходит к концу вегетации массовое накопление спор гриба, обусловленного его споруляцией на прикорневых листьях растения-хозяина. Скорость роста популяции *B. sorokiniana* как типичного К-стратега возрастает только к концу вегетации. В связи с этим снижение исходной популяции возбудителя имеет решающее значение в оздоровлении почв.

Поступающие пожнивные растительные остатки имеют высокий уровень заселенности *B. sorokiniana* и полностью не разлагаются (только 30%) в осенний период. Их обеззараживание происходит в течение следующего вегетационного периода, наиболее интенсивно этот процесс происходит в глубоких слоях почвы. Растительные остатки и семена являются дополнительными факторами передачи гриба *B. sorokiniana*.

С целью выяснения первичной экологической ниши возбудителя в пределах органов растения-хозяина была изучена динамика заражения различных органов растений яровой пшеницы и, как показали результаты микологического анализа, их зараженность была неодинакова в течение вегетации. Гриб в большей степени заражал надземные органы, чем подземные. Пики инфицирования надземных и подземных органов четко совпадали со споруляцией *B. sorokiniana* в этот период. Установлено наличие тесной зависимости между зараженностью и числом образующихся спор на прикорневых листьях пшеницы  $r = 0,997 \pm 0,065$ .

Полученные нами данные подтверждают тесную взаимосвязь всех тактик жизненного цикла гриба *B. sorokiniana*. Заражая растение-хозяина, он накапливает вегетативную массу в форме мицелия преимущественно на прикорневых листьях (тактика Т-трофическая связь), затем происходит его массовое размножение (тактика Р-размножение), образу-

ющиеся конидии попадают в почву вместе с растительными остатками (тактика В-выживания). Таким образом, происходит его циркуляция в агроценозе в пространстве и во времени.

Поскольку массовое размножение возбудителя происходит в конце вегетации на прикорневых листьях растений яровой пшеницы, то прикорневые листья можно отнести к основной экологической нише возбудителя. В связи с этим для снижения численности патогена в агроценозе необходимо возделывать устойчивые сорта или сорта пшеницы с невысокой интенсивностью спорообразования [11].

Т.к. интенсивность споруляции гриба нарастает к концу вегетации, когда яровая пшеница заканчивает вегетационный период, для прогноза вредоносности болезни в следующем году обследование почв патогеном необходимо проводить осенью, когда массовая споруляция заканчивается.

#### Список литературы

1. Чулкина В.А. Биологические основы эпифитотииологии. М.: Агропромиздат. 1991: 288 с.
2. Tinline RD. Cochliobolus sativus. IV. Drug-resistant, color and nutritionally exacting mutants. Canad J Bot. 1961; 39(7): 1695-704.
3. Ашмарина Л.Ф., Павлова О.И. Споруляция гриба *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Schoem. в агро- и естественном ценозах. Науч.-техн. бюл. СибНИИЗХим. 1985; 39: 35-8.
4. Жданова Н.Н., Василевская А.И. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. Киев: Наук. думка. 1982: 168 с.
5. Ашмарина Л.Ф., Чулкина В.А. Особенности видового состава и динамики численности *Bipolaris sorokiniana* и видов рода *Fusarium* в агро- и естественных фитоценозах Антропогенная экология микромитетов: аспекты математического моделирования и охрана окружающей среды. Киев. 1989: 80-1.
6. Ашмарина Л.Ф., Горобей И.М. Видовой состав и динамика болезней ячменя в лесостепи Западной Сибири. Сиб. вестн. с.-х. науки. 1997; 3/4: 61-65.
7. Chinn SHF. Changes in the spore population of *Cochliobolus sativus* in Saskatchewan wheat fields. Canad J Plant Sci. 1965; 45(3): 288-91.
8. Papavizas GC, Lumsolen RD. Biological control of soilborne fungal propagules. Annu Rev Phytopathol. 1980; 18: 389-413.
9. Чумаков А.Е. Роль биотических факторов в ограничении почвенной инфекции *Helminthosporium sativum* P., K. et B. как возбудителя корневой гнили пшеницы Тр. ВНИИ защ. раст. 1948; 1: 43-6.
10. Ашмарина Л.Ф. Видовой состав и соотношение основных возбудителей корневой гнили яровой пшеницы в Западной Сибири. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Киев. 1984: 19 с.
11. Ашмарина Л.Ф. Совершенствование защиты зерновых культур от болезней и вредителей в Западной Сибири. Автореф. дис. ... докт. с-х наук. Новосибирск. 2005: 32 с.

## КРАТКОВРЕМЕННОЕ ОСВЕЩЕНИЕ СПОР *MAGNAPORTHE ORYZAE* ПОВЫШАЕТ ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ И АГРЕССИВНОСТЬ

Аверьянов А.А.<sup>1</sup>, Ланикова В.П.<sup>1</sup>, Пасечник Т.Д.<sup>1</sup>, Baker С.Ј.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский институт фитопатологии, Б. Вяземы Московской области,  
<sup>2</sup>Agricultural Research Service USDA, Beltsville, USA

Паразитические микробы, поражающие надземную часть растений, сталкиваются с неблагоприятными факторами, от преодоления которых зависит успех колонизации хозяина. Сюда относятся активные формы кислорода (АФК), образуемые растениями и участвующие в механизме устойчивости к патогенам, по крайней мере, биотрофным. Микробы могут сталкиваться с АФК хозяина уже в инфекционных каплях. Так, капельными диффузатами зараженных пирикулярриозом листьев устойчивых сортов риса образуют супероксидный радикал  $O_2^{\cdot-}$ , при участии которого (а также гидроксильного радикала  $OH^{\cdot}$  и перекиси водорода) диффузаты подавляют прорастание спор возбудителя болезни (*Magnaporthe oryzae* Couch et Kohn) [1]. Патогенные грибы, как и любые аэробы, сами образуют АФК [2]. В экстремальных условиях этот процесс избыточен и тоже наносит ущерб патогену.

В то же время, умеренный окислительный стресс способен вызывать антиокислительную адаптацию, позволяющую затем выдержать более сильный стресс. Мы попытались выяснить, как эти закономерности, известные на многих примерах, проявляются при пирикулярриозе.

В качестве природного экстремального абиотического фактора было выбрано облучение видимым светом. Оно, как известно, способно вызывать окислительное повреждение. Ранее [3] установлено, что споры (конидии), собранные с культуры *M. oryzae*, выращенной при ежедневном 12-час сравнительно слабом освещении 2 кЛк более устойчивы, чем споры с затемненной культуры, к некоторым неблагоприятным факторам. Это – более интенсивный свет 10 кЛк, искусственно образованные АФК, а также диффузаты листьев. Важно, что такие споры и более агрессивны для восприимчивого хозяина.

**Цель работы** – выяснить, повышается ли толерантность спор *M. oryzae* к окислительному стрессу и их агрессивность после освещения не длительного, а кратковременного, и не мицелия, а лишь самих спор.

Установлено, что чем дольше освещали споры при 10 кЛк, тем сильнее подавлялось их прорастание. Подавление ослабляли экзогенные антиоксиданты, а именно, супероксиддисмутаза (СОД), тайрон, каталаза и перехватчики гидроксильного радикала маннит и формиат. Следовательно, в подавлении участвовали образованные спорами  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  и  $OH^{\cdot}$ .

Часовое освещение той же интенсивности не влияло на прорастание. Нас интересовало, повышает ли оно продукцию АФК. Для этого анализировали супероксидный радикал в диффузатах спор сразу после выключения света, а также через 4 и 23 ч последующего пребывания в темноте. В результате супероксид

был обнаружен только через сутки, причем в освещенном варианте – в большем количестве. Следовательно, даже безразличная для внешних проявлений развития доза света стимулирует образование АФК.

Мы проверили, может ли та же доза повышать толерантность спор к последующему окислительному повреждению. Для этого их после 1-часового освещения 10 кЛк помещали в 3 мМ раствор  $H_2O_2$  или же в реакционные смеси, образующие радикалы  $O_2^{\cdot-}$  (рибофлавин + метионин) или  $OH^{\cdot}$  (система Фентона). Еще через 4 ч подсчитывали прорастание. Последнее оказалось подавленным во всех трех химических системах, но у предварительно освещенных спор – в меньшей степени. Т.е. они были толерантнее к окислительному стрессу, чем затемненные.

Чтобы судить, успешнее ли они противостояли химической защите хозяина, споры проращивали в диффузатах зараженных листьев одного из трех устойчивых сортов Zenith, Raminad Str 3 или Tadukan. Во всех случаях прорастание было подавлено, но у предварительно освещенных спор – вновь слабее. Следовательно, засвечивание придавало им устойчивость к фунгитоксическим защитным реакциям растения.

Чтобы поверить, проявлялось ли это преимущество в способности вызывать болезнь, мы сравнили визуальные симптомы на восприимчивом сорте, который заражали затемненным или же освещенным 1 ч инокулюмом. В предыдущих опытах [3], где сравнивали споры, смытые с длительно освещенного или затемненного мицелия, различия в агрессивности обнаруживались только при пониженной инфекционной нагрузке. Поэтому освещенные и затемненные споры мы тоже испытали в разбавленных суспензиях.

Как и предполагалось, освещенные споры вызывали совместимые симптомы чаще, т.е. были агрессивнее, вероятно, в связи с большей толерантностью к защитным реакциям. Однако следует отметить, что при инфекционной нагрузке, оптимальной для заражения, исход был иным и, более того, противоположным. Иными словами, освещение спор, ослабляло их агрессивность. Такой неоднозначный результат, по-видимому, объясняется двойственным влиянием освещения.

С одной стороны, оно придает спорам толерантность к защитным реакциям растения, но, с другой, как показано выше, стимулирует выделение АФК, способные индуцировать эти реакции. По-видимому, споры в плотной суспензии выделяют относительно больше АФК. Последние стимулируют болезнеустойчивость растения, что оказывается весомее индуцированного светом повышения толерантности

патогена. Иными словами, свет действует на гриб неоднозначно, но при определенных условиях, в самом деле, может способствовать патогенности.

Определяли локализацию веществ, защищающих споры от окислительного стресса, а именно, их способности выделяться в окружающую среду. Для этого получали диффузаты проросших спор и проверяли способность этих препаратов защищать другие споры от вышеупомянутых неблагоприятных факторов. Нам не удалось обнаружить защиты от гидроксильного радикала, но она наблюдалась в остальных случаях, то есть от супероксида, перекиси водорода, а также диффузатов листьев. Следовательно, толерантность спор, по крайней мере, отчасти обусловлена внеклеточными продуктами.

Естественно было выяснить, стимулирует ли кратковременное освещение спор защитные свойства их экзометаболических. В большинстве случаев эффекта не было. Тем не менее диффузаты освещенных спор штаммов Ina 168 и Куи 82-395А достоверно лучше, чем в случае затемненных спор детоксицировали супероксидный радикал. Аналогично, освещение спор штамма Н5-3 усиливало способность их диффузата детоксицировать диффузат листьев устойчивого сорта Tadukan. Следовательно, светозависимая антиокислительная адаптация спор может быть обусловлена их экзометаболическими, правда, лишь в небольшой степени.

Мы не смогли судить о природе индуцируемых светом метаболитов гриба, ответственных за его толерантность к АФК. При длительном освещении мицелия наблюдается усиленное накопление меланинов в нем и спорах [3]. Антиокислительные свойства меланинов, в частности, грибных известны [4]. Однако синтез *de novo* меланина или других соединений в спорах вряд ли был причиной наблюдавшегося быстрого роста их антиокислительной толерантности. Вероятно, происходила мобилизация ранее накопленных антиоксидантов.

#### Список литературы

1. Пасечник Т.Д., Аверьянов А.А., Лапикова В.П. и др. Возможное участие активных форм кислорода в проявлениях вертикальной и горизонтальной устойчивости риса к пирикулярриозу. Физиол. раст. 1998; 45: 433-41.
2. Heller J, Tudzynski P. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu Rev Phytopathol.* 2011; 49: 369-90.
3. Николаев О.Н., Аверьянов А.А. Влияние трициклазола и диэтилдитиокарбамата натрия на антиокислительные свойства и патогенность гриба *Pyricularia oryzae* Cav. *Агрехимия.* 1991; 2: 110-17.
4. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol.* 1986; 24: 411-51.

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ОБРАЗОВАНИЕ ГАЛО ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ МУЧНИСТОРОСЯНОГО ПАТОГЕНА С КЛЕТКАМИ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ

Аветисян Г.А., Бабоша А.В., Аветисян Т.В.

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва

Развитие мучнисторосяных грибов приурочено к эпидермальной ткани растений-хозяев, и происходит на ее поверхности. Прорастание конидии происходит при оптимальных условиях уже через несколько часов после попадания конидий гриба на поверхность эпидермальной клетки растения. В месте контакта многих мучнисторосяных грибов на поверхности эпидермальной клетки образуются концентрические структуры, получившие название гало. Конидии *Erysiphe graminis* прорастают с образованием первичной ростковой трубки и затем аппрессориальной ростковой трубки, которая в дальнейшем формирует аппрессорий [1]. При взаимодействии с эпидермисом первичной ростковой трубки образуется малое гало, лопасти аппрессория – большое гало, которые заметны на 2–4 сут после инокуляции.

Как известно, перекись водорода является медиатором индуцированной устойчивости [2]. Многие исследователи, изучавшие механизм действия перекиси водорода, отмечали, что предварительная обработка растений экзогенной перекисью водорода дает

начало серии биохимических изменений, которые индуцируют устойчивость к патогену [3, 4]. При инфицировании листьев ячменя *E. graminis* f. sp. *hordei* образуется перекись водорода, которая, по-видимому, участвует в утолщении клеточной стенки растения-хозяина, что затрудняет процесс проникновения гриба [5].

Ранее нами было показано, что при обработке перекисью водорода происходит увеличение размеров гало [6]. В данной работе изучали влияние экзогенной перекиси водорода на особенности распределения гало по размерам.

Инфицированные *E. graminis* f. sp. *tritici* отделенные листья пшеницы обрабатывали перекисью водорода в концентрации 1 мМ в чашках Петри на плаву. В контроле использовали дистиллированную воду. Для цитохимического выявления гало инфицированные участки эпидермиса снимали с абаксиальной стороны листа через 3 сут после инокуляции патогена и окрашивали с использованием амидочерного. Определение размеров гало было выполнено по цифровым изображениям, выведенным с микроско-

па Carl Zeiss на компьютер с использованием пакета программ ImageJ].

При обработке перекисью водорода происходило увеличение размеров гало. В контроле средний диаметр гало составлял  $65,7 \pm 3,3$ , а при действии перекиси  $131,5 \pm 17,3$ . Особенностью действия перекиси водорода в наших опытах было появление очень

крупных и отличающихся по окраске и структуре гало. Среди них встречались крупные слабо окрашенные однотонные фиолетово-серые гало, а также крупные практически неокрашенные гало с узкими четкими кольцами темно-серого, пурпурного или синего цвета. Этот тип гало встречался в опытных вариантах наряду с гало, которые были похожи на

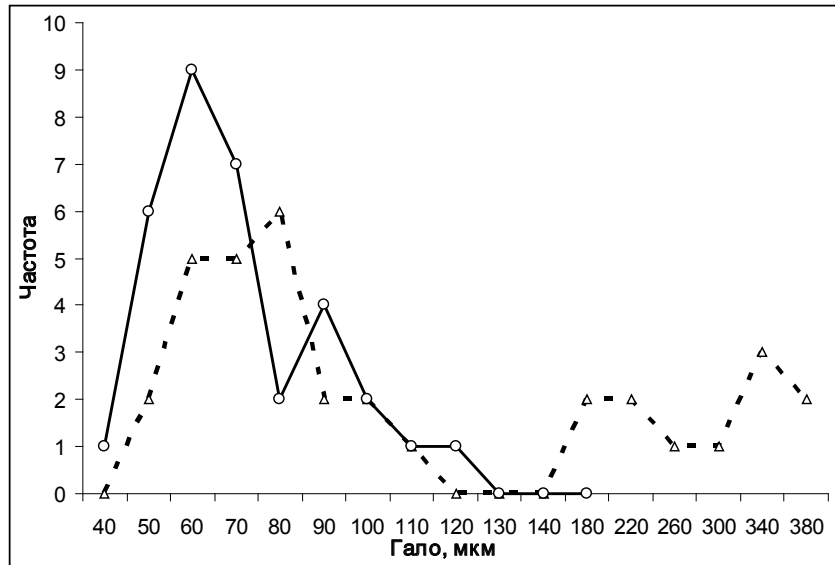


Рисунок 1. Распределение значений диаметра гало в контроле (сплошная линия) и при обработке 1 мМ перекиси водорода (пунктир).

гало в контроле. В связи с наличием двух групп гало, резко различающихся по своим параметрам, нами были изучены особенности статистического распределения значений диаметра большого гало в контроле и при обработке 1 мМ  $P_2O_2$  (рис. 1).

Как видно из рисунка, характер распределения диаметра гало в контроле близок к нормальному. Распределение в варианте с обработкой перекисью водорода имело выраженный бимодальный характер. График распределения в этом случае помимо пика со средними значениями (50 – 110 мкм), несомненно превышающими контрольные, имел дополнительные элементы, соответствующие гало аномально большого размера (160 – 300 мкм). Таким образом, в варианте с обработкой перекисью водорода имеется 2 типа гало, резко отличающиеся по размерам. В связи с отличием распределения в одном из вариантов от нормального, для их сравнения дополнительно использовали непараметрический метод медианы [7], который также показал высокую достоверность стимулирующего действия перекиси водорода ( $p < 0,005$ ).

Таким образом, размеры гало в местах контакта растения и патогена являются параметром, зависящим от физиологических воздействий, в частности, обработки прооксидантами. При этом увеличение средних значений диаметра происходило благодаря появлению в некоторых сайтах контакта растения и патогена очень крупных гало с аномальной структурой. Это свидетельствует о гетерогенности клеток

эпидермиса растения по реакции на взаимодействие с мучнисторосяным патогеном, которое проявляется в обработанных перекисью водорода растениях и, возможно, у растений в условиях стресса при увеличении уровня активных форм кислорода.

#### Список литературы

1. Kunoh H, Kunoh K, Ishizaki H. Cytological studies of the early stages of powdery mildew in barley and wheat. XI. Autofluorescence and galos at penetration sites of appressoria of *Erysiphe graminis hordei* and *Erysiphe pisi* on barley coleoptiles. *Can J Bot.* 1985; 63: 1535-9.
2. Baek K-H, Rajashekar CB. Hydrogen peroxide reduces hypoxia in germinating bean seeds. *Hort Science.* 2000; 35: 427-8.
3. Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell.* 1994; 6: 65-74.
4. Feng H, Li X, Duan J et al. Chilling tolerance of wheat seedlings is related to an enhanced alternative respiratory pathway. *Crop Sci.* 2008; 48: 2381-8.
5. Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD et al. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol.* 2008; 121: 267-80.
6. Аветисян Г.А., Бабоша А.В. Роль окислительного стресса в патогенезе мучнистой росы пшеницы. *Бюлл. ГБС.* 2009; 196: 158-65.
7. Урбах В.Ю. Биометрические методы. М: Наука. 1964.

## ПРЕОБЛАДАНИЕ ПРОДОЛЬНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО ОСИ ЛИСТА У ПЕРВИЧНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ СТРУКТУР ВОЗБУДИТЕЛЯ МУЧНИСТОЙ РОСЫ ПШЕНИЦЫ ПРИ ПРОРАСТАНИИ НА ЛИСТЯХ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЗЛАКОВ

Бабоша А.В., Рябченко А.С., Аветисян Т.В.

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва

**Актуальность проблемы.** В развитии значительного числа фитопатогенов присутствует эктофитная фаза, предшествующая проникновению в растительную клетку. Для мучнисторосяных грибов эктофитная фаза имеет особое значение, поскольку большая часть тела гриба (за исключением питающих структур – гаусторий) расположена на поверхности эпидермальной ткани растений-хозяев. Топография поверхности листа наряду с внутренними причинами, по-видимому, должна играть важную роль в детерминации направления роста и формы возникающих грибных структур (в частности, морфологии первичных инфекционных структур и формы колоний). Можно предположить существование адаптивных физиологических механизмов, определяющих оптимальное направление ростковых трубок при прорастании конидии мучнисторосяного патогена.

В связи с этим особый интерес представляют листья злаков и, возможно, ряда других растений, у которых эпидермальные клетки, являющиеся объектами атаки грибного патогена, сильно вытянуты вдоль длинной оси листа. Это приводит к анизотропии поверхности листа. При этом, попадая на лист злака, спора патогена в самом начале развития находится в условиях неравноценности возможных направлений роста инфекционных структур вдоль или поперек листа.

Так, у возбудителя ржавчины на листьях пшеницы наблюдали ориентацию ростковых трубок перпендикулярно длинной оси эпидермальных клеток или по направлению к устьицам [1, 2]. Это правило строго соблюдалось на поверхности восприимчивого сорта и в меньшей степени на листьях устойчивых сортов или растений-нехозяев. Для возбудителя ржавчины адаптивное значение регуляции направления роста, очевидно, связано с их проникновением в ткани растения через устьица. Ранее нами было показано, что преимущественное направление роста может наблюдаться и у мучнисторосяных грибов.

В отличие от возбудителя ржавчины при прорастании конидий мучнистой росы на листьях мягкой пшеницы аппрессориальная ростковая трубка была преимущественно направлена вдоль оси листа [3]. Вместе с тем при обработке пшеницы физиологически активными веществами, в частности, некоторыми концентрациями цитокининов [3] или перекиси водорода [4] доля поперечного роста могла заметно увеличиваться. Таким образом, этот параметр зависит от физиологического состояния клеток растения-хозяина, которое может варьировать в зависимости от, например, возраста органа растения и

имеющегося стрессового воздействия, а также различаться у разных сортов или видов.

**Цель работы** – изучение направления роста первичных инфекционных структур возбудителя мучнистой росы пшеницы *Erysiphe graminis* DC. f. sp. tritici March. (*Blumeria graminis* f. sp. tritici) на листьях близких к пшенице видов злаков.

Растения выращивали при 20–22 °С с 16-часовым фотопериодом на растворе Кнопа. Семена эгилопсов *Aegilops cylindrica* и *Ae. vavilovii* любезно предоставлены Н.Н. Чикидой (ВИР), пшеницы *Triticum aestivum* сорта Заря – В.П. Упелником (ГБС). Растения пырея *Agropyron repens* собраны в Московской области. При заражении использовали популяцию возбудителя мучнистой росы пшеницы, поддерживаемую на восприимчивой пшенице. Отделенные листья после инокуляции патогена инкубировали во влажной камере. Для сканирующей электронной микроскопии фрагменты листьев эгилопсов собирали через 48 ч после инфицирования, фиксировали в 4%-ном растворе глутарового альдегида, а затем в 2%-ном растворе четырехоксида осмия, обезвоживали в серии растворов этилового спирта и ацетоне, высушивали при критической точке, проводили напыление золотом [5].

Адаксиальную сторону фрагментов листа просматривали в сканирующем электронном микроскопе LEO-1430 VP. Не фиксированные образцы пырея и пшеницы просматривали в режиме высокого вакуума при –30 °С на столике замораживающей приставки «Deben CoolStage». На электронных фотографиях подсчитывали количество нормальных аппрессориев и аномальных (изросших, удлинённых) ростковых трубок, растущих вдоль и поперек длинной оси эпидермальных клеток. Направление роста считали продольным, если угол между длинной осью эпидермальной клетки (антиклинальной клеточной стенкой) и направлением роста аппрессория не превышал 30°.

Полученные результаты, представленные в таблице (см. след. стр.), свидетельствуют о преимущественно продольном характере роста грибных инфекционных структур нормальной морфологии. Соотношение продольного и поперечного направления у этих структур было примерно одинаковым в пределах одного эксперимента как на листьях эгилопсов, так и у пырея и пшеницы. Наоборот, в случае аномальных инфекционных структур наблюдали различия: преобладал поперечный рост (*Ae. cylindrica*), оба направления были равновероятными (*Ae. vavilovii*) или соотношение незначительно отли-

Таблица. Соотношение численности проросших конидий *E. graminis tritici* с инфекционными структурами нормальной и аномальной морфологии с аппрессориальной ростковой трубкой, направленной вдоль и поперек главной жилки листа, на листьях двух видов эгилопса.

Вид	Нормальные аппрессории			Длинные ростковые трубки		
	вдоль	поперек	вдоль / поперек	вдоль	поперек	вдоль / поперек
<i>Ae. cylindrica</i>	51	8	6,4	11	27	0,4
<i>Ae. vavilovii</i>	229	32	7,2	58	58	1,0
<i>T. aestivum</i>	105	40	2,6	15	7	2,1
<i>A. repens</i>	84	35	2,4	6	2	3,0

чалось от значений инфекционных структур с нормальной морфологией (у пырея и пшеницы).

Соотношение числа продольно и поперечно направленных нормальных ростковых трубок патогена на листьях всех видов растений существенно отличалось (согласно критерию  $\chi^2$  при  $p < 0,05$ ) от теоретически возможного соотношения 1: 2, которое могло бы возникнуть при случайном направлении роста аппрессориальной ростковой трубки. Для эгилопсов достоверные различия соответствующих отношений для нормальных и аномальных инфекционных структур дало также применение критерия независимости сопряженных признаков. Это свидетельствует о влиянии характера дифференциации на направление роста ростковой трубки в опыте с листьями эгилопсов. Отсутствие такого влияния у пшеницы и пырея, по-видимому, связано с тем обстоятельством, что в этом эксперименте количество структур, отнесенных к аномальным, было относительно небольшим, а отклонения их морфологии от нормы были не столь значительными.

Ранее нами была выдвинута гипотеза [3] о том, что рост аппрессориальной ростковой трубки нормальной морфологии происходит в направлении вероятного расположения восприимчивой клетки. Как известно, характерной особенностью *E. graminis* является прорастание конидии двумя ростковыми трубками, и соответственно, ее контакт с растением в 2-х точках [6]. При этом первичная ростковая трубка, по-видимому, служит своеобразным тестером состояния растения-хозяина. При благоприятном первичном контакте наилучшей стратегией было бы попасть в ту же клетку, что с большей вероятностью может произойти при росте вдоль оси листа. Наоборот, при неблагоприятном первичном контакте для паразита целесообразно поискать другую клетку, для чего нужна более длинная аппрессориальная

ростковая трубка, растущая в поперечном направлении. Наконец, особо неблагоприятные локальные условия способствуют нарушению регуляции роста и образованию аномалий. Если приведенные выше рассуждения справедливы, высокие показатели соотношения продольного и поперечного роста можно интерпретировать как свидетельство отсутствия интенсивного защитного ответа на инокуляцию патогенного гриба у изучаемых видов. Действительно, через неделю после инфицирования у обоих видов эгилопса в данном опыте было отмечено появление нормально развитых колоний с конидиеносцами. В случае пырея, инфицированного *E. graminis tritici* уже через 48 ч было заметно развитие гиф, что также свидетельствует об отсутствии защитных реакций на данном этапе, однако в дальнейшем образующиеся колонии очень сильно отставали в развитии (по сравнению с инфицированной пшеницей) и конидиеносцев не образовывали. Можно также предположить, что условия, благоприятствующие инфицированию и продольному росту гриба, по крайней мере, на ранних стадиях патогенеза в достаточной степени универсальны и с высокой степенью вероятности соблюдаются у ряда близких восприимчивых видов растений-хозяев.

Финансирование работы частично осуществлялось благодаря поддержке гранта 15-04-03729А РФФИ.

#### Список литературы

1. Сerezкина Г.В., Плотникова Ю.М., Андреев Л.Н. Прорастание уредоспор *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in vitro и на поверхности листа. Изв. АН. Сер. биол. 1975; 4: 524-32.
2. Андреев Л.Н., Плотникова Ю.М. Ржавчина пшеницы: цитология и физиология. М.: Наука. 1989: 304 с.
3. Рябченко А.С., Аветисян Т.В., Бабоша А.В. Особенности роста возбудителя мучнистой росы пшеницы вдоль и поперек длинной оси листа под действием экзогенного зеатина. Изв. АН. Сер. Биол. 2009; 5: 1-13.
4. Аветисян Г.А. Цитофизиологические особенности ранних стадий развития возбудителя мучнистой росы пшеницы при моделировании окислительного стресса. Автореф. дис... канд. биол. наук. М. 2011: 22 с.
5. Мишина Г.Н., Сerezкина Г.В., Аветисян Т.В. и др. Особенности формирования гало в процессе патогенеза как ответная реакция эпидермальных клеток злаков на проникновение возбудителей мучнистой росы. Изв. РАН. Сер. биол. 2001; 4: 424-30.
6. Kunoh H, Ishizaki H, Nakaya K. Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat leaves: (II) significance of the primary germ tube of *Erysiphe graminis* on barley leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 1977; 10: 191-9.

## СПЕКТР БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПАТОГЕНОВ АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ

Берестецкий А.О.<sup>1</sup>, Шиповская Е.А.<sup>2</sup>, Гасич Е.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт

Амброзия полыннолистная – один из наиболее опасных карантинных сорняков. Наносит огромный ущерб сельскому хозяйству и здоровью людей: засоренные им посевы резко снижают урожайность культур, а пыльца сорняка в период цветения вызывает у людей массовое аллергические заболевания, так называемую «осеннюю сенную лихорадку». В лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР создана коллекция фитопатогенных грибов, выделенных из различных органов амброзии полыннолистной.

Цель исследования – изучение спектра биологической активности 11 штаммов из этой коллекции в связи с их возможным использованием для биологической борьбы с этим проблемным сорняком.

Грибы культивировали на двух жидких питательных средах (ДМГ и среде Чапека с витаминами) в течение 3 нед. Грибные метаболиты извлекали из культурального фильтрата этилацетатом, а из высушенного мицелия ацетоном. Фитотоксическую активность экстрактов оценивали на листьях амброзии полыннолистной и осота полевого в концентрации 5 мг/мл, антимикробную – *Bacillus subtilis* в концентрации 100 и 500 мкг/диск, зоотоксическую – на инфузориях *Paramecium caudatum* в концентрации 10 и 100 мкг/мл.

Существенную фитотоксическую активность проявили экстракты культурального фильтрата 7 штаммов изученных грибов. Среди них продуцентами наиболее фитотоксичных экстрактов были *Alternaria tenuissima* 1.75, *Fusarium oxysporum* 4.35, *Acremonium* sp. 16.7, *Pestalotiopsis stevensonii* 59.4. Заметную антимикробную активность продемонстрировали экстракты из культурального фильтрата *Colletotrichum gloeosporioides* 13.14, *Phoma* sp. 32.78, *Phoma* sp. 32.149 *Fusarium semitectum* 14.31, а также *Alternaria tenuissima* 1.74 и 1.75.

Экстракты из мицелия изученных грибов существенной фитотоксической и антимикробной активностью не обладали. Все экстракты, обладающие фитотоксической активностью, проявили зоотоксическую активность: инфузории были высокочувствительны к метаболитам *Alternaria tenuissima* 1.75; метаболиты *Phoma* sp. 32.78 и *Fusarium oxysporum* 4.35 были слаботоксичными. Таким образом, метаболиты, образуемые патогенами амброзии, обладают широким спектром биологической активности, что указывает на необходимость углубленных токсикологических исследований для безопасного их применения в качестве микогербицидов.

## РАЗВИТИЕ ЭНДОФИТНОГО МИЦЕЛИЯ ВНУТРИ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА

Благовещенская Е.Ю., Попкова Е.Г.

Кафедра микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Эндифиты злаков – это специфическая группа грибов трибы Balansiae (Clavicipitaceae, Нуроскреалес, Sordariomycetes, Ascomycota), представленная аноморфными грибами рода *Neotyphodium* и некоторыми видами рода *Eriophloe*. Мицелий этих грибов бессимптомно развивается в надземных частях различных злаков, распространяются они, преимущественно, через семена растения-хозяина [1, 2]. Эндифиты привлекают большое внимание не только как интересная модель мутуалистических отношений, но и как требующий пристального внимания фактор в сельском хозяйстве, так как многие кормовые злаки из-за присутствия эндифита могут становиться чрезвычайно токсичными для травоядных [3].

Как оказалось, в одном растении, могут присутствовать как зараженные, так и незараженные побеги [4], что существенно меняет устоявшиеся представления о развитии эндифитных грибов. Данная работа посвящена особенностям развития эндифитного мицелия внутри отдельных растений.

В первой части работы проводили анализ 40 проростков овсяницы луговой, выращенных в стерильных условиях из зараженных семян [5]. Во второй части проводили подробный анализ трехлетнего куста овсяницы луговой, выращенного из зараженного семени в стерильных условиях и высаженного затем в открытый грунт на опытном участке ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса. На момент анализа этот куст состоял из 30 клональных растений. Для выявления эндифитного мицелия проводили микроскопирование окрашенных анилиновым синим срывов адаксиального эпидермиса влагиалища верхнего зеленого листа.

1. Высота 20-дневных проростков овсяницы составила в среднем 106 мм (от 12 до 169 мм). Растения на момент снятия опыта имели два листа, второй из которых не вышел из влагиалища. Длина корня составила в среднем 57 мм (от 14 до 96 мм). Растения были разделены на две группы в зависимости от наличия или отсутствия эндифитного мицелия в верхней части листовой пластинки 1-го листа. Проведенный по

полученным данным дисперсионный анализ показал значимое влияние этого фактора как на длину листа, так и на длину корня растения. Растения, для которых показано отсутствие мицелия в кончике первого листа, в целом крупнее. Можно было бы предположить, что эндофит отрицательно влияет на рост растения. Но, так как на самом деле инфицированными являются все исследованные образцы, то более вероятно, что мицелий просто не успел дорасти до конца листа, поэтому не обнаружился в данной части проростка. Данный вывод о запаздывании роста гриба подтверждается отсутствием мицелия во вторых листьях некоторых растений. Тем самым в растении может образовываться зона, свободная от эндофита.

2. После отмыывания корневой системы от почвы и тщательного разбора трехлетнего растения овсяницы луговой было обнаружено, что произошло деление куста и новообразованные особи имели от 1 до 10 вегетативных побегов. Анализ побегов показал, что не во всех из них присутствует мицелий эндофитного гриба, в 9 растениях не было ни одного зараженного побега. Если разбить эти растения

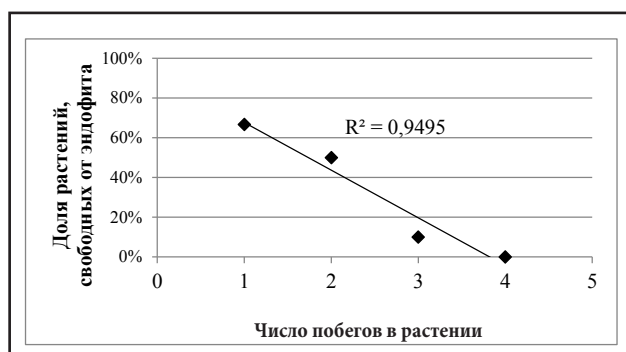


Рис. 1. Зависимость количества (Е-) растений в группе от числа побегов в одном растении

обнаружено, что конус нарастания таких растений весь пронизан тонкими гифами гриба. Тем самым результаты опыта подтверждают данные, полученные при анализе проростков о возможном отставании мицелия при формировании вегетативных органов растения.

Таким образом, развитие эндофитного мицелия в растении характеризуется неоднородностью и является изменяемым параметром.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФ проект № 14-50-00029.*

#### Список литературы

1. Clay K, Scharndl CL. Evolutionary origin and ecological consequences of endophyte symbioses with grasses. *Amer Natur.* 2002; 160: 99-127.

на группы по числу побегов, то доля незараженных растений (Е-) в каждой группе будет обратно пропорциональна числу побегов (рис. 1), причем среди растений имеющих 5 и более побегов незараженных не оказалось.

Если в имеющихся группах учитывать вместе все побеги всех растений, то получится аналогичная картина (рис. 2): чем больше в растении побегов, тем выше у этого растения будет процент побегов, листья которых пронизаны грибным мицелием. На самом деле говорить о том, что те или иные побеги свободны от мицелия, мы можем только условно, так как использованный метод обнаружения эндофитов хотя и является одним из самых распространенных, но, фактически, учитывает зараженность только листьев растения. Считалось, что такие данные полностью коррелируют зараженностью всего растения [6], но на самом деле это не совсем так. Для овсяницы характерны т.н. вегетативные укороченные побеги, стебель которых практически незаметен и составляет всего 2-4 мм в высоту. При изучении срезов стеблей «незараженных» растений данного опыта было

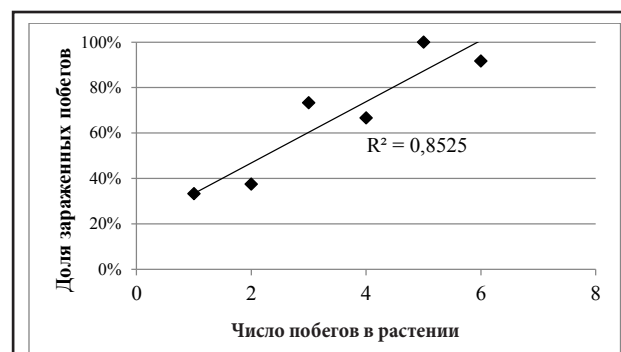


Рис. 2. Зависимость количества (Е+) побегов в группе от числа побегов в одном растении

2. Благовещенская Е.Ю., Дьяков Ю.Т. Эндофитные грибы злаков. *Микол. фитопатол.* 2005; 39(3): 1-15.
3. Fribourg HA, Hoveland CS, Gwinn KD. Tall fescue and the fungal endophyte – a review of current knowledge. *Tennessee Farm and Home Sci.* 1991: 30-7.
4. Благовещенская Е.Ю., Костенко Н.Ю., Разгуляева Н.В. Динамика зараженности эндофитным грибом *Neotyphodium uncinatum* отдельных растений овсяницы луговой (*Festuca pratensis*). *Микол. фитопатол.* 2008; 42(3): 278-86.
5. Попкова Е.Г. Эндосимбиотические грибы злаков на территории Москвы и Московской области. *Бюлл/Оренбургского научн. центра УрО РАН.* 2014; 3:10.
6. Hesse U, Christensen MJ, Scharndl CL. Tissue specificity of endophyte development in *Epichloe/Neotyphodium* symbioses with grasses. *Proc. of the 11th Intern Congress of Mol Plant-Microbe Interact.* 2004; 4: 448-52.



## МИКОЦЕНОЗ ЛЮЦЕРНЫ В ЗИМНИЙ ПЕРИОД В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Бондаренко И.И.

Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар

В условиях Краснодарского края люцерна поражается возбудителями болезней грибной этиологии [1]. Многие виды патогенов в зимний период сохраняются в живых тканях люцерны или растительных остатках.

Цель исследований – изучение микоценоза люцерны зимнего периода. Исследования выполнялись на базе длительного многофакторного стационарного опыта Кубанского государственного аграрного университета в 11-польном зернотравянопропашном севообороте в вариантах с естественным уровнем плодородия, без применения минеральных удобрений и средств защиты растений. Фитопатологический мониторинг проводился на протяжении двух ротаций севооборота. Первая ротация (1992–2002 гг.) включала чередование озимой пшеницы с пропашными культурами и заканчивалась трехлетним возделыванием люцерны (1998–2002 гг., сорт Славянская местная), вторая (2001–2012 гг.) начиналась с чередования: озимая пшеница, озимый ячмень, а далее – озимая пшеница с пропашными культурами и люцерной трех лет жизни (2009–2012 гг., сорт Фея).

Растительные образцы отбирались в осенний, зимний и ранний весенний периоды. Фитосанитарное состояние оценивали по общепринятым в фитопатологии методикам, выделение микромицетов из растительного субстрата проводилось с использованием голодного алкогольного (ГАА), картофельно-сахарозного (КСА) и картофельно-морковного (КМА) агаров.

В условиях Краснодарского края существуют особые условия для перезимовки люцерны. Тёплые и затяжные, влажные, умеренно влажные или засушливые, осенние периоды, небольшой и неустойчивый снежный покров, частые оттепели, обильная инсоляция в зимнее время, способствуют вегетации растений. Люцерна находится в состоянии замедленного роста, развиваются листовые пластинки, слабо растут стебли. Патогенные виды микромицетов в таких условиях переходят к формированию покоящихся структур, телеоморфы или/и продолжают развиваться в анаморфной стадии, вызывая новое заражение живых тканей культуры.

Структура патогенного комплекса микромицетов люцерны зимнего периода во многом определялась видовым составом грибов, паразитирующих на растениях в период активной вегетации. При этом после каждого укуса инфекционное начало большинства патогенов сохранялось в стерне. К последнему укусу, который проводился во второй декаде сентября, в стерне накапливался определённый видовой и количественный запас патогенов. Из живых тканей и отмерших частей растений люцерны выделены микромицеты из различных биологических групп. По

трофической специализации они ранжированы на две группы – фитопатогенную и сапротрофную. 1-ю группу составили биотрофы, гемибиотрофы и некротрофные микромицеты.

Микромицеты *Peronospora aestivalis* Syd., *Erysiphe communis* Grev., f. *medicaginis* Dietr., *Uromyces striatus* Schroter, составляли биотрофную группу патогенов, в зимний период сохранялись в виде эндогенного мицелия в живых тканях растений люцерны. Кроме того, патогены в поражённых тканях формировали телеоморфную стадию – *P. aestivalis* в виде ооспор, а *E. communis* – клейстотециев. На живых и отмерших листьях и стеблях люцерны обнаруживались жизнеспособные телиоспоры гриба *U. striatus*.

Гемибиотрофную группу патогенов представляли возбудители пятнистостей: *Alternaria tenuissima* (Fr.) Wiltshire., *Ascochyta imperfecta* Peck., *Cercospora medicaginis* Ell. et Hol., *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum. var. *medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis* Sacc., *Pseudoplea trifolii* Rostr., *Sporonema phacidiodes* Desm., *Stemphylium botryosum* Wallr. В живых тканях зимующих растений микромицеты сохранялись в форме мицелия, в живых и отмерших тканях – в виде покоящихся микроструктур, спороношения анаморфной и/или телеоморфной стадий.

Из корней и коронки изолированы: *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. culmorum* (Sm.) Sacc., *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. oxysporum* Schlecht. var. *medicaginis* Weimer, *F. sambucinum* Fuckel, *F. solani* (Mart) App. et Wr., *F. sporotrichiella* Swerb., *Microdochium nivale* (Fr.) Sumuets et Hallet., *Pythium ultimum* Trow., *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold, *Verticillium dahliae* Kleb., *Rhizoctonia solani* Kuehn., *R. violaceae* Tul., *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) S.F. Ashby.

Некротрофы: *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus glaucus* Fr., *A. niger* van Tieghem, *A. tamarii* Kita, *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea* Pers, *Cephalosporium acremonium* Cda., *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link., *C. macrocarpum* Preuss., *P. glabrum* (Wehmer) Westling, *P. frequentans* West., I Link, *P. claviforme* Bain., *P. corymbiferum* Westl., *P. luteum* Zukal, *P. variabile* Sopp, *Verticillium lateritium* Berk., *V. nigrescens* Ehrend., *V. kubanicum* Sczzerbin-Parfenenko, *Trichotecium roseum* Fr., *Ulocladium botrytis* Preuss. участвовали в патологическом процессе, вызванном био- и гемибиотрофными видами микромицетов.

Сапротрофная группа микромицетов изолирована из отмерших фрагментов растений люцерны, представлена видами: *Chaetomium*, *Dendryphion nanum* (Nees) S. Hughes, *Stachybotrys alternans* Bonord., *Stysanus stemonites* (Pers. et Steud.) Morton et G. Sm., *Torula herbarum* (Pers.) Link, *Trichoderma aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. viride* Pers, *Ulocladim botrytis* Preuss. Ядро сапротрофного комплекса – токсинообразующий гриб *S. alternans*.

Таким образом, в межсезонный период в ценозе люцерны формируется комплекс микромицетов с различной трофической специализацией. Патогены, поражающие растения в период вегетации, в зимний период сохраняются в форме мицелия, его видоизменений, а также формируют анаморфную и/или телеоморфную стадии на живых и погибших частях растений.

При наступлении благоприятных условий окружающей среды сформировавшийся патогенный потенциал переходит на отрастающие растения лю-

церны, вызывая различные виды микозов. Мертвые послеуборочные остатки трансформируются сапротрофными грибами, доминантам среди которых чаще оказывался гриб *S. alternans*.

#### Список литературы

1. Горьковенко В.С. Особенности формирования комплекса микромицетов в зернотравянопропашном севообороте. Мат. Межд. н.-практ. конф. «Теоретические и технологические основы воспроизводства плодородия почв и урожайность сельскохозяйственных культур». М.: РГАУ-МСХА. 2012: 498-507.

## ГРИБЫ-МАКРОМИЦЕТЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ СТВОЛОВЫЕ И КОРНЕВЫЕ ГНИЛИ В ЛЕСАХ ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ

Булгаков Е.А.

Оренбургский государственный университет, Оренбург

Грибы-макромицеты относятся к так называемым трутовым грибам, способным длительное время осуществлять гниение ослабленных или сухостойных деревьев разных пород и образующие многолетние плодовые тела. С прагматической точки зрения они наносят значительный вред лесному хозяйству, приводя к большим потерям древесины; в то же время они являются регуляторами структуры древостоев, обеспечивая отпад наименее устойчивых деревьев [1, 2].

В Оренбургской области к грибам, способным поселяться на вегетирующих растениях, относятся *Armillaria mellea* (Vahl.: Fr.) Kumm., *Fistulina hepatica* (Schaeff.: Fr.) Fr., *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr., *Fomitopsis pinicola* (Sow.: Fr.) P.Karst., *F. robusta* (P.Karst) Fiasson & Niemellä, *Ganoderma lipsiense* (Batsch.) G.F.Atk., *Heterobasidion annosa* (Fr.) Bref., *Inocutis dryophila* (Berk.) Fiasson & Niemellä, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill, *Oxyporus populinus* (Schumach.: Fr.) Donk, *Phellinus alni* (Bondartsev) Parmasto, *Ph. igniarius* Niemellä, *Ph. linteus* (Berk.et Curt.) Teng, *Ph. tremulae* (Bondartsev) Bondartsev & Borisov, *Porodaedalea pini* (Brot.: Fr.) Murrill [2].

Такие виды, как *Daedalea quercina* (L.: Fr.) Pers., *Irpex lacteus* (Fr.: Fr.) Fr., *Fomitoporia punctata* (P. Karst.) Pilat, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P.Karst., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., *Polyporus squamosus* Huds.: Fr., *Trametes gibbosa* (Pers.: Fr.) Fr., *T. trogii* Berk. можно отнести к некротрофным паразитам, поражающим ткани дерева, ставшие мертвыми по иным причинам (бактериальное поражение, инфекция другого гриба, механическое повреждение).

К числу наиболее активных фитопатогенов следует отнести *Heterobasidion annosa*, *Porodaedalea pini*, *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus tremulae*, *Fistulina hepatica*, *Fomitoporia robusta*, *Inocutis dryophila*.

В Оренбургской области наличие очага *Heterobasidion annosa* было впервые отмечено С.И. Ваниным [4] в Бузулукском бору. По данным М.В. Давиденко [6] в начале 80-х гг. более 1/5 площади сосняков

Бузулукского бора было заражено корневой губкой. Общая площадь очагов составляла 5,6 тыс. га; средний ежегодный отпад деревьев в очагах – до 6,7%. В 1997 г. очаг *Heterobasidion annosa* возник на крайнем востоке области – в Болотовском бору Кваркенского района и привел к возникновению ветровалов.

Также в Бузулукском бору достаточно широко распространена сосновая губка (*Porodaedalea pini*). С.И. Ванин [4, 5] указывал, что в Бузулукском бору зараженность древостоев сосны *Porodaedalea pini* составляет в среднем 16%, но в перестойных сосняках достигает 68%. В данный момент уровень зараженности древостоев этим грибом в Бузулукском бору практически не изменился.

Большое влияние на состояние древостоев дубрав региона оказывает трутовик древолюбивый (*Inocutis dryophila*), печеночница обыкновенная (*Fistulina hepatica*), ложный дубовый трутовик (*Fomitoporia robusta*). Впервые *Inocutis dryophila* в Оренбургской области был отмечен С.И. Ваниным [4, 5], исследовавшим дубовые древостои окрестностей Бузулукского бора. По его данным, зараженность трутовиком в этих дубравах достигала 70–90%. В разных районах области в среднем уровень зараженности древостоев этим видом составляет 10–15%. Лишь в дубравах, в которых наблюдается хозяйственная и рекреационная активность, а также в древостоях, поврежденных низовыми пожарами, зараженность достигает 40–60%. Это, вероятно, обусловлено большим количеством повреждений стволов дуба. Также активным патогеном дуба является *Fomitoporia robusta*. В Оренбургской области *Fomitoporia robusta* чаще встречается в низкогорных дубравах южных отрогов Уральских гор, где зараженность древостоев грибом местами достигает 7–10%; в сыровых и пойменных дубравах зараженность составляет 1–3%.

Гриб *Fistulina hepatica* имеет меньшее распространение в Оренбургской области. Его ареал также связан с ареалом дуба. Большая часть деревьев, пораженных этим грибом, имеют «скрытую гниль». Лишь

в наиболее благоприятных климатических условиях происходит образование базидиом. Наибольшая зараженность печеночницей (до 30%) была отмечена в пойменных дубравах реки Урал, пройденных низовым пожаром [7]. Наибольшие показатели зараженности древостоев дуба всеми тремя вышеуказанными видами характерны для дубрав с высокой антропогенной нагрузкой.

На прочих лиственных деревьях чаще встречаются *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* и *Phellinus tremulae*. В Оренбургской области *F. fomentarius* отмечен на древесине всех родов древесных растений, кроме сосны, лиственницы и жимолости [1]. Особенно велика значимость гриба в микоценозах березняков и осинников, где с его участием происходит деструкция валежной древесины, пней, сухостоя и вегетирующих деревьев. Максимальная зараженность отмечена в перестойных березняках и осинниках (до 30%). *Ph. igniarius* в Оренбургской области чаще всего встречается на осине, несколько реже – на ивах, тополях, кленах. С.И. Ванин в работе [4] отмечал, что в осинниках окрестностей Бузулукского бора зараженность осины этим грибом достигала 80–90%. В изученных нами осинниках зараженность древостоев не превышала 30–40%. В целом, распространение *Ph. igniarius* в области по большей части приурочено к пойменным биотопам.

Еще одним видом, приводящим к потерям большого количества древесины осины в Оренбургской области, является *Ph. tremulae*. Максимальная зараженность грибом отмечена в осинниках в возрасте 60–70 лет, где она достигает 60–90% [5]. В осинниках Оренбургской области *Ph. tremulae* является достаточно постоянным участником микоценозов, однако численность его не высока (10–15%). Исключения составляют перестойные осинники, подверженные значительной антропогенной нагрузке, в которых наблюдается большое количество механических по-

вреждений стволов, обламывание ветвей, что и приводит к заражению деревьев грибом.

Описанные выше виды ксилотрофных базидиомицетов достаточно широко распространены в лесах Оренбургской области. Их высокая деструктивная активность и тенденция к быстрому расселению в лесах, подверженных рекреационному воздействию, требуют создания постоянно действующей системы мониторинга за состоянием популяций этих видов, контроля за состоянием древостоев, в которых эти патогены могут дать вспышку численности – в первую очередь это касается спелых и перестойных сосняков, дубрав и осинников.

#### Список литературы

1. Сафонов М.А. Структура сообществ ксилотрофных грибов. Екатеринбург: УрО РАН. 2003: 269 с.
2. Сафонов М.А., Маленкова А.С. Изменения функциональной структуры сообществ деструктивных грибов как отражение состояния древостоев. Межд. журн. фундам. прикл. исследований. 2014; 8: 72-7.
3. Сафонов М.А., Маленкова А.С., Шамраев А.В., Булгаков Е.А. Распространение и экология фитопатогенных деструктивных базидиальных грибов Южного Приуралья. Вестн. ОГУ, № 9(170). – сент. 2014: 143-6
4. Ванин С.И. Главнейшие грибные болезни Бузулукского бора Самарской губернии. Мат. микол. и фитопатол. т. VIII, Ч .1. Л. 1929: 238-56.
5. Ванин С.И. Курс лесной фитопатологии. М.-Л.: Сельхозгиз. 1931. ч. 1: 326 с.
6. Давиденко М.В. Корневая губка в культурах сосны Бузулукского бора и разработка мер борьбы с ней. Автореф. дисс. ...канд. с-хоз. наук. Л. 1986: 20 с.
7. Сафонов М.А. Пирогенные сукцессии микоценозов ксилотрофных грибов. Сибирский экол. журн. 2006; 13(3): 325-9.

## ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ РОДА *DOTHISTROMA* В РОССИИ И ПРИЛЕГАЮЩИХ СТРАНАХ: ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ И СОВРЕМЕННЫЕ СВЕДЕНИЯ

Булгаков Т.С., Мусолин Д.Л.  
ООО «Вега», Шахты

Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова

В последние годы в Европе и других частях света наблюдается резкое возрастание распространенности и вредности ранее малоизвестной болезни хвойных – красной пятнистости хвои (дотистромоза), возбудителями которой являются два близкородственных вида грибов-микроспоридий рода *Dothistroma*: *D. septosporum* (Dorog.) Morelet (сумчатая стадия, или телеоморфа данного анаморфного гриба носит название *Mycosphaerella pini* Rostrup & Munk) и *D. pini* Hulbary (телеоморфа этого вида неизвестна в природе)[1]. В настоящее время вспышки

болезни отмечены более чем в 70 странах мира на 89 видах хвойных растений, преимущественно соснах (род *Pinus*, 82 вида), но известны случаи поражения и других растений семейства Pinaceae – видов *Larix*, *Picea* и *Pseudotsuga* (Watt et al., 2009).

В некоторых случаях красная пятнистость хвои приводит к сильному угнетению и даже гибели молодых сосен в возрасте до 30 лет, что в последние годы побудило начать активные исследования возбудителей в рамках международного проекта COST FP 1102 DIAROD [2].

Почти неизвестный в нашей стране фитопатогенный гриб *Dothistroma septosporum* впервые был обнаружен и описан в 1911 г. именно из России – на «горной сосне» (скорее всего, на *Pinus mugo* Turra в культуре) в окрестностях Санкт-Петербурга под названием *Cytosporina septospora* Dorog. [4]. Позже этот же вид был переописан автором на основании образцов из окрестностей г. Смела (ныне Украина, Черкасская область), и именно собранные с территории Украины образцы послужили неотипом, изученным в 1960-е гг. европейскими микологами [5], когда было предложено современное название вида *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet (syn. *Actinothyrium marginatum* Sacc., *Septoria septospora* (Dorog.) Arx, *Septoriella septospora* (Dorog.) Sacc.), а для его сумчатой стадии – *Mycosphaerella pini* Rostr. ex Munk (syn. *Scirrhia pini* A. Funk & A.K. Parker) [1].

Во второй половине XX века из самых разных стран все чаще стали приходить сообщения об обнаружении рассматриваемого патогена и вызываемых им эпифитотиях в естественных сосновых лесах и рукотворных плантациях. Очевидно, это было связано как с развитием мировой науки и накоплением лесопатологических сведений, так и начавшимся широким культивированием ценных видов сосен по всему миру. Массовая интродукция хвойных за пределы естественных ареалов привела и к массовому перемещению ассоциированных с ними фитопатогенных грибов, в особенности из Северного полушария в страны Южного полушария, а появление одновидовых плантаций сосен создало благоприятные условия для развития эпифитотий [3].

На территории бывшего СССР в советский период *D. septosporum* была найдена на территории нынешней Грузии и Абхазии на сосне пицундской *Pinus brutia* Ten. var. *pityusa* (Steven) Silba [6] и на сосне обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Казахстане [7], однако в обоих случаях патоген был отнесен к разряду редких и маловредоносных.

На рубеже XX и XXI веков в связи с широким распространением молекулярно-биологических методов начался непрерывный поток сообщений об обнаружении дотистромоза в различных европейских странах, и к настоящему времени *D. septosporum* обнаружена почти во всех странах Европы, включая бывшие страны СССР – Эстонию, Латвию, Литву и Украину [2]. Одновременно началось его систематическое изучение в странах Северной Америки и Южного полушария (Чили, ЮАР, Австралия, Новая Зеландия).

В начале XXI в. по итогам исследований образцов со всего мира микологами из ЮАР было доказано существование двух видов *Dothistroma*, поражающих сосны [1]: космополитного вида *D. septosporum* (*Mycosphaerella pini*), приуроченного к самым разным видам хвойных (всего известно около 80 видов растений-хозяев), и менее распространенного вида *D. pini* Hulbary, первоначально известного лишь из США на черной сосне *Pinus nigra* J.F. Arnold. Затем *D. pini* был обнаружен в России и Украине на черной сосне и ее

подвидах, однако опять же в условиях культуры [8]. В 2004–2006 гг. он вызвал эпифитотию в искусственных сосновых посадках широко культивирующейся в степной зоне «крымской сосны» *Pinus nigra* J.F. Arnold subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe на песчаных массивах вдоль Днепра, Дона и Сев. Донца (Луганская, Николаевская, Херсонская обл. Украины и Ростовская и Волгоградская обл. России) [5, 8, 9, 13]

Впоследствии *D. pini* был также обнаружен в Венгрии [11] и Франции [12] на хвое *P. nigra* совместно с *D. septosporum*. Морфологические характеристики и симптомы двух видов очень схожи, и единственным надежным различием может служить ширина конидий (особенно в культуре), несколько большая у *D. pini* (3,1–3,5 мкм), чем у *D. septosporum* (2,3–3,0 мкм), а также отсутствие у *D. pini* телеоморфы и его приуроченность к *Pinus nigra* [1, 8]. Однако наличие множества морфотипов и вероятность развития двух видов на одном растении (*P. nigra*) позволяют уверенно различать их лишь с помощью методов анализа ДНК.

*D. septosporum* характеризуется широким распространением на территории России и прилегающих стран, однако почти не попадает в поле зрения лесопатологов как редкий вид, к тому не включенный в старые определители фитопатогенных грибов и лесопатологические пособия. Лишь в последние годы появились новые сообщения об обнаружении *Dothistroma septosporum* в различных регионах России, в частности, исследования в Москве [13] и Санкт-Петербурге [14] показали, что *D. septosporum* встречается на *Pinus sylvestris* в городских парках и в естественных пригородных лесах. Однако в целом сведения о дотистромозе с территории России остаются скудными и ограничиваются сообщениями о ряде находок возбудителя *Dothistroma* sp. на аборигенном виде *Pinus sylvestris* в Республике Марий Эл (национальный парк «Марий Чодра»), в Тульской области (заповедник «Ясная Поляна»), на юге Красноярского края (национальный парк «Шушенский бор»), а также в Краснодарском крае – в Сочинском государственном природном национальном парке на *Pinus sylvestris* var. *hamata* Steven и на Черноморском побережье Кавказа от Анапы до Туапсе на *Pinus brutia* var. *pityusa* (Жуков и др., 2013).

Для уточнения ареалов *Dothistroma*, их биологических особенностей и приуроченности к определенным видам хвойных очень важно получить образцы хвои с симптомами дотистромоза из различных регионов России. Любые сведения о распространении видов *Dothistroma* в России и помощь в сборе материала будут приветствоваться авторами данной публикации.

#### Список литературы

1. Barnes I, Crous PW, Wingfield BD, Wingfield MJ. Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. *Stud. Mycol.* 2004; 50: 551-65.

2. Watt MS, Kriticos DJ, Alcaraz S et al. The hosts and potential geographic range of *Dothistroma* needle blight. *Forest. Ecol. Manag.* 2009; 257: 1505-19.
3. Barnes I, Wingfield MJ, Carbone I et al. Population structure and diversity of an invasive pine needle pathogen reflects anthropogenic activity. *Ecol Evol.* 2014; 4(18): 3642-61.
4. Doroguine G. Une maladie cryptogamique du Pin. *Bull Trimest Soc Mycol.* 2011; 27: 105-6.
5. Усиченко А.С., Акулов А.Ю. *Dothistroma septosporum* (телеоморфа *Mycosphaerella pini*) – карантинный фитопатогенный гриб, выявленный в Украине. В сб.: Грибы в природных и антропогенных экосистемах. Тр. межд. конф., посв. 100-летию начала работы проф. А.С. Бондарцева в Ботаническом инст. им. В.Л. Комарова РАН. СПб. 2005; 2: 248-53.
6. Шишкина А.К., Цанава Н.Н. *Dothistroma pini* Hulbary на сосне в Грузии. *Новости систематики низших растений.* М.-Л. 1966: 205-9.
7. Арапова Н.Н. Структура и экологические особенности комплекса филлотрофных микромицетов в сосняках Казахстана. Автореф. ... канд. дисс. М. 1992: 19 с.
8. Barnes I, Kirisits T, Akulov AYU. et al. New host and country records of the *Dothistroma* needle blight pathogens from Europe and Asia. *Forest Pathol.* 2008; 38: 178-95.
9. Булгаков Т.С. Дотистромоз – новое опасное заболевание сосны крымской на юге России. Актуальные проблемы лесного комплекса. Сб. научн. тр. междунар. науч.-техн. конф. «Лес-2007». Брянск: БГИ-ТА. 2007; 17: 109-13.
10. Соколова Э.С., Фомина Л.А. Дотистромоз – малоизвестная болезнь хвои сосны крымской в Ростовской области. *Лесное хоз.* 2007; 3: 45-6.
11. Barnes I, Kirisits T, Wingfield MJ, Wingfield BD. Needle blight of pine caused by two species of *Dothistroma* in Hungary. *Forest Pathol.* 2011; 41: 361-9.
12. Fabre B, Ioos R, Piou D, Marçais B. Is the emergence of *Dothistroma* needle blight of pine in France caused by the cryptic species *Dothistroma pini*? *Phytopathology.* 2012; 102: 47-54.
13. Соколова Э.С., Колганихина Г.Б. Грибные болезни древесных интродуцентов в насаждениях Москвы и Подмосковья. *Лесн. вестн.* 2009; 5 (68): 145-53.
14. Мусолин Д.Л., Булгаков Т.С., Селиховкин А.В. и др. *Dothistroma septosporum*, *D. pini* и *Hymenoscyphus fraxineus* (Ascomycota) – патогены древесных растений, вызывающие серьезную озабоченность в Европе. VIII чтения памяти О.А. Катаева. Вредители и болезни древесных растений России. Мат. межд. конф. (Санкт-Петербург, 18–20 ноября 2014 г.). Под ред. Д.Л. Мусолина и А.В. Селиховкина. СПб.: СПб ГЛТУ. 2014: 54-5.
15. Жуков А.М., Гниненко Ю.И., Жуков П.Д. Опасные малоизученные болезни хвойных пород в лесах России. Пушкино: ВНИИЛМ. 2013: 128 с.

## СТРЕПТОМИЦЕТЫ ПОЧВ МОЛДОВЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Бурцева С.А.<sup>1</sup>, Бырса М.Н.<sup>1</sup>, Березюк Ю. Н.<sup>1</sup>, Пойрас Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и биотехнологии АНРМ, Кишинев, Молдавия

<sup>2</sup>Институт зоологии АНРМ, Кишинев, Молдавия

Антагонизм в природе широко распространен среди различных групп микроорганизмов. В зависимости от наследственных особенностей, а также различных экологических факторов и условий культивирования, микроорганизмы могут проявлять антагонистические свойства по отношению к другим организмам, что привлекает внимание ученых и практиков и используется в борьбе с фитопатогенными организмами, причиняющими немалый вред сельскохозяйственному производству [1].

По данным литературы последних лет, актиномицеты, в основном, представители рода *Streptomyces*, оказывают мощное и разнообразное специфическое воздействие на почвенные грибы, которое зависит от биологической активности актиномицетов – продуцентов биологически активных веществ разного биологического действия [2–5]. Стрептомицеты – широко распространенная в почве группа актиномицетов, многие из которых, в основном, синтезируют антибиотики различной химической природы, которые применяются в медицине, ветеринарии и

сельском хозяйстве [6, 7]. Известно, что более 60% биологически активных веществ микробного происхождения и 2/3 антибиотиков, отличающихся своей эффективностью и малотоксичностью – метаболиты актиномицетов, 80% из которых синтезируют представители рода *Streptomyces*.

На протяжении многих лет они привлекают к себе пристальное внимание, прежде всего как потенциальный источник новых антибиотиков, обладающих широким спектром действия. Большинство исследователей свидетельствует о наличии высокой антагонистической активности среди представителей рода *Streptomyces* и показывает эффективность использования их метаболитов в качестве ингибиторов роста фитопатогенов сельскохозяйственных растений, сеянцев хвойных, овощных культур и пр. [8, 9].

Микробиометод в системе защиты растений от вредителей, по мнению ряда исследователей, на современном этапе должен рассматриваться в аспекте развивающейся в последние годы тенденции по биологизации и экологизации земледелия. Для дальней-

шего развития биологического метода необходимо продолжать разработки по поиску новых высокоактивных штаммов, что позволит расширить ассортимент биологических средств и применить их с учетом биоэкологических особенностей возбудителей болезней сельскохозяйственных культур в интегрированных системах защиты.

Авторы сообщают, что актиномицеты и особенно стрептомицеты могут быть использованы в качестве биоконтроля в сельском хозяйстве, в частности, растениеводстве, т.к. являясь сапрофитами и находясь в ризосфере, влияют на рост растений, защищают их против разного рода патогенных грибов [2]. Снизить функциональную значимость фитопатогенов можно посредством интродукции в агроэкосистему разнообразных микроорганизмов, включая популяции антагонистов, а также микробные препараты сложного состава [10].

Мероприятия по борьбе с возбудителями болезней сельхозрастений должны приводить к снижению численности этих фитопатогенов до экономического порога вредности, при котором их отрицательное влияние на культурные растения практически не проявляется [11].

Поэтому изучение антагонистических свойств новых штаммов стрептомицетов, выделенных из почвы Молдовы позволит выявить потенциальные штаммы для борьбы с фитопатогенными грибами и выбрать наиболее активных антагонистов для даль-

нейшей разработки биопрепаратов, эффективных в защите растений.

**Материалы и методы.** Объектами исследований были актиномицеты рода *Streptomyces* (240 изолятов), выделенные из различных образцов чернозема центральной части Республики Молдова, отличающиеся содержанием гумуса (2,4–6,8).

Исследуемые штаммы поддерживали на агаризованной среде Чапека с глюкозой, овсяном агаре, среде Гаузе [12, 13]. Для определения антифунгальной активности использовали метод, основанный на способности веществ с антимикробной активностью диффундировать в агаризованную среду и задерживать рост тест-культур. По размеру зон задержки роста судили об антифунгальной активности изучаемых штаммов [1]. В наших экспериментах в качестве тест-культур использовали фитопатогенные грибы *A. alternata*, *A. flavus*, *A. niger*, *B. cinerea*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rh. solani*, *Scl. sclerotiorum*, *T. basicola*.

**Результаты и обсуждение.** По данным литературы, стрептомицеты обладают высокой антагонистической активностью по отношению к *A. alternata*, *B. cinerea*, представителям рода *Fusarium*, *Rh. solani*, *Scl. sclerotiorum* [14].

Среди выделенных из почвы Молдовы стрептомицетов также были выявлены штаммы, обладающие способностью задерживать рост перечисленных фитопатогенов в разной степени (таблица).

Таблица 1. Антифунгальная активность стрептомицетов почв Молдовы.

№ № штаммов	Диаметр зон задержки роста тест-культур, мм									
	<i>A. alt.</i>	<i>A. fl.</i>	<i>A. nig.</i>	<i>B. cin.</i>	<i>F. gram.</i>	<i>F. oxysp.</i>	<i>F. sol.</i>	<i>Rh.</i>	<i>Scl. scl.</i>	<i>T. bas.</i>
9	28,0	29,0	19,0	29,0	28,0	34,0	29,0	29,0	П.п.	29,0
10	П.п.	-	22,0	П.п.	П.п.	16,0	14,0	-	-	-
12	25,0	19,5	17,0	22,0	-	-	17,5	17,0	21,5	24,0
17	25,0	0	23,0	П.п.	23,0	-	11,0	0	0	0
19	13,0	0	0	0	11,0	13,5	15,0	10,0	18,0	10,0
33	П.п.	0	0	24,0	30,0	0	0	0	0	0
37	П.п.	0	25,0	24,0	25,0	-	14,0	0	0	0
66	25,0	25,0	29,0	20,0	20,0	15,0	14,0	-	28,0	22,0
76	17,0	0	0	13,5	0	0	14,5	0	16,5	16,5
120	0	0	0	14,0	17,5	0	12,0	0	24,0	0
178	0	0	0	16,0	0	20,0	14,5	0	14,0	20,0
193	0	0	0	12,0	16,5	0	12,0	12,0	27,0	14,0

Из выделенных из почвы Молдовы стрептомицетов также были выявлены штаммы, обладающие способностью задерживать рост перечисленных фитопатогенов в разной степени (таблица). Так, например, 4 штамма (№10, 23, 33, 37) полностью подавляли рост *A. alternata*, 2 штамма (№ 10 и 17) – *B. cinerea*, 1 штамм (№10) – *F. graminearum* и 2 штамма (№9 и 42) – *Scl. sclerotiorum*. Следует также отметить и анти-

фунгальную активность по отношению к этим фитопатогенам и у таких штаммов, как № 9, 12, 17, 33, 37, 66 и 193, под действием метаболитов которых размер зоны задержки роста тест-грибов варьировал в диаметре от 24,0 до 34,0 мм.

Из почв Юго-восточной Сербии были получены 20 изолятов стрептомицетов, активных в отношении *B. cinerea* [6]. В почвенных образцах центральной

части Молдовы нам удалось выделить 26 изолятов, задерживающих рост *B. cinerea* (зоны диаметром 12,0–29,0 мм), а также полностью подавлять рост этой тест-культуры (таблица, рисунок).

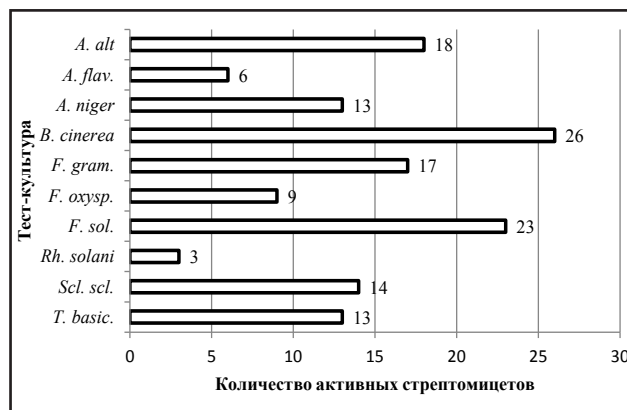


Рис. Количество активных стрептомицетов против фитопатогенов.

Фунгицидную активность против *F. culmorum* и других грибов обнаружил Кох [15] у *S. antimycoticus* FZ B53, отличающегося более высоким уровнем по сравнению с другими 243 штаммами 49 видов изучаемых актиномицетов. В наших исследованиях из 240 штаммов стрептомицетов можно отметить 17 штаммов, задерживающих рост *F. graminearum*, 9 штаммов – *F. oxysporum* и 23 штамма – *F. solani*. Зоны задержки роста у этих тест-культур варьировали от 11,0 до 34,0 мм диаметром. Обращает внимание факт наличия среди выделенных из почвы Молдовы стрептомицетов, отличающихся достаточно широким спектром действия на фитопатогенные грибы.

Так, например, у штамма № 9 фиксировали активность разного уровня к 10 тест-грибам, у штамма № 66 – к 9 тест-грибам, у штамма № 12 – к 8 тестам, а у штаммов № 10, 17, 37, 178 и 193 – к 5-6 тест-грибам.

Следует также подчеркнуть, что из выделенных нами почвенных стрептомицетов имеются штаммы, активно подавляющие рост таких широко распространенных в Молдове возбудителей болезней сельскохозяйственных растений, как *A. alternata*, *B. cinerea*, а также представителей рода *Fusarium* (штаммы № 9, 10, 17, 33, 37, 66).

**Выводы.** (1) Из образцов почвы центральной части Республики Молдова выделены 240 штаммов стрептомицетов, которые различаются между собой способностью синтезировать вещества, обладающие антимикробной активностью, в том числе и по отношению к фитопатогенным грибам, вызывающим болезни сельскохозяйственных растений. (2) Выявлены штаммы стрептомицетов с антифунгальным спектром, включающим 9–10 фитопатогенных грибов (диаметр зон задержки роста фитопатогенов варьирует от 11,0 до 34,0 мм). (3) Найдены штаммы стрептомицетов, метаболиты которых полностью подавляют рост таких фитопатогенов, как *A. alternata*

(4 штамма), *B. cinerea* (2 штамма), *F. graminearum* (1 штамм) и *S. sclerotiorum* (2 штамма).

#### Список литературы

- Егоров Н.С. 2004. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука: 528 с.
- Виноградова К.А., Кожевин П.А. Взаимоотношения актиномицетов с почвенными грибами и их использование для биологического контроля фитопатогенов. Микол. фитопатол. 2011; 45(4): 289-93.
- Шенин Ю.Д., Новиков И.И., Суика Уаркакайя П.В., Выделение и характеристика антибиотиков, продуцируемых р-21 и Л-242. Биотехнология. 2010; 2: 41-53.
- Park CN, Lee D, Kim W et all. Antifungal activity of saleceyin A against *Colletotrichum orbiculare* and *Phytophthora capsici*. J Basic Microbiol. 2007; 47: 332-9.
- Atta HM. An antifungal agent produced by *Streptomyces olivaceiscleroticus* AZ-SH514. World Applied Sci J, 2009; 6: 1495-505.
- Илич С.Б., Константинович С.С., Тодорович З.Б. и др. Биоактивные метаболиты из изолятов стрептомицетов – описание и антимикробная активность. Микробиология. 2007; 76(4): 480-7.
- Mohamed EH. Variable antibiotic susceptibility patterns among *Streptomyces* species causing actinomycetoma in man and animals. Ann Clin Microbiol Antimicrobials. 2011; 10: 24-8.
- Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Садыкова В.С., Габдулина И.Г. Биологические особенности нового штамма *Streptomyces lateritius* 19/97-М, перспективы для использования в растениеводстве. Биотехнология. 2005; 5: 37-40.
- Berdy J. Bioactive microbial metabolites – a personal view. J. Antibiot. 2005; 58: 1-26.
- Кожевин П.А. Некоторые аксиомы почвенной биотехнологии и применение эффективных микроорганизмов. Микробиологические препараты «Байкал ЭМ1», «Тамир», «ЭМ-курунга». Практическая биотехнология в сельском хозяйстве, экологии, здравоохранении: Сб. тр. М.: Агрорус, 2006: 76-80.
- Агаронян А.Г., Ходжоян Н.А. Фитосанитарное состояние посевов свеклы на Ширакской равнине Армении. Мат. XXI Межд. симп. «Охрана биосферы. Эниология. Нетрадиционное растениеводство. Экология и медицина» 9–16 сент. 2012. Симферополь. 2012: 106-7.
- Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др. Определитель актиномицетов. М.: Наука. 1983: 248 с.
- Зенова Г.М. 1992. Почвенные актиномицеты. М.: МГУ: 76 с.
- Qiu L, Jicheng Yu, Jianfang Y et all. Antagonism and action mechanism of antifungal metabolites from *Streptomyces rimosus* MY02. J. Phytopathol. 2009; 157(5): 306-10.
- Koch E, Yoffler I. Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZ B 53. J. Phytopathol. 2007; 157(4): 235-42.

## ВСПЫШКА АНТРАКНОЗА ЗЕМЛЯНИКИ В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Дудченко И.П., Скрипка О.В., Копина М.Б.

Всероссийский центр карантина растений, Быково Московской области

На долю земляники приходится 68 % общемирового производства ягод и эта доля с каждым годом увеличивается [9]. Современная селекция земляники направлена на создание высокопродуктивных, ремонтантных сортов, однако при этом часто приходится «жертвовать» устойчивостью растений к заболеваниям. Появляющиеся новые патогенные штаммы и расы, обладая устойчивостью к применяемым пестицидам, с посадочным материалом распространяются по всему миру.

Недавно в России обнаружен антракноз земляники, вызываемый грибом *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. Отдельные случаи обнаружения этого патогена отмечались в Краснодарском крае, Московской и Тамбовской областях [1, 2]. Впервые возбудитель болезни выявлен в Австралии в 1965 г. на землянике и папайе, однако как самостоятельный вид описан только в 1968 г. [8]. Потери урожая земляники от поражения *C. acutatum* составляют от 30 до 80%.

Вредоносность заключается также в ухудшении товарных качеств ягод. Болезнь опасна еще тем, что после проникновения в растение патоген может не проявляться в течение нескольких лет, находясь в латентном состоянии. Именно с такими бессимптомными растениями и происходит его быстрое распространение по всему миру [1, 5]. Кроме того, возбудитель может наносить существенный вред ряду других ягодных (клюква, черника), плодово-декоративных, овощных, травянистых культур.

В 2013 г. в результате обследований производственных посадок земляники в открытом грунте, проведенных в ООО «Острогжск сад-питомник» Воронежской области, были отобраны кусты земляники нескольких сортов (Ханей, Ароса и Вима Кимберли и др.) с признаками заболевания. Растения различались по времени посадки (2009 и 2013 г.), однако имели довольно близкие по характеру поражения внешние симптомы (увядание, наличие темных вдавленных язв на черешках и стеблях побегов, пятнистости и побурение отдельных рожков и листьев).

Наиболее характерные признаки были обнаружены на зрелых ягодах, которые имели вид гниющей массы красновато-коричневого цвета, но сохраняющими свою форму. Во влажных условиях на них выступали слизистые капельки желто-оранжевого экссудата, состоящего из конидий возбудителя. При этом на некоторых ягодах образовались темные, почти черные пятна округлой формы, напоминающие «вдавленность от большого пальца». Распространенность заболевания на отдельных полях достигала 50–80%. При этом на посадках применялась стандартная схема защиты от грибных заболеваний.

Диагностику возбудителей проводили анатомическим и биологическим (во влажной камере, по-

севом на питательные среды) методами с последующим микроскопированием. Пораженные плоды, части стеблей, черешков промывали в проточной воде, поверхностно стерилизовали в 96%-ном спирте, отмывали в стерильной воде и помещали во влажные камеры и на 2% картофельно-глюкозный агар и сусло-агар [3].

В результате лабораторного анализа практически из всех органов растений земляники на 5–10-е сут были выделены изоляты гриба, которые образовывали плотный мицелий беловато-серого цвета, в дальнейшем он сохранялся лишь по краю колонии, а в центре становился темным, образуя участки споренного мицелия со скоплением спор оранжевого цвета, аналогичных выделению экссудата на поверхности пораженных ягод. Морфологические характеристики изолятов гриба (конидиеносцев и конидий) показали, что они соответствовали возбудителю антракноза, вызываемому *Colletotrichum acutatum* [2, 4, 7].

Вместе с тем, отмечается сходство фенотипических и морфологических признаков данного патогена с другими близкородственными видами рода *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides* Penz. и *C. fragariae* Brooks), в том числе и с видами рода *Fusarium*, особенно *F. oxysporum*.

Поэтому дополнительно, для подтверждения первичной идентификации выделенных культур гриба была проведена постановка классической ПЦР с универсальными праймерами, рекомендованными q-bank Fungi [10], которые амплифицировали продукт размером 600 п. о. внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS). ДНК из мицелия возбудителя выделяли с помощью набора «М-Сорб-Туб» (ЗАО Синтол, Москва). При постановке классической ПЦР с праймерами ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC), ITS5 (AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) с образцами ДНК, были получены ампликоны размером 600 п. о. фрагмента ITS. [6].

Нуклеотидную последовательность полученных ампликонов расшифровывали на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 («Applied Biosystems Int.»). После сравнения с базой данных Генбанка [11], было установлено, что полученная последовательность образцов была идентична с имеющимися в базе фрагментами региона ITS возбудителя *C. acutatum* на 99–100%.

Помимо этого патогена, были обнаружены возбудители серой и черной гнили (*Botrytis cinerea* Pers, *Rhizopus* spp.), коричневой пятнистости (*Hainesia lythri* (Desm.) Höhn.) – на ягодах, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler., *Cladosporium herbarum* (Pers.) Lk. – на листьях, побегах и рожках. В связи с тем, что возбудитель *C. acutatum* выделялся из всех пораженных частей растений, можно предположить, что он являлся основной причиной болезни.



Одним из вероятных путей проникновения возбудителя в питомник Воронежской области могло быть поступление зараженного посадочного материала земляники из Польши и Италии через Белоруссию в течение нескольких лет. Следует отметить, что вегетационный период 2013 г. характеризовался частыми дождями, повышенной влажностью воздуха и умеренными температурами, что и привело к вспышке грибных заболеваний на землянике во многих хозяйствах.

**Заключение.** Практика показывает, что обычные меры борьбы при вспышке заболевания не обеспечивают необходимой защиты растений, поэтому важно не пропустить начало проявления болезни и по ее развитию определить сроки последующей химической обработки. Наиболее важным фактором защиты от антракноза (*C. acutatum*) является использование здорового посадочного материала. Своевременная диагностика и прогноз в сочетании с современными средствами борьбы, включающими химическую обработку, подбор толерантных сортов, агротехнические и профилактические мероприятия помогут защитить ягодные насаждения.

#### Список литературы

1. Говорова Г.Ф., Говоров Д.Н. Грибные болезни земляники: Монография. М: ВСТИСП. 2010: 84-8.
2. Головин С.Е. Новые болезни земляники в средней полосе России. Плодоводство и ягодоводство России. М: ВСТИСП. 2014; 1: 88-95.
3. Кирай З., Клемент З., Шоймоши Ф., Вереш Й. Методы фитопатологии. М.: Колос. 1974: 342 с.
4. Метлицкий О.З., Холод Н.А., Головин С.Е., Ундрицова И.А. Антракноз садовой земляники. Агро XXI. 2007; 4-6: 51.
5. Adaskaveg JE, Forster H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. The American Phytopathological Society. St. Paul MN. 2000: 317-36.
6. Debode J, Van Hemelrijck W, Baeyen S et all. Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. Plant Pathology. 2009; 58: 504-14
7. EPPO, PQR database European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2014: [http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Colletotrichum\\_acutatum/COLLAC\\_ds.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Colletotrichum_acutatum/COLLAC_ds.pdf)
8. Simmonds J.H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland J Agricult Anim Sci. 1966; 22: 437-59.
9. Рынок свежих ягод в мире и России. 2012. [www.foodmarket.spb.ru](http://www.foodmarket.spb.ru).
10. [www.q-bank.eu/Fungi/](http://www.q-bank.eu/Fungi/)
11. [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

## СОРТОВАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ОЗИМОГО ТРИТИКАЛЕ К БУРОЙ ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ

Ефремова И.В.<sup>1</sup>, Мелькумова Е.А.<sup>1</sup>, Дедяев В.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный аграрный университет им. Петра Великого, Воронеж.

<sup>2</sup>НИИСХ ЦЧП имени В.В. Докучаева, Воронеж

Программа по селекции тритикале разработана в НИИСХ ЦЧП им. В.В. Докучаева в 1975 г. При изучении образцов мировой коллекции ВИР выделены перспективные селекционные образцы озимых зерновых культур и на их основе создан местный исходный материал. К 2006 г. в Госреестр селекционных достижений РФ было включено 8 сортов лаборатории селекции тритикале, которые в настоящее время возделываются в 4, 5, 6, 7 и 9 регионах РФ [1]. С появлением в производственных посевах сорта Тальва 100 усилились эпифитотии бурой листовой ржавчины, что стало необходимым при изучении селекционных образцов тритикале на искусственном инфекционном фоне и поиску устойчивых форм для дальнейших селекционно-генетических изысканий.

Создание искусственного инфекционного фона проводили согласно методики оценки сортов зерновых культур на устойчивость к ржавчине с применением инокуляции [2]. Селекционные образцы высевались трехрядковыми деланками (1×0,6 м) по 20 зерен в рядок и двукратном повторении. Индикатором служил сорт озимой пшеницы Тарасовская 29,

а в 2007–2010 гг. Тальва 100. Визуальную оценку степени поражения (СП) растений в вариантах опыта проводили в фазу налива зерна по шкале Петерсона и др. Тип расоспецифической реакции определяли по шкале Мейнса и Джексона [3]. Объем изученного материала представлен в табл. 1.

За время изучения (2006–210 гг.) отечественных и зарубежных сортов коллекционного материала на искусственном инфекционном фоне, бурой ржавчиной в разной степени поразились практически все образцы.

По характеру расоспецифической реакции и, соответственно, степени поражения патогеном, наблюдалась четкая дифференциация на классы (4 тип, 80–100% СП), иммунный (без признаков поражения),  $x$  – (минус) гетерогенный (5–20% поражения листовой пластинки с преобладанием 1–2 типов расоспецифической реакции),  $x$  + (плюс) гетерогенный (30–80% поражения с преобладанием урединий 3–4 типов), а также растений с единичными урединиями 1,2,3 и 4 типов [4], что указывает на широкий полиморфизм по генам устойчивости тритикале к бурой ржавчине.

Таблица 1. Изучение селекционного материала озимого тритикале на искусственных инфекционных фонах.

Показатели	Годы								
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Образцов, шт	79	87	82	109	127	142	90	114	228
Делянок, шт	168	184	172	221	272	294	224	231	572

Таблица 2. Характеристика сортов тритикале по степени устойчивости к бурой ржавчине.

№ п/п	Сортообразец	2006 г.			2007 г.			2008 г.		
		растений		СП,	растений		СП,	растений		СП,
		шт.	имм.,%	%	шт.	имм.,%	%	шт.	имм.,%	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Тальва 100	413	0	79,3	868	0	76,3	777	0	92,1
2	Доктрина 110	71	0	15,0	99	5	41,3	93	69,9	9,0
3	Ти – 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Каприз	-	-	-	108	29	5,5	100	100	0,0
5	Водолей	60	27	73,3	64	98	0,1	98	99	1,9
6	Кентавр	55	82	1,1	37	73	9,0	60	100	0,0
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
7	Рондо	58	78	15,7	111	3	34,2	107	44	54,8
8	Союз	68	6	44,6	95	57	33,1	84	87	11,8
9	Дон	-	-	-	104	99	0,5	90	100	0,0
10	Трибун	-	-	-	92	100	0,0	86	100	0,0
11	Зимогор	-	-	-	101	54	23,4	81	100	0,0
12	Бард	-	-	-	107	51	5,0	96	100	0,0
13	98-190Т-71	-	-	-	98	1	1,7	88	100	0,0
14	Мудрец	54	3	10,2	98	45	13,1	86	74,4	2,6
15	Корнет	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Крастал	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	03-125t-37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Среднее	61,0	32,7	26,6	92,8	51,2	13,9	89,1	97,9	6,7

В табл. 2 представлена характеристика устойчивых сортообразцов, имеющих иммунные растения.

Степень поражения восприимчивого сорта Тальва 100 на искусственном инфекционном фоне в 2008 г. равна 92,1%. В 2009 и 2010 гг. она составила 99,6% и 100%, то есть увеличение произошло всего лишь на 8%. Средняя СП у выделившихся по устойчивости сортообразцов (табл. 2) увеличилась в 5 раз – с 6,7% до 34,7 и 33,3% соответственно по годам исследования.

В 2008 г., после инокуляции, болезнь проявилась на растениях в конце мая и, из-за отсутствия продолжительных рос, не развивалась в плоть до срока созревания зерна. Вредоносность болезни не отразилась на продуктивности колоса сорта – индикатора Тальва 100. В 2009 и 2010 гг. вредоносность составила 23,7 и 27,6% что свидетельствует о наличии продолжительной влаги в виде росы.

В связи с этим произошло увеличение СП устойчивого материала в 5 раз (табл. 2), а образцы Каприз, Кентавр, Дон, Трибун, Зимогор, Бард и 98-190Т-71 не подвержены поражению в 2008 г., в 2009 – ока-

зались пораженными на 74, 4,7, 41,5, 29,8, 40,7, 19,4 и 9,4% соответственно сложившимся погодным условиям спровоцировали не только вирулентность патогена но и их агрессивность, о чем свидетельствуют резкие различия в СП образцов за годы исследований.

В последующие 2011–2014 гг. выявлены высокоустойчивые сортообразцы по годам изучения соответственно: 14, 7, 11, 27 шт., в которых также наблюдалось варьирование растений по типам устойчивости и СП растений. Перспективный образец Линия 119у, обладающий высокой устойчивостью к бурой ржавчине, в 2013 г. передан в Государственное сортоиспытание.

Наличие в сортах тритикале растений с различной СП бурой ржавчиной, сохраняет ассимиляционную поверхность листового аппарата, что незначительно отражается на снижении их продуктивности.

В сортообразцах тритикале, обладающих не подверженными данной болезнью растениями, возможен их отбор, который должен быть более эффективным в годы максимальной вредоносности патогена.

Продолжение Таблицы 2

№ п/п	2009 г.			2010 г.		
	растений		СП, %	растений		СП, %
	шт.	имм., %		шт.	имм., %	
1	1441	0,0	99,6	993	0,0	100,0
2	107	18,7	43,0	73	0,0	74,8
3	191	34,6	63,8	90	16,7	60,9
4	203	24,6	74,0	62	9,7	63,9
5	200	89,0	3,9	66	21,2	13,5
6	107	95,3	4,7	76	40,8	16,6
7	95	14,7	67,5	63	7,9	73,7
8	111	49,5	47,0	66	15,4	26,2
9	218	53,7	41,5	78	23,1	35,1
10	202	49,5	29,8	74	67,6	11,0
11	201	57,7	40,7	68	13,2	17,4
12	219	49,3	19,4	89	27,0	21,7
13	104	89,4	9,4	89	13,5	36,1
14	-	-	-	-	-	-
15	103	8,8	40,3	76	23,1	30,0
16	95	91,6	0,8	81	9,9	18,0
17	-	-	-	41	100,0	0,0
18	154,0	51,9	34,7	72,8	25,9	33,3

**Список литературы**

- Горбунов В.Н. Лаборатория селекции тритикале. Селекция в Каменной степи. К 100-летию организации селекционных работ. Воронеж: Истоки. 2011; 1: 52-4.
- Методика оценки сортов зерновых культур на устойчивость к ржавчине с применением искусственного заражения. (Госкомиссия по сортоиспытанию с.-х. культур). Рот. бюро МСХ СССР. 1977: 48 с.
- Гешеле Э.Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений. М.: Колос, 1978: 206 с.
- Ефремова И.В. Особенности развития бурой листової ржавчины при выращивании тритикале на инфекционных фонах в условиях юго-востока ЦЧР России. Вестн. ВГАУ. 2013; 2(37): 69-73.

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВЛАЖНОСТИ НА ПОРАЖЕНИЕ ГИБРИДОВ  
ПРИМУЛЫ (PRIMULA) ПОЛЬСКОЙ СЕЛЕКЦИИ *VOTRYTIS CINEREA PERS.*  
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ ВЫРАЩИВАНИЯ**

Егорова Е.В.

Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар

Условия окружающей среды способствовали тому, что у возбудителей болезней сельскохозяйственных культур жизненные, биологические и инфекционные циклы развития организованы во времени и пространстве и складываются таким образом, что повреждающие стадии совпадают с наличием растения-хозяина.

Кроме того, абиотические факторы, ускоряя или замедляя обменные процессы вредных организмов, определяют количество и продолжительность генераций, скорость инфекционного процесса. На рост и развитие патогенных микромицетов влияют многие

факторы внешней среды: температура, влажность, степень аэробности среды, но определяющими являются температура и влажность [1, 2].

Фитопатогенные грибы, да и сами высшие растения, относятся к пойкилотермным организмам. Главным источником поступления тепловой энергии у них является тепло окружающей среды. И поскольку динамика температуры тела пойкилотермных организмов определяется изменениями температуры среды, скорости обменных процессов также оказывается в прямой зависимости от температуры окружающей среды, точнее от притока теплоты извне.

У растений в зависимости от температуры изменяются темпы поступления воды и питательных веществ через корни: повышение температуры до определенного предела увеличивает проницаемость протоплазмы для воды. Известно, что при понижении температуры от 20 до 0 °С поглощение воды корнями уменьшается на 60–70%. Повышение температуры вызывает у растений усиление дыхания [3, 4].

Температура является одним из основных факторов, определяющих возможность возникновения болезни, характера её протекания, вредоносности. Она определяет длину инкубационного периода болезни и, чем ближе показатели температуры к оптимальным, тем короче инкубационный период, формируется максимальное количество генераций, выше скорость инфекции.

Диапазон изменений температуры, в пределах которого сохраняется активная жизнедеятельность микромицетов, широко варьируют у разных видов.

В диапазоне развития патогенных видов грибов различают температуры:

- минимальные – температуры нижнего порога развития, «биологический нуль»;
- оптимальные – температуры, при которых обменные процессы протекают наиболее интенсивно; за минимальный временной период формируется максимальное количество генераций; отсутствует гибель особей в популяции вида;
- максимальные – температуры верхнего порога развития.

За пределами нижнего и верхнего диапазона развития вида патогенного микромицета находится летальная температура при которой наступает гибель организма [2–4].

Большое значение в протекании жизненного цикла микромицетов играет наличие влаги. Живых организмов, не содержащих воды, не существует. Все процессы обмена веществ – питание, дыхание, выделение – требуют участия воды. Вода необходима как средство теплообмена.

В различных органах растений содержание воды колеблется в довольно широких пределах и в среднем составляет 80–90% массы растения. Её содержание изменяется в зависимости от условий внешней среды, ткани, органа, возраста, функциональной активности и вида растения.

У фитопатогенных грибов наличие влаги и её дефицит определяют интенсивность споруляции, репродукцию, продолжительность и количество генераций, скорость инфекции. Границы прорастания спор и активного роста мицелия обычно различны. Способность грибов к прорастанию можно рассматривать как показатель их жизнеспособности, а способность к активному росту как показатель жизнедеятельности. Кроме того, температура окружающей среды через растение-хозяина может влиять на возникновение и протекание патологического процесса.

Возбудители болезней к условиям увлажнения относятся неоднозначно. Например, для прорастания спор большинства видов грибов, требуется наличие

капельной влаги. В этом случае имеет значение увлажнённость листьев, наличие росы. Другая группа патогенов способна активно развиваться в отсутствие влаги и при низкой относительной влажности.

Микромицет *B. cinerea* является типичным аэробом. Для развития гриба оптимальной является температура в пределах 15–26 °С, минимальной 1–3 °С, при 32 °С конидии гриба не прорастают. Патоген очень требователен к относительной влажности воздуха, оптимальной является в пределах 80–100% [6–9].

При выращивании гибридов примулы польской селекции в условиях защищенного грунта частного тепличного комплекса г. Краснодара в 2012–2013 гг. температурный режим и относительную влажность очень сложно контролировать. Оптимальной для выращивания примулы является температура в пределах 18–22 °С, а относительная влажность 60–65%. Близкие к оптимальным относительная влажность и температурный режимы складываются в весенний и осенний периоды. В зимний и летний периоды условия окружающей среды в тепличном комплексе очень сложно удержать в пределах оптимальных показателей. Так, в летний период влажность понижается до критически низких пределов – 40–45%, а температура, наоборот, высоких – 29–31 °С. В зимний период температура понижается до 10–15 °С, а влажность повышается до 80–90%.

Таким образом, температурный режим и относительная влажность в поздний осенний, зимний и ранне-весенний период складываются не очень благоприятно для примулы и, наоборот, благоприятно для микромицета *B. cinerea*.

В частном тепличном комплексе гибриды примулы выращивают в два срока:

- зимний, семена высевают в октябре месяце, цветок реализуется в мае;
- летний, семена высевают в феврале месяце, цветок реализуется в августе.

Проведенный фитопатологический мониторинг показал, что температурный режим и относительная влажность в различные сроки выращивания примулы влияют на поражение примулы возбудителем серой гнили (таблица).

При зимнем сроке выращивания уже в фазу бутонизации распространение серой гнили оказалось в 2,8, а развитие в 4,4 раза выше, чем при летнем сроке выращивания примулы. В фазу цветения, когда цветок идет на реализацию, эти показатели при зимнем сроке выращивания возросли почти в 3 раза.

Таким образом, в тепличном комплексе условия окружающей среды в зимний и летний сезоны очень сложно удержать в пределах оптимальных показателей. Так, в летний период влажность понижается до критически низких пределов – 40–45%, а температура, наоборот, высоких – 29–31 °С. В зимний период температура понижается до 10–15 °С, а влажность повышается до 80–90%. Температурный режим и относительная влажность в летний и зимний сроки выращивания примулы влияют на поражение примулы возбудителем серой гнили. При зимнем способе вы-

Таблица. Влияние условий окружающей среды на поражение гибридов примулы микромицетом *B.cinerea* при зимнем и весеннем сроках выращивания, частный тепличный комплекс, г. Краснодар, 2012–2013 гг.

Срок выращивания	Максимальное поражение (%) микромицетом <i>B. cinerea</i> по фазам			
	бутонизация		цветения	
	распространение	развитие	распространение	развитие
Зимний	34,7	16,2	53,1	29,1
Летний	12,5	3,7	21,4	6,9

ращивания уже в фазу бутонизации распространение серой гнили оказалось в 2,8, а развитие в 4,4 раза выше, чем при летнем сроке выращивания примулы. В фазу цветения, когда цветок идет на реализацию, эти показатели при зимнем сроке выращивания возросли почти в 2 раза [8, 9].

#### Список литературы

1. Марфенина О.Е. Микологический мониторинг почв: возможности и перспективы. Почвоведение. 1994; 1: 75-80.
2. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. М.: МГУ. 1988: 220 с.
3. Звягинцев Д.Г. Биология почв. М.: МГУ. 2005: 455 с.
4. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: МГУ. 1986: 256 с.
5. Билай В.И. Микромицеты – компоненты почвенных биогеоценозов (фрагменты к экологии почвенных микромицетов). Микромицеты почв. Киев: Наук. думка. 1984: 5-33.
6. Билай В.И. Основы общей микологии. Киев: Выща школа. 1989: 392 с.
7. Рудаков О.Л. Биология и условия паразитизма грибов рода *Botrytis*. Фрунзе. 1959: 189 с.
8. Егорова Е.В., Горьковенко В.С. Грибы рода *Botrytis* в ценозе цветочных. Сб. научн. тр. Студенчество и наука. Краснодар: КГАУ. Вып. 8. Том 1. 2012: 188-91.
9. Егорова Е.В. Особенности патогенеза гриба *Botrytis cinerea* Pers. при поражении герберы и примулы. Агротехнический метод защиты растений от вредных организмов. Мат. «VI Межд. науч.-практ. конф. 17–21 июня 2013 г.» 2013: 56-8.

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ОИДИУМА ВИНОГРАДА (*UNCINULA NECATOR BURR*) К СТРОБИЛУРИНАМ В УСЛОВИЯХ ЮЖНОГО БЕРЕГА КРЫМА

Галкина Е.С., Алейникова Н.В.  
ННИИ ВиВ «Магарач», Ялта

Оидиум винограда (возбудитель *Uncinula necator* Burr.) одно из хозяйственно и экономически значимых заболеваний виноградной лозы, для которого характерен высокий уровень потерь урожая (от 40 % и более), особенно в условиях Южного берега Крыма. До настоящего времени основным методом защиты винограда от оидиума остаётся химический, как наиболее эффективный и наименее трудоёмкий, но главным его недостатком является развитие резистентности (приобретенной устойчивости) у возбудителя данного заболевания к фунгицидам.

Среди причин резистентности значимыми являются особенности фунгицидов, природа фитопатогена, его репродуктивная способность (в т.ч. наличие полового размножения) и возможность выживания устойчивых линий в природе. Показано, что для *Uncinula necator* свойственно явление гетеротализма и наличие трех типов спаривания [1]. Неизбежным следствием резистентности становится увеличение норм расхода пестицидов, кратности химических обработок и, как следствие этого, полная потеря эффективности препаратов, экономический ущерб, а также загрязнение окружающей среды [2, 3].

На сегодняшний день для защиты винограда от оидиума в мировой практике широко используются фунгициды контактного, системного и системно-контактного действия, которые относятся к следующим химическим группам: элементарная сера, бензимидазолы, триазолы, стробилурины, азафталены, пиридин-карбоксамиды и др. Данные научных публикаций к настоящему времени подтверждают развитие устойчивости *U. necator* к ингибиторам синтеза стерола и стробилуринам [4–7].

Стробилурины являются синтетическими производными природных стробилуринов, продуцируемых дереворазрушающими грибами, в частности *Oudemansiella mucida* и *Strobilurus tenacellus*. Механизм их действия основан на блокировании переноса электронов в митохондриях гриба, то есть на подавлении его дыхания за счет блокирования цитохрома в комплексе bc1 [8, 9]. Стробилурины появились на рынке в 1996 г. [9, 10]. Первым в 1997 г. стал применяться на виноградниках США и был высокоэффективным в защите от оидиума азоксистробин, в 2000 – крезоксим-метил, 2001 – трифлуксистробин, 2003 – пираклостробин. Резистентность оидиума к стро-

билуринам была впервые обнаружена в Нью-Йорке, США, в 2003 г [6], в Венгрии и Австрии в 2006 г. [7]. Установлено, что к развитию у *U. necator* сопротивления к стробилуринам приводит мутация G143A в цитохроме b [11]. В виноградарских хозяйствах Южного берега Крыма в условиях эпифитотийного развития оидиума несколько лет (2001–2005 гг.) активно использовался фунгицид из группы стробилуринов – Строби, в.г. (0,3 кг/га, 50% крезоксим-метил, 500 г/кг), но, после ряда случаев его недостаточной эффективности фунгицид был фактически исключен из систем защиты.

**Цель работы** – многолетний мониторинг возможности и скорости возникновения устойчивых форм *U. necator* – возбудителя оидиума винограда к фунгициду Строби, в.г., 0,3 кг/га, а также разработке рекомендаций по его эффективному применению.

Полевые опыты проводились согласно общепринятым в виноградарстве и защите растений методикам [12, 13] на виноградных насаждениях сорта Мускат белый в условиях Южного берега Крыма (ГП с-з «Ливадия», 2006–2014 гг.), выращиваемого в соответствии с агротехническими мероприятиями, рекомендуемыми для данной зоны виноградарства.

В опытах оценивали биологическую эффективность применения фунгицида Строби, в.г. в защите гроздей винограда от оидиума в сравнении с контролем (без обработок) и эталоном (чередование фунгицидов). О развитии резистентности судили по снижению биологической эффективности применения исследуемого фунгицида. Схемой опытов предусматривались варианты с одно- и двухлетним применением Строби, в.г. – семи и четырнадцати опрыскиваний соответственно.

Для тестирования чувствительности возбудителя оидиума к крезоксим-метилу были адаптированы методики, описанные в работах зарубежных исследователей, а также FRAC [4, 5, 14–16]. В исследованиях использовались гетерогенные популяции *Uncinula necator*. Образцы конидиеспор собирали путем произвольного отбора инфицированных листьев с виноградных растений, обработанных и не обработанных фунгицидом после окончания его защитного действия. При определении ЭК50 применяли растворы фунгицида в диагностических концентрациях по действующему веществу (0,00015; 0,0005; 0,0015; 0,005; 0,015%), установленные ранее экспериментальным путем. Растворы фунгицидов с определенной концентрацией действующего вещества готовили согласно [2].

В лаборатории отдельные листья винограда, свободные от инфекции, обрабатывались стерильной водой (контроль) и фунгицидом (погружением в раствор на 30 мин), просушивались между слоями стерильной фильтровальной бумаги и помещались в стерильные чашки Петри с двумя дисками стерильной фильтровальной бумаги, смоченными в стерильной дистиллированной воде. Через 24 ч после обработки растворами фунгицида каждый изолированный лист инокулировался путем диспергирова-

ния конидиеспор тестового образца с хорошо спорующих листьев, плотность инокуляции была на уровне 200–300 конидий/см<sup>2</sup> листовой поверхности. Затем чашки Петри в пластиковом боксе помещались в климатическую камеру (24 °С, продолжительность периодов освещения и темноты 12/12 ч) на 14-е сут. Опыт закладывался в трехкратной повторности. После периода инкубации оценивали интенсивность развития оидиума в сравнении с необработанным контролем. Процент подавления болезни или уровень чувствительности исследуемых популяций рассчитывали по формуле Эббота. Значение ЭК50 рассчитывали при помощи пробит-анализа [17] и электронных таблиц Excel. Фактор резистентности определяли по отношению ЭК50 обрабатываемых популяций к контрольным [18].

В результате многолетнего мониторинга чувствительности возбудителя оидиума к крезоксим-метилу (Строби в.г., 0,3 кг/га) в полевых условиях получены данные, представленные на рис. 1.

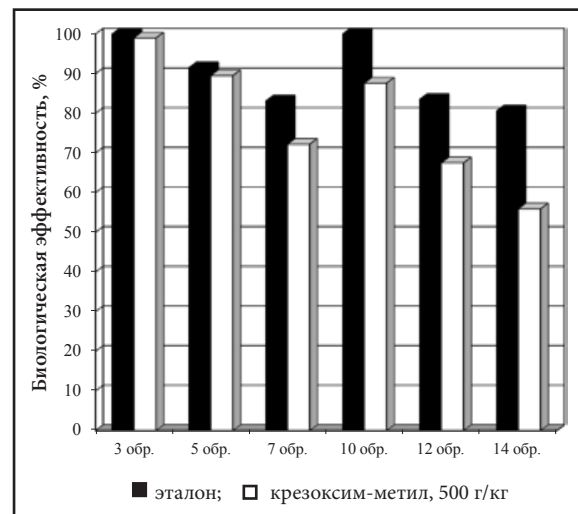


Рис. 1. Снижение биологической эффективности фунгицида Строби в.г., 0,3 кг/га, в защите от оидиума, 2006–2014 гг.

Снижение биологической эффективности фунгицида Строби, в.г. по сравнению с эталоном (чередование фунгицидов) в среднем за 2006–2014 гг. получено после 7, 10, 12 и 14 опрыскиваний на 10,9; 12,4; 16 и 24,7 % соответственно. Следовательно, максимальную потерю эффективности и, соответственно, уровень устойчивости возбудителя оидиума наблюдали после 14-ти опрыскиваний.

В результате лабораторных экспериментов рассчитан фактор резистентности возбудителя оидиума к крезоксим-метилу (табл. 1). Высокий фактор резистентности гетерогенных популяций возбудителя оидиума к крезоксим-метилу отмечен после 5-, 7- и 12-ти обработок Строби, в.г. в норме 0,3 кг/га; низкий – после шести обработок данным фунгицидом.

Следовательно, существенное снижение технической эффективности при использовании фунгицидов в полевых условиях происходит после нако-

Табл. 1. Определение фактора резистентности опытных популяций *Uncinula necator* Berkf. к крезоксим-метилу, 2014 г.

Фактор резистентности после опрыскиваний				
после 4	после 5	после 6	после 7 й	после 12
0,93	295,12 (высокий)	3,5 (низкий)	123,03 (высокий)	10 <sup>4</sup> (высокий)

пления в популяциях возбудителя оидиума форм с высоким фактором резистентности.

Таким образом, эффективное применение фунгицида Строби в.г. (50% крезоксим-метил, 500 г/кг) в норме 0,3 кг/га для защиты винограда от оидиума в условиях Южного берега Крыма возможно при условии предупреждения накопления устойчивых популяций возбудителя. Для этого необходимо его строгое применение в соответствии с рекомендациями производителя (не допустимо увеличение нормы расхода препарата), профилактически при чередовании с фунгицидами, не обладающими перекрестной резистентностью со стробилуринами.

#### Список литературы

- Gadoury DM, Pearson RC. Heterothallism and pathogenic specialization in *Uncinula necator*. *Phytopathology*. 1991; 81(10): 1287-93.
- Голышин Н.М. Фунгициды в сельском хозяйстве. М.: Колос. 1970: 161-77.
- Тютюрев С.Л. Проблемы устойчивости фитопатогенов к новым фунгицидам. *Вестн. защ. раст.* 2001; 1: 38-53.
- Erickson EO, Wilcox WF. Distributions of sensitivities to three sterol demethylation inhibitor fungicides among populations of *Uncinula necator* sensitive and resistant to triadimefon. *Phytopathology*. 1997; 87(8): 784-91.
- Урета HL, Урета M, Gubler WD. Sensitivity of *Uncinula necator* to benomyl, triadimefon, myclobutanil, and fenarimol in California. *Plant Dis*. 1997; 81: 293-7.
- Wilcox WF, Burr JA, Riegel DG, Wong FP. Practical resistance to QoI fungicides in New York populations of *Uncinula necator* associated with quantitative shifts in pathogen sensitivities. *Abstr. Phytopathol.* 2003; 93(6S): 90.
- International FRAC QoI working group minutes 2006, non-cereal part: Nove. 28th, 2006: [http://www.frac.info/frac/meeting/qoi/FRAC\\_QoI\\_Minutes\\_Dec\\_2006\\_print\\_version\\_web.pdf](http://www.frac.info/frac/meeting/qoi/FRAC_QoI_Minutes_Dec_2006_print_version_web.pdf).
- Miller TC, Gubler WD. Sensitivity of California isolates of *Uncinula necator* to trifloxystrobin and spiroxamine, and update on triadimefon sensitivity. *Plant Dis*. 2004; 88(11): 1205-12.
- Ma Z, Michailides TJ. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 2005; 24: 853-63.
- Gisi U, Sierotski H, Cook A, McCaffery A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag Sci.* 2002; 58: 859-67.
- Grasso V, Palermo S, Sierotzki H et al. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag. Sci.* 2006; 62: 465-72.
- Иванченко В.И., Бейбулатов М.Р., Антипов В.П. и др. Методические рекомендации по агротехническим исследованиям в виноградарстве Украины. Под ред. А.М.Авидзба. Ялта: ИВиВ «Магарач». 2004: 264 с.
- Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов антибиотиков и протравителей семян сельскохозяйственных культур. Под ред. К.В. Новожилова. М. 1985: 89 с.
- Stein U, Heintz C, Blalch R. Die in vitro-Priifung von Rebsorten auf Oidium- and Plasmopara-Resistenz. *Plant Dis*. 1985. Prot. 92: 355-69.
- Francis PW, Wilcox WF. Sensitivity to azoxystrobin among isolates of *Uncinula necator*: Baseline distribution and relationship to myclobutanil sensitivity. *Plant Dis*. 2002; 86(4): 394-404.
- Monitoring Methods. <http://www.frac.info/monitoringmethods>.
- Доспехов Б. А. Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных. М.: Колос. 1979: 206 с.
- Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. М.: Колос. 2007: 232 с.

## ПАТОГЕННОСТЬ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ИНОКУЛУМА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АЛЬТЕРНАРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ КУЛЬТУР

Гасич Е.Л., Ганнибал Ф.Б., Хлопунова Л.Б., Левитин М.М.  
ВНИИ институт защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург

Альтернариоз крестоцветных культур, вызываемый *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. и *A. brassicicola* (Schwein.) Wiltsh., является экономически значимым заболеванием в различных районах мира [1-5].

Разработаны лабораторные методики оценки устойчивости крестоцветных культур к альтернари-

озу, позволяющие оценить большое количество материала в стандартных условиях [6-9]. Обзор данных методик приведен в работе [10]. В результате сравнительной оценки нескольких методов, приведенных в работе [9], преимущество было отдано методу инокуляции отделенных листьев, также этими авторами

Таблица 1. Патогенность штаммов 2.37 *Alternaria brassicae* (\*) и 20.1 *A. brassicicola* (\*\*)  
для рапса масличного (метод агаровых блоков).

Температура, °С	Диаметр некроза, мм			
	Инокулом наносили на верхнюю поверхность диска		Инокулом наносили на нижнюю поверхность диска	
	Без укола	С уколом	Без укола	С уколом
16	2,2±0,4*/4,7±0,3**	5,5±0,5/4,0±1,2	4,3±1,2/8,0±1,0	5,7±1,4/8,3±0,9
24	<1/5,0	5,0/4,7±1,4	3,7±1,45/6,0±1,0	6,0±1,2/7,0±0,6
28	<1/6,0±1,2	4,7±0,7/5,3±0,3	4,8±1,9/10,0	4,7±0,3/10,0

была отмечена положительная корреляция между результатами инокуляции отделенных листьев и растений. Большинство авторов в качестве инокулюма использовали суспензию конидий с концентрацией порядка  $10^3$ – $10^5$  спор/мл.

Для штаммов *A. brassicicola*, характеризующихся стабильным образованием спороношения на агаризованных средах, использование конидиальной суспензии в качестве инокулюма предпочтительно. Большинство же штаммов *A. brassicae* характеризуется низкой споровой продуктивностью на питательных средах, а также быстрой потерей способности формировать споры при пересевах. Методы, предложенные рядом авторов для стимуляции спороношения [6, 7, 11, 12;], не всегда дают стабильный результат. Для заражения листьев могут использоваться агаровые блоки с мицелием и спороношением гриба, как это предлагалось польскими исследователями [8] для *A. brassicicola*. Цель исследования – оценить возможность применения мицелиального инокулюма *A. brassicae* и *A. brassicicola*.

Проведена оценка патогенности штаммов 2.37 *A. brassicae* и 20.1 *A. brassicicola* для листовых дисков рапса масличного сорта Оредеж 2 методом агаровых блоков. Из 2–3 нижнего листа растений рапса, находящихся в стадии 4–5 настоящего листа, буром вырезали диски диаметром 1 см и помещали в чашки Петри на увлажненную водой фильтровальную бумагу.

Штаммы выращивали на картофельно-сахарозном агаре в течение 2,5 нед в темноте при 24°C. При помощи бура из культуры вырезали агаровые блоки диаметром 4 мм, которые помещали в центр листового диска, мицелием к листовой поверхности. Чашки инкубировали при 16, 24 и 28°C. Диаметр повреждений измеряли на 3-и сут.

Повреждение листовой поверхности при помещении агаровых блоков с мицелием штамма 2.37 *A. brassicae* на нижнюю поверхность (НП) листового диска не оказывало существенного влияния на развитие некрозов. В случае нанесения инокулюма на верхнюю поверхность (ВП), повреждение дисков перед инокуляцией приводило к развитию более крупных некрозов. Температурные условия существенно не влияли на патогенность штамма (табл. 1).

Нанесение агаровых блоков с мицелием и спорами штамма 20.1 *A. brassicicola* на НП листового диска вызывало развитие более крупных пятен по сравне-

нию с нанесением инокулюма на ВП. Повреждение дисков перед инокуляцией не приводило к развитию более крупных некрозов. Температурные условия существенно не влияли на патогенность штамма в случае нанесения инокулюма на ВП диска, при нанесении инокулюма на НП наибольший диаметр некроза отмечался при 28 °С (табл. 1).

Изучено влияние питательной среды, возраста культуры и концентрации на патогенность мицелиального инокулюма штаммов 2.37 и 20.1 для листовых дисков рапса. Штаммы культивировали на жидкой модифицированной среде Чапека или соевой среде (50 мл среды на 250 мл колбу) на качалке (200 об/мин) в течение 3 и 7 сут. Мицелий отделяли от культуральной жидкости, отжимали, навеску мицелия растирали в фарфоровой ступке пестиком в определенном объеме воды. Одну каплю (10 мкл) мицелиальной суспензии помещали в центр листового диска.

Мицелий штаммов, полученных в жидкой культуре на качалке, обладал высокой патогенностью для рапса. Патогенность штамма 2.37 *A. brassicae* существенно не зависела от питательной среды, возраста культуры и стороны листовой поверхности, на которую наносился инокулюм. Существенных различий между средами культивирования по патогенности полученного на них мицелия штамма 20.1 *A. brassicicola* не обнаружено. Минимальная концентрация мицелия, при которой отмечалось развитие выраженных некрозов, составляла 1 мг/мл. Оптимальной для оценки патогенности обоих штаммов может являться концентрация 10 мг/мл (табл. 2).

Метод агаровых блоков может использоваться для оценки патогенности штаммов как *A. brassicicola*, так и *A. brassicae*. Агаровые блоки рекомендуется помещать на нижнюю поверхность листовых дисков. Недостатком метода является сравнительно продолжительный период культивирования, необходимый для достаточного развития колоний для получения нужного количества блоков. Кроме того, неравномерное развитие спороносных структур по поверхности колонии может определять различный инфекционный потенциал блоков (какие-то блоки содержат только мицелий, какие-то мицелий и споры). Для неспорулирующих или слабо спорулирующих штаммов *A. brassicae* наиболее оптимальным является их культивирование в жидкой культуре,



Таблица 2. Влияние среды культивирования, возраста культуры и концентрации инокулюма на патогенность мицелия штаммов 2.37 *Alternaria brassicae* (\*) и 20.1 *A. brassicicola* для рапса масличного.

Концентрация инокулюма, мг/мл	Диаметр некроза на 3 сут, мм			
	3 сут культура		7 сут культура	
	Модифицированная среда Чапека	Соевая среда	Модифицированная среда Чапека	Соевая среда
40	7,8±1,1*/6,7±0,2** 3,5±1,3***/5,0±1,0****	7,0±1,0/7,2±0,2 5,0±1,3/4,2±0,2	5,0±0,5/7,7±0,3 -/-	5,8±1,2/8,3±0,3 -/-
20	6,7±0,3/5,8±0,2 6,0±1,7/5,5±0,5	6,3±0,3/7,8±0,6 4,7±0,9/5,3±0,9	5,8±0,6/7,3±0,9 -/-	9,7±0,3/10,0 -/-
10	4,5±1,3/6,2±0,7 3,5±0,8/5,7±1,1	6,3±1,8/7,2±0,4 6,2±2,0/4,3±1,2	8,7±0,9/9,3±0,3 -/5,4±0,6	6,7±1,2/8,5±0,6 -/7,5±0,3
1	-/- -/-	-/- -/-	3,5±1,0/4,3±0,7 -/4,0±0,4	-/- -/6,5±0,3
0.1	-/- -/-	-/- -/-	<1/<1 -/1,4±0,1	-/- -/2,4±1,1
0.01	-/- -/-	-/- -/-	0/0 -/<1	-/- -/<1

\* – инокулюм *A. brassicae* наносили на ВП диска; \*\* – инокулюм *A. brassicae* наносили на НП диска

\*\*\* – инокулюм *A. brassicicola* наносили на ВП диска; \*\*\*\* – инокулюм *A. brassicicola* наносили на НП диска

-- не изучалось.

позволяющее в быстрые сроки получить необходимое количество инокулюма. Например, сырая биомасса трехсуточной культуры штамма 2.37 на соевой среде достигает ~300, а 7-суточной 1500 мг/колбу. Также этот метод может успешно использоваться для *A. brassicicola* и других видов *Alternaria*.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект 14-26-00067).

#### Список литературы

- Madej T. Incidence of disease affecting-cruciferous plants in Poland. Wissenschaftliche Zeitschrift der Wilhelm-Pieck-Universität Rostock, Naturwissensch. Reihe. 1986; 35: 50-1.
- Kolte SJ, Awasthi RP, Vishwanath. Assessment of yield losses due to *Alternaria* blight in rapeseed and mustard. Indian Phytopath. 1987; 40: 209-11.
- Stovold GE, Maiter RL, Francis A. Seed-borne levels, chemical seed treatment and effects on seed quality following a severe outbreak of *Alternaria brassicae* on rapeseed in New South Wales. Plant Prot Quart. 1987; 2: 128-31.
- Brun H, Plessis J, Renard M. Resistance of some crucifers to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. Proc. 7th Int Rapeseed Congr Poznan. Poland. 1987: 1222-7.
- Tewari JP. Resistance to *Alternaria brassicae* in crucifers. Proc. Meetings of Working Group "Integrated control in oilseed crops", Rothamsted (UK), 1-3 March 1990 and Paderborn (Germany), 19-20 April 1990. IOBC/WPRS Bull., Bull. OILB/SROP. 1991; 14(6): 154-61.
- Claassen U, Günzelmann A, Paul VY, Masuch G. Methods for testing the susceptibility of oilseed rape to *Alternaria brassicae* and *A. brassicicola*. Proc of the Meetings of working group "Integrated control in oilseed crops", Rothamsted (UK). 1-3 March 1990 and Paderborn (Germany). 19-20 April 1990. IOBC/WPRS Bulletin, Bull. OILB/SROP. 1991; XIV; 6: 162-5.
- Mridha MAU, Wheeler BEJ. In vitro effects of temperature and wet periods on infection of oilseed rape by *Alternaria brassicae*. Plant Pathol. 1993; 42: 671-75.
- Dakowska S, Jędrzycka M. Reakcja odmian rzepaku jarego no porażenie przez *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wilt. I Krajowa Konferencja Naukowa "Patogeny rzepaku oraz możliwości wykorzystania technik biologii molekularnej w hodowli odpornościowej". Poznan. 28 wrzesnia 2001. Poznan. 2001: 16-7.
- Doullah MAU, Meah MB, Okazaki K. Development of an effective screening method for partial resistance to *Alternaria brassicicola* (dark leaf spot) in *Brassica rapa*. Eur J Plant Pathol. 2006; 116: 33-43.
- Ганнибал Ф.Б., Гасич Е.Л., Орина А.С. Оценка устойчивости селекционного материала крестоцветных и пасленовых культур к альтернариозам. Методическое пособие. Под. ред. М.М. Левитина. СПб.: ГНУ ВИЗР РАСХХ. 2011: 50 с.
- Billotte JM. Une methode d'induction de la sporulation de l'*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. du colza en culture pure. Extrait du procès-verbal de la Séance du 16 Oct 1963: 1056-61.
- Ioshi MK, Singh US, Garg GK. Use of Brassica callus culture to induce sporulation in *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1988; 14: 59-62.

## ЭЛЕМЕНТЫ МИКОБИОТЫ НАДЗЕМНЫХ ПОБЕГОВ И КЛУБНЕЙ УВЯДАЮЩЕГО КАРТОФЕЛЯ

Приходько Е.С., Белошапкина О.О., Смирнов А.Н.

Сектор фитопатологии кафедры защиты растений РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева

Вегетационные сезоны 2010-2014 гг. характеризовались на территории Нечерноземной зоны контрастными погодными условиями. При этом короткие периоды выпадения значительного количества осадков сменялись довольно продолжительными периодами сухой погоды, максимальная температура днем достигала 35°–40 °С. Эти агрометеорологические условия создавали много проблем при ведении сельскохозяйственных производств. В частности, мы располагаем информацией о сильном полегании и отмирании надземных органов картофеля в разных регионах России.

**Цель исследования** – идентифицировать комплекс микроорганизмов грибной природы из листьев, стеблей и клубней, ассоциирующихся с полеганием картофеля в различных регионах России в условиях вегетационного периода 2014 г.

**Материалы и методы.** Фрагменты листьев и стеблей картофеля отбирали в следующих регионах с мелкомасштабных посадок (до 1 га) картофеля разных сортов в период с июля по октябрь 2014 г.:

(1) Москва: лаборатория защиты растений РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева;

(2) Ивановская область: Лухский район, деревня Порздни;

(3) Новгородская область: Валдайский район, деревня Большое Уклеино;

(4) Ленинградская область: окрестности г. Санкт-Петербурга;

(5) Владимирская область: Суздальский район (Владимирское ополье, окрестности г. Суздаль, поле Владимирского НИИ сельского хозяйства);

(6) Пермский край: Красновишерский район, г. Красновишерск. Отбирали 5 образцов листьев и стеблей с каждого обследованного поля картофеля. В Москве исследовали также клубни пораженных растений.

Фрагменты листьев, стеблей и клубней картофеля помещали во влажные камеры (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой), которые инкубировали при 22–24 °С и ограниченном освещении. Образующиеся налеты анализировали посредством световой микроскопии при увеличениях  $\times 800$ – $2000$ . Изучали морфологию и биометрию наблюдаемых структур грибов, на основании чего идентифицировали их до рода.

### Результаты и их обсуждение.

**Грибы, выявленные на листьях и стеблях.** В большинстве исследованных образцов из всех регионов обнаружили грибы из рода *Fusarium*. Доказательством этому служило наличие многочисленных бесцветных палочковидных или изогнутых макроконидий из нескольких клеток, одиночных и в скоплениях, со значительной примесью миниатюрных

микроконидий из одной или нескольких клеток аналогичной формы. В московских и пермских образцах в гниющих тканях дополнительно обнаружили группы типичных хламидоспор в цепочках на гифах.

Также почти во всех исследованных образцах обнаружили лимонovidные крупные коричневые многоклеточные конидии в хаотичных скоплениях и цепочках на бесцветном и светло-коричневом мицелии. В отдельных образцах из Ивановской и Владимирской областей, а также в Пермском крае обнаружили группы хламидоспор в цепочках. Эти структуры достоверно идентифицировали как грибы рода *Alternaria*.

В 30% образцов из Владимирской области обнаружили одноклеточные коричневые овальные споры, предположительно конидии, со слабо заостренными концами, единичные и в группах. Эти структуры характерны для грибов рода *Arthrinium* (синонимы *Gymnosporium* и *Papularia*). В образцах из Красновишерска (Пермский край) обнаружено повреждение нематодой и цисты вредителя. Так как образцы собирали в конце октября из-под выпавшего снега, то самих нематод обнаружить не удалось. Наличие довольно многочисленных хламидоспор фузариев и альтернарий можно связать с зимними условиями и с возможным влиянием нематод.

В единичных образцах из этого региона обнаружили бесцветные крупные двухклеточные асимметричные (базальная клетка меньше апикальной) конидии, отрастающие мутовкой от гифы-конидиеносца, единичные и в скоплениях. Эти грибные структуры удалось идентифицировать как принадлежащие роду *Arthrobotrys*. Грибы из рода *Arthrobotrys* – известные паразиты нематод, за счет того, что его мицелий образует на нематодах так называемые «ловчие кольца». Есть основания полагать, что этот факт существенно повлиял на развитие грибного сообщества в обследуемых образцах картофеля. В результате показано, что в условиях Пермского края присутствует естественная регуляция нематод, паразитирующих на картофеле.

Также в некоторых образцах из Пермского края присутствовали скопления одноклеточных коричневых овальных конидий с шиповатой неровной стенкой. На основании полученных данных микроскопирования их удалось отнести к грибам из рода *Epicoccium*. Этот гриб образуется на отмерших тканях, до того подвергнутым значительному стрессовому фактору, например, после обработки гербицидами.

**Грибы, выявленные на клубнях картофеля.** Во многих исследованных образцах обнаружили грибы из рода *Fusarium*. Доказательством этому служило наличие многочисленных бесцветных палочковидных или изогнутых макроконидий из нескольких

клеток, одиночных и в скоплениях, со значительной примесью миниатюрных микроконидий из одной или нескольких клеток аналогичной формы. В отдельных образцах дополнительно обнаружили группы типичных хламидоспор в цепочках на гифах.

Также в отдельных образцах присутствовали скопления одноклеточных коричневых шаровидных конидий с шиповатой неровной стенкой. На основании полученных данных микроскопирования их удалось отнести к грибам из рода *Epicothium*. В редких обнаружили одноклеточные коричневые овальные споры с заостренными концами, предположительно конидии, со слабо заостренными концами, единичные и в группах. Эти структуры характерны для грибов рода *Arthrimum*. Очень принципиальным результатом было обнаружение мутовчатых спороношений с овальными конидиями, идентифицированных как грибы рода *Verticillium*. Также обнаружили двухклеточные местами изогнутые конидии, принадлежащие грибам рода *Trichotecium*.

**Обсуждение результатов.** Таким образом, в результате исследований выявлено, что в разных регионах России на лежащих растениях картофеля выявлен микологический комплекс *Fusarium* – *Alternaria*. Предположительно именно эти грибы в большой степени способствовали полеганию ботвы картофеля в разных регионах России. На наш взгляд, довольно неожиданно мы обнаружили *Verticillium* именно при обследовании клубней полежавшего картофеля. Этот микологический результат может иметь большое прикладное значение в связи со спецификой уборки и хранения клубней картофеля.

Экспериментальные данные о масштабном образовании хламидоспор фузариев и альтернарий в

полевых условиях имеют теоретическое значение. Они способны играть существенную роль в жизненном цикле грибов. Вопрос об их очень значительном образовании при массовой вспышке развития болезни при полегании ботвы картофеля требует дальнейших исследований.

Образование хламидоспор, очевидно, целесообразно учитывать при определении стратегий размножения и поддержания жизнеспособности полевых популяций несовершенных грибов. Однако в отличие от оомицетов, хламидоспоры несовершенных грибов – это уникальные структурно-функциональные единицы. Соответственно, определение стратегий размножения и поддержания жизнеспособности этих грибов не сводится только к определению рангов образования конидий (РОК) и рангов агрессивности (РА). Для объективной оценки стратегий несовершенных грибов, прежде всего, фузариев и альтернарий, целесообразно вводить дополнительный показатель, позволяющий оценивать интенсивность образования их хламидоспор.

**Заключение.** Анализ климатических и микологических данных свидетельствует о сопряженной природе полегания картофеля, инфекционная составляющая которого сводится к патоккомплексу из грибов родов *Fusarium* и *Alternaria*.

Неинфекционная составляющая связана с потеплению климата и нарушениям структуры севооборота в виде длительного выращивания картофеля на одном месте или смежных территориях без надлежащей ротации. Этой возможности должна быть дана всесторонняя оценка, на основе которой целесообразно планировать и осуществлять защитные мероприятия.

---

## К МИКОБИОТЕ СОРНЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ ПСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Гасич Е.Л., Ганнибал Ф.Б., Берестецкий А.О., Казарцев И.А., Хлопунова Л.Б., Бильдер И.В.  
ВНИИ защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург

Разработка методов биологического контроля сорных растений при помощи фитопатогенных грибов базируется на выявлении видового состава микромицетов, поражающих сорняки. Изучению микобиоты Псковской области уделялось большое внимание, в том числе фитопатогенным микромицетам [1–10]. Однако специального изучения микобиоты сорных растений ранее не проводилось.

**Цель исследования** – определение видового состава микромицетов на сорных и дикорастущих травянистых растениях Псковской области.

Сбор образцов проводился в 2004, 2005, 2013 гг. в 15 районах области. Идентифицировано 122 вида микромицетов из 45 родов 4-х отделов. Из них 45 видов ранее не упоминались в вышеприведен-

ных источниках. На долю Deuteromycota приходится 62,3% выявленных видов, Basidiomycota – 20,5%, Ascomycota – 9,0%, Oomycota – 8,2%. Микромицеты обнаружены на 74 видах растений и 18 растениях неидентифицированных до вида из 75 родов 30 семейств.

Отдел Oomycota представлен 10 видами из порядков Peronosporales и Albuginales. Оомицеты включают возбудителей ложной мучнистой росы пастушьей сумки, подорожника большого, мака самосейки, мари белой, короставника полевого, осота шероховатого, трехреберника продырявленного, видов василька и чертополоха, а также возбудителей белой ржавчины пастушьей сумки, бодяка полевого и centaurei шероховатой.

Выявленные сумчатые грибы относятся к 11 видам, 6 семействам из порядков Erysiphales, Hymenochaetales, Phyllachorales, Taphrinales, Capnodiales, Helotiales. Представители порядка Erysiphales выявлены как возбудители мучнистой росы недотроги обыкновенной, манжетки, сивца лугового, подорожника большого, метлицы обыкновенной, купыря лесного, борщевика Сосновского, клевера, яснотки пурпурной, пикульника обыкновенного, марьянника лугового. Отмечено поражение соцветий вейника наземного, костреца безостого, лисохвоста лугового спорыньей (возбудитель *Claviceps purpurea*, сем. Clavicipitaceae). На сныти обыкновенной обнаружен *Protomyces macrosporus* (сем. Taphrinaceae). Представители остальных семейств вызывали листовые пятнистости лисохвоста лугового, вейника пурпурного (возбудитель *Phyllachora graminis*, сем. Phyllachoraceae) и видов клевера (возбудитель *Cymadothea trifolii*, сем. Mycosphaerellaceae и *Pseudopeziza trifolii*, сем. Dermateaceae).

25 идентифицированных видов базидиомицетов относятся к порядкам Microbotryales, Urocystidales и Pucciniales из трех классов Microbotryomycetes, Ustilaginomycetes и Pucciniomycetes соответственно. К обнаруженным представителям порядка Microbotryales относится один вид – *Microbotryum reticulatum*, зарегистрированный как возбудитель головни соцветий горца развесистого. Второй порядок (Urocystidales) был представлен видом *Thecaphora oligaspora*, вызывающим поражение листьев осоки.

23 вида из числа представителей порядка Pucciniales относятся к семействам Pucciniaceae, Melampsoraceae, Coleosporiaceae, Pucciniastraceae и являются возбудителями ржавчины купыря лесного, вероники колосистой, звездчатки дубравной, лопуха паутинистого, полыни обыкновенной, одуванчика лекарственного, мать-и-мачехи обыкновенной, тысячелистника птармики, бодяка полевого, осота полевого, колокольчика рапунцелевидного, молочая солнцегляда, репешка волосистого, подмаренника, горца, гречишки вьюнковой, видов вейника, тимopheевки луговой, костреца безостого, овсяницы, пырея ползучего, ежи сборной, горошка мышиного, горечавки легочной и нескольких видов клевера.

Наиболее многочисленными по числу видов были анаморфные грибы (анаморфы сумчатых грибов). Гифомицеты представлены 27 видами и включали возбудителей листовых пятнистостей горошка мышиного (возб. – *Botrytis cinerea*), астрагала (*Cercospora astragali*), цикория обыкновенного (*C. cichorii*), клевера ползучего (*C. zebryna*), купыря лесного (*Passalora bupleuri*, *Ramularia heraclei*), сабельника болотного (*P. comari*), дудника (*P. depressa*), мари белой (*P. dubia*), мать-и-мачехи обыкновенной (*R. brunnea*), колокольчика рапунцелевидного (*R. campanulata-latifoliae*), щавеля курчавого (*R. circumfusa*), бодяка полевого (*Ramularia synagae*), подмаренника гарцинского (*Ramularia galii*), герани (*Ramularia geranii*), борщевика сибирского и борщевика Сосновского (*Ramularia heraclei*), одуванчика лекарственного, я-

стребинки, горюхи ястребинковидной (*R. inaequalis*), мальвы лесной (*R. keithii*), фиалки горной (*R. lactea*), тимopheевки луговой, овсяницы луговой, вейника пурпурного (*R. pusilla*), короставника (*R. tricherae*), лютика (*R. torrendii*), крапивы двудомной (*R. urticae*), ежи сборной, костреца безостого (*R. secalis*). Также на пятнах, вызванных другими возбудителями, зарегистрированы сапротрофные виды *Alternaria tenuissima*, *Cladosporium herbarum* и *Epicoccum nigrum*.

Идентифицировано 49 видов целомицетных грибов, являющихся возбудителями пятнистостей клевера (*Ascochyta boltshauseri*), мари белой (*A. chenopodiicola*, *Phyllosticta ambrosioidis*), вахты трехлистной (*A. menyanthicola*), одуванчика лекарственного (*A. doronici*), осота шероховатого и бодяка полевого (*Boeremia exigua*), галинсоги мелкоцветковой (*Colletotrichum fuscum*, *Septoria galinsogae*), мать-и-мачехи обыкновенной (*Phyllosticta farfarae*), трехреберника продырявленного, лепидотеки пахучей (*S. matricariae*), полыни обыкновенной (*S. tabacina*), пижмы обыкновенной (*S. tanacetii*), короставника (*S. scabiosicola*), тимopheевки луговой (*C. graminicola*), овсяницы (*C. graminicola*, *S. agropyri*), ежи сборной (*C. graminicola*, *P. stomaticola*), вейника (*Diplodina calamagrostidis*, *P. donacis*, *S. alopecuri*, *S. arundinacea*), мятлика лугового (*Zymoseptoria tritici*), ожики равнинной (*C. luzulae*), осоки (*Phaeoseptoria caricicola*), камыша озерного (*S. scirpi*), мыльнянки лекарственной (*Gloeosporium saponariae*), дремы белой (*Phyllosticta lychnidina*, *S. melandryi-albi*), звездчатки средней (*S. stellariae*), борщевика Сосновского (*Phloeospora heraclei*), борщевика сибирского (*Phomopsis asteriscus*), сныти обыкновенной (*S. aegopodii*), чистотела большого (*S. chelidonii*), полевой заборной (*S. convolvuli*, *Stagonospora calystegiae*), вьюнка полевого (*S. convolvuli*, *S. longispora*, *Stagonospora calystegiae*), пикульника обыкновенного (*S. galeopsidis*), яснотки белой (*S. lamiicola*), шлемника обыкновенного (*S. scutellariae*), гравилата городского (*S. gei*), подорожника большого (*S. inconspicua*), люпина многолистного (*S. kaznowskii*), ослинника (*S. oenotherae*), горца (*S. polygonorum*), щавеля (*S. rumicis*, *S. acetosae*), седмичника европейского (*S. trientalis*). На мицелии мучнисторосяного гриба, поражающего подорожник большой, выявлен гиперпаразит *Ampelomyces quisqualis*, а в пустулах различных видов ржавчинных грибов *Eudarlucia caricis*.

Среди выявленных микромицетов, дальнейшего изучения в качестве потенциальных агентов биоконтроля требуют возбудители пятнистостей *Convolvulus arvensis*, *Chenopodium album*, видов рода *Heracleum* и видов сем. Asteraceae.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект 14-26-00067).

#### Список литературы

1. Лобик А.И. Грибные паразиты, собранные в Холмском уезде Псковской губернии летом 1912-1913 гг. Болезни растений, 1914, № 2-3, с. 74-89.

2. Александров И.Н. Мучнисторосяные грибы Псковской области. Труды ЛСХА. 1977; 122: 14-5.
3. Иванов И.С. Грибы (Fungi): облигатные паразитические микромицеты. Биоразнообразие и редкие виды национального парка «Себежский». Труды СПБООЕ, СПб, СПбГУ. 2001; 6(4): 44-7.
4. Черепанова Н.П., Кочетков В.В., Черепанов П.С. Материалы к микофлоре Псковской области. Вестн. ЛГУ. Сер. 3. 1989; 4(24): 33-40.
5. Мельник В.А., Попов Е.С., Шабунин Д.А. Материалы к изучению микобиоты Новгородской и Псковской областей. I. Гифомицеты. Микол. фитопатол. 2007; 41(6): 515-25.
6. Мельник В.А., Попов Е.С., Шабунин Д.А. Материалы к изучению микобиоты Новгородской и Псковской областей. II. Целомицеты. Микол. фитопатол. 2008; 42(1): 43-52.
7. Попов Е.С., Шабунин Д.А., Мельник В.А. Материалы к изучению микобиоты Новгородской и Псковской областей. III. Пиренокарпные аскомицеты. Микол. фитопатол. 2008; 42(2): 137-51.
8. Мельник В.А., Попов Е.С., Шабунин Д.А. Материалы к изучению микобиоты Новгородской и Псковской областей. IV. Хитридиевые, пероноспорные, мучнисторосяные, ржавчинные, экзобазидиальные, головневые, анаморфные грибы. Микол. фитопатол. 2008; 42(6): 524-39.
9. Мельник В.А. Микромицеты. Аннотированный список видов. В кн.: Грибы нац. парка «Себежский» Под. ред. Г.Ю. Конечной и С.А. Фетисова. Себеж. 2012; 2: 126-51.
10. Попов Е.С. Сумчатые грибы. Аннотированный список видов. В кн.: Грибы национального парка «Себежский». Под. ред. Г.Ю. Конечной и С.А. Фетисова. Себеж. 2012: 96-125.

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОЗА ЛЮЦЕРНЫ ХМЕЛЕВИДНОЙ (*MEDICAGO LUPULINA*) С ГРИБОМ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ *GLOMUS INTRARADICES*

Ганеева Н.Е.<sup>1</sup>, Юрков А.П.<sup>1,2</sup>, Степанова Г.В.<sup>3</sup>, Якоби Л.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Российский государственный гидрометеорологический университет, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ВНИИ кормов имени В.Р. Вильямса, Лобня

Одним из самых распространенных растительно-микробных симбиозов является арбускулярная микориза (АМ), формируемая грибами отдела *Glomeromycota* с большинством наземных растений. АМ способствует усилению питания (особенно фосфорного), защите растений от патогенов, их адаптации к стресс-факторам абиотической природы, а также изменяет гормональный статус растений, ускоряя их развитие [1].

Несмотря на значительную роль АМ в развитии растений и в целом в функционировании природных экосистем механизмы, контролирующие развитие эффективной АМ, до сих пор полностью не раскрыты. Экологические и физиологические аспекты в становлении эффективного симбиоза также остаются малоизученными.

Исследования показали наличие существенного полиморфизма по симбиотической эффективности АМ на люцерне хмелевидной как на внутривидовом уровне, так и на внутривидовом [2]. Это позволило выделить быстроотзывчивую на микоризацию линию MIS-1 люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L. var. *vulgaris* Koch) – самоопылитель, диплоид с высокой семенной продуктивностью. Эта линия представляется подходящим модельным растением для изучения механизмов эффективности АМ.

Цель исследования – изучение роста, симбиотической эффективности и микоризации грибом *Glomus intraradices* линии MIS-1 люцерны хмелевидной в различных температурных условиях.

Вегетационные опыты проводились в помещении с искусственным освещением, которое работало с периодичностью 18 ч – свет, 6 ч – ночь. Организовано 5 температурных режимов (ТР) со средней температурой за весь период опыта (день/ночь):

ТР1: 20/17 °С;

ТР2: 25/17 °С;

ТР3: 25/22 °С;

ТР4: 30/22 °С;

ТР5: 35/+22 °С

с отклонением в опытах ~1,5°С.

Постановка опытов проводилась по отработанной методике [2, 3]. Двухдневные проростки люцерны высаживались в сосуды с 220 г стерилизованного субстрата (дерново-подзолистой почвы с низким содержанием доступного фосфора) по 1 проростку в каждый сосуд. Инокуляционный материал в виде микоризованных грибом *G. intraradices* корней плектрантуса вносили на корни проростков люцерны при посадке, а в контроле вносили немикоризованные корни плектрантуса. Размножение гриба на плектрантусе длилось около полугода, и ко времени начала экспериментов корни были микоризованы примерно на 90% длины. Уборку люцерны проводили на 55-е сут от посадки, при этом учитывали продуктивность и фазы роста растений, встречаемость микоризации (*F*, %), интенсивность микоризообразования (*m*, %) и структуру АМ – обилие арбускул (*a*, %) и везикул (*b*, %) в микоризованной части корней, а также рассчитывали эффективность АМ по пока-

Таблица. Показатели продуктивности, симбиотической эффективности и микоризации люцерны хмелевидной при различных температурных режимах

Температурный режим	Инокуляция грибом АМ	Сухой вес, мг/растение		Эффективность АМ, %		F, %	m, %	a, %	b, %
		стебли	корни	стебли	корни				
ТР1: (20/17 °С)	без инокуляции	44,9	44,9	–	–	0	0	0	0
	инокуляция	36,1	24,7	13,5	46,6*	25	38	50	48
ТР2: (25/17 °С)	без инокуляции	57,7	38,6	–	–	0	0	0	0
	инокуляция	89,3	28,5	54,5*	26,1	54	54	54	13
ТР3: (25/22 °С)	без инокуляции	67,8	26,2	–	–	0	0	0	0
	инокуляция	230,7	49,2	240,2*	87,8*	69	44	47	20
ТР4: (30/22 °С)	без инокуляции	42,7	24,0	–	–	0	0	0	0
	инокуляция	167,9	47,0	293,2*	95,8*	70	51	49	9
ТР5: (35/22 °С)	без инокуляции	27,5	9,6	–	–	0	0	0	0
	инокуляция	54,2	14,6	97,1*	52,1*	46	29	58	4

Примечание: \* – существенные ( $p < 0,05$ ) отличия показателей продуктивности в варианте с инокуляцией по сравнению с вариантом без инокуляции, что говорит о достоверной эффективности симбиоза.

зателям продуктивности растений. Биологическая повторность составляла 15 растений (табл.).

По результатам оценки продуктивности люцерны видно, что наиболее благоприятными условиями для роста микоризованных растений был ТР3 (наибольший вес надземных частей – 231 мг/растение и корней – 49 мг/растение). Высокие показатели по весу стеблей и корней были также у микоризованных растений при ТР4 (168 и 47 мг/растение соответственно). Судя по показателям эффективности АМ в этих вариантах, высокая урожайность растений была во многом обусловлена «работой» микоризы.

Анализ урожая корней при разных ТР показал, что повышение температуры отрицательно влияло на этот показатель у немикоризованных растений: наибольшая масса корней была при ТР1 (45 мг/растение), а наименьшая – при ТР5 (10 мг/1 растение). У микоризованных растений наиболее низкая масса корней отмечена при ТР5 (15 мг/1 растение), как в случае с немикоризованными растениями. Однако при ТР1 и ТР2 микоризованные растения также имели сравнительно низкую массу корней (25 и 29 мг/растение соответственно). Кроме того, микориза в этих условиях была неэффективна. Это может указывать на то, что имеет место негативное влияние микоризы на рост корней в данных температурных условиях.

Показано, что температура влияла на развитие АМ. Об этом свидетельствуют данные по встречаемости (F, %) и структуре микоризы (m, a, и b, %), полученные путем микроскопии корней с применением общепринятых методов [5, 6]. Оптимальными для микоризации корней были условия при ТР3 и ТР4, при которых получены наиболее высокие

показатели встречаемости микоризы (F = 69 и 70% соответственно). Самый низкий показатель колонизации корней был при ТР1 (F = 25%). Однако при ТР1 получен наиболее высокий показатель обилия везикул в микоризованной части корней (b = 48%). Последнее может свидетельствовать об ускорении развития микросимбионта в условиях низкой температуры. Известно, что везикулы в процессе развития микоризы превращаются в споры, а обилие везикул и спор указывает на завершающий этап цикла развития гриба и подготовку его к стадии покоя в почве после гибели корней растения-хозяина.

Анализ структуры АМ при разных ТР показал, что обилие арбускул в микоризованной части корня (a, %) во всех вариантах имеет близкие значения в пределах от 47 до 58%, т.е. не зависит от температуры. И это несмотря на различия во встречаемости (F, %) и обилии везикул (b, %), а также на различия в показателях эффективности АМ при разных ТР. Можно предположить, что это связано с видовыми особенностями люцерны хмелевидной и гриба *G. intraradices*, обуславливающими характер их взаимодействия при образовании АМ.

Таким образом, на люцерне хмелевидной показано, что температура оказывает существенное влияние на развитие и эффективность АМ: (1) не выявлено взаимосвязи между эффективностью АМ и обилием арбускул; (2) низкая температура способствует формированию большего количества везикул; (3) оптимальные режимы для формирования эффективного симбиоза *M. lupulina* с *G. intraradices* являются ТР3, ТР4 и (4) при ТР1 и ТР2 АМ, формируемая *M. lupulina* с *G. intraradices* была неэффективной или слабоэффективной.

## Список литературы

1. Смит С.Э., Рид Д.Дж. Микоризный симбиоз. Пер. с 3-го англ. изд. Е.Ю. Ворониной. М.: Тов. науч. изд. КМК. 2012: 776 с.
2. Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В. и соавт. Эффективность инокуляции форм люцерны хмелевидной грибом арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* и внутринуллярная изменчивость растений по показателям продуктивности и микоризообразования. Сельскох. биол. 2007; 5: 67-74.
3. Юрков А.П., Якоби Л.М., Дзюбенко Н.И. и др. Полиморфизм популяции Павловская люцерны хмелевидной по показателям продуктивности, микоризации и эффективности симбиоза с *Glomus intraradices*. Сельскохоз. биол. 2011;3: 65-70.
4. Юрков А.П., Якоби Л.М. Получение мутантов люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) с изменениями развития арбускулярной микоризы. Естеств. техн. науки. 2011; 6(56): 127-33.
5. Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transact Br. Mycor Soc.* 1970; 55: 158-61.
6. Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Eds Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. Paris: INRA-Press. 1986: 217-21.

## ПАТОГЕННАЯ МИКОБИОТА КОЛЛЕКЦИИ ТРОПИЧЕСКИХ И СУБТРОПИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН АЗЕРБАЙДЖАНА

Гасымов Ш.Н.<sup>1</sup>, Велиева С.С.<sup>2</sup>, Тахмазова Д.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Центральный Ботанический Сад НАНАз, Баку

<sup>2</sup>Институт микробиологии НАНАз, Баку

<sup>3</sup>Азербайджанский Государственный Педагогический Университет, Баку

Сегодня под воздействием техногенного и антропогенного факторов исчезают многие виды тропических и субтропических растений, особенно реликты и эндемы. В связи с этим увеличивается роль ботанических садов в сохранении биоразнообразия растительного мира путем создания коллекций ценными видами и последующей реинтродукцией растений в естественные места их произрастания [3]. Поэтому для создания и успешного сохранения биологического разнообразия растений в виде коллекций необходимо изучить биологию интродуцентов в новых условиях.

В этом плане одним из важных вопросов является защита тропических и субтропических растений от вредителей и болезней в условиях оранжереи. В условиях защищенного грунта на тропические и субтропические растения существенно влияют патогенные организмы, особенно грибы. Большинство патогенных грибов нарушают процессы нормального роста и развития растений, в результате значительно снижается долговечность, декоративные качества растений, что иногда приводит растения к гибели.

Коллекция фондовой оранжереи Центрального ботанического сада НАН Азербайджана содержит 294 видов растений, относящихся к 164 родам, принадлежащих 60 семействам различных эколого-географических зон Земного шара – тропики, субтропики (сухие и влажные), пустыни, саванны, горные районы [2].

Эти экзотические растения из различных эколого-географических зон Земного шара при выращивании требуют определенный режим температуры, освещения и влажность и воздуха. Нарушение этого режима приводит к ослаблению растения. Ослаблен-

ные растения часто заражаются болезнями, которые в значительной степени вызывают потерю декоративности и гибель растений. Сохранение здоровой коллекции является ответственной задачей для каждого научного работника ботанических садов. Поэтому состояние коллекции оранжерейных растений зависит от соблюдения агротехники, своевременного выявления патогенов и фитофагов, а также проведения мероприятий, направленных на оздоровление растений. Для успешного сохранения и оздоровления коллекции тропических и субтропических растений Центрального ботанического сада НАН Азербайджана начаты исследования состава патогенной микобиоты в закрытом грунте [1]. Проведенные исследования коллекции фондовой оранжереи выявили большое разнообразие видового состава патогенных грибов.

В результате проведенных работ были идентифицированы 143 видов микромицетов относящихся к 71 родам: 1. *Alternaria* – 2 вида; 2. *Antrodia* – 1; 3. *Armillaria* – 1; 4. *Ascochyta* – 2; 5. *Botryodiplodia* – 14; 6. *Botrytis* – 14; 7. *Bremia* – 1; 8. *Cephalosporium* – 1; 9. *Ceratocystis* – 14; 10. *Ceratostomella* – 1; 11. *Cereospora* – 5; 12. *Ceuthospora* – 1; 13. *Chaetodiplodia* – 1; 14. *Coleosporium* – 1; 15. *Colletotrichum* – 8; 16. *Coniothyrium* – 1, 17. *Corynespora* – 1; 18. *Cylindrocarpon* – 2; 19. *Deuterophoma* – 1; 20. *Diplodia* – 3; 21. *Erysiphe* – 1; 22. *Exobasidium* – 1, 23. *Exosporium* – 1; 24. *Fusarium* – 8; 25. *Fulvia* – 1; 26. *Fomes* – 1; 27. *Gloeosporium* – 11; 28. *Glomerella* – 2, 29. *Graphiola* – 1; 30. *Helminthosporium* – 1; 31. *Hemileia* – 2; 32. *Haplobasidium* – 1; 33. *Lasiodiplodia* – 1; 34. *Leptothyrium* – 1; 35. *Meliola* – 1; 36. *Macrospora* – 2; 37. *Mycosphaerella* – 2; 38. *Marasmius* – 1; 39. *Macrosporium* – 1; 40. *Nectria*

– 2; 41. *Oidium* – 5; 42. *Olpidium* – 1; 43. *Omphalia* – 1; 44. *Phytophthora* – 7; 45. *Pythium* – 4; 46. *Penicillium* – 4; 47. *Phyllosticta* – 2; 48. *Pestalotia* – 2; 49. *Phyllosticta* – 3; 50. *Peronospora* – 2; 51. *Phomopsis* – 1; 52. *Phoma* – 2; 53. *Polystichum* – 1; 54. *Pucciniastrum* – 1; 55. *Pyricularia* – 1; 56. *Puccinia* – 1; 57. *Pseudocercospora* – 1, 58. *Rhizoctonia* – 2; 59. *Rhizopus* – 1; 60. *Septoria* – 7; 61. *Stagonospora* – 1; 62. *Septogloeum* – 1; 63. *Sclerotinia* – 1; 64. *Sclerotium* – 2; 65. *Sclecotrichum* – 1; 66. *Scutellonema* – 1; 67. *Thielaviopsis* – 1, 68. *Trachysphaera* – 1; 69. *Tubercularia* – 1; 70. *Uredo* – 4; 71. *Verticillium* – 2.

Значительная часть выявленных патогенных грибов коллекции оранжереи являются возбудителями многих опасных болезней. Поэтому в условиях оранжереи болезни тропических и субтропических растений очень вредоносны и разнообразны (гниль корней, корневой шейки и основания стебля и разные части вегетативных и генеративных органов; пятнистости, фузариозная гниль, мягкая гниль, хлороз, побурение, мокрая гниль корней, сердцевина стебля и сухая гниль).

Формирование и развитие патогенной микобиоты в коллекции тропических и субтропических

растений в оранжереи идет по-разному. Основные грибные болезни поражают ослабленные, плохо вегетирующие растения. Учитывая это необходимо постоянный мониторинг фитопатогенов коллекции тропических и субтропических растений для выявления болезней, что позволит своевременно проводить правильную агротехнику, обосновывать необходимые защитные мероприятия.

#### Список литературы

1. Гасымов Ш.Н. Патогенные грибы, вызывающие болезни тропических и субтропических растений. Тр. Инст. микробиол. НАН Азербайджана. 2008; 6: 200-8.
2. Гасымов Ш.Н. Коллекционный фонд тропических и субтропических растений Центрального ботанического сада. “Интродукция и акклиматизация растений”. В сб.: Тр. Центр. бот. сада НАН Азербайджана. Баку. 2004; 4: 142-8.
3. Международная программа ботанических садов по охране растений. Международный совет ботанических садов по охране растений. – М.: Bot Gardens Conserv Intern. 2000: 58 с.

## ВЛИЯНИЕ ЦВЕТКОВОЙ ПЛЕНКИ НА МИКОБИОТУ ГЕНОТИПОВ ОВСА

Гаврилова О.П.<sup>1</sup>, Грибченко Э.С.<sup>1</sup>, Лоскутов И.Г.<sup>2,3</sup>, Гагкаева Т.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург–Пушкин

<sup>2</sup>Всероссийский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Зерно овса представляет собой важный источник питательных веществ для организма и способствуют его оздоровлению [1]. Однако зараженность овса микромицетами, особенно, способными образовывать токсичные вторичные метаболиты, может оказать негативный эффект на пищевые и кормовые качества продукции, изготовляемой на основе его зерна. Поскольку овес является пленчатой культурой, то значение цветковой пленки в процессе инфицирования зерновки патогенами имеет особую важность в понимании взаимоотношений растений и патогенов. Кроме пленчатой формы, у овса существует также голозерная форма, которая характеризуется отсутствием цветковых пленок.

**Цель исследования** – оценка влияния фактора пассивной морфологической устойчивости овса (наличие цветковой пленки) на зараженность зерна различными патогенами.

Зараженность генотипов овса из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова оценивали на искусственном инфекционном фоне в условиях Ленинградской области в 2007 и 2014 гг. В поле, в период выметывания проводили заражение штаммами *F. sporotrichioides* Sherb. растений овса. После ручного обмолота, устойчивость генотипов овса оценивали по трем параметрам: зараженность зерна грибами, количество

ДНК трихотеценпродуцирующих грибов *Fusarium* и количество фузариотоксинов в зерне – дезоксиниваленола (ДОН) и Т-2/НТ-2 токсинов [2]. Зараженность зерна грибами определяли на питательной агаризованной среде, после его предварительной поверхностной стерилизации. Зараженность зерна пленчатых образцов овса оценивали двумя способами – в цветковой пленке и после ее механического удаления с поверхности зерновки. Для количественного определения содержания грибов *Fusarium* применяли метод TaqMan-ПЦР с группоспецифичными праймерами для видов фузариевых грибов, продуцирующих трихотеценовые микотоксины [3]. Анализ количества микотоксинов выполняли иммуноферментным методом с применением тест-систем российского производства, пределы чувствительности которых составляли 4 и 20 мкг/кг соответственно для Т-2/НТ-2 токсинов и ДОН [4]. ДНК и микотоксины экстрагировали из муки, полученной из образцов зерна овса и просеянной через мелкоячеистое сито для отделения цветковых пленок.

Анализ зараженности фузариевыми грибами зерна генотипов овса, выращенных в 2007 г., выявил широкое варьирование этого показателя – от 0 до 100%. После удаления пленки инфицированность грибами *Fusarium* пленчатых овсов в среднем сни-



жалась на 58,3% (0 – 83,3%). Несмотря на высокий искусственный фон фузариозной инфекции в микобиоте овса выявили виды грибов, относящихся к другим таксономическим группам. Значительная часть грибов *Alternaria* также была сконцентрирована в цветковой пленке овса, при этом зараженность зерна составляла 0–14% и после очистки зерновки уменьшалась на 85% (от 15 до 100%).

В тоже время, рассматривая цветковую пленку как механическую преграду для проникновения микромицетов, нельзя не отметить уникальную генетическую устойчивость голозерных форм (табл.).

Зерно голозерных форм овса было заражено в существенно меньшей степени, а в муке, полученной из такого зерна, выявляли значительно меньше микотоксинов и ДНК токсинопродуцирующих грибов.

Погодные условия вегетационного периода 2014 г. в Ленинградской области характеризовались необычно высокими температурами и отсутствием осадков в июле, и оказали неблагоприятное воздействие, как на растения овса, так и развитие гриба *F. sporotrichioides*. В результате, несмотря на значительную инфекционную нагрузку, внесенную в поле, зараженность образцов овса была относительно

Таблица. Характеристика пленчатых и голозерных форм овса из коллекции ВИР по зараженности зерна грибами, количеству микотоксинов и ДНК грибов *Fusarium* в зерне.

Форма овса (число образцов, шт.)	Показатели в среднем (диапазон значений)						
	<i>Fusarium</i> spp, %		Микотоксины, мкг/кг		ДНК <i>Fusarium</i> , нг/ мкл	<i>Alternaria</i> spp, %	
	П.*	О.	Т-2/ НТ-2 токсины	ДОН		П.	О.
Пленчатая (68)	13 (0–100)	7 (0–98)	558 (0–5625)	717 (53–11190)	0,7 (0–3,4)	3 (0–14)	1 (0–6)
Голозерная (6)	–	1 (0–4)	107 (0–397)	233 (91–536)	0,3 (0,6–0,04)	–	1 (0–6)

\* П. – зерновка в цветковой пленке, О. – зерновка, очищенная от цветковой пленки.

невысокой. Т-2 токсин также был выявлен только в следовых количествах у 56% образцов из 12-ти анализированных.

Кроме *F. sporotrichioides*, патогена использованного для создания инфекционного фона, на зерне овса были выявлены следующие виды фузариевых грибов: *F. anguioides* Sherb., *F. poae* (Peck.) Wollenw., *F. incarnatum* (Desm.) Sacc. и *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas. В среднем зараженность зерна грибами *Fusarium* была низкой – 2% (пределы варьирования составили 0–8%).

Встречаемость представителей грибов других таксономических групп (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoecium*, *Phoma*, *Penicillium*, *Bipolaris*, *Aspergillus*) на зерне овса варьировала по образцам. Представители родов *Alternaria* и *Cladosporium* доминировали в комплексе патогенов зерна овса – зараженность зерна в пленке составляла 20–24%, но и после ее удаления они оставались наиболее представительными группами микобиоты – 8,7 и 2,5% соответственно (рисунок). Удаление цветковой пленки снижало зараженность зерна в среднем на 77,7%. Таким образом, у

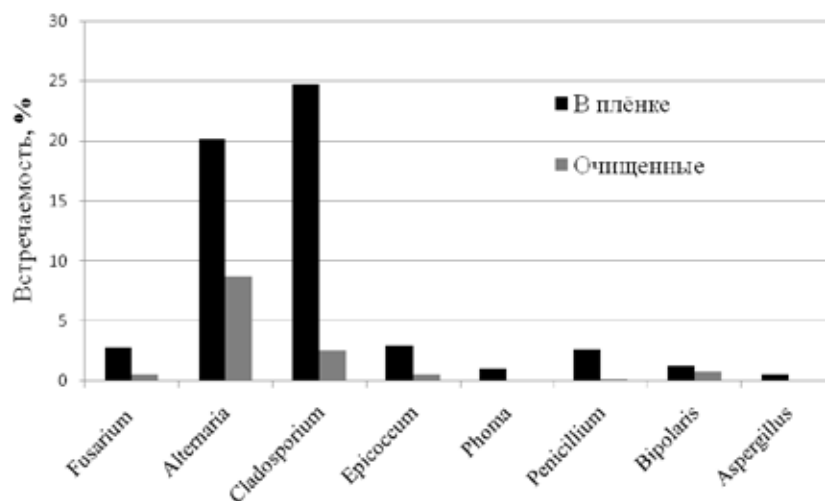


Рисунок. Численность различных таксономических групп грибов, выделенных из зерна овса в цветковой пленке и после ее удаления

пленчатых форм овса цветковая пленка, препятствующая колонизации зерновки грибами, является фактором пассивной устойчивости. Прилегающая к зерновке пленка подсыхает быстрее, чем сама зерновка, и легко может быть заражена слабопатогенными и сапротрофными грибами. В условиях повышенной влажности, даже непатогенные виды грибов могут проникнуть с пленки в зерновку и колонизировать ее, что может привести, как к снижению всхожести зерна, так и к ухудшению его пищевых и кормовых качеств. По всей видимости, у голозерных форм овса существуют другие факторы устойчивости к фузариозу, препятствующие заражению зерна грибами и образованию микотоксинов [5]. Это недавно выявленное уникальное свойство голозерных форм овса способствует повышению к ним интереса селекционеров и производителей овсяной продукции, наблюдаемого во всем мире [6, 7, 8].

*Исследование частично финансировано грантом Российского научного фонда (проект № 14-16-00072).*

#### Список литературы

- Rose DJ. Impact of whole grains on the gut microbiota: the next frontier for oats? *Br J Nutr.* 2014; 112(S2): 44-9.
- Gagkaeva TYu, Gavrilova OP, Yli-Mattila T, Loskutov IG. Sources of resistance to *Fusarium* head blight in VIR oat collection. *Euphytica.* 2013; 191(3): 355-64.
- Halstensen AS., Nordby KC, Eduard W, Klemsdal SS. Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. *J Environ Monit.* 2006; 8: 1235-41.
- Кононенко Г.П., Буркин А.А., Соболева Н.А., Зотова Е.В. Иммуноферментный метод определения Т-2 токсина в контаминированном зерне. *Прикл. биохим. микробиол.* 1999; 35(4): 457-62.
- Boutigni A-L, Richard-Forget F, Barreau C. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *Eur J Plant Pathol.* 2008; 121: 411-23.
- Adler A, Lew H, Moudry J et al. Microbiological and mycotoxicological quality parameters of naked and covered oats with regard to the production of bran and flakes. *Die Bodenkultur.* 2003; 54: 41-8.
- Peltonen-Sainio P, Kirkkary A-M, Jauhianen L. Characterizing strengths, weakness, opportunities and threats in producing naked oat as a novel crop for northern growing conditions. *Agricult. Food Sci.* 2004; 13(1-2): 212-28.
- Баталова Г.А. Перспективы и результаты селекции голозерного овса. *Зернобоб. круп. культ.* 2014; 2(10): 64-9.

## СОСТАВ ПАТОГЕННОЙ МИКОБИОТЫ СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА ПШЕНИЦЫ

*Глинушкин А.П.<sup>1</sup>, Белошапкина О.О.<sup>2</sup>, Акимов Т.А.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург;

<sup>2,3</sup>РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

Зерновое производство является стратегическим для России, а регион Южного Урала занимает в ней ведущее место в обеспечении качественным зерном. Низкая реализация потенциальной продуктивности растений во многом является следствием неблагоприятного фитосанитарного состояния посевов и семян. Микробиота зерновок, способность их к прорастанию, формирование биомассы проростков находятся в зависимости от почвенных и климатических условий, а также генотипических особенностей сортов. Поэтому необходим регулярный и тщательный анализ семенного материала по видовому составу возбудителей с учетом вредоносности и реакции сорта на патогены [1, 5].

Одной из задач нашего комплексного исследования по оценке патоконплекса агроценозов и семенного материала зерновых культур было уточнить видовой состав, распространенность и вредоносность грибных патогенов в семенном материале пшеницы из разных регионов.

Базовый мониторинг фитосанитарного состояния семян пшеницы проводили в 9 предприятиях в условиях Южного Урала, а также на Полевой опытной станции РГАУ-МСХА (г. Москва). Использо-

ваны общепринятые и модифицированные фитопатологические, микробиологические лабораторные методы исследований.

Анализы зараженности семенного материала яровой пшеницы Южного Урала, характеризующегося в целом засушливым, континентальным климатом, выявили различия по видам возбудителей в хозяйствах (табл. 1). В патоконплексе семян преобладали грибы родов *Fusarium* – до 14,8% и *Alternaria* – 12,0%. Зараженность склероциями *Claviceps purpurea* была минимальной (до 0,5%).

В течение описанных лет во всех обследованных хозяйствах улучшилось фитосанитарное состояние семенного материала, что обусловлено комплексом проводимых мероприятий. Были применены как химические и биологические методы защиты яровой пшеницы, так и другие мероприятия, например, обновление семенного фонда, сортосмена ранее выращиваемых сортов, использование современных семяочистительных линий.

В Сибири, в схожих условиях с климатом Оренбуржья, по сообщению Е.Ю. Тороповой [6] в результате микологических анализов на семенах мягкой яровой пшеницы было выявлено 7 родов патогенных

Таблица 1. Динамика зараженности (%) семенного материала яровой пшеницы в хозяйствах степной зоны Южного Урала (2006–2009 гг.)

Возбудитель	Хозяйства								
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Ustilago tritici</i>	1,3/0**	-/-	5,1/0	1,0/0	3,1/0	1,1/0	0,3/0	0/0	0/0
<i>Tilletia caries</i>	3,8/0	-/-	16,3/0	2,7/0	7,3/0	2,4/0	2,1/0	0/0	0/0
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	8,9/1,1	6,3/1,3	9,1/0,7	6,7/0,5	6,1/2,1	4,3/0,3	7,8/1,9	1,0/0,9	4,3/3,1
<i>Fusarium sp.</i>	10,3/2,7	6,1/2,8	14,8/2,1	9,8/3,1	10,3/3,1	10,7/1,7	14,1/6,3	8,7/4,8	12,6/10,3
<i>Alternaria sp.</i>	7,1/2,1	8,9/3,7	9,7/2,8	5,9/4,7	12,0/3,1	9,3/3,1	10,3/6,1	6,3/5,1	7,8/4,5
<i>Mucor, Penicillium</i> и др. плесневые	3,1/1,3	3,7/2,8	5,8/0,7	5,1/2,0	5,3/1,1	4,3/1,7	5,3/4,7	4,1/3,1	4,1/3,7
<i>Claviceps purpurea</i>	0,2/0	0/0	0,3/0	0,3/0	0,3/0	0,3/0	0,5/0,1	0/0	0/0

Примечание: \* хозяйства с разной формой собственности: 1 – КФХ «Галина»; 2 – КФХ «Мария»; 3 – КФХ «Соловых А.Д.»; 4 – КФХ «Уран»; 5 – КФХ «Родник»; 6 – ООО «Поиск»; 7 – ОАО «Саринский»; 8 – ЗАО «Обильное»; 9 – ЗАО «Искра»; \*\* – в числителе зараженность в первый год учета, в знаменателе – через 2 года.

Таблица 2. Результаты исследования зараженности и качества семян озимой пшеницы разных репродукций (рулонный метод, сорт Оренбургская 105, 2009–2012 гг.)

Варианты	Длина, см		Длина корней, см					Распространенность болезней, %		
	Растения	Коллеоптиля	1	2	3	4	5	бактериозы	микозы	Смешанное
Питомник размножения	11,3	7,4	11,1	9,3	7,7	5,8	4,8	1,7±0,3	2,3±0,5	0,7±0,1
Супер элита	11,6	6,9	9,8	8,2	6,4	4,8	1,8	4,0±0,9	2,7±0,8	2±0,2
Элита	9,9	5,0	9,3	7,7	6,6	5,3	4,5	3,0±1,0	11,0±3,0	3,3±0,5
Первая репродукция	10,8	8,3	10,6	8,9	7,4	5,5	4,4	13,6±1,7	28,0±4	2±0,3
НСР <sub>05</sub>	2,0	0,8	1,7	1,3	1,1	1,0	0,7	-	-	-

грибов, на ячмене – 9 родов, в т. ч. как наиболее вредоносные, описаны *Fusarium sp.*, *Bipolaris sp.*, *Tilletia sp.*, *Ustilago sp.*. Отмечается схожесть патогенной микобиоты на семенах озимой и яровой пшеницы.

Установлены определенные закономерности по исходной зараженности семян и показателям роста и развития растений в зависимости от репродукции, или классности, семенного материала (табл. 2).

Анализ семенного материала озимой пшеницы с Полевой опытной станции РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева (Московский регион с умеренно-континентальным климатом и достаточным увлажнением) выявили иной состав микобиоты (табл. 3).

Доминирующим компонентом патогенной микобиоты семян озимой пшеницы практически во все годы были грибы рода *Alternaria sp.*, распространенность которых статистически различалась и варьировала от 43 до 62%. Инфекционные структуры

Табл. 3. Динамика зараженности (%) семенного материала озимой пшеницы пшеницы (линии L-15, L-1, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева)

Возбудитель	Годы				НСР <sub>05</sub>
	2009	2010	2011	2012	
<i>Alternaria sp.</i>	57,8	45,9	61,5	43,2	5,76
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	20,7	17,6	10,4	5,3	5,77
<i>Fusarium sp.</i>	11,1	9,8	21,3	45,0	5,99
<i>Mucor, Penicillium</i> и др. плесневые	6,7	8,4	6,8	11,8	1,99

*Tilletia caries* и *Claviceps purpurea* не были обнаружены в течение четырех лет.

Произошло существенное снижение распространенности гриба *Bipolaris sorokiniana* (20,7– 5,3%), но резко возросла зараженность семян представителями *Fusarium* (11,1 – 45,0%), однако статистически такая динамика подтвердилась лишь в последние два года исследований. Распространенность плесневых грибов практически все годы варьировала несущественно и только в 2012 г. достигла показателя 11,8 %.

Учитывая, что различные виды гриба *Fusarium* sp. поражают растения пшеницы в течение всей вегетации, в том числе и в зимний период (*F. nivale*), рост распространенности фузариев в условиях Нечерноземья требует дальнейшего изучения их состава и динамики. Необходимость идентификации видового состава фузариевых грибов во всех зонах обусловлена также тем, что многие из них продуцируют микотоксины, различающиеся по своей токсичности для теплокровных [2]. Основным методом дезинфекции семян зерновых является обработка химическими и биологическими препаратами. При выборе их необходимо учитывать состав патогенов.

ГОСТ 12044-93, регламентирующий методы определения зараженности семян болезнями, базируется на методике Н.А. Наумовой (1960 г.) для *Fusarium* sp. и *B. sorokiniana* и не предполагает выбора препаратов и их смесей для защиты семян.

При фитосанитарных анализах нами была расширена линейка возбудителей с двух до четырех (*Fusarium* sp., *B. sorokiniana*, *Alternaria* sp. и *Penicillium* sp.) как с моно-, так и смешанным поражением [4]. Подобно *Alternaria* sp. следует описывать по 4-балльной шкале и характерные поражения остальными возбудителями: 1 балл – наличие налета и изменения окраски, в основном, в светло-серый цвет на зерновке нормального проростка; 2 балла – наличие серо-черного налета и пятен на колеоптиле, стебле или корешках при угнетении не более 50%; 3 балла – наличие характерного налета и пятен на колеоптиле, стебле или корешках при угнетении более 50%; 4 балла – непроросшие или проросшие (с длиной не более 1 см колеоптиля, стебля или корней); с подтвержде-

нием наличия патогена микроскопированием спор и мицелия.

Нами также разработан алгоритм методик определения средств и их комбинации для защиты и корректирования развития растений пшеницы в зависимости от состава патогенной микобиоты, в т.ч. смешанной (исключая головневые грибы).

**Закключение.** Сравнивая патогенный состав грибных микроорганизмов на семенах пшеницы в разных по климатическим и почвенным условиям, выявили постоянное присутствие грибов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Bipolaris*, и *Penicillium* с явным преобладанием патогенов 2-х первых родов. В условиях неудовлетворительного фитосанитарного состояния семян необходим подбор активных веществ против конкретных патогенов на основе оценки партий семенного материала.

#### Список литературы

1. Боме Н.А. Колоколова Н.Н., Белозерова А.А. и др. Устойчивость сортов зерновых культур к стрессовым факторам. Усп. совр. естеств. 2006; 4: 28.
2. Гакаева Т.Ю. Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур. журн. Защ. карант. раст. (прилож.). 2011; 5: 70-120.
3. Глинушкин А.П. Эффективность методики определения качества семян при производстве яровой мягкой пшеницы. Изв. Оренбургского ГАУ. 2010; 1(25): 39-41.
4. Глинушкин А.П. Белошапкина О.О. Влияние синтетических и биологических препаратов на всхожесть семян и выживаемость пшеницы. Достиж. науки и техн. АПК. 2013; 1: 11-4.
5. Соколов М.С., Марченко А.И., Санин С.С. и др. Здоровье почвы агроценозов как атрибут ее качества и устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам Торопова. Изв. ТСХА. 2009; 1: 13-22.
6. Торопова Е.Ю. Экологические основы защиты растений от болезней в Сибири. Монография. Под ред. В.А. Чулкиной. Новосибирск. 2005: 370 с.

### РАСОВЫЙ СОСТАВ *FUSARIUM OXYSPORUM* *F.SP. VASINFECTUM* (FOV) В ОТДЕЛЬНЫХ ОБЛАСТЯХ УЗБЕКИСТАНА

Глухова Л.А.<sup>1</sup>, Шералиев А.Ш.,<sup>1</sup> Эгамбердиев Ш.Ш.<sup>2</sup>, Салахутдинов И.Б.<sup>2</sup>, Абдуллаев А.А.<sup>1</sup>,  
Шеримбетов А.Г.,<sup>1</sup> Зохидов А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт Генетики и экспериментальной биологии растений АН РУз,  
п/о Юкори-Юз Ташкентской области

<sup>2</sup>Центр геномики и биоинформатики АН, Министерства сельского и водного хозяйства  
Узбекистана и объединение 'Uzpakhtasanoat', Узбекистан

В последние десятилетия расширяется круг фузариев-оппортунистов, а паразитические формы становятся все более агрессивными и токсиногенными, опережая в своей эволюции эволюцию культурных растений [1–3]. Материалами для исследований служили образцы различных органов растений и семян

хлопчатника, собранных в различных климато-географических зонах Узбекистана, и почва из разных горизонтов пахотного слоя хлопковых полей.

Микологическая экспертиза образцов больных растений включала: промывание отрезков образцов, размером 2 – 3 мм, в контейнерах из инертного мате-

риала под проточной водопроводной водой в течение 2 ч; поверхностную стерилизацию: последовательное погружение на 30 сек в чашки Петри (ЧП) со стерильной дистиллированной водой: (а) с добавлением детергента твин-80 (0,002%); (б) в 50% этанол; (в) в 0,5%-ный раствор гипохлорита натрия; (г) 3-кратное ополаскивание в стерильной дистиллированной воде по 1 мин. Затем отрезки просушивали на стерильной фильтровальной бумаге, раскладывали на поверхность различных агаризированных сред [4].

Поверхностная стерилизация образцов семян хлопчатника включала делинтацию серной кислотой, погружение в 70%-ный этанол (об/об) (1 мин), в 2,5%-ный раствор гипохлорит натрия (об/об) до 20 мин, трехкратное ополаскивание в стерильной дистиллированной воде [5]. Экспертизу образцов почвы с хлопковых полей проводили классическими методами (б) посева последовательных разведений почвы в стерильной дистиллированной воде в соотношении почва/вода: 1: 1000 и 1: 10 000 в ЧП на среду различных агаризированных сред.

Для подавления бактериальной микрофлоры в среды (рН в пределах 6,0–7,2) добавляли хлорамфеникол или стрептомицин сульфа. ЧП экспонировали в камере искусственного климата с фотопериодом 12 ч при температурных условиях, оптимальных для развития патогенов. Микроскопию образцов и изоляцию культур проводили со 2-го дня инкубации. Изучение свойств культур проводили только на микроспоровых изолятах.

Макроморфологические признаки культур изучали на стандартной картофельно-декстрозной среде, микроморфологические и топографию колоний – на синтетической среде Ниренберга с кусочками стерильной фильтровальной бумаги для лучшей споруляции. На гвоздично-листовом агаре с добавлением KCl большая часть изолятов продуцировала макрокониции [6, 7]. Для предотвращения кантамации и выявления пигментации изолятов использовали питательные среды с добавлением L-аспарагина в качестве единственного источника азота. Идентификацию проводили по комплексу культурально-морфологических признаков с использованием работ [8, 9]. Из образцов растений хлопчатника, семян и почвы из Ташкентской, Бухарской, Сурхандарьинской, Наманганской, Сырдарьинской, Кашкадарьинской и Андижанской областей выделено 242 изолята грибов *Fusarium* Link.

В дополнение к культурально-морфологической диагностике культур *Fusarium* Link. проводили видо- и расо-специфическую идентификацию на молекулярно-генетическом уровне – обобщенный анализ при сравнении последовательностей генов VT, EF, NIR и рДНК, что позволило идентифицировать трудно различимые между собой по морфологическим признакам виды: *F. proliferatum* (Tel. *Gibberella intermedia*); *F. fujikuroi* Nirenberg (Tel.: *G. fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. Kimura), общ. син. *F. proliferatum*; *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, син. *F. moniliforme* (Tel.: *G. moniliformis*), впервые

в Узбекистане выделить сумчатую стадию гриба *F. verticillioides* – *G. moniliformis*, и определить расовый состав возбудителя фузариозного вилта хлопчатника *F. oxysporum* Schl. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen (FOV) в отдельных областях Узбекистана: Ташкентская, Сырдарьинская и Андижанская области – Race 3; Каршинская – Clade Race 4 или 7; Бухарская – Clade Race 4 или 7 и Clade Race 6, или 1, или 2.

Расы FOV 1, 3, 4, 8 и австралийская раса VCG1112 могут быть классифицированы во всем мире [11,12, 13]. В 2009 г. на юго-востоке США классифицированы 4 новых генотипа FOV, 2 из которых принадлежали Clade Race 1, 2, 4, 6, и 8 и 2 – к расе 3. Ранее за пределами Калифорнии были определены расы 3 и 8 [14]. Изучение вирулентности, специализированности и расового состава выделенных изолятов поможет при выборе программ, оценки эффективности химических и биологических средств защиты растений в Узбекистане.

#### Список литературы

1. Leslie JF, Summerell BA. *Fusarium laboratory manual*. First edn. Blackwell Publish. USA. 2006: 399 p.
2. Прогноз болезней сельскохозяйственных растений. 2012: <http://larchikruta.ru/bolezni-khlopchatnika>.
3. Монастырский О.А. Токсикообразующие грибы, паразитирующие на зерне. Агро XXI. 2001; 11: 6-7.
4. Хасанов Б.А., Глухова Л.А. Методические указания по выделению, идентификации возбудителей и созданию искусственного инфекционного фона "гельминтоспориозов" ячменя. Ташкент: Фан. 1992.
5. Дудка И.А., Вассер С.Б. и др. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Киев: Наук. Думка. 1982: 458-87.
6. Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA, Nelson PE. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*. 1982; 72: 151-53
7. Snyder WC, Hansen HN. Advantages of natural media and environments in the culture of fungi. *Phytopathology*. 1947; 37: 420-1
8. Gerlach W, Nirenberg H. The genus *Fusarium* – A pictorial atlas. *Mitt. Biol. Bund Land-Forst*. 1982: 209 p.
9. Leslie JF, Summerell BA. *Laboratory Manual Blackwell Publ, The Fusarium*. Ames, IA, USA. 2006: 388 p.
10. Fernandez D, Assigbese K, Dubois MP, Geiger J.P. Molecular Characterization on of races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 4039-46.
11. Kim Y, Hutmacher RB, Davis RM. Characterization of California Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Dis*. 2005; 89(4): 366-72.
12. Skovgaard K, Nirenberg HI, O'Donnell K, Rosendahl S. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Races inferred from Multigene Genealogies. *Phytopathology*. 2001; 91(12): 1231-7
13. Holmes EA, Bennett RS, Spurgeon DW et al. New genotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from the southeastern United States. *Plant Dis*. 2009; 93: 1298-304.

## ЭЛИМИНИРОВАНИЕ МИКОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ ТЮЛЬПАНА ПРИ ВЫГОНКЕ В ЗАЩИЩЕННОМ ГРУНТЕ БИОПРЕПАРАТОМ ФУНГИЛЕКС, Ж

Головченко Л.А.<sup>1</sup>, Рыженкова Ю.И.<sup>1</sup>, Войтка Д.В.<sup>2</sup>, Юзефович Е.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центральный ботанический сад НАНБ, Минск

<sup>2</sup>Институт защиты растений, Прилуки, Беларусь

**Введение.** Тюльпан – многолетнее луковичное растение семейства Лилейные, которое с каждым годом все шире используется в цветоводческих хозяйствах Беларуси для выгонки. Ассортимент тюльпанов, которые используют на выгонку, в основном представлен в следующих классах: Простые ранние, Махровые ранние, Триумф, Дарвиновы гибриды, Лилиецветные, Бахромчатые, Махровые поздние. Метод выгонки основан на способности луковиц тюльпана, подвергнутых холодовому воздействию, зацвести раньше естественных сроков.

Для выгонки отбираются высококачественные луковицы без внешних признаков поражения болезнями. Перед посадкой желательно с луковиц очистить внешнюю коричневую чешую, окружающую корневой валик, что повышает равномерность укоренения и приводит к выравненности в росте. В хозяйствах в качестве субстрата для укоренения обычно используют смесь песка и торфа, оптимальная кислотность субстрата pH 6,0–7,0. Такой субстрат благоприятен для развития многих фитопатогенных микроорганизмов. Риск поражения растений тюльпана этими патогенами возрастает при использовании субстрата, который ранее применяли при выращивании тюльпанов или другой культуры.

Наиболее вредоносными патогенами тюльпана при выгонке являются роды *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Botrytis* [1]. Результаты маршрутных обследований цветоводческих хозяйств КУП «Цветы столицы», ОСП «Тепличное хозяйство» ОАО «ДорОРС» и защищенного грунта Центрального ботанического сада, проведенных нами в 2005–2013 гг., показали, что в Беларуси при выгонке тюльпана наиболее распространены пенициллез (*Penicillium hirsutum* Dierckx) – до 50,0%, серая гниль (*Botrytis tulipae* (Lib.) Lind., *Botrytis cinerea* Pers.) – до 40,0%, отмечены единичные случаи поражения растений ризоктониозом (*Rhizoctonia* sp.), фузариозом (*Fusarium culmorum* (Wm.G.Sm.) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.) [2, 3].

Определенную роль в защите тюльпана от болезней играет протравливание луковиц, которое частично обеззараживает их и предохраняет от почвенной инфекции [1, 4, 5]. Ситуацию осложняет то, что в настоящее время в республике нет разрешенных химических препаратов для предпосадочной обработки луковиц тюльпана [6]. К тому же использование пестицидов химического синтеза способствует формированию резистентности у возбудителей болезней, что провоцирует снижение эффективности используемых препаратов.

В данном аспекте представляет практический интерес использование биологических агентов кон-

троля патогенной микофлоры. Высоким защитным эффектом и соответствием требованиям экологической безопасности в защите растений от болезней обладает разработанный в РУП «Институт защиты растений» (Беларусь) препарат биологический Фунгилекс, Ж на основе высокоактивного штамма почвенного гриба-антагониста *Trichoderma* sp. IZR D-11. Гриб, являющийся основой препарата, обладает антагонистической активностью по отношению к широкому спектру фитопатогенных микроорганизмов pp. *Fusarium* Link, *Alternaria* Nees, *Helminthosporium* Lk: Fr., *Rhizoctonia* DC., *Venturia* De Not. et Ces., *Phytophthora* De Bary, *Sphaeropsis* Peck. и др [7, 8].

В связи с этим нами оценена биологическая и хозяйственная эффективности биологического препарата Фунгилекс, Ж в защите тюльпана от грибных болезней при выгонке в защищенном грунте.

**Материалы и методы.** Исследования проведены в зимний сезон 2013–2014 гг. в ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» на тюльпанах сортов Bellsong, Cambridge (садовый класс 7 – Бахромчатые тюльпаны) и Ice Lolly (садовый класс 3 – Триумф-тюльпаны). Посадку проводили в начале ноября 2013 г. в пластмассовые ящики размером 40x60 см с отверстиями в боковых стенках и дне. Ящики наполняли субстратом для укоренения (смесь дерновой земли, торфа и песка в соотношении 2: 1: 0,5; толщина слоя не менее 6 см), который перед посадкой поливали из расчета один литр воды на ящик. Вручную раскладывали на поверхности субстрата очищенные от чешуи луковицы тюльпанов по схеме 11 рядов по 6 шт.

При таком способе посадки растения развиваются равномерно, образуя стебли одинаковой высоты, что облегчает срезку. После посадки луковицы присыпали слоем крупнозернистого песка в 2 см, чтобы предотвратить выпирание луковиц из субстрата в процессе их развития. После посадки луковиц ящики помещали в помещение для укоренения для выдерживания при пониженной температуре (5; 9 °С). В помещении для укоренения при влажности 80–85% субстрат подсыхает медленно, тем не менее соблюдали постоянный контроль над влажностью субстрата и при необходимости поливали его. Ящики размещали таким образом, чтобы воздух мог свободно циркулировать между ними. После периода охлаждения (3–3,5 мес) ящики с растениями в фазе «конуса» (при высоте 8–10 см) переносили в теплицу для выгонки, где неделю поддерживали температуру 10...+12 °С. Начиная с 10 февраля 2014 г., температуру повышали до 15...18 °С, в солнечные дни использовали затенение и передвижные экраны, поливали проходы и увеличивали вентиляцию.

Таблица. Влияние препарата Фунгилекс, Ж. на пораженность растений тюльпана пенициллезом и декоративные качества цветочной срезки (Центральный ботанический сад НАН Беларуси, защищенный грунт, декабрь 2013 г. – февраль 2014 г.)

Вариант	Распространенность, %		БЭ, %	Высота цветоноса		Цветочная срезка	
	до внесения (16.12)	после внесе- ния, (25.02)		см	%, к контролю	шт./ растение	%, к контролю
<b>Сорт Bellsong</b>							
Контроль	8,3	8,3	–	41,7±2,3	100,0	0,9	100,0
Фунгилекс, Ж, 1,0% р. ж.	5,6	0	100	39,8±0,6	95,4	1	111,1
Фунгилекс, Ж, 0,1% р. ж.	5,6	0	100	40,7±0,6	97,6	1	111,1
<b>Сорт Cambridge</b>							
Контроль	33,3	33,3	–	41,8±3,2	100,0	0,8	100,0
Фунгилекс, Ж., 0,1% р. ж.	66,7	0	100	52,1±1,7	124,6	1	125,0
Фунгилекс, Ж, 0,05% р. ж.	83,3	0	100	45,8±3,3	109,6	1	125,0
<b>Сорт Ice Lolly</b>							
Контроль	15,4	15,4	–	17,4±1,7	100,0	0,8	100,0
Фунгилекс Ж, 1,0% р. ж.	40,0	0	100	21,5±0,5	123,6	1	125,0
Фунгилекс, Ж, 0,1% р. ж.	33,3	0	100	20,6±0,6	118,4	0,9	112,5

Примечание: БЭ – биологическая эффективность препарата.

Схема опыта включала двукратное внесение био-препарата Фунгилекс: первый полив субстрата и луковец тюльпана – в помещении для укоренения (+5 °С, 16.12.2013 г.), второй – при перемещении ящиков с растениями в теплицу (+12 °С, 07.02.2014 г.). Препарат применяли в концентрации от 0,05 до 1,0% с нормой расхода рабочей жидкости 10 мл/растение. Контроль – полив водой.

В ходе опыта учитывали распространенность болезней, рассчитывали биологическую эффективность препарата, а также оценивали биометрические показатели цветочной срезки тюльпана. Срез цветов проводили в фазе полного окрашивания лепестков, утром при закрытом бутоне.

Результаты исследований и их обсуждение. Посадочный материал тюльпана был поставлен из Нидерландов осенью 2013 г., луковицы были уже подвернуты предпосадочной обработке протравителями. Тем не менее результаты фитопатологического анализа показали, что на момент посадки луковицы были поражены пенициллезом, распространенность которого, в зависимости от сорта, варьировала от 5,6 до 83,3% (таблица).

Применение био-препарата Фунгилекс, Ж позволило не только предотвратить дальнейшее распространение болезни, но и привело к лизису мицелия гриба *Penicillium hirsutum* на пораженных луковицах

тюльпана. Биологическая эффективность препарата при двукратном внесении достигала 100%. Причем одинаково эффективным было использование препарата Фунгилекс, Ж. во всех испытанных концентрациях. В контрольном варианте не было отмечено увеличение количества пораженных растений. Однако на наружных чешуях луковиц тюльпана на имеющихся перед посадкой желтых пятнах развился обильный зеленоватый налет спороношения гриба *P. hirsutum*, а на верхушках листьев образовались бурые засыхающие пятна. Кроме того, на сорте Bellsong в контрольном варианте отмечено поражение растений грибом *Botrytis tulipae* – распространенность серой гнили составила 8,3% при развитии 6,3%.

Результаты оценки показателей цветочной срезки тюльпана показали, что внесение био-препарата Фунгилекс, Ж положительно сказалось на продуктивности цветения: выход цветочной срезки с одного растения увеличился на 11,1–25,0%. В контроле поражение растений пенициллезом привело к снижению продуктивности цветения, а у сортов Cambridge и Ice Lolly – также к формированию ослабленных растений, у которых высота цветоноса была на 9,6–24,6% ниже, чем при внесении Фунгилекса, Ж.

**Заключение.** Результаты исследований показали высокую эффективность био-препарата Фунгилекс, Ж в ограничении пенициллеза и серой гнили

тюльпана при выгонке в защищенном грунте. Установлено, что двукратное внесение биопрепарата с концентрацией рабочей жидкости 0,05–1,0% способствовало достижению биологической эффективности в отношении данных болезней до 100%. Также отмечено росторегуляторное действие препарата, заключающееся в повышении продуктивности цветения и формировании более качественной цветочной срезки тюльпана.

#### Список литературы

1. Granneman W. The forcing of Tulips. Forcing methods for cut flower production, for pot plant production. Ed. Ejking J. The Intern. Flower Bulb Center, Hillegom. – 62 p.
2. Головченко Л.А., Линник Л.И., Войнило Н.В., Тимофеева В.А. Болезни декоративных растений закрытого грунта. Сб. науч. тр. / Ботаника (исследования). Минск. 2008; 36: 245–53.
3. Головченко Л.А. Серая гниль декоративных растений и контроль ее развития на луковичных цветочных культурах. Дис. ... канд. биол. наук. Минск. 2013: 162 с.
4. Горленко С.В., Панько Н.А. Защита луковичных и клубнелуковичных культур от болезней и вредителей. Под ред. Н.А. Дорожкина. Минск: Наука и техн. 1977: 208 с.
5. Трейвас Л.Ю. Болезни и вредители декоративных садовых растений: Атлас-определитель. Москва: ЗАО «Фитон+». 2007: 192 с.
6. Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь. Справочное издание. Минск. 2014: 627 с.
7. Voitka D, Yuzefovich N. In vitro comprehensive assessment of antagonistic activity of Trichoderma genus fungi against Fusarium spp. In: "Fifth International scientific agricultural symposium «Agrosym 2014»". Jahorina, Oct. 23–26, 2014 ed. D. Kovačević. East Sarajevo. 2014: 110.
8. Войтка Д.В., Юзефович Е.К. Применение препарата биологического Фунгилекс для защиты зеленных культур, выращиваемых способом проточной гидропоники, от болезней: Метод. реком. Респ. науч. дочер. унитар. предприятие "Ин-т защиты растений". Минск. 2014: 27 с.

## ОСОБЕННОСТИ БИОЭКОЛОГИИ МИКРОМИЦЕТА *PYRENOPHORA TERES* (SACC.) ШОЕМ. В ЦЕНОЗЕ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Горьковенко В.С., Соловьева А.Ю., Орловская Е.Н.  
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар

Микромицет *Pyrenophora teres* (Sacc.) Shoem., анаморфа *Drechslera teres* (Saccardo) Shoemaker. в условиях Краснодарского в последние два десятилетия является одним из наиболее распространённых и вредоносных заболеваний озимого ячменя Эпифитотии, которые возникают с частотой 5–6 раз в 10 лет, приводят к полной гибели листового аппарата растений, в результате уменьшается число колосьев и зерен в колосе, а потери урожая достигают 35–50%.

С целью установления причин возрастания вредоносности патогена в посевах озимого ячменя, целью исследований стало изучение биоэкологических особенностей развития микромицета *P. teres* в агроценозе озимого ячменя, а также влияние отдельных агротехнических приёмов на сохранение инфекционного потенциала в межсезонный период на фоне экстенсивной технологии возделывания культуры.

Исследования проводились в 2012–2014 гг. в научно-исследовательской лаборатории факультета защиты растений и в стационарном многофакторном опыте КубГАУ в типичном зернотравянопропашном севообороте в посевах озимого ячменя сорта Гордей. Мониторинг проводился в вариантах с экстенсивной технологией возделывания на фоне различных системах основной обработки почвы:  $D_0$  – прямой посев («нулевая», no-till);  $D_1$  – поверхностная (почво-защитная, mini-till) – под пропашные и люцерну безотвальная (30–32 см) и поверхностная (8–12 см) под

озимые зерновые;  $D_2$  – рекомендуемая (стандарт), под пропашные и люцерну отвальная (30–32 см) и поверхностная (8 – 12 см) под озимые зерновые;  $D_3$  – отвальная с периодическим глубоким рыхлением – под пропашные и люцерну отвальная (30 – 32 см) на фоне глубокого рыхления (до 70 см) и отвальную (20 – 22 см) под озимые зерновые. Сорт Гордей создан отделом селекции и семеноводства ячменя Краснодарского НИИСХ, максимальная урожайность в производственных условиях достигает более 70 ц/га. Сорт устойчив к мучнистой росе, умеренно восприимчив к карликовой ржавчине, восприимчив к пыльной и твердой головне. Степень устойчивости к возбудителю сетчатого гельминтоспориоза в оригинальной характеристике сорта не приводится.

На Кубани после уборки озимого ячменя на одном квадратном метре остаётся 0,5 – 0,6 кг послеуборочных остатков. Органические остатки, остающиеся на поверхности почвы, являются прекрасным субстратом для образования анаморфной стадии патогена *Pyrenophora teres*. Её формирование начинается сразу после уборки культуры и продолжается весь осенний период.

Установлено, что в осенний период при нулевой ( $D_0$ ) обработке почвы на послеуборочных остатках, находящихся на одном квадратном метре, в среднем формируется 4 – 5 млн конидий микромицета, при поверхностной ( $D_1$ ) – в 15–20, рекомендованной ( $D_2$ )



и отвальной ( $D_3$ ) в – 40– 50 раз меньше. В результате к моменту появления всходов озимого ячменя в агроценозе накапливается огромный инфекционный потенциал анаморфной стадии гриба, который в сухую погоду переносится ветром и служит источником первичного заражения растений. Первые признаки сетчатого гельминтоспориоза появляются в осенний период на листьях в виде одиночных удлинённых светло-зелёных, позже некротических овальных бурых пятен с хлоротичной каймой. Поражение сопровождалось формированием конидий анаморфной стадии гриба.

Формирование телеоморфной стадия гриба в форме псевдотециев начиналось в осенний период. В этот период содержимое псевдотециев представляло собой бесструктурную аморфную массу, не дифференцированную на микроструктуры патогена. Созревание аскоспор отмечено в феврале месяце, а их массовый выброс происходил в марте и апреле.

Прослежено, что при нулевой ( $D_0$ ) обработке почвы на послеуборочных остатках, находящихся на одном квадратном метре, в среднем формируется 0,1 – 0,2 млн аскоспор микромицета, при поверхностной ( $D_1$ ) – в 30 раз меньше, при рекомендованной ( $D_2$ ) и отвальной ( $D_3$ ) микроструктуры телеоморфной стадии изолировать не удалось.

Минимальная температура развития озимого ячменя и патогена совпадают, и находится в пределах 5–6 °С. При возобновлении весенней вегетации культуры, одновременно возобновляется и патологический процесс в инфицированных с осени растениях. В этот же период продолжается инфицирование растений конидиями анаморфной и аскоспорами телеоморфной стадий. Огромный запас в агроценозе инфекционного начала микромицет *Pyrenophora teres*, восприимчивость сорта и благоприятные погодные условия, складывающиеся с фазы выхода в трубку, способствовали эпифитотийному развитию сетчатого гельминтоспориоза.

В вариантах с экстенсивной технологией возделывания на фоне нулевой ( $D_0$ ) обработки почвы ежегодно в фазу созревания зерна при 100%-ном распространении болезни, интенсивность поражения достигала 50–60 %.

Таким образом, в межсезонный период микромицет *Pyrenophora teres* в форме эндогенного мицелия сохраняется в тканях зимующего растения-хозяина, на послеуборочных остатках в виде жизнеспособных конидий анаморфной и телеоморфной стадий. Энергосберегающие технологии основной обработки почвы, способствуют накоплению в агроценозе огромного инфекционного потенциала патогена.

## МИКРОМИЦЕТ *GIBELLINA CEREALIS* PASS. В АГРОЦЕНОЗЕ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ: ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА

Горьковенко В.С., Монастырня Э.И., Богословская Н.Б.  
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар

Мониторинг фитосанитарного состояния посевов озимой пшеницы, проведённый в Краснодарском крае более чем за двадцатилетний период (1992 – 2014 гг.), показал, что эпифитотии гибеллиноза отмечались в 12 вегетационных сезонах. Наиболее вредоносным заболеванием оказывалось в годы, когда инфицирование растений микромицетом *Gibellina cerealis* Pass., происходило на ранних этапах онтогенеза озимой пшеницы – прорастания, всходы, осеннего и весеннего кущения (Z 7-30).

В возникновении эпифитотии в патологическом треугольнике «растение-хозяин – патоген – окружающая среда» роль в равной степени принадлежит всем его составляющим. Только при наличии растения-хозяина, инфекционного начала патогена и оптимальных условиях окружающей среды, развитие болезни принимает эпифитотийный характер.

Первая составляющая патологического процесса, «растение-хозяин», в агроценозе всегда присутствует, поскольку все сорта, возделываемые в крае, поражаются микромицетом *G. cerealis*. В роле «патогена» выступают заражённые грибом послеуборочные растительные остатки озимой пшеницы, в них микромицет сохраняется длительное время. Одной из причин в накоплении огромного инфекционного

потенциала патогена в агроценозе, явились энергосберегающие технологии основной обработки почвы, предопределившие длительное сохранение инфицированных послеуборочных остатков в верхних слоях почвы. Что касается третьей составляющей, «окружающая среда», то погодные условия контролируют время возникновения заболевания, динамику распространения и развития.

Прослежено, что массовое инфицирование озимой пшеницы на ранних этапах онтогенеза (Z 07-25) отмечено в 2002–2003 и 2013–2014 гг. сельскохозяйственном году. Прорастание, появление всходов и начало кущения озимой пшеницы в осенний период 2002 и 2013 гг. проходило при аномально дождливой и тёплой погоде. За этот период в северной, центральной и южной зоне края выпало от 180 до 380% нормы осадков. Весеннее развитие растений (Z 30-51) проходило при избыточном увлажнении, дожди шли обильно, равномерно. Заражение растений шло интенсивно, развитие гибеллиноза приняло характер ранней эпифитотии.

Скорость инфекции была настолько высокой, что в очагах поражения 60 процентов растений погибли до фазы выхода в трубку. При этом на фоне массовой гибели сильно поражённых растений, более чем

у 30% растений, кроме ранее появившихся признаков гибеллиноза, появились новые пятна, а у 20% растений в зоне корневой шейки и на эпикотиле образовались совсем молодые пятна. Самое позднее заражение растений, в фазу молочной спелости зерна (Z 70-75), нами отмечено в эпифитотийном 2011 г. в Новоселецком районе Ставропольского края, когда на сорте Нота распространение гибеллиноза достигло 60%, при этом 15–20% в растений имели вновь образовавшиеся гибеллинозные пятна. Позднему инфицированию растений предшествовали обильные ливневые осадки на фоне умеренных температур.

Высокая вредоносность микромицета *G. cerealis* обусловлена его биологическими особенностями. В агроценозе озимой пшеницы за период вегетации патоген формирует одну генерацию, которая включает три этапа развития: инфицирования, вегетативного роста и формирования органов спороношения.

Инфицирование растений осуществляется аскоспорами, которые сохраняются в перитециях в послеуборочных остатках. Перитеции являются микроструктурами очень стойкими к экологическим факторам. При благоприятных условиях созревшие аски выходят из перитециев, их оболочка саморастворяется и аскоспоры освобождаются. Споры имеют плотную жёлто-коричневую оболочку, богатую питательными веществами.

Её прорастанию должен предшествовать длительный период увлажнения, влага размягчает оболочку, повышает её проницаемость и облегчает выход инфекционной гифы. Для прорастания аскоспор кроме влаги необходимо наличие источников энергии, в роли которых выступают питательные вещества, находящиеся в оболочке аскоспор и корневые выделения растения-хозяина. Микромицет *G. cerealis* вообще не может трогаться в рост без наличия влаги и источника энергии, это экологическое приспособление обеспечивает ему длительное и рациональное использование инфекционного запаса, находящегося в природе.

Первичное инфицирование растений грибом – в полевых условиях может происходить достаточно длительный период – от фазы прорастания до периода, когда у растений прекращается нарастание вегетативной массы и идёт активное отмирание слабо развитых боковых побегов. Как уже отмечалось выше, в зависимости от погодных условий, устойчивости сорта и условий выращивания озимой пшеницы, время последнего заражения может приходиться на фазу колошения-молочной спелости. Однако наиболее опасными периодами массового заражения растений являются ранние фазы развития озимой пшеницы. В этом случае патологический процесс развивается таким образом, что большинство продуктивных побегов внутри каждого растения к фазе созревания погибает.

При заражении растений на ранних этапах онтогенеза – в фазу прорастания и/или всходов (Z 10-13), инфицированию подвергается колеоптиле и распо-

ложенные под ним зачатки листьев, стебля и колоса. Предохраняя первый лист от механических повреждений при росте в почве, колеоптиле первым вступает в контакт с почвенной инфекцией микромицета *G. cerealis*. В результате контакта инфекционных гиф гриба с колеоптиле, патоген проникает в ткани, переходит к паразитической фазе своего развития.

Развиваясь, мицелий гриба с колеоптиля проникает в расположенные под ним ткани зачаточных листьев и стеблевую часть проростка. На первых этапах патогенеза гибеллиноз проявляется в виде типичного глазкового пятна на колеоптиле. Позже, при появлении первого и последующих листьев, признаки болезни на них выглядят в виде локальных нечётко выраженных некротических или светло-зелёных пятен с обильным формированием вегетативных микроструктур гриба.

В случае, когда некроз опоясывал всё ширину листовых пластинок, наблюдалась гибель отдельных листьев или всего проростка. Во влажной камере при оптимальных температурах поражённые ткани покрывались белым, хлопьевидным или пушистым мицелием гриба. Очень часто в период прорастания, колеоптиль в почве неоднократно вступает в контакт с инфекционным началом патогена, в результате главный побег заражается несколько раз и на нём формируются два и более глазковых пятен.

Следующим органом, который подвергается заражению грибом *G. cerealis*, является эпикотиль. В фазу всходов, когда идёт рост 2-го и 3-го листьев происходит активный рост корневого междоузлия – эпикотилия, разрастаясь, он поднимает к поверхности почвы узел кущения. В период своего роста, если корневое междоузлие вступает в контакт с почвенной инфекцией микромицета *G. cerealis*, происходит инфицирование эпикотилия. Признаки проявления гибеллиноза на эпикотиле такие же, как и на колеоптиле – в виде глазкового пятна со стромой в центре, только они более мелкие.

Прослежено, что в фазу всходов озимой пшеницы, гибеллиноз может проявляться одновременно на колеоптиле и эпикотиле. Происходит это, по всей видимости, потому, что инфицирование их осуществляется от одного и того же источника почвенного источника инфекции патогена. Происходит это следующим образом, эпикотиль разрастаясь, поднимается вверх по тому же «пути», по которому вначале «прошёл» и заразился колеоптиль. Проведенные многочисленные гистологические анализы корневых междоузлий с различной степенью поражения грибом *G. cerealis* показали, что на начальных этапах патогенеза наблюдается поражение межклеточного вещества, затем поражаются оболочки и содержимое отдельных, позже – целого комплекса клеток. Клетки теряют структурность, погибают, физиологические процессы приостанавливаются, подземное междоузлие прекращает выполнять свою непосредственную функцию.

Как показали дальнейшие наблюдения, проведённые в последующие фазы развития озимой пшени-

цы, поражённый гибеллинозной инфекцией эпикотиль, всегда погибал. Вредоносность такой формы проявления болезни очевидна, поскольку с гибелью эпикотилия погибает первичная корневая система, которая вплоть до фазы созревания озимой пшеницы поставляет влагу и питательные вещества из более глубоких слоёв почвы. По характеру поражения и вредоносности такую форму проявления гибеллиноза на всходах озимой пшеницы можно рассматривать как корневую гниль.

В фазу осеннего и весеннего кушения (Z 21-30) характер поражения растений озимой пшеницы гибеллинозной инфекцией носит разноплановый характер. При благоприятных погодных условиях продолжается первичное заражение растений от почвенного источника инфекции. Одновременно внутри растения, имеющего поражённый побег, в результате тесного контакта с носителем инфекции, происходит заражение вновь формирующихся боковых побегов. Характерно, что у перезаразившихся друг от друга побегов, типичные глазковые пятна находятся на первом междоузлии, расположены на одной высоте и имеют сходные признаки первичного проявления гибеллиноза.

Кроме того, в фазу кушения озимой пшеницы происходит интенсивная колонизация патогеном здоровых тканей растения. Мицелий гриба быстро проникает вглубь растения через ткани сформировавшихся листьев к зачаточным листьям, стеблю и колосу. Одновременно идёт распространение патогена вверх по растению. Этот процесс сопровождается формированием под обёртками листьев стромы, над стромой на поверхности обёртки образуются глазковые пятна. В результате сильного поражения наблюдается гибель отдельных побегов или всего растения.

Особенностью патологического процесса в фазу выхода в трубку (Z 31-49) является интенсивная колонизация патогеном нарастающих органов растения на протяжении всей фазы с последующей гибелью сильно поражённых побегов, особенно в конце фазы. При выпадении обильных осадков возможно первичное заражение побегов от почвенного источника инфекции, но чем позже происходит заражение побегов, тем интенсивность поражения уменьшается и вредоносность заболевания ниже.

Под обёртками листьев идёт обильное формирование стромы – субстрата, в котором будут формироваться перитеции гриба. На листьях верхнего яруса у растений с признаками гибеллиноза иногда появляются желтоватые, округлые, диаметром около одного см пятна с тёмной мицелиальной стромой или налётом пепельного цвета. На наш взгляд, появление таких пятен является следствием инфицирования патогеном зачатков листьев внутри стебля. Таким же образом выносятся инфекция на чешуйки и ости колоса пшеницы, на которых отмечено формирование чёрной стромы гриба.

Формирование перитециев начинается в конце фазы выхода в трубку (Z 51) и продолжается в последующие периоды. Перитеции закладываются в мицелиальной строме, под обёртками листьев или на поверхности в центре «глазковых» пятен. Строма представляет собой мицелиальное сплетение, состоящее из толстостенных тёмных и светлоокрашенных, богатых питательными веществами, стерильных гиф. Перитеции погружены в строму и только хоботки, через разрывы обёртки листа, выходят на поверхность. После уборки урожая заражённые послеуборочные остатки пополняют запас почвенной инфекции, которая будет реализовываться в посевах озимой пшеницы в последующие годы.

## ВЕГЕТАТИВНАЯ НЕСОВМЕСТИМОСТЬ ИЗОЛЯТОВ *CRYPHONECTRIA PARASITICA* ИЗ ТУРЦИИ И СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

Гринько Н.Н.

Адлерская опытная станция ВИР, Сочи

Гиповирулентные изоляты *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr., содержащие плазмиды dsRNA, представляют практический интерес как агенты биологического контроля возбудителя рака коры каштана посевного [1–3]. Успешная конверсия *Cryphonectria hypovirus* возможна между вегетативно совместимыми изолятами в популяциях *C. parasitica* с преобладанием бесполого типа размножения [4–6]. На Северном Кавказе трансмиссия гиповируса CHV1-EP713 из alb – гиповирулентных изолятов в aur (агрессивные) блокируется системой вегетативной несовместимости [7, 8]. Поэтому с целью поиска вегетативно совместимых групп анализировали изоляты паразита из причерноморского ареала каштана посевного Турции как ближайшего природно-климатического аналога Северного Кавказа.

В 2010–2012 гг. поэтапно скрещивали 31 изолята *C. parasitica*: Турция – 21 и Северный Кавказ – 10. В 1-й серии опытов гибридизировали изоляты, выделенные из каштана посевного на севере Турции в Бартынской (Амасрынский, Бартынский, Хасанкадынский районы) и Зонгулдакской (Алаплынский район) областях. Изоляты получили из Московского государственного областного университета в процессе творческих контактов [9] и дифференцировали на высокоагрессивные aur – оранжевые; среднеагрессивные lut – золотисто-желтые; гиповирулентные alb – беловатые [11–13]. Изоляты обозначили согласно территориально – географическим границам, в пределах которых осуществлялся сбор инфекционного материала: aur – Ba1, Ba2, Bb3, Bh4, Bh5, Sa6, Sa7, Sa8, Sa9; lut – Ba10, Ba11, Bb12, Sa13, Sa14, Sa15; alb – Bh16,

Bh17, Sa18, Sa19, Sa20, Sa21. Во 2-й серии опытов попарно скрещивали турецкие и выделенные нами северокавказские изоляты (Гринько, 2009), обозначенные начальными буквами локальных популяций (А – Адлерская, С – Сочинская, Кп – Краснополянская, Л – Лазаревская, Кр – Краснодарская) в соответствии с порядковыми коллекционными номерами: aur – А47, С32, Кп42, Л79, Кр61; lut – А12, С25, Кп14; alb – А2, А9.

В опытах использовали картофельно-глюкозный агар, чашки Петри инкубировали в течение 30 сут при 24–26 °С. Типы взаимодействия изолятов классифицировали как антагонизм (барраж и бордюры), совместимость (Дьяков, Долгова, 1995). Для распределения изолятов по типам взаимодействия использовали показатель частоты ( $p$ ), рассчитанный от суммарного числа скрещиваемых комбинаций, принятого за 1. Разнообразие реакций тестируемых изолятов оценивали с помощью индекса Шеннона ( $H$ ). Результаты исследований обрабатывали методами статистического анализа с использованием прикладных программ Excel и Statistica.

Гибридизация морфотипов *C. parasitica* из Турции. Сокультивирование изолятов выявило доминирование антагонистических реакций – барраж и бордюры. Барраж – разграничительная линия из мертвых клеток в зоне контакта двух колоний, фиксировался при скрещивании изолятов независимо от их территориальной принадлежности. Отсутствие в зонах барража перитециев позволило отнести тестируемые изоляты паразита к МАТ–1 типу спаривания.

Наши данные согласуются с известными сведениями об отсутствии полового размножения в популяциях *C. parasitica* некоторых провинций Турции [2]. Между показателями частоты распределения ( $p$ ) изолятов по типам взаимодействия и индексом разнообразия Шеннона обнаружена высокая положительная корреляционная связь ( $Cr = 0,97 \pm 0,08$ ). Доля морфотипов с реакцией барраж достигала максимального уровня ( $p = 0,88 \pm 0,04$ ;  $H = 1,44$ ), причем оказалась относительно выше в Зонгулдакской популяции по сравнению с Бартынской (рис. 1).

В комбинациях суммарных скрещиваний изолятов из обеих выборок выявлена предельно высокая частота индивидуумов ( $p = 0,46 \pm 0,04$ ) с реакцией барраж, при среднем значении индекса Шеннона ( $H = 0,52$ ). Бордюры (отталкивание) – торможение роста изолятов к центру чашки Петри с отсутствием мицелия на границе между колониями, наблюдался при скрещивании изолятов из Бартынской популяции, а также в сочетаниях из обеих выборок. Вегетативная совместимость – сращивание колоний, обнаружена в 14 сочетаниях морфотипов ( $p = 0,07 \pm 0,04$ ;  $H = 0,37$ ).

При гибридизации изолятов равнозначных и разнокачественных морфотипов во всех анализируемых сочетаниях формировался барраж. В комбинациях однотипных индивидуумов частота и индекс разнообразия Шеннона достигали максимального уровня среди высокоагрессивных морфотипов aur –

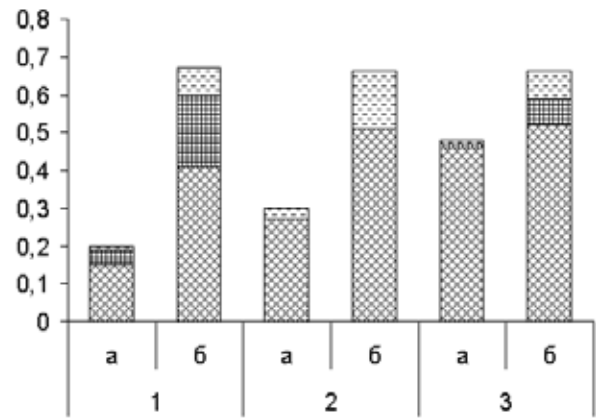


Рис. 1. Типы взаимодействия изолятов *Cryphonectria parasitica* из Турции. а – частота морфотипа ( $p$ ), б – индекс разнообразия Шеннона; реакции взаимодействия: I – барраж, II – бордюры, III – совместимость; комбинации скрещивания морфотипов по популяциям: 1 – Бартынская, 2 – Зонгулдакская, 3 – Бартынская + Зонгулдакская.

aur ( $p = 0,11 \pm 0,02$ ;  $H = 0,35$ ), а минимального – слабо вирулентных alb–alb (рис. 2).

В разнящихся группах морфотипов, превалировали комбинации aur – lut и aur – alb ( $p = 0,26 \pm 0,02$ ;  $H = 0,51$ ). Бордюры проявлялся в парах морфотипов aur – aur из обеих выборок при гибридизации изолятов Ba1 + Ba2 + Ba3, а также каждого из них с Bh4, Bh5 и Sa6. Совместимыми оказались сочетания морфотипов: lut – lut ( $H = 0,07$ ) и alb – alb ( $H = 0,22$ ). Характерно, что в комбинации морфотипов alb–alb выявлено сращивание изолятов: Bh16 + Bh17 и каждого из них с Sa18; Sa18 + Sa19 с Sa20 и Sa21; Sa19 + Sa20 и Sa21; Sa20+Sa21. Отсутствие совместимых комбинаций и наличие барража между некоторыми изолятами alb- морфотипа из Турции, свидетельствует в пользу их интерстерильности. Линия барража предотвращает конверсию штаммов CHV1-EP721 и CHV1-euro7 из генома Bh16 и Sa19 alb – морфотипа в aur – агрессивные изоляты *C. parasitica*.

Перекрестная гибридизация морфотипов из Турции и Северного Кавказа (Гринько, 2012в). Скрещивание равнозначных и разнокачественных морфотипов выявило преобладание реакции барраж ( $p = 0,90 \pm 0,03$ ;  $H = 2,17$ ). Бордюры наблюдался в сочетаниях морфотипов lut – lut и alb – alb (рис. 3). При этом в комбинациях морфотипов lut – lut антагонизм проявили изоляты: Ba10 + A12, Ba10 + C25 и Bb12 + C25. Совместимыми оказались только изоляты Ba11, Sa13 и Sa15 с Кп14 из Краснополянской выборки.

Ранее нами установлена вегетативная совместимость lut–lut морфотипов из северокавказской популяции [13]. Следовательно, lut – морфотипы из Турции и Северного Кавказа относятся к генетически различным индивидуумам. Не исключено, что вегетативная несовместимость обусловлена также инфицированием lut – изолятов штаммами гиповируса, не относящимися к подтипу CHV1 и ранее не обнаруженными в Европе.

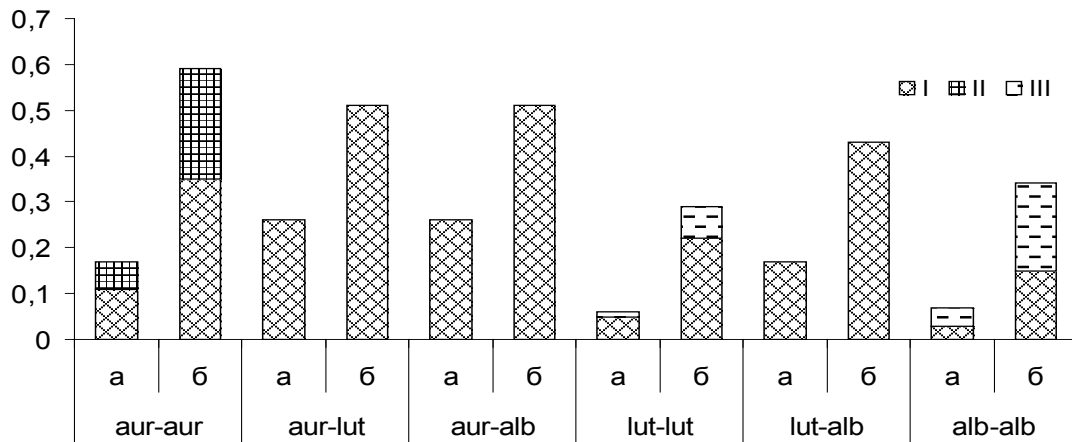


Рисунок 2. Типы реакций при гибридизации равнозначных и разнокачественных морфотипов *Cryphonectria parasitica* из Турции. а – частота морфотипа (p), б – индекс разнообразия Шеннона; реакции взаимодействия: I – барраж, II – бордюры, III – совместимость.

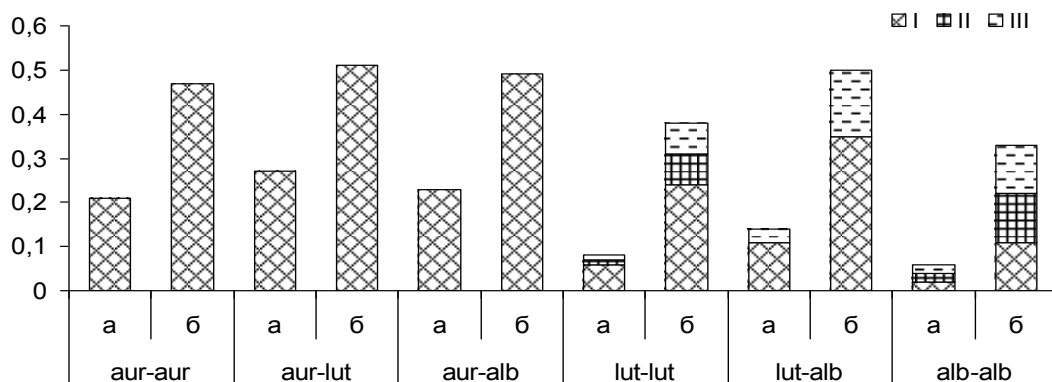


Рисунок 3. Типы реакций при гибридизации равнозначных и разнокачественных морфотипов *Cryphonectria parasitica* из Турции и Северного Кавказа. а – частота морфотипа (p), б – индекс разнообразия Шеннона; реакции взаимодействия: I – барраж, II – бордюры, III – совместимость.

Итак, линии барража блокируют инвазию гиповируса CHV1-EP713 из alb-морфотипов северокавказской популяции в турецкие aur – агрессивные изоляты. Конверсия гиповируса возможна лишь при вегетативной гибридизации alb – морфотипов A2 и A9 из Северного Кавказа со среднеагрессивными lut- Ba11, Sa13 и Sa15 и слабовирулентными alb – Sa20 и Sa21 из Турции.

Анализ типов взаимодействия изолятов выявил наличие 9 VC-групп ( $H = 2,37$ ) в локальных популяциях *C. parasitica* из Турции, среди которых вегетативно совместимыми оказались 2. Ранее, в скрещиваемых комбинациях турецких изолятов с европейскими гиповирулентными тестерами EU-1 и EU-2, выделено 2 VC-группы [1].

Перекрестная гибридизация изолятов из Турции и Северного Кавказа доказала наличие 15VC-групп ( $H = 2,68$ ), а совместимыми оказались 3. В локальных популяциях *C. parasitica* Северного Кавказа идентифицировано 38 мелких VC-групп, агрегированных в 6 VC-групп более высокого ранга, различающихся числом изолятов и типом вегетативной несовместимости. Варьирование числа VC-групп, вероятно, обусловлено штаммовыми различиями гиповирусов.

Подтверждена идентичность турецких и европейских штаммов CHV1-EP721 и CHV1-Euro7, незначительно снижающих морфологические и паразитические признаки *C. parasitica* [5, 9]. Напротив, высокоагрессивный гиповирус CHV1-EP713, существенно преобразующий геном патогена [3], инвазирует только изоляты alb – морфотипа на Северном Кавказе.

Итак, нами впервые дана оценка вегетативной несовместимости изолятов *C. parasitica* из Турции и Северного Кавказа. В турецкой популяции паразита трансмиссия гиповирусов CHV1-EP721 и CHV1-euro7 из alb-гиповирулентных в aur – агрессивные изоляты ингибируется фактором вегетативной несовместимости.

Подтверждена также возможность конверсии гиповируса CHV1-EP713 из изолятов A2 и A9 alb-морфотипа Северного Кавказа в среднеагрессивные lut-изоляты *C. parasitica* Турции.

#### Список литературы

1. Çeliker NM, Onoğur E. Evaluation of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for the biological control of chestnut blight in Turkey. Forest Snow and Landscape Res. 2001; 76(3): 378-82.

2. Döken MT, Açıkgoz S, Erincik O. Chestnut blight and evaluation of the feasibility of its biological control in the Aydin province, Turkey by using hypovirulence: I European Congress on chestnut castanea. Acta Hortical. 2009: 866.
3. Robin C, Lanz S, Souteron A, Rigling D. Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south – castern France is associated with fitness-related traits. Biol Control. 2010; 53(1): 55-61.
4. Milgroom MG, Cortesi P. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analys. Annu Rev Phytopathol. 2004; 42: 311-38.
5. Linder-Basso D, Dynek JN, Hillman BI. Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus 4*, the most common hypovirus species in North America. Virology. 2005; 1(337): 192-203.
5. Liu YC, Milgroom MG. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. Mycologia. 2007; 99(2): 279-84.
6. Гринько Н.Н. Внутривидовое разнообразие возбудителя рака каштана съедобного на Северном Кавказе. Вестн. РАСХН. 2009; 4: 29-33.
7. Гринько Н.Н. Гибридизация морфотипов *Cryphonectria parasitica*: Северный Кавказ. Фотоальбом. 2012 (<https://www.facebook.com/nina.grinko/photos>).
8. Белов А.А. Внутривидовой полиморфизм фитопатогенного гриба *Cryphonectria parasitica* в причерноморской части ареала каштана посевного (*Castanea sativa*). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. 2010: 19 с.
9. Гринько Н.Н. Морфологическая изменчивость гриба *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr. из Турции. Вісн. Харьків. нац. аграр. ун-ту ім. В.В. Докучаєва: сер. «Фітопатол. ентомол.». 2011; 9: 44-50.
10. Гринько Н.Н. Агрессивность внутривидовых структур гриба *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr. из Турции. Вісн. Харьків. нац. аграр. ун-ту ім. В.В. Докучаєва: сер. «Фітопатол. ентомол.». 2012а; 11: 46-51.
11. Гринько Н.Н. Полиморфизм гриба *Cryphonectria parasitica*: Турция. Фотоальбом. 2012 (<https://www.facebook.com/nina.grinko/photos>).
12. Дьяков Ю.Т., Долгова А.В. Вегетативная несовместимость у фитопатогенных грибов. М.: МГУ. 1995: 161с.
13. Гринько Н.Н. Гибридизация изолятов *C. parasitica* (Северный Кавказ # Турция). Фотоальбом. 2012 (<https://www.facebook.com/nina.grinko/photos>).

## ВИРУЛЕНТНОСТЬ ГРИБА *PUSCINIA TRITICINA* ERIKS. НА ТЕТРАПЛОИДНЫХ ВИДАХ ПШЕНИЦЫ

Гульятеева Е.И.<sup>1</sup>, Шайдаюк Е.Л.<sup>1</sup>, Косман Е.<sup>2</sup>, Ахметова А.К.<sup>3</sup>, Гончаров Н.П.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин

<sup>2</sup>Institute for Cereal Crops Improvement, Tel Aviv University, Israel

<sup>3</sup>Представительство Международного центра улучшения пшеницы и кукурузы (СИММИТ) в Казахстане;  
Научно-производственный Центр зернового хозяйства имени А.И. Бараева

<sup>4</sup>ФГБНУ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Большинство популяционных исследований гриба *Puccinia triticina* Eriks. выполнены с использованием инфекционного материала *Triticum aestivum* L. и *T. durum* Desf. Возбудитель бурой ржавчины в вегетативной фазе жизненного цикла наряду с мягкой пшеницей (*T. aestivum*) обитает и на других культурных и диких злаках. Однако в литературе имеется ограниченная информация о вирулентности и составе популяций на этих растениях-хозяевах [1–3].

**Цель исследования** – характеристика популяций гриба на тетраплоидных видах пшеницы *T. aethiopicum* Jakubz., *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl., *T. dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf., *T. turanicum* Jakubz., *T. durum* и *Aegilops crassa* Boiss. по признаку вирулентности и сравнение их с *T. aestivum*.

**Материалы и методы.** Инфекционный материал, представленный листьями с урединиопустулами, был собран в 2014 г. в трех точках: на коллекционном поле Дагестанской опытной станции ВИР с трех тетраплоидных видов пшеницы ( $2n=4x=28$ , ВВАУАУ) (*T. aethiopicum* (к-19316, Эфиопия), *T. dicoccum*

(И-622692, Германия), *T. turanicum* (к-35579, Туркменистан)) и *Ae. crassa* ( $2n=4x=28$ , DcDcMM) (к-552, Нахичевань)), и гексаплоидного – *T. aestivum* ( $2n=4x=42$ , ВВАУАУDD) (смесь сортов); в Новосибирске на опытном поле ИЦиГ СО РАН с *T. dicoccum* (i: BS2E), *T. dicoccoides* ( $2n=4x=28$ , ВВАУАУ) (к-61773, Израиль) и *T. aestivum* (к-39218, Китай); в Казахстане (ТОО «НПЦ ЗХ им. А.И. Бараева, инфекционный питомник) с *T. durum* ( $2n=4x=28$ , ВВАУАУ) (сорта Дамсинская 90 и Харьковская 4) и *T. aestivum* (сорт Акмола 2).

Популяции с сухих листьев были реанимированы на восприимчивом сорте и клонированы. Монопустульные изоляты тестировали на 16 почти изогенных линиях сорта мягкой пшеницы Thatcher (Tc). Для обозначения фенотипов использовали буквенную северо-американскую номенклатуру [4], основанную на определении вирулентности к наборам изогенных линий Tc: группа 1: Lr1, Lr2a, Lr2c, Lr3a; группа 2: Lr9, Lr16, Lr24, Lr26; группа 3: Lr3ka, Lr11, Lr17, Lr30, группа 4: Lr2b, Lr3bg, Lr14a, Lr14b, группа 5: Lr15, Lr18, Lr19, Lr20.

Таблица 1. Вирулентность изолятов *P. triticina* на тетраплоидных видах пшеницы и *Aegilops crassa* Boiss. на гексаплоидном *T. aestivum*

Линия с Lr-геном	<i>Ae. crassa</i>	<i>T. aethiopicum</i>	<i>T. dicoccum</i> Д*	<i>T. dicoccum</i> Н	<i>T. dicoccoides</i>	<i>T. turanicum</i>	<i>T. durum</i>	<i>T. aestivum</i> Д	<i>T. aestivum</i> Н	<i>T. aestivum</i> К
9, 19, 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	100	100	100	100	0	100	100	100
2a, 2b, 15	0	0	0	0	0	0	0	7±6.9	100	100
2c	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100
3a, 3bg	100	100	100	100	100	11±7,4	100	100	100	100
14b	100	100	78±10,5	100	100	100	100	100	100	100
16	100	86±9,4	0	100	100	22±9,8	0	86±9.4	100	100
20	0	0	0	100	100	0	0	36±12.8	100	33±13.6
26	0	0	100	100	100	0	100	79±11	100	100
3ка,11, 14а,17,18,30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Примечание: \* Д – Дербент, Н – Новосибирск, К – Казахстан

Таблица 2. Разнообразие изолятов *P. triticina* на тетраплоидных видах пшеницы и *Aegilops crassa* Boiss. на гексаплоидном *T. aestivum*.

Показатели	<i>Ae. crassa</i>	<i>T. aethiopicum</i>	<i>T. dicoccum</i> Д	<i>T. dicoccum</i> Н	<i>T. dicoccoides</i>	<i>T. turanicum</i>	<i>T. durum</i>	<i>T. aestivum</i> Д	<i>T. aestivum</i> Н	<i>T. aestivum</i> К
Число изолятов, n	11	14	9	12	12	18	20	14	10	12
Число фенотипов, ph	1	2	2	1	1	3	1	6	1	2
Частота доминантного фенотипа, %	100	86	78	100	100	78	100	50	100	67
Среднее число аллелей вирулентности	10	9	10	13	13	8	9	13	17	16
Simple richness (ph/n)	0,09	0,14	0,22	0,08	0,08	0,16	0,05	0,43	0,10	0,17
Evenness, (равномерность распределения фенотипов)	0	0,59	0,76	0	0	0,62	0	0,79	0	0,92
Индексы разнообразия: Космана ( <i>KWm</i> )	0	0,01	0,02	0	0	0,04	0	0,09	0	0,03
Нея ( <i>Hs</i> )	0	0,01	0,02	0	0	0,04	0	0,07	0	0,02
Шеннона ( <i>Sh</i> )	0	0,24	0,035	0	0	0,37	0	0,68	0	0,44

Работа выполнена по методикам лабораторного культивирования *P. triticina*, основанных на применении бензимидазола [5].

Все изученные популяции характеризовались авирулентностью к генам Lr9, Lr19 и Lr24 и вирулентностью к Lr3ка, Lr11, Lr14а, Lr17, Lr18 и Lr30. Вариабельность отмечена на линиях TcLr1, TcLr2а, TcLr2b, TcLr2с, TcLr3а, TcLr3bg, TcLr14b, TcLr15, TcLr16, TcLr20 и TcLr26 (табл. 1). Показатели внутрипопуляционного разнообразия представлены в табл. 2. Наиболее вирулентными оказались клоны с образцов *T. aestivum*. При этом наблюдались различия между географически отдаленными популяциями; среднее число аллелей вирулентности колебалось от 13 в дербентской популяции до 16-17 в казахстанской

и новосибирской соответственно (табл. 2). Высокое сходство по вирулентности и фенотипическому составу отмечено между новосибирской и казахстанской популяциями. Различие между ними наблюдалось только по вирулентности к Lr20. Дербентская популяция с мягкой пшеницы имела более высокое фенотипическое разнообразие, по сравнению с западно-азиатскими, что, вероятно, обусловлено составом инфекционного материала, представленного большим количеством сортов.

Менее вирулентными, по сравнению с *T. aestivum* и рядом тетраплоидных видов, оказались изоляты с *T. turanicum*, *T. durum*, *T. aethiopicum* и *Ae. crassa*. Среднее число аллелей вирулентности у них составляло 8; 9; 9 и 10 соответственно.

Внутрипопуляционное разнообразие изолятов с *T. turanicum* было значительно выше, чем с других видов. На данном виде выявлены редкие для российских популяций изоляты авирулентные на линиях с генами Lr3a и Lr3bg. Наибольшее сходство по фенотипическому составу имели популяции с *T. aethiopicum* и *Ae. crassa*. Отличие их от *T. durum* состояло в высокой вирулентности к Lr16 и Lr26. Как и на мягкой пшенице, в казахстанской популяции сШ отмечена вирулентность к гену Lr26. Отсутствие инфекционного материала с твердой пшеницы из Дербента не позволило провести сравнение в двух географически отдаленных регионах. В аналогичном эксперименте с дербентской популяцией в 1980 г. Л.А. Михайловой [6] показано, что вирулентность на разных сортах *T. durum*, выращиваемых на ДОО ВИР колебалась от 100 до 17,6%. Как и в наших исследованиях, популяции с этого вида были менее вирулентными.

Фенотипический состав новосибирских изолятов с *T. dicoccoides* имел высокое сходство с *T. dicoccum*. При этом выявлены различия по вирулентности к генам Lr16 и Lr20 между новосибирской и дербентской популяциями с *T. dicoccum*.

С использованием международного набора Lr-линий-дифференциаторов в дербентских популяциях выявлены следующие фенотипы: на *T. turanicum* – LBTFG (78%), LGTFG (11%), MGTKG (11%); *T. aethiopicum* – CGTKG (86%), CBTKG (14%); *Ae. crassa* – CGTKG (100%); *T. dicoccum* – MCTKG (78%), MCTJG (22%); *T. aestivum* – PHTKG (50%), PGTKH (21), PCTKH (7%), PCTKG(7%), PHTKH (7%), THTTQ (7%); в новосибирских – *T. dicoccum* – MHTKH (100%); *T. dicoccoides* – MHTKH (100%); *T. aestivum* – THTTR (100%); с казахстанских – *T. durum* – CCTKB (100%); *T. aestivum* – THTTR (33%), THTTQ (67%).

Согласно UPGMA-дендрограмме (NTSYSpc, Version 2.2.) наблюдали разную степень генетического сходства по вирулентности между изолятами с мягкой пшеницы и тетраплоидных видов. Изоляты с тетраплоидных видов кластеризовались в 3 группы. Первую группу составляли изоляты с *Ae. crassa*, *T. aethiopicum*, *T. turanicum* и *T. durum*. Вторая включала новосибирские изоляты с *T. dicoccoides* и *T. dicoccum*, а третья – дербентские изоляты с *T. dicoccum*, и эти две группы были ближе между собой по сравнению с первой группой. Следует отметить, что ряд дербентских изолятов с мягкой пшеницы также имели высокое сходство с изолятами второй и третьей групп.

Центром происхождения возбудителя бурой ржавчины считается Плодородный полумесяц, рас-

положенного на территории от Малой Азии до ирано-иракского пограничья (гор. Загроса) и от Палестины до Турецкого Закавказья, где произрастают основные и промежуточные растения-хозяева [7]. Считается, что именно здесь произрастала тетраплоидная дикая пшеница *T. dicoccoides* [8] и, соответственно, могла наблюдаться совместная эволюция растения-хозяина и патогена.

В целом, следует отметить, что изоляты с тетраплоидных видов пшеницы и эгилопс были менее вирулентны, чем с *T. aestivum*. Практически на всех изученных видах наблюдали отбор клонов гриба авирулентных к Lr2b, Lr2c, Lr15. При этом они различались по вирулентности к генам Lr3a, Lr3bg, Lr14b, Lr16, Lr20 и Lr26. Отмечена ассоциация признаков авирулентности к Lr2a и Lr15 как для тетраплоидных видов, так и для изученных изолятов с мягкой пшеницы.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-26-00067).*

#### Список литературы

1. Михайлова Л.А., Метревели Т.Г. Структура популяции *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. tritici на разных видах пшеницы. Микол. фитопатол. 1986; 20(2): 138-43.
2. Bhardwaj SC, Jain SK, Prashar M, Kumar S. A new variant 5R9-7 of *Puccinia triticina* on emmer and durum wheat in India. Australian Plant Pathol. 2013; 42: 525-31.
3. Kosman E, Ben-Yehuda P, Manistersli J. Diversity of virulence phenotypes among annual populations of wheat leaf rust in Israel from 1993 to 2008. Plant Pathol. 2013; 63(3): 563-71.
4. Long DL, Kolmer JA. North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f.sp. tritici. Phytopathology. 1989; 79: 525-9.
5. Михайлова Л.А., Гультияева Е.И., Мироненко Н.В. Методы исследования генетического разнообразия популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob.ex Desm.f.sp.tritici. Санкт-Петербург, ВНИИЗР РАСХН; Инновац. центр защ. раст. 2003: 24 с.
6. Михайлова Л.А. Генетика взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы. Под ред. акад. РАСХН М.М. Левитина. СПб.: ВИЗР. 2006: 80 с.
7. Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. Mol plant pathol. 2008; 9(5): 563-75.
8. Гончаров Н.П. Доместикация растений. Вавиловский журн. генет. сел. 2013; 17(4/2): 884-99.



МЕЛКОСПОРОВЫЕ ВИДЫ *ALTERNARIA* НА ПОДСОЛНЕЧНИКЕ

Ивевбор М.В., Саукова С.Л., Арасланова Н.М., Антонова Т.С., Рамазанова С.А.  
ВНИИ масличных культур им. В. С. Пустовойта, Краснодар

Мелкоспоровые виды *Alternaria* распространены повсеместно и существуют преимущественно как сапротрофы. Однако на многих сельскохозяйственных культурах эти грибы могут вызывать массовое заражение, снижая и загрязняя микотоксинами урожаи. Исследования возбудителей альтернариоза подсолнечника на юге РФ, проводимые с 2010 г. во ВНИИМК, показали широкое распространение и видовое разнообразие этих грибов. Из семян и вегетирующих растений подсолнечника были выделены *A. tenuissima* (Nees et T.Nees: Fr.) Wiltshire, *A. alternata* (Fr.) Keissl, *A. arborescens* E.G. Simmons и комплекса *A. infectoria* (далее по тексту – '*A. infectoria*'). Виды идентифицировали по систематике E.G. Simmons [1].

Хотя на вегетирующих растениях подсолнечника среди возбудителей альтернариоза преобладал специализированный вид *Alternariaster helianthi* E.G. Simmons, Walczet R.G. Roberts (син. *A. helianthi* (Hansford) Tubaki et Nishihara), мелкоспоровые виды *Alternaria* выделялись часто. Обычно вместе с другими микромицетами и бактериями, а также из мест повреждений (насекомыми и др.). Среди них превалировал вид *A. tenuissima*; виды *A. alternata* и *A. infectoria* встречались реже [2].

Инфицированность партий семян подсолнечника мелкоспоровыми представителями рода *Alternaria* колебалась от 3 до 62%, что составляло от 8 до 92% в суммарной зараженности семян микрофлорой (разными грибами и бактериями). В каждом образце семян над другими видами *Alternaria* преобладал *A. tenuissima*. Во многих выборках семян присутствовали *A. alternata* и *A. infectoria*; редко встречался *A. arborescens* [3]. Эти данные сходны с полученными Ф.Б. Ганнибалом [4] в результате изучения микрофлоры семян подсолнечника из нескольких регионов РФ.

Были проведены исследования с целью определения патогенности и фитотоксичности для подсолнечника выделенных мелкоспоровых видов *Alternaria*.

Для определения фитотоксичности в жидкой среде Чапека при 25 °С культивировали изоляты грибов (4 изолята *A. tenuissima* и по одному *A. alternata* и *A. infectoria*). Через 14 сут получали культуральные фильтраты, которыми заливали семена гибридов подсолнечника Кубанский 930 и Меркурий (в трёх повторностях по 100 семян). Через 24 ч семянки раскладывали на влажную фильтровальную бумагу и выращивали в рулонах при температуре 25 °С в течение 5 сут. В качестве контролей использовали среду Чапека и воду. Учитывали количество сгнивших и проросших семян, измеряли длину проростка и центрального корня. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа.

Культуральные фильтраты изученных изолятов не вызывали полного ингибирования прорастания семян гибридов подсолнечника. Количество непророс-

ших семян обоих гибридов во всех вариантах было незначительным и не различалось с контролем. Метаболиты всех изолятов подавляли развитие корней в большей степени, чем гипокотилей. Различия между гибридами были в пределах ошибки опыта. Для всех изолятов количество аномально развитых проростков (полное отсутствие корней или отсутствие центрального корня) превышало контрольные варианты. Наблюдались различия по токсичности культуральных фильтратов между изолятами вида *A. tenuissima*.

Наиболее токсичным был изолят *A. tenuissima*, выделенный из поражённого участка листа: более 96% проростков имело аномально развитые корни. Существенно ингибировал рост и корней, и гипокотилей изолят *A. infectoria*, при этом аномальное развитие корней наблюдалось у 58% проростков гибрида Кубанский 930 и 72% – гибрида Меркурий.

Изучали патогенность 75 изолятов, выделенных из семян и растений подсолнечника из разных регионов юга РФ в 2010–2014 гг. Из них *A. tenuissima* – 39, *A. alternata* и *A. infectoria* – по 14 и *Alternaria* sp. (*A. arborescens* и неидентифицированные) – 8 изолятов. Для получения инокулюма изоляты выращивали 10 дней в пластиковых чашках Петри на среде КМА (картофельно-морковный агар) при 25 °С под лампами дневного света (16-часовой фотопериод). Эксперимент проводили на двух гибридах подсолнечника – Меркурий и Кубанский 930. В лабораторных условиях заражали растения в двух вариантах: (1) 10-дневные проростки и (2) – в фазу трех пар настоящих листьев.

У части растений перед заражением стерильной иглой были проколоты семядоли и листья и поверхностно повреждены стебли и гипокотили. Титр суспензии конидий и фрагментов мицелия составлял  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл. При помощи пульверизатора опрыскивали растения инокулюмом; контрольные – стерильной водой. В течение суток растения выдерживали в темноте в условиях 100 % влажности воздуха, после чего перемещали под свет. Температура воздуха составляла 25–30 °С. Учеты вели каждые сутки в течение 25 дней с момента заражения.

Также 15 из этих изолятов (*A. tenuissima* – 7 изолятов, *A. alternata* и *A. infectoria* – по 3 и *Alternaria* sp. – 2 изолята), включая все изученные по фитотоксичности, были использованы для заражения 10 самоопыленных линий подсолнечника в разных концентрациях инокулюма ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  и  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл) и режимах: температуры 20, 25, 30 и 35 °С в сочетаниях с относительной влажностью воздуха 55–65 и 80–90%.

В результате заражения растений подсолнечника, в том числе высоко фитотоксичными изолятами, ни в одном из вариантов опыта симптомов альтернариоза не наблюдалось, даже в местах проколов настоя-

щих листьев и поверхностных повреждений гипокотилей и стеблей. На некоторых растениях возникали небольшие некрозы вокруг проколов семядолей, но аналогичная картина наблюдалась и на отдельных контрольных растениях (обработанных стерильной водой). Вероятно, изученные мелкоспоровые виды *Alternaria* не могут преодолевать иммунные барьеры здоровых тканей растений подсолнечника и проникать в них, самостоятельно вызывая альтернариоз. Это согласуется с результатами мониторинговых исследований: из пораженных альтернариозом растений подсолнечника эти грибы выделялись вместе с другими патогенами либо при наличии механических повреждений. Наибольшее развитие альтернариоза, вызванного мелкоспоровыми видами *Alternaria*, наблюдалось на поврежденных сосущими вредителями растениях.

Таким образом, неспециализированные мелкоспоровые виды *Alternaria* фитоксичны для проростков подсолнечника и значит, способны ухуд-

шать состояние посевов. Для здоровых растений подсолнечника эти грибы не патогенны.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края, грант № 13-04-96586*

#### Список литературы

1. Simmons E.G. *Alternaria. An Identification Manual*. Utrecht: CBS. 2007: 775 p.
2. Ивевор М.В., Антонова Т.С., Саукова С.Л. К вопросу о возбудителях альтернариоза подсолнечника. Научн.-техн. бюл. ВНИИ масличных культур. Краснодар. 2013; 153-4: 90-100.
3. Ивевор М.В., Саукова С.Л., Антонова Т.С., Арасланова Н.М. Грибы рода *Alternaria* Nees в семенах подсолнечника. Научн.-техн. бюл. ВНИИ масличных культур. Краснодар. 2014; 1 (157-158): 139-44.
4. Ганнибал Ф. Б. Видовой состав, систематика и география возбудителей альтернариозов подсолнечника в России. Вестн. защ. раст. 2011; 1: 13-9.

## ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ КАРТОФЕЛЯ: ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ПОИСК АНТАГОНИСТОВ

*Карамова Н.С.<sup>1</sup>, Сташевски З.<sup>2</sup>, Илюхина Д.Л.<sup>1</sup>, Хадиева Г.Ф.<sup>1</sup>, Марданова А.М.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup>Татарский НИИ сельского хозяйства, Казань

Фитопатогенные грибы – возбудители инфекционных болезней растений, способные наносить огромный ущерб урожаю экономически важных сельскохозяйственных культур. В настоящее время известно более 10000 видов грибов, вызывающих различные болезни у растений [1]. Потери урожая важнейших культур – риса, пшеницы, кукурузы, соевых бобов и картофеля от действия фитопатогенных грибов могут достигать до 125 млн тонн ежегодно [2].

В Республике Татарстан, в последние годы, изменение агроклиматических условий и ухудшение экономического состояния хозяйств, привели к массовому распространению фитопатогенных микромицетов – возбудителей корневых гнилей сельскохозяйственных культур. В частности, возросли численность и разнообразие грибов *Fusarium*. В настоящее время к роду *Fusarium* относится несколько сотен видов грибов, многие из которых являются патогенами самых разных сельскохозяйственных растений [3]. Фузариозы, проявляющиеся в виде фузариозного увядания растений и сухой гнили клубней, представляют особую опасность для картофеля, вызывая потери урожая до 25% [4].

Применение биопрепаратов и физиологически активных веществ в борьбе с фитопатогенными микромицетами представляется весьма перспективным направлением, открывающим новые возможности в защите культуры от инфекций, для получения

экологически безопасной продукции, а также сохранения баланса в агробиоценозах.

**Цель работы** – выделение, идентификация возбудителей фузариозов картофеля и поиск антагонистов, обладающих фунгистатической активностью.

**Материалы и методы.** В работе были использованы образцы картофеля сортов Удача, Ароза, собранных с опытных полей ТатНИИСХ (Татарстан).

Клубни картофеля с признаками сухой гнили промывали водопроводной водой, подсушивали и протирали тампоном, смоченным 76%-ным этиловым спиртом. Из пораженного участка клубней стерильным скальпелем вырезали кусочки размером 2x2 см и раскладывали на поверхность среды Чапека в чашках Петри. Чашки инкубировали во влажной камере при 28 °С до 7 сут. Для выделения чистых культур грибов проводили многократный пересев колоний, выросших вокруг исследуемых образцов картофеля, в среду Чапека на чашках Петри. Полученные изоляты контролировали микроскопированием на отсутствие посторонней микрофлоры и соответствие морфологических признаков.

Молекулярно-биологическую идентификацию выделенных микромицетов проводили по анализу нуклеотидных последовательностей ITS-области генов 5,8S рДНК. Амплификацию региона ITS ДНК, выделенной из мицелия грибов, проводили по методике [5] с использованием праймеров ITS1F и ITS4R.

Секвенирование полученных продуктов амплификации генов 5,8S рРНК изолятов микромицетов проводилось в Научно-производственной компании СИНТОЛ (г. Москва).

Анализ последовательностей генов 5,8S рРНК проводили с использованием алгоритма BLAST – пакета программ, представленного на сервере NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

Для характеристики вирулентных свойств изолятов микромицетов здоровые клубни картофеля заражали чистой культурой грибов уколом, используя 10–14-суточный мицелий. Инфицированные клубни инкубировали во влажных камерах в течение 14 сут при температуре 20–22 °С. Оценивали динамику развития сухой гнили по диаметру пораженного участка вокруг укола.

Бактерии-антагонисты выделяли из образцов почвы картофельного поля и ризосферы растений картофеля на среде LB-агар в чашках Петри методом скученного посева. Были отобраны колонии бактерий, вокруг которых наблюдалась зона подавления роста почвенных бактерий. Бактерии были выделены в виде чистой культуры. Для характеристики морфологических признаков препараты бактерий окрашивали по Граму.

Антагонистические свойства чистых культур бактерий в отношении фитопатогенных изолятов грибов *Fusarium* исследовали методом агаровых блоков [6] и оценивали по наличию зоны задержки роста микромицетов вокруг блоков с бактериями. О степени ингибирования судили по размеру диаметра колонии микромицета в сравнении с контролем. Видовую идентификацию изолятов бактерий, обладающих антагонистическими свойствами, проводили с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии (MALDI Biotyper, Bruker Daltonik).

**Результаты и обсуждение.** Из клубней картофеля сортов Удача и Ароза, пораженных сухой гнилью, выделено 4 изолята микромицетов, которые по результатам микробиологического анализа отнесены к роду *Fusarium*. Молекулярно-генетический метод идентификации, основанный на секвенировании последовательности генов 5,8S рРНК, и BLAST анализ с использованием базы данных NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) позволил установить видовую принадлежность выделенных изолятов микромицетов: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum* и *Fusarium tricinctum* (табл. 1). Чистые культуры микромицетов были использованы для инфицирования клубней картофеля.

Инфицированные клубни инкубировали при комнатной температуре в течение 14 сут. Через каждые сутки измеряли диаметр пораженного участка. Через 7 сут диаметр пораженных участков составлял 15, 8, 2 и 14 мм вокруг места укола для штаммов *F. solani* NZ1, *F. oxysporum* ID1, *F. avenaceum* NK1 и *F. tricinctum* SA1 соответственно. Таким образом, штаммы *F. solani* NZ1 и *F. tricinctum* SA1 проявляют высокие вирулентные свойства и вызывают сухую гниль клубней картофеля.

Таблица 1. Идентификация изолятов микромицетов по гомологии последовательности ITS-области генов 5,8S рДНК

№	Штамм	Перекрытие	Идентичность
1	<i>Fusarium</i> sp. 1	78%	99% <i>Fusarium solani</i> isolate TVD_Fungal-Culture126
2	<i>Fusarium</i> sp. 2	80%	100% <i>Fusarium oxysporum</i> strain CEF-06
3	<i>Fusarium</i> sp. 3	80%	99% <i>Fusarium avenaceum</i> strain 1
4	<i>Fusarium</i> sp. 4	82%	100% <i>Fusarium tricinctum</i> штамм Z5

Из образцов почвы картофельного поля и ризосферы растений картофеля выделено 20 изолятов бактерий разной морфологии – представители грамположительных и грамотрицательных бактерий, демонстрирующих потенциальную антагонистическую активность в отношении других почвенных микроорганизмов.

Табл. 2. Фунгистатическая активность бактерий в отношении возбудителей фузариоза картофеля

Фитопатоген	Ингибирование роста микромицетов, %		
	<i>Bacillus subtilis</i> штамм 1	<i>Bacillus subtilis</i> штамм 2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>Fusarium solani</i> NZ1	71 %	68%	33%
<i>Fusarium oxysporum</i> ID1	73%	77%	20%
<i>Fusarium avenaceum</i> NK1	64%	71%	5%
<i>Fusarium tricinctum</i> SA1	64%	76%	22%

По результатам скрининга первичной антагонистической активности выделенных бактерий в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium* отобраны 3 изолята, обладающих выраженным фунгистатическим действием (табл. 2).

Идентификация штаммов с выраженной антифунгицидной активностью с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии позволила установить, что два грамположительных изолята относятся к виду *Bacillus subtilis*, а изолят с грамотрицательным морфотипом относится к виду *Acinetobacter calcoaceticus*.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о выраженном антагонистическом потенциале бактерий штаммов *Bacillus subtilis* в отношении фитопатогенных грибов *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum* и *F. tricinctum*, что, в свою

очередь позволяет рассматривать данные штаммы бактерий как основу для создания эффективных и безопасных препаратов для борьбы с фузариозом картофеля в условиях Республики Татарстан.

*Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной КФУ для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект 14-83).*

#### Список литературы

1. Pérez-García A, Romero D, Zeriouh H, de Vicente A. Biological control of phytopathogenic fungi by aerobic endospore-formers. In: *Aerobic, Endospore-Forming Soil Bacteria*. Ed. Logan NA, De Vos. Berlin: Springer-Verlag. 2011: 157-80.
2. Fisher MC, Henk DA, Briggs Ch J et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*. 2012; 484: 186-94.
3. Du M, Ren X, Sun Q et al. Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen. *Potato Res.* 2012; 55: 175-84.
4. Wharton P, Kirk W, Berry D, Tumbalam P. Seed treatment application-timing option for control of *Fusarium* decay and sprout rot of cut seed pieces. *Am J Potato Res.* 2007; 84: 237-44.
5. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1): 471.
6. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М.: МГУ. 1976: 308 с.

## ВЛИЯНИЕ АЛЬТЕРНАРИОЗА НА ВОДНЫЙ РЕЖИМ КАРТОФЕЛЬНОГО РАСТЕНИЯ

*Кинчарова М.Н.*

*Самарская государственная сельскохозяйственная академия*

Диагностическим показателем, связанным со многими важными физиологическими процессами, является водоудерживающая способность тканей [1–3]. В целом, реакция растений на стрессы проявляется в снижении общей оводненности и водоудерживающих сил [4, 5]. При этом наблюдается возрастание содержания упорядоченных форм внутриклеточной воды [6]. Возрастающий водный дефицит в листьях ведет к закрыванию устьиц и снижает поступление двуокси углерода. Снижение содержания воды в тканях сопровождается падением интенсивности фотосинтеза и других ассимиляционных процессов и усилением процессов распада, в первую очередь – дыхания [7].

**Цель работы** – изучение влияния грибов *Alternaria* на водный режим растений картофеля при естественном инфицировании.

Для этого было взято несколько сортов различных групп спелости с различной степенью поражения заболеванием. Степень поражения определяли по 5-балльной шкале. Определение показателей водного режима проводили по работе [8]. Содержание свободного пролина определяли по [9].

При анализе данных по водному режиму растений за 5 лет исследований (2006–2010 гг.) нельзя оставлять без внимания погодные условия. Замечено, что у ранних сортов, как правило, во влажные и теплые годы общая оводненность, либо на начальных стадиях практически не изменялась, либо сначала возрастала, а затем снижалась по мере накопления инфекции. В засушливых условиях с увеличением балла поражения общая оводненность сначала возрастала, а затем падала. Следует отметить, что у достаточно устойчивых к болезни сортов, таких как Розара и Ароза, оводненность в зависимости от зараженности менялась слабо. Только в экстремально жаркий и засушливый

2010 г. она возрастала у этих сортов по мере увеличения балла заражения болезнью.

У средне ранних сортов общая оводненность находилась в зависимости от сорта, а именно у сортов Космос и Невский в благоприятные по влагообеспеченности годы она снижалась, а по мере увеличения балла заражения повышалась, у сорта Памир наоборот сначала повышалась, а затем снижалась. В засушливые годы у всех сортов этой группы – в основном понижалась. У среднеспелых и позднеспелых сортов, то в основном общая оводненность у них в зависимости от условий года изменялась одинаково, с той лишь разницей, что в благоприятные годы она повышалась до 3 баллов поражения альтернариозом (из 5 возможных), а затем падала, а в засушливые годы повышение отмечалось только до 1 балла.

Имеются данные [11] о том, что при снижении общего содержания воды в клетке пролин способствует поддержанию оводненности тканей. Результаты наших исследований полностью соотносятся с этими данными. У раннего сорта Удача при развитии альтернариоза с уменьшением содержания пролина снижалась и оводненность тканей. У среднеспелого сорта Космос обратная тенденция – с повышением содержания пролина оводненность увеличивалась.

С точки зрения защитных механизмов важно проследить связь между водным режимом растений и факторами стресса, происходящими в растениях в ответ на заражение грибом, одним из которых является накопление свободного пролина.

У ранних сортов картофеля в 2007 г. четкой зависимости между общей оводненностью и содержанием пролина не наблюдалось. В 2008 г. у большинства сортов этой группы при накоплении свободного пролина возрастала и оводненность, а у сорта Каратоп при снижении одного признака – снижался и другой.

В засушливые годы у ранних сортов также видна зависимость водного режима и содержания свободного пролина. А именно, в 2009 г. у раннего сорта Розара общая оводненность тканей повышалась, а содержание пролина снижалось. У остальных сортов из группы ранних, содержание пролина незначительно, но увеличивалось, а общая оводненность у одних незначительно снижалась, а у других существенно не изменялась. В засушливый 2010 г. у устойчивых к альтернариозу сортов засуха привела к снижению оводненности и увеличению свободного пролина у сорта Розара в начале периода вегетации и у сорта Ароза в середине вегетации, а затем к дальнейшему увеличению пролина.

Зависимость между общей оводненностью и содержанием свободного пролина наблюдалась также и у среднеранних сортов. Особенно по сорту Космос, в 2007 г. повышение содержания пролина явно заметно при заражении растений картофеля альтернариозом в 1 балл и более, в то же время общая оводненность в этот же период значительно выросла. В 2009 г. – с уменьшением содержания пролина также снижалась и общая оводненность. Такие же данные можно проследить и в отношении сорта Невский.

Повышение содержания пролина и общей оводненности в благоприятные годы наблюдалось у среднеспелых сортов Ресурс, Расинка, Голубизна и позднеспелого сорта Пикассо. Причем у Голубизны отмечено увеличение содержания свободного пролина при поражении растений альтернариозом в 2 балла, общая оводненность в данном случае, наоборот, снижалась.

Анализ данных показал, что водоудерживающая способность у разных сортов, в целом, зависела не только от группы спелости, к которой они относятся, но также от сложившихся погодных условий и степени развития альтернариоза. Отмечено, что у ранних сортов независимо от погодных условий водоудерживающая способность практически не изменялась или в начале вегетации повышалась, а затем падала.

У среднеранних сортов растения реагировали по-разному. Например, у сорта Памир водоудерживающая способность во влажные годы снижалась, а у сорта Невский повышалась. В засушливых условиях у сорта Памир выявлено незначительное усиление водоудерживающей способности в начале вегетации, а затем с увеличением балла поражения – снижение. У сорта Невский наблюдалась обратная тенденция.

У среднеспелых сортов в начале вегетации водоудерживающая способность снижается, а затем растет, а у позднеспелого сорта Пикассо, наоборот, в конце вегетации наблюдался её снижение. Таким образом, ранние сорта в большей степени противостояли альтернариозу на начальном этапе поражения, по отношению к другим сортам. Сорта Ароза и Розара являются наиболее устойчивыми к инфекции, так как независимо от погодных условий и степени поражения водоудерживающая способность у них повышалась. Во влажные годы повышалась водоудерживающая способность растений среднеранне-

го сорта Невский, у остальных сортов она менялась незначительно. У всех среднеспелых сортов в благоприятные годы отмечено снижение водоудерживающей способности на начальном периоде заражения альтернариозом. В засушливые годы этот показатель в основном снижался.

Таким образом, наиболее сильно влиянию альтернариоза противостояли сорта из ранней и среднеспелой групп спелости, у большинства изученных сортов реакция растений проявлялась сразу после начального момента заражения альтернариозом – начиналось стабильное накопление влаги, что свидетельствует о способности противостоять патогену. В тоже время не следует забывать и о погодных условиях, так как влагообеспеченность в эти годы была разной не только для растений, но и для возбудителя альтернариоза. Поэтому в годы благоприятные для альтернариоза наиболее сильно видна зависимость водоудерживающей способности от развития и распространения заболевания.

#### Список литературы

1. Генкель П.А. О сопряженной и конвергентной устойчивости растений. Физиол. раст. 1979; 26(5): 921-31.
2. Грининько В.В., Поспевалова Ю.С. Методы определения устойчивости растений к обезвоживанию как признака приспособления к природным. Методы оценки стойкости растений к неблагоприятным условиям среды. М. 1976: 35-9.
3. Жибоедов П.М. Водоудерживающая способность побегов – один из диагностических показателей зимостойкости тополей. Лесное хозяйство и агролесомелиорация в Казахстане. Алма-Ата: Кайнар, 1973; 8: 163-72.
4. Сидорович Е.А. Устойчивость интродуцированных растений к газообразным соединениям серы в условиях Белоруссии. Минск: Наука и техника, 1979: 72 с.
5. Рязанцева Л.А. Влияние промышленного загрязнения на водный режим древесных растений. Газоустойчивость растений. Новосибирск: Наука. 1980: 174-5.
6. Макогонов В.С. Загрязнение атмосферного воздуха выбросами промышленных предприятий и их влияние на растительность. Зеленое строительство в степной зоне УССР. Киев: Наук. думка. 1970: 161-9.
7. Рубин Б.А. Курс физиологии растений. М.: Высш. школа. 1976: 576 с.
8. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос. 1972: 456 с.
9. Bates LS, Waldern RP, Teare D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil. 1973; 39: 205-7.
10. Schoberf B, Tschesche H. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. Biochim. Biophys. Acta. 1978; 541(2): 270-7.
11. Stewart CR, Boggess SF. Metabolism of proline by barley leaves and its use in measuring the effects of water on proline oxidation. Plant Physiol. 1978; 61(4): 654-7.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛИСТОВЫХ ПЯТНИСТОСТЕЙ КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТА

Кокаева Л.Ю., Еланский С.Н., Берёзов Ю.И.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Проведен молекулярно-генетический анализ грибов-возбудителей листовых пятнистостей картофеля и томата. Потери урожая картофеля от этих заболеваний за счет преждевременного отмирания ботвы составляют около 10%, но в эпифитотийные годы могут возрастать до 40% и более [1]. Потери томата в случае эпифитотийного развития и массового поражения созревающих плодов могут достигать 100%. Борьба с возбудителями листовых пятнистостей осложняется очень высокой изменчивостью возбудителей этих болезней.

Методы морфологического анализа не позволяют объективно оценивать биоразнообразие грибов и структуру их популяций, что делает практически невозможным определение видовой принадлежности схожих видов. Получение полного спектра видов, вызывающих поражение, важно с практической точки зрения, т.к. позволяет подобрать фунгициды, эффективные против всех присутствующих в пораженном органе видов грибов [2].

Современные исследования в области защиты картофеля и томата от возбудителей листовых пятнистостей направлены, в основном, на изучение возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и возбудителей альтернариозов (виды *Alternaria*). Эти исследования не дают представления о разнообразии грибных патогенов, вызывающих листовые пятнистости. Во многих случаях в некрозе, вызванном фитофторой или альтернарией, присутствуют и другие виды грибов. Однако даже при микроскопировании пораженных образцов, помещенных во влажные камеры, не все грибы проявляют себя. Поэтому для изучения видового состава грибов – возбудителей пятнистостей листьев необходимо применение других методов, позволяющих определять видовой состав в пораженном образце без выделения чистых культур или получения видоспецифичных структур (например спороношения). В данном случае может помочь применение молекулярно-генетических методов, в частности, полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием ампликонов.

Для исследования видового разнообразия фитопатогенных грибов из пораженных листьев картофеля и томата проводили изучение нуклеотидного состава участков ядерных рибосомных генов (ITS). ДНК выделяли из отдельных некрозов и целых листовых пластинок с использованием общепринятых методов: замороженный материал растирали в жидком азоте, после чего лизировали в СТАВ-буфере и очищали с использованием хлороформа. ПЦР-ам-

плификация проводилась с праймерами, являющимися специфичными для грибной ДНК: ITS86f-ITS4, ITS1f-ITS4, ITS5-ITS4, ITS1-ITS4 [3, 4]. Полученные после амплификации ПЦР-продукты подвергали электрофоретическому разделению в агарозном геле. Полученный фрагмент выделяли из геля, при этом часть продукта была отсекарована непосредственно, вторая клонирована в *E. coli* с последующим секвенированием вставки из отдельных клонов бактерии. При клонировании ампликоны лигировали в вектор pAL2-T (Евроген). Лигированную смесь трансформировали в компетентные клетки *E. coli*, которые впоследствии высевали на селективную среду LB с ампицилином. Отбор клонов проводился с помощью бело-голубой селекции, что позволило отобрать по 10-20 белых колоний для каждого образца. Анализ клонов для выявления нужной вставки проводился методом ПЦР. Выделенная плазмидная ДНК была секвенирована.

В результате в некрозах листьев при прямом секвенировании амплифицированных ITS-регионов (без клонирования) были идентифицированы только последовательности ДНК растения-хозяина или *A. alternata*. В тех же образцах после клонирования в *E. coli*, были определены последовательности, характерные для других видов грибов: *A. solani*, *Phytophthora infestans*, *Cladosporium* sp. и др.

Таким образом, показано, что молекулярно-генетический анализ пораженных листьев с использованием клонирования позволяет более полно определять существующий в них комплекс фитопатогенных грибов по сравнению с прямым секвенированием, которое выявляет только один вид. Количество таксонов грибов в образце пораженной растительной ткани листа не зависело от размера некроза.

### Список литературы

1. Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. Минск: Белпринт. 2005: 696 с.
2. Побединская М.А., Плуталов П.Н., Романова С.С. и др. Устойчивость возбудителей альтернариоза картофеля и томата к фунгицидам. Микол. фитопатол. 2012; 46(6): 401-8.
3. Vancov T, Keen B. Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. FEMS Microbiol Lett. 2009. 296(1). P.91-96.
4. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Acad Press. 1990: 315-22.

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЦИЛИНДРОКЛАДИОЗА В СОЧИНСКОМ НАЦИОНАЛЬНОМ ПАРКЕ

Колганихина Г.Б.

Институт лесоведения РАН, Успенское, Московской области  
Московский государственный университет леса, Мытищи

Самшит колхидский, или кавказская пальма (*Buxus colchica* Pojark.) является третичным реликтом и эндемиком колхидско-лазистанской флоры. Вид находится под охраной государства, он занесен в Красную книгу РФ и некоторые региональные Красные книги. Начиная с 2009 г. на территории российского Кавказа наблюдается массовое ослабление и усыхание самшитовых деревьев [1–3]. Подобная проблема имеет место на территории сопредельной Абхазии и в Грузии [4–6].

На территории Сочинского национального парка (СНП) комплексные исследования по этой проблеме ведутся с 2011 г., основные материалы собраны в 2012 и 2013 гг. [7–9]. Одной из наиболее важных задач было установление причины патологического процесса, особое внимание уделялось выявлению опасных грибных заболеваний.

С этой целью было проведено детальное лесопатологическое обследование насаждений самшита на территории Адлерского, Верхне-Сочинского и Дагомысского лесничеств, проведены микологический, молекулярно-фитопатологический и анатомо-гистохимический анализы собранных образцов пораженных органов растений. Молекулярно-фитопатологическая диагностика образцов тканей самшита, чистых культур и спороношений грибов выполнялась специалистами лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси под руководством в.н.с., к.б.н. О.Ю. Баранова. На отдельных участках произрастания самшита были проведены повторные учеты, позволившие получить представление о динамике развития патологического процесса в течение одного года. Дополнительно были обследованы посадки самшита в парке «Дендрарий» СНП.

В результате проведенных исследований было выявлено более 50 видов грибов. Большинство из них ранее не были отмечены для СНП [10]. Из обнаруженных видов 35, или 69% являются патогенными и характеризуются той или иной степенью паразитической активности. Наиболее распространенные из них поражают листья и побеги.

Это такие виды, как *Pseudonectria buxi* (DC.) Seifert, Gräfenhan & Schroers с патогенной несовершенной стадией *Volutella buxi* (DC.) Berk.), *Bionectria coronata* (Juel) Schroers с патогенной несовершенной стадией *Clonostachys buxi* (J.C. Schmidt ex Link) Schroers, виды *Phomopsis*, *Macrophoma candollei* (Berk. & Broome) Berl. & Voglino, *Geejayessia desmazieri* (Becc. & De Not.) Schroers, Gräfenhan & Seifert, *Guignardia* sp. и *Puccinia buxi* Sowerby.

На территории СНП также был обнаружен возбудитель опасного заболевания листьев и побегов

самшита *Cylindrocladium buxicola* Henricot, не отмечавшийся здесь ранее. Это вредоносное заболевание некоторые исследователи рассматривают как перво-степенную причину массового усыхания самшита в кавказском регионе [2, 4–6]. По этой причине цилиндрокладиоз, или ожог самшита, оказался под самым пристальным нашим вниманием.

В осенний период 2012 г. гриб был обнаружен во всех обследованных лесничествах СНП, где был зафиксирован лишь на опавших листьях. Доля листовых пластинок со спороношениями этого гриба в образцах с разных пробных площадей колебалась от 0 до 23,2 %, а в среднем составила 10,9 %. Однако в парке «Дендрарий» СНП в декабре 2012 г. болезнь, вызываемая *C. buxicola*, была зарегистрирована на единичных живых побегах самшита вечнозеленого (*Buxus sempervirens* var. *suffruticosa* L.).

В результате периодических наблюдений в течение 2013 г., которые на отдельных участках начались еще в феврале месяце, характерные признаки вредоносного заболевания на живых растениях в виде бурых пятен на листьях и черно-бурых штрихов на зеленых стеблях одно- или двулетних приростов появились только в октябре. Этому предшествовал период довольно прохладной и дождливой погоды.

Болезнь проявилась лишь на части деревьев, преимущественно на водяных побегах, образовавшихся на стволах и скелетных ветвях в нижней части кроны, хотя были отмечены случаи поражения отдельных участков нормально развитых нижних ветвей, а также жизнеспособного подростка. Степень поражения растений (судя по количеству пораженных побегов в просматриваемой части кроны и количеству опавших листьев), как правило, была слабая, в редких случаях – средняя.

Сильнее других цилиндрокладиозом были поражены мелкие водяные побеги в пучках, особенно образующие на стволах плотные подушки. На стеблях таких побегов, как правило, были развиты некрозы в виде черно-бурых штрихов, а сохранившиеся на них пораженные листья были уже засохшими, иногда немного скрученными и имели зеленовато-серую окраску. В условиях влажной камеры на этих листьях помимо *Cylindrocladium buxicola* в массе появлялись также спороношения *Volutella buxi* (DC.) Berk. и *Clonostachys buxi* (J.C. Schmidt ex Link) Schroers. Плотные подушки из мелких водяных побегов дольше удерживают влагу и тем самым способствуют развитию болезней, являясь при этом постоянным источником инфекции.

Цилиндрокладиоз, безусловно, следует рассматривать в ряду важных факторов ослабления самшита, учитывая тот факт, что самшит является веч-

нозеленым растением, и что болезнью поражаются преимущественно молодые побеги, преждевременно теряющие часть листьев в результате развития заболевания. Тем не менее за весь период наблюдений, и особенно в октябре 2013 г., когда цилиндрокладиоз был зарегистрирован на живых листьях и побегах самшита, массового опадения листьев вследствие поражения растений этим заболеванием не наблюдалось. За годовой период наблюдений на пробных площадях не произошло резкого ухудшения состояния и дальнейшего усыхания самшитовых деревьев, не отмечено резких переходов деревьев из одной категории состояния в другую.

Продолженные наблюдения наряду с другими исследованиями позволяют утвердиться во мнении, что цилиндрокладиоз не следует рассматривать в качестве первостепенной причины массового ослабления и усыхания растений, и что данное явление имеет более сложную этиологию. Однако в насаждениях самшита необходимо продолжить ведение фитопатологического мониторинга.

В 2014 г. самшитники в кавказском регионе подверглись новой угрозе вследствие быстрого распространения инвазивного вида вредителя – самшитовой огневки (*Cydalima perspectalis* Walker) [8, 11]. В настоящее время самшит колхидский находится в серьезной опасности. Негативное воздействие целого ряда факторов на протяжении нескольких последних лет привело к тому, что существование этого древнего вида оказалось под угрозой.

#### Список литературы

1. Дворецкая Е.В. Вспышка заболеваемости самшита колхидского в Сочинском национальном парке. Краснодар. 2011; 7(2): 45-50.
2. Грабенко Е.А. Ботаники бьют тревогу. Кавказ заповедный. 2011; 4(87): 2.
3. Колганихина Г.Б. Усыхание самшита в Сочинском национальном парке. Горные экосистемы и их компоненты: Мат. IV Межд. конф., посвящ. 80-летию основателя ИЭГТ КБНЦ РАН чл.-корр. РАН А.К. Темботова и 80-летию Абхазского государственного университета. Сухум. Абхазия 10-14 сент. 2012 г. Сухум. 2012: 16-7.
4. Гасич Е.Л. Возбудитель ожога самшита *Calonectria pseudonaviculata* – первая находка. Совр. микол. в России. 2012; 4: 277.
5. Гасич Е.Л. Новый для Абхазии вид *Calonectria pseudonaviculata* – возбудитель ожога самшита. Микол. фитопатол. 2013; 47(2): 129-31.
6. Мепаришвили Г. Внимание! *Vuxus colchica* в опасности. Роль ботанических садов в сохранении разнообразия растений. Мат. юбилейн. конф., посвящ. 100-летию Батумского бот. сада. Батуми. 2013. Ч. II: 212.
7. Колганихина Г.Б. Массовое усыхание самшита на территории Сочинского национального парка и роль патогенных грибов в этом процессе. Вест. МГУЛ – Лесной вестн. 2013; 6(98): 117-24.
8. Колганихина Г.Б. Годичная динамика состояния самшита колхидского и развитие цилиндрокладиоза в Сочинском национальном парке. Вестн. МГУЛ – Лесной вестн. 2014; 6(104): 202-9.
9. Колганихина Г.Б. Массовое усыхание самшита колхидского в Сочинском национальном парке: состояние, комплекс возбудителей болезней, динамика патологического процесса. М.; Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2014; 4: 38-49.
10. Ширяева Н.В. Вредные членистоногие и паразитная микофлора древесных растений Сочинского национального парка (справочник). Сочи. 2000: 40 с.
11. Гниненко Ю.И. Самшитовая огнёвка – новый инвазивный организм в лесах российского Кавказа. Карантин раст.: Наука и практи. 2014; 3(7): 32-9.

## ВИДОВАЯ И ВНУТРИВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* ПО ПАТОГЕННЫМ И ТОКСИНОГЕННЫМ СВОЙСТВАМ

Коломиец Т.М., Панкратова Л.Ф.

ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы, Московской области

В последние годы широкое распространение в агроценозах сельскохозяйственных культур получают патогены-полифаги, вызывающие болезни различной этиологии. К числу таких фитопатогенов в большинстве регионов России относятся грибы из рода *Fusarium*, широко распространенные на посевах зерновых культур и вызывающие очень вредоносные заболевания: фузариоз колоса, снежную плесень и корневую гниль. Кроме того, фузариевые грибы обуславливают накопление в зерне опасных для здоровья человека и животных микотоксинов, вызывающих развитие рака, желудочно-кишечные, почечные, нервные и другие расстройства, а также

снижают резистентность к инфекционным заболеваниям.

Грибы из рода *Fusarium* являются актуальными для стран Западной Европы, США, Канады, Китая и др. Вредоносность фузариевых грибов в Российской Федерации в последние годы возрастает. Одним из вредоносных болезней зерновых культур является фузариозная корневая гниль. Заболевание распространено повсеместно и проявляется во все фазы вегетации растений. Наиболее подвержены фузариозной корневой гнили яровая и озимая пшеница. В последние годы корневая гниль этих культур приобрела широкое распространение и наносит значительный ущерб народному хозяйству. Потери тем



выше, чем ниже культура земледелия. Неправильные севообороты, наличие монокультуры, низкая агротехника приводят к ухудшению структуры почвы, к истощению плодородия, создают неблагоприятные условия для развития растений, способствуют накоплению в почве патогенных грибов.

В отдельных случаях корневая гниль бывает причиной массовой гибели посевов. Проблема фузариоза колоса является актуальной для большинства стран мира и международных организаций (ВОЗ, ФАО, МАИР и др.). Основными причинами высокой вредности заболеваний, вызываемых фузариевыми грибами, являются высокая изменчивость возбудителей, отсутствие устойчивых сортов, недостаточная эффективность химического метода защиты и другие.

Во ВНИИ фитопатологии длительное время изучается видовое и внутривидовое разнообразие возбудителей из рода *Fusarium*, определены доминирующие виды фитопатогенов в различных регионах России и проведено их картирование. В результате исследований по патогенности и токсиногенности фузариевых грибов выявлено неоднозначное влияние споровой суспензии и фильтрата культуральной жидкости разных видов и штаммов патогенов на рост корней и проростков пшеницы.

По патогенности и токсинообразующей способности штаммы возбудителей были дифференцированы на четыре группы:

- Непатогенные, нетоксигенные (НП, НТ) – ингибирование роста растений 0 – 30%,
- Слабопатогенные, слаботоксигенные (СП, СТ) – ингибирование роста растений 31 – 50%,
- умеренно-патогенные, умеренно токсигенные (УП, УТ) – ингибирование роста растений 51 – 70%,
- патогенные, токсигенные (П, Т) – ингибирование роста растений свыше 70%.

Эксперименты по изучению патогенности 16 видов возбудителей из рода *Fusarium* показали, что большая часть видов грибов характеризовались слабыми патогенными свойствами. По средним данным изучаемых показателей только три вида фузариевых грибов: *F. sambucinum* (*G. pulicaris*), *F. roseum*, *F. lateritium* (*G. baccata*) характеризовались умеренной патогенностью. С умеренным уровнем токсигенности идентифицировано 5 видов грибов: *F. nivale* (*M. nivalis*), *F. graminearum* (*G. zaeae*), *F. semitectum*, *F. lateritium* (*G. baccata*), *F. solani* (*Nectria haematococca*).

Выявлен только один вид возбудителя *F. lateritium* (*G. baccata*) с умеренными свойствами патогенности и токсигенности.

В результате сравнительного анализа свойств патогенности и токсинообразующей способности для грибов *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. nivale* (*M. nivalis*), *F. graminearum* (*G. zaeae*), *F. gibbosum*, *F. sambucinum* (*G. pulicaris*), *F. moniliforme* (*G. moniliformis*), *F. avenacium* (*G. avenacea*), *F. semitectum*, *F. roseum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. lateritium* (*G. baccata*), *F. solani* (*Nectria haematococca*) – возбудителей фузариоза колоса, снежной плесени и корневой гнили пшеницы было показано, что в большинстве случаев отсутствовала корреляция между показателями патогенности и токсинообразующей способностью. Прямая корреляция отмечена при анализе внутривидового разнообразия фитопатогенов.

Штаммы возбудителей *F. graminearum*, *F. sambucinum* (*G. pulicaris*), *F. moniliforme* (*G. moniliformis*), *F. nivale* (*Monographella nivalis*) характеризующиеся в основном высокой токсинообразующей способностью, не всегда имели высокие показатели патогенности. Корреляция по высокому уровню изучаемых показателей выявлена у штамма *F. nivale* (*Monographella nivalis*) и 2 штаммов *F. sambucinum* (*G. pulicaris*). У вида *F. culmorum* больше идентифицировано штаммов с высоким уровнем патогенности. Среди видов *F. gibbosum*, *F. sporotrichioides* и *F. oxysporum* с одинаковой частотой встречались как патогенные, так и токсигенные штаммы.

С высоким уровнем токсинообразующей способности идентифицированы штаммы в Северо-Кавказском, Центральном и Средневолжском регионах, с высоким уровнем патогенности в Центральном, Центрально-Черноземном и Восточно-Сибирском регионах Российской Федерации.

#### Список литературы

1. Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.С. и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. Киев: Наук. думка. 1988: 552 с.
2. Билай В.И., Курбацкая З.А. Определитель токсинообразующих микромицетов. Киев: Наук. Думка, 1990: 236 с.
3. Саркисов А.К. Микотоксикозы. М.: Сельхозиздат, 1954: 216 с.
4. Leslie JF, Summerell BA. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publish. 2006: 388 p.

## БОЛЕЗНИ ЖЕНЬШЕНЯ В ПРОМЫШЛЕННОЙ КУЛЬТУРЕ И НА ПРИУСАДЕБНЫХ УЧАСТКАХ

Кориняк С.И.

Институт экспериментальной ботаники НАНБ им. В.Ф. Купревича, Минск

Нередко в промышленности, а также на приусадебных участках садоводы помимо традиционных культур возделывают лекарственные растения, многие из которых привезены и введены в культуру на территории Беларуси из различных регионов мира, в том числе и Дальнего Востока.

Из культивируемых лекарственных растений интродуценты, особенно многолетники, относятся к числу наиболее поражаемых фитопатогенными микромицетами. Это связано со спецификой их возделывания и произрастания. Расположение растений рядами, изменение экологических факторов вследствие интродукции, а также на протяжении многих лет отсутствие севооборотов приводит к тому, что заболевания, вызываемые фитопатогенными грибами распространяются весьма широко и быстро, и носят характер эпифитотий. Присутствие фитопатогенной инфекции ведет к изменению биохимических свойств лекарственных соединений, ухудшению качества растительного сырья, частичной, а иногда, и полной потере урожая.

Женьшень обыкновенный (*Panax ginseng* С.А. Мей) – многолетнее травянистое растение, из семейства аралиевых (Araliaceae). В диком виде произрастает в Приморском крае, Корею, Китае, обычно встречается в девственных широколиственных и хвойных лесах. Как правило, растет одиночно, но иногда образует популяции до 100 растений и более. Женьшень культивируется в Корею, Китае, Японии, а в последние десятилетия в России и Белоруссии.

Поскольку Женьшень *Panax ginseng* С.А. Мей (Araliaceae) – интродуцирован из Восточноазиатского региона в западные районы СНГ и является источником ценного лекарственного сырья в медицинских целях особый интерес представляет идентификация фитопатогенов этого растения.

Изучение микобиоты проводилось путем регулярных исследований культур и сбором гербарного материала с видимыми симптомами поражения в периоды вегетации в Цеху лекарственных трав Коммунального унитарного предприятия Минская овощная фабрика. Собранные образцы пораженных растений проходили дальнейшую камеральную обработку. При гербаризации материала и определении видового состава микромицетов использованы общепринятые следующие методы, описанные В.И. Билай: макроскопический и микроскопический анализы, метод выращивания грибов во влажной камере на естественном субстрате и метод чистых культур.

Для определения степени поражения органа растения (например листа) использована пятибалльная шкала, где: 0 баллов – отсутствие поражения, 1 – поражено до 1/5 поверхности листа, 2 – поражено

от 1/5 до 1/3 поверхности листа, 3 – поражено от 1/3 до 2/3 поверхности листа, 4 – поражено более 2/3 поверхности листа.

Идентификация микромицетов проводилась в соответствии с культуральными и морфологическими признаками по определителям В.А. Мельника, Н.М. Пидопличко, В. Sutton. Названия нижеприведенных видов грибов, а также их синонимы отвечают требованиям международной микологической глобальной базы данных – Index fungorum. Далее приводятся: список видов грибов их синонимы и анаморфы. Указывается степень поражения растения в баллах, общее распространение фитопатогена.

На *Panax ginseng* С.А. Мей. (Araliaceae) определен комплекс из 8 видов патогенных грибов, вызывающих поражения сеянцев, листьев, плодов, семян, корней.

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. Syn.: *Torula alternata* Fr., Syst. mycol. (Lundae) 3 (2): 500 (1832). *A. alternata* (Fr.) Keissl., Beih. bot. Zbl., Abt. 2 29: 434 (1912) var. *alternate*. *Ulocladium consortiale* sensu Brook; fide NZfungi (2008). *A. tenuis* Nees, Syst. Pilze (Würzburg): 72 (1816). *A. tenuis* Nees, Syst. Pilze (Würzburg): 20 (1816) var. *tenuis*. *A. tenuis* Nees, Syst. Pilze (Würzburg): 20 (1816) f. *tenuis*. *Macrosporium fasciculatum* Cooke & Ellis, Grevillea 6 (no. 37): 6 (1877). *A. fasciculata* (Cooke & Ellis) L.R. Jones & Grout, Bull. Torrey bot. Club 24 (5): 257 (1897). *A. rugosa* McAlpine, Agric. Gaz. N.S.W., Sydney 7: 304 (1896). *A. tenuis* f. *trichosanthis* D. Sacc., Mycotheca ital.: no. 1592 (1898). *A. tenuis* f. *chalaroides* Sacc., Giorn. Vitic. Enol. 11: 132 (1903). *A. tenuis* var. *mali* Marchal & É.J. Marchal, Bull. Soc. R. Bot. Belg. 54: 133 (1921). *A. tenuis* f. *genuina* Unamuno, Boln Real Soc. Españ. Hist. Nat., Biologica 33: 224 (1933). *A. alternata* var. *rosicola* V.G. Rao, Mycopath. Mycol. appl. 27: 132 (1965). Anamorphic Lewia. Возбудитель пятнистости листьев (альтернариоз). Встречается на листьях и на плодах *Panax ginseng*. Поражаются преимущественно листья. Степень поражения листа 1–2 балла. Степень поражения плода 1–2 балла. Общее распространение: обычный сапротроф, на растительных субстратах, в почве. Космополит.

*Alternaria panax* Whetzel. Bulletin of the U.S. Department of Agriculture 250: 11 (1912). Syn.: *A. araliae* H.C. Greene, Trans. Wis. Acad. Sci. Arts Lett. 42: 80 (1953). Anamorphic Lewia. Возбудитель бурой пятнистости листьев (альтернариоз). Встречается на листьях и на плодах *Panax ginseng*. Пятна неправильные, сливающиеся и постепенно занимающие весь лист, темно-бурые с ржаво-коричневой каймой. На пятнах бархатисто-оливковый налет спороншения гриба. Степень поражения листа 1–4 баллов. Степень поражения плода 1–2 балла. Общее распространение: Европа, Восточная Азия.

*Ascochyta marginata* J. J. Davis. Trans. Wis. Acad. Sci. Arts Lett. 18: 263 (1915). Anamorphic Didymella. Возбудитель пятнистости листьев (аскохитоз). Встречается на листьях *Panax ginseng*. Степень поражения листа 1 балл. Общее распространение: Европа, Восточная Азия, Северная Америка.

*Botrytis cinerea* Persoon ex Fries. Ann. Bot. (Usteri) 1: 32 (1794). Syn.: *B. cinerea* Pers., Ann. Bot. (Usteri) 1: 32 (1794) var. *cinerea*. *B. cinerea* Pers., Ann. Bot. (Usteri) 1: 32 (1794) f. *cinerea*. *B. cinerea* Pers., Ann. Bot. (Usteri) 1: 32 (1794) subsp. *cinerea*. *Polyactis sclerotiophila* Klotzsch, Klotzschii Herb. Viv. Mycol.: no. 1668 (1873). *B. cinerea* subsp. *sclerotiophila* (Klotzsch) Sacc., Michelia 2(no. 7): 358 (1881). *B. cinerea* var. *sclerotiophila* (Klotzsch) Sacc., Syll. fung. (Abellini) 4: 129 (1886).

*Anamorphic botryotinia*. Возбудитель пятнистости листьев. Встречается на листьях и семенах *Panax ginseng*. Степень поражения листа 1–3 балла. Степень поражения семян 1 балл. На поверхности пятна образуется серый пушистый налет спороношений гриба. Грибница бесцветная. Конидиальный налет в виде округлых или неправильно расположенных дерновинок, серый, пепельно-серый, поднимающийся над субстратом, пушистый, несущий многочисленные точковидные головки. Общее распространение: повсеместно, космополит.

*Fusarium sambucinum* Fuckel. (Berkley & Curtis) Bilal [as 'ossiculum'], Mikrobiol. Zh. 49 (6): 6 (1987). Syn.: *Fusisporium ossicola* Berk. & M.A. Curtis 1875. Nectriaceae. Возбудитель фузариоза корня. Поражает преимущественно сеянцы, а также корни *Panax ginseng*. Степень поражения сеянцев до 4 баллов. Степень поражения корня 1–2 балла. Общее распространение: повсеместно, космополит.

*Phoma panacis* Nakata & S. Takim., (1922). Anamorphic Didymella. Возбудитель фомоза стебля. Встречается на стеблях *Panax ginseng*. Стебли у основания приобретают светло-бурую, а затем серебристо-бурую окраску, постепенно засыхают, содержат точечные пикниды. В конечном итоге стебель у основания переламывается и растение погибает. Степень поражения до 4 баллов. Общее распространение: Европа, Восточная Азия.

*Ramularia hedericola* Heald. et Wolf. Heald & F.A. Wolf, Mycologia 3 (1): 21 (1911). Syn.: *Cercospora*

*hedericola* (Heald & F.A. Wolf) U. Braun, Mycotaxon 48: 276 (1993). Anamorphic Mycosphaerella. Возбудитель пятнистости листьев (рамуляриоз). Встречается на листьях *Panax ginseng*. Степень поражения листа 1 балл. Общее распространение: Европа, Восточная Азия.

*Ramularia robusta* A.A. Hildebr. Can. J. of Res., Sect. C 12 (1): 102 (1935). Syn.: *Ilyonectria robusta* (A.A. Hildebr.) A. Cabral & Crous, Mycol. Progr. 11: 680 (2012). Нупocreales. Возбудитель ржавчины корня (рамуляриоз). Встречается на корнях *Panax ginseng*. Пятна поначалу мелкие, округлые, ржаво-бурые, увеличивающиеся в размерах и постепенно занимающие весь корень. Впоследствии на корне появляются каверны, увеличивающиеся в размерах. Преимущественно поражаются тонкие боковые корешки с образованием мелких, округлых, ржаво-бурых пятен, постепенно увеличивающихся. Иногда поражается весь корень. Степень поражения корня до 4 баллов. Общее распространение: Европа, Восточная Азия.

Из проделанной работы видно, что виды грибов *Ascochyta marginata*, *Ramularia hedericola*, вызывают незначительные повреждения листа до 1 балла, в то время как *Alternaria panax*, *Alternaria alternata*, *Phoma panacis*, *Fusarium sambucinum*, *Ramularia robusta* вызывают сильные поражения органов растения до 4 баллов, что может привести к возникновению эпифитотии в культуре и полной потере урожая женьшеня.

Женьшень в условиях Беларуси в значительной степени страдает от поражений вызванных фитопатогенными грибами. В связи с этим чрезвычайно актуальность приобретает вопрос о разработке системы защитных мероприятий, имеющих профилактический характер (поддержание целостности притенительных сооружений, кислотности почвы, своевременный полив, прополка, уборка растительных остатков, обработка вегетирующих растений бордосской смесью, предпосевная и послеуборочная культивация и обработка почвы), которая, с одной стороны, позволит свести к минимуму ущерб наносимый женьшеню болезнями, но в то же время позволит избежать наличия остаточных количеств фунгицидов в лекарственном сырье, т. е. будет экологически безопасной.

## ПОСЛЕДСТВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕРБИЦИДОВ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ФИТОПАТОГЕНОВ В ЧЕРНОЗЕМНЫХ ПОЧВАХ

Коробова Л.Н.

Новосибирский государственный аграрный университет  
Белгородский государственный национальный исследовательский университет

Почвы являются резерватом для многих фитопатогенных раневых и некротрофных микромицетов, таких как возбудители корневых гнилей, увядания, гипертрофии корней и др. У таких грибов в почве сохраняются и прорастают споры, происходит поиск

и инфицирование восприимчивого хозяина. На уровень прорастания спор фитопатогенов, показатели и морфологические характеристики растущего мицелия влияют многие факторы, сочетание которых называют супрессивностью почвы [1]. В почвах чер-

ноземного ряда Западной Сибири это, прежде всего, уровень антагонистической активности [2].

Известно, что применение пестицидов и накопление их остатков в почве приводит к изменению численности антагонистов, контролирующих развитие фитопатогенов, увеличению роли фитопатогенных грибов в грибном сообществе и формированию устойчивых рас возбудителей болезней [4–6 и др.]. При этом в литературе мало работ, освещающих особенности развития фитопатогенных грибов после применения гербицидов, и, что особенно важно, в рекомендованных производству нормах.

**Цель работы** – показать последствия, в том числе отдаленные, применения гербицидов для развития широко распространенных почвенных фитопатогенов на примере черноземов юга Сибири.

Изучено развитие возбудителей обыкновенной корневой гнили яровых злаков *Bipolaris sorokiniana* Shoem. и черной плесени лука *Aspergillus niger* van Tiegh. в черноземах лесостепи Приобья (подзоны северная и южная, чернозем выщелоченный среднегумусный) и Кулундинской степи (чернозем южный), а также возбудителя трахеомикозного увядания и корневой гнили *Fusarium oxysporum* Schlecht. в северной лесостепи Приобья. Исследования выполнены с помощью метода мембранных камер [7] на фильтрах отечественного производства с диаметром пор 2,5 мкм.

Развитие *B. sorokiniana* и *A. niger* в почве ограничивали внесением луварама (д.в. 2,4-Д, диметилламинная соль) в норме, составляющей 50% от рекомендуемой для подавления двудольных сорняков. За развитием *Fusarium oxysporum* в почве наблюдали спустя год после гербицидных обработок однолетней культуры лука стомпом (д.в. пендиметалин), 3 л/га, двух обработок гоалом (д.в. оксифлуорфен), каскадно – 50 г/га, 100 г/га и миурой (д.в. хизалофоп-П-этил), 0,6 л/га. Эту почву отобрали в полевом опыте под луком осенью и в течение года инкубировали, моделируя в климатической камере смену сезонов.

Выявили, что в пахотных почвах внесение остаточных количеств луварама отчетливо изменяло уровень прорастания спор почвенных фитопатогенных грибов (фунгистазис) и скорость их линейного роста. Уровень прорастания конидий *B. sorokiniana* в освоённом черноземе с луварамом увеличился на 10,6% по сравнению с почвой без пестицидов. При этом в целинной почве луварама снизил фунгистазис в отношении *B. sorokiniana* на 6,2% (в 1,7 раза слабее). У *A. niger* отличия в прорастании спор между освоённой почвой и целиной составили 2,1 раза. Одной из причин снижения фунгистазиса по отношению к фитопатогенам стало ограничение луварамом развития антагонистической микрофлоры. Численность ее (определенная нами по методу Г.С. Муромцева [8]) отклонялась от исходной почвы параллельно с изменением фунгистазиса. В освоённой почве общий антагонистический потенциал к *B. sorokiniana* составил 830,8 тыс. антагонистов/г почвы, в целине – 1057,0 тыс.

Потенциальными антагонистами были такие виды бактерий и актиномицетов, как *Bacillus subtilis*, *Bac. megaterium*, *Bac. polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa*, *Xanthomonas fragariae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium phlei*, *Streptomyces griseus*, *S. griseoflavus*, *S. albus* и др. Среди микроскопических грибов антагонистов было много внутри рода *Penicillium*: *P. canescens*, *P. chrysogenum*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. janthinellum*, *P. notatum*, *P. purpurogenum*, *P. rubrum* и др. Высокой антагонистической способностью обладает и сборный вид *Trichoderma lignorum* [3].

В условиях пестицидного стресса в освоённой почве менялся мицелиальный рост и интенсивность ветвления мицелия фитопатогенов, в то время как в целине скорость роста и модульное строение грибов сохранялись. Это показано в таблице 1 по диапазону изменчивости характеристик мицелия *A. niger*.

Подобно *A. niger* развивался в освоённой почве после попадания гербицида и *B. sorokiniana*. Мицелий его прирастал в 3 раза активнее, чем при внесении луварама в целинную почву. Число ростковых трубок на 1 конидию увеличивалось до 1,5 при 1,1 в целине, ветвление гиф шло активнее в 2 раза. Все это свидетельствует о том, что гербицидная обработка в черноземных почвах провоцирует перестройку процессов регуляции роста и развития фитопатогенных грибов. Подобным образом реагируют грибы и на другие нарушения почвенных условий [9]. В длительном последствии гербициды продолжали ослаблять фунгистатический контроль почвы за развитием фитопатогенов [10]. Так, через год после применения гербицидов на луке споры *F. oxysporum* прорастали в опытной почве в 2 раза активнее, чем в почве с ограниченной гербицидной нагрузкой (табл. 2).

Это стало следствием длительного ослабления биоконтроля за развитием фитопатогенов со стороны микробов – антагонистов. Антагонистический потенциал опытной почвы в отношении *F. oxysporum* в пересчете на 1 пропагулу возбудителя оказался в 1,5–1,6 раз ниже контрольной почвы.

Отличался и мицелиальный рост гриба. В почве с отсутствием гербицидов стомпа, гоала и миуры, мицелий *F. oxysporum* развивался сравнительно медленно. В контрольных вариантах за 4 сут развития его прирост из 1 ростовой трубки максимально достигал 25,3 – 27,0 мкм. В вариантах с последствием гербицидов средняя длина мицелия превысила эти значения в 1,4–3,1 раза. В почве под раннеспелыми гибридами лука в длительном последствии гербицидов было хорошо выражено мицелиальное ветвление *F. oxysporum*.

Таким образом, в той почве, куда попадали остаточные количества гербицидов при химической прополке посевов, фитопатогенные грибы и в год применения и через год гораздо успешнее прорастали, накапливали мицелиальную массу и образовывали совершенно другие по форме колонии, чем в почве с отсутствием гербицидной нагрузки. На этом основании можно считать, что толерантность фитопатогенов в почве с гербицидными остатками в сибирском

Таблица 1. Ветвление и длина мицелия гриба *A. niger* в пахотных и целинных черноземах и их изменение под действием гербицида луварама (50% от нормы)

Вариант	Длина мицелия за неделю развития, (а), балл	Отклонение под влиянием луварама,  а	Число верхушек роста, (б), шт./гифу	Отклонение под влиянием луварама,  б
<b>Северная лесостепь Приобья, Чв</b>				
1. Агроценоз	0,08	0,10	5,60	10,7
4. Целина	0,11	0,05	0,96	0,9
<b>Южная лесостепь Приобья, Чв</b>				
1. Агроценоз	1,00	0,83	4,20	5,2
4. Целина	0,07	0,01	0,93	1,3
<b>Кулундинская степь, Чю</b>				
1. Агроценоз	0,19	0,10	2,00	3,5
4. Целина	0,05	0,03	0,75	1,2
НСР <sub>0,1</sub> по фак. А	0,15		0,44	
НСР <sub>0,1</sub> по фак. Б	0,07		0,18	
НСР <sub>0,1</sub> по АБ	0,22		0,62	

Примечание. Фактор А – освоенность почвы; фактор Б – влияние луварама, АБ – взаимодействие факторов А и Б. В северной лесостепи основная обработка почвы – вспашка, в южной лесостепи и степи – мелкая плоскорезная обработка.

выщелоченном черноземе возрастает, и это создает дополнительную опасность массового заражения растений фитопатогенами в последующую вегетацию.

#### Список литературы

1. Cook RS, Baker K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. MN: St. Paul, 1983: 539 p.
2. Коробова Л.Н. Особенности сукцессии микробных сообществ в черноземах Западной Сибири: автореф. дис. д-ра биол. наук. Новосибирск. 2007: 43 с.
3. Клевенская И.Л. Значение биологического состояния почвы для развития корневой гнили пшеницы. Изв. Сиб. отд. АН СССР. 1984; 2: 59-64.
4. Чекмарев В.В. Изменение видового состава грибов р. *Fusarium* под действием протравителей. Защита и карантин растений. 2012; 2: 27-8.
5. Тимофеева М.Г. Влияние различных групп синтетических пестицидов на развитие, выживаемость и антагонистическую активность некоторых видов аэробных спорообразующих бактерий. Изв. Самарского науч. центра РАН. 2011; 13(5): 239-43.
6. Heimbach U. Erfahrungen mit dem biologischen Pflanzenschutz im Ankerbau in Deutschland. J. fur Kulturpflanzen. 2010; 62(3): 89-92.
7. Лагутина Т.М. Изучение экологии почвообитающего фитопатогена *Verticillium dahliae* Kleb. мето-

Табл. 2. Фунгистазис выщелоченного чернозема по отношению к *Fusarium oxysporum* и его контроль со стороны микрофлоры через 12 мес после применения гербицидов

Вариант		Сумм. уровень прорастания спор за 4 сут, %	Плотность микробов-антагонистов, шт./пропагулу гриба
Раннеспелые гибриды	контроль	32,6	1,1
	опыт	70,0**	0,7
Среднеспелые гибриды	контроль	29,5	1,5
	опыт	60,0**	1,0*

- дом мембранных камер. Автореф. дис...канд. биол. наук. Л. 1985: 17 с.
8. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос. 1983: 295 с.
  9. Марфенина, О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: «Медицина для всех». 2005: 195 с.
  10. Ферাপонтова С.А. Изменения в агроценозе *Allium serae* L. при интенсивном возделывании в однолетней культуре в Приобье. Автореф. дис. канд. биол. наук. Новосибирск, 2015: 19 с.

ВИДЫ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* НА ПОДСОЛНЕЧНИКЕ

Котлярова И.А., Терещенко Г.А.

ВНИИ масличных культур им. В.С. Пустовойта, Краснодар

Грибы рода *Fusarium* (телеоморфа – Gibberella) распространены по всему миру. Представители рода являются возбудителями фузариозов у сельскохозяйственных культур, фузариотоксикозов у животных и человека. Большинство видов рода *Fusarium* – возбудители болезней растений [1, 2].

Для разработки мер по ограничению численности и вредоносности этого патогена необходимо достоверно знать видовой состав грибов рода *Fusarium* в данной местности, на определенном круге растений-хозяев. Однако обилие морфологических, культуральных признаков, сильная изменчивость, отсутствие единой классификации этого рода крайне затрудняет определение видов и приводит к несогласованности результатов исследований. Так, по видовому составу грибов рода *Fusarium* на растениях подсолнечника опубликовано несколько работ, в которых число видов варьирует от 7 до 20 [3–7].

На территории России используется система, предложенная В.И. Билай (1955, 1977) – 31 вид. В данной системе отсутствуют некоторые виды, не совпадают видовые названия, а также положение видов в секциях и наличие самих секций, принятых в настоящее время в других странах мира. Со времени ее опубликования получены новые знания об изменчивости культуральных и морфологических признаков, о строении органов конидиального спороношения, у 37–50% обнаружены половые стадии [8, 9, 10].

В 2008 г. Н.П. Шипилова, В.Г. Иващенко представили работу по систематике и диагностике грибов рода *Fusarium*, которая облегчает определение видовой принадлежности и соответствует современной номенклатуре и таксономии [11].

С 1999 по 2008 гг. идентификацию изолятов, выделенных с пораженных фузариозом органов растений подсолнечника, осуществляли по методике и определителю В.И. Билай. По полученным данным комплекс патогенов, вызывающий фузариоз подсолнечника включал 20 видов и разновидностей, относящихся к шести секциям рода *Fusarium*. По результатам микроскопического анализа доминирующим видом, паразитирующим на подсолнечнике, являлся вид *F. oxysporum* (Schlecht.) emend Snyd. et Hans и его разновидность *F. oxysporum* v. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilai. из секции *Elegans*. Частота встречаемости в исследуемых образцах – 39,8%. При этом преобладала разновидность *F. oxysporum* v. *orthoceras* – 31,0%, которая не упоминается ни в одной другой таксономической системе. К секции *Elegans* относился вид *F. moniliforme* Sheld. с разновидностью *F. moniliforme* v. *lactis* (Pir. et Rib.) Bilai, которые выделялись в основном из семядолей и корзиночек. Распространенность составляла 1,2–2,9% соответственно. В настоящее время в таксономических системах П.Е. Нельсона с соавт. [12], В. Герлаха и Х. Ниренберга

[13] вид *F. moniliforme* объединен с разновидностью *F. moniliforme* v. *lactis* и отнесен в секцию *Liseola*. В определителях В.И. Билай эта секция отсутствует. Кроме того, в 1998 г. на VIII Международном совещании по грибам рода *Fusarium*, вид *F. moniliforme* переименован в *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenb. По нашим данным, секцию *Sporotrichiella* на подсолнечнике представляли две разновидности с частотой встречаемости *F. sporotrichiella* v. *roae* (Pk.) Wr. emend Bilai – 12,7 % и *F. sporotrichiella* v. *sporotrichioides* (Sherb.) Bilai – 9,7 %. В современных определителях они рассматриваются как отдельные виды. Восемь видов, выделенные из различных частей растений подсолнечника относились к секции *Discolor*: *F. lateritium* Nees, *F. gibbosum* App. et Wr. emend Bilai, *F. gibbosum* v. *bullatum* (Sherb.) Bilai, *F. gibbosum* v. *acuminatum* (Ell. et Ev) Bilai, *F. heterosporum* Nees, *F. sambucinum* v. *ossiculum* (Berk. et Curt) Bilai, *F. sambucinum* v. *sublunatum* (Rg.) Bilai, *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc. Распространенность их колебалась от 0,2 до 6,5 %. В настоящее время у видов *F. gibbosum* v. *acuminatum*, *F. gibbosum* изменены видовые названия и они отнесены в секцию *Gibbosum*, которая отсутствует в системе В.И. Билай. Вид *F. semitectum* Berk. et Rav с разновидностью *F. semitectum* v. *majus* Wr. в определителе В.И. Билай отнесен к секции *Roseum*. Распространенность их не превышала 3,5%. В 1983 г. П.Е. Нельсон с соавт. объединили *F. semitectum* и его разновидность в один вид и перенесли в секцию *Arthrosporiella*. По данным микологического анализа, секцию *Martiella* представляли: *F. solani* (Mart.) App. et Wr., разновидность *F. solani* v. *argillaceum* (Fr.) Bilai и *F. javanicum* Koord. Эти виды в основном выделялись из корней с частотой встречаемостью 5,3; 1,3; 0,7% соответственно. В последнее время секция *Martiella* в публикациях рассматривается как *Martiella complex* или *Nectria haematococca complex*, в которую входит комплекс видов *F. solani*.

Таким образом, полученные нами данные по номенклатуре видов и их положению в секциях по системе В.И. Билай не совсем согласуются с информацией по систематике грибов рода *Fusarium*, опубликованной в последние годы.

С целью уточнения видового состава грибов рода *Fusarium* на подсолнечнике использовали свыше 2000 пораженных фузариозом образцов подсолнечника, отобранных во время маршрутных обследований семенных и производственных посевов в 2009–2012 гг.

Определение видовой принадлежности грибов рода *Fusarium* осуществляли по диагностическим признакам и номенклатуре принятой в настоящее время. По результатам идентификации видов, выделенных с пораженных фузариозом органов растений подсолнечника, патосистема гриба состоит из 12 ви-

Табл.1. Распространенность видов грибов рода *Fusarium*, выделенных из пораженных растений подсолнечника. ВНИИМК, 2009-2012 гг.

Секция	Виды	Частота встречаемости, %
<i>Lateritium</i>	<i>F. lateritium</i> Nees.	0,6
<i>Gibbosum</i>	<i>F. equiseti</i> (Corda) Sacc.	1,9
<i>Discolor</i>	<i>F. heterosporum</i> Nees. ex Fr.	1,0
	<i>F. sambucinum</i> Fuckel.	4,5
	<i>F. culmorum</i> (W.G. Sm.) Sacc.	4,0
<i>Elegans</i>	<i>F. oxysporum</i> (Schlecht.) emend Snyder & Hans.	31,1
<i>Liseola</i>	<i>F. verticillioides</i> (Sacc.) Nirenb.	7,7
	<i>F. proliferatum</i> (Matsush.) Nirenb.(1976)	4,1
<i>Arthrosporiella</i>	<i>F. semitectum</i> Berk.& Rav.in Berk.	3,5
<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. poae</i> (Peck) Wollenw.	18,5
	<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	8,5
<i>Martiella</i>	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	14,6

дов, относящихся к восьми секциям рода *Fusarium* (табл. 1).

Одним из основных возбудителей, вызывающих корневую гниль и фузариозное увядание, является вид *F. oxysporum*. Частота встречаемости в исследуемых образцах – 31,1%. Согласно современным представлениям в секцию *Elegans* входит группа видов *F. oxysporum* [9]. По разным системам секция *Liseola* представлена различным количеством видов. На подсолнечнике мы выделили два вида: *F. verticillioides* и *F. proliferatum*, частота встречаемости 7,7% и 4,1% соответственно. Большинство изолятов этих видов было выделено из семядолей, корзинок и семян. Из пораженных фузариозом корней, семядолей, корзинок были выделены виды *F. sporotrichioides* и *F. poae* из секции *Sporotrichiella*. Частота встречаемости *F. sporotrichioides* и *F. poae* составляла 8,5 и 18,5% соответственно.

Проведенная нами видовая идентификация грибов рода *Fusarium* показала, что 14,6% изолятов, выделенных из пораженных органов подсолнечника, принадлежит виду *F. solani* секции *Martiella*. Большинство изолятов этого вида выделялось из корней (11,5%). В результате проведенного микологического анализа на подсолнечнике обнаружено 3 вида грибов секции *Discolor*: *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. heterosporum*. Распространенность видов составляла 4,5; 4,0; 1,0 % соответственно. Из корней вы-

делялся вид *F. heterosporum*, из корзинок и семян – *F. sambucinum*. Вид *F. culmorum* в основном отмечали на семядолях и листьях.

Кроме того, в процессе уточнения видового состава из пораженных корней выделялся вид *F. equiseti* из секции *Gibbosum*, частота встречаемости 1,9%. Около 3,5% изолятов, выделенных из семядолей и корзинок, относились к виду *F. semitectum* секции *Arthrosporiella*. Довольно редко (0,6%) из листьев выделялся вид *F. lateritium* секции *Lateritium*.

Все выделенные нами изоляты были патогенными, но в разной степени. Наиболее высокой болезнетворной способностью обладали изоляты видов *F. poae* и *F. sporotrichioides*, выделенные из корзинок, семян и корневой системы, развитие болезни достигало 82,6 и 80,9% соответственно. Патогенность основных возбудителей корневой гнили и трахеомикозного увядания для подсолнечника видов *F. oxysporum* и *F. solani* варьировала от средней до высокой (50,0–75,0%). Средней патогенностью обладали виды *F. proliferatum* и *F. verticillioides* (41,6–56,0%). Слабая патогенность характерна для изолятов выделенных из листьев.

Таким образом, диагностика и видовая идентификация по классификациям Н.П. Шипиловой, В.Г. Иващенко (2008), П.Е. Нельсона с соавт. (Nelson et al, 1983), В. Герлаха и Х. Ниренберга (Gerlach, Nirenberg, 1982) показала, что род *Fusarium* на подсолнечнике представлен 12 видами из 8 секций. Из пораженных фузариозом семядолей и корзинок выделен вид *F. proliferatum*, ранее не зарегистрированный на подсолнечнике. Кроме того, по результатам проведенного микологического анализа наблюдается увеличение частоты встречаемости видов *F. verticillioides*, *F. poae*, *F. solani* на 3,6; 5,7; 8,0% соответственно и значительное снижение видов *F. heterosporum* (на 5,5%) и *F. lateritium* – на 2,0%.

Очевидно, доминирующими, наиболее патогенными видами на подсолнечнике, являются *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. solani*. Они вызывают гнили различных органов растений и трахеомикозное увядание. Виды *F. culmorum* и *F. sambucinum*, выделенные из пятнистостей, в основном, слабо или средне патогенные.

#### Список литературы

1. Райлло А.И. Грибы рода *Fusarium*. М.: Изд-во с.-х. литературы. 1950: 416 с.
2. Билай В.И. Фузариозы. Киев: Наукова думка. 1977: 442 с.
3. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Саукова С.Л. Распространение фузариоза подсолнечника в Краснодарском крае. Доклады РАСХН. 200; 2: 6-8.
4. Маслиенко Л.В., Мурадасилова Н.В. Видовой состав *Fusarium* spp. на подсолнечнике. Науч.-техн. бюлл. ВНИИ масличных культур. Краснодар. 2000: 25-31.
5. Бородин С.Г., Котлярова И.А., Терещенко Г.А. Распространение возбудителей фузариоза в Краснодарском крае. Агро XXI. М. 2002; 4: 16-17.

6. Выприцкая А.А., Пучнин А.М., Кузнецов А.А. Грибы рода *Fusarium* Link. на подсолнечнике в Тамбовской области. Вестник ТГУ. 2012; 17(1): 394-8.
7. Якуткин В.И. Фузариоз подсолнечника и проблема фитосанитарного мониторинга заболевания в России. Всероссийский съезд по защите растений. СПб: ВИЗР. 1995: 108-9.
8. Шипилова Н.П. Систематика грибов рода *Fusarium*. В сб.: Новое в систематике и номенклатуре грибов. М.: Нац. акад. микол.; «Медицина для всех». 200: 192-218.
9. Гагкаева Т.Ю., Левитин М.М. Современное состояние таксономии грибов комплекса *Gibberella fujikuroi*. Микол. фитопатол. 2005; 39(6): 1-14.
10. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М. Современное состояние таксономии грибов рода *Fusarium* секции *Sporotrichiella*. Микол. и фитопатол. 2008; 42(3): 201-13.
11. Шипилова Н.П., Иващенко В.Г. Систематика и диагностика грибов рода *Fusarium* на зерновых культурах. СПб. 2008: 84 с.
12. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park and London. 1983: 193 p.
13. Gerlach W, Nirenberg H. The genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-u. Forst-wirsch. Berlin-Dachlem. 1982; 209: 406 p.

## ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* НА АРБУСКУЛЯНУЮ МИКОРИЗУ РАСТЕНИЙ

Кураמיшина З.М.<sup>1</sup>, Смирнова Ю.В.<sup>1</sup>, Хайруллин Р.М.<sup>2</sup>, Саттарова Л.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского НЦ РАН, Уфа

Беспорядочное использование синтетических удобрений привело к загрязнению и заражению почвы, воды, гибели полезных микроорганизмов и насекомых, что сделало культурные растения более склонными к болезням. В практике сельского хозяйства все более широко стали использоваться биоудобрения на основе различных микроорганизмов, в том числе растительных рост-стимулирующих бактерий (PGPB) [1, 2].

Среди антагонистов фитопатогенов привлекают внимание представители *Bacillus subtilis*, благодаря их способности продуцировать различные биологически активные вещества, в том числе антибиотики и ферменты, способные подавлять рост фитопатогенных грибов и бактерий [3]. Важна и их преимущественная безопасность для человека и животных [4]. На основе разных штаммов *B. subtilis* налажен выпуск разнообразных биофунгицидов (Фитоспори М, Аллирин и др.).

Однако многие биологические свойства бактерий *B. subtilis* остаются до конца не изученными, в том числе особенности их взаимоотношений не только с фитопатогенными, но и с «хозяйственно полезными» микроорганизмами почвы и микоризными грибами. Так, при инокуляции посевного материала растений антагонистическими штаммами *B. subtilis* установлено подавление роста фитопатогенов на поверхности семян и в почве.

Отмечено, что антагонисты (при отсутствии высокой селективности к видовому составу объектов мишеней) могут подавлять развитие и полезной микрофлоры, например, микромицетов, азотфиксаторов и других микроорганизмов, оказывая, тем самым, влияние на их разнообразие, численность и активность. При этом не исключено, что такие антагонистические бактерии, особенно эндофитные их

штаммы, подавляют также развитие и микоризных грибов.

**Цель исследований** – выяснение влияния эндофитных штаммов *B. subtilis* на арбускулярные микоризные грибы различных сельскохозяйственных растений.

Семена мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Омская), ячменя (*Hordeum vulgare* L. сорт Прерия), гороха (*Pisum sativum*, сорт Чишминский-99) обрабатывали суспензией спор *B. subtilis* из расчета 20 л с титром 10<sup>6</sup> КОЕ/мл на 1 т семян. Через сутки после обработки на каждую делянку площадью 80×80 см на одинаковую глубину (4–5 см) вручную высевали по 150 откалиброванных семян. Опыты проводили в трехкратной повторности. Варианты располагали случайным образом. Почва участка – выщелоченный чернозем. Через 10 нед после посева с каждой делянки отбирали по 50 растений вместе с корневой системой, которую затем отделяли, промывали в проточной воде и окрашивали по методу работы [5] трипановым синим для визуализации структур везикулярно-арбускулярной микоризы. По методике этих же авторов оценивали частоту встречаемости микоризы и степень ее колонизации.

Обработка семян пшеницы бациллами заметно снижала все показатели микоризации корней пшеницы (табл. 1). Частота встречаемости микоризы (т.е. доля растений, сформировавших микоризу) под воздействием исследованных штаммов, тем не менее сохранялась на достаточно высоком уровне по сравнению с другими показателями. Хорошо известно, что в различных экспериментах при одинаковом числе растений, инфицированных фитопатогенными грибами или имеющих микоризу в корнях, степень распространения грибных микроорганизмов в тканях может быть различной, что определяется ответной



Таблица 1. Влияние *Bacillus subtilis* на арбускулярную микоризу различных растений

Вариант	Контроль	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 11ВМ
Частота микоризации корневой системы, F%			
Пшеница	99,46±0,2	82,13±1,79	90,73±1,99
Ячмень	100±0	99,60±0,15	100±0
Горох	98,80±0,51	97,70±1,05	99,26±0,27
Интенсивность колонизации корневой системы микоризой, M%			
Пшеница	20,46±1,1	1,73±0,12	2,60±0,20
Ячмень	28,19±1,39	11,79±0,87	21,90±1,08
Горох	28,77±1,72	42,11±1,57	19,20±1,75
Интенсивность колонизации корневого фрагмента микоризой, m%			
Пшеница	20,40±1,26	2,05±0,13	1,90±0,12
Ячмень	28,19±1,39	11,85±0,89±	21,92±1,08
Горох	28,96±1,69	42,0±1,57	19,29±1,76
Изобилие арбускул в корневой системе, A%			
Пшеница	11,66±1,0	0,08±0,04	0,05±0,01
Ячмень	1,84±0,16	0,65±0,18	1,18±0,08
Горох	1,08±0,10	1,17±0,08	0,53±0,09
Изобилие арбускул в корневом фрагменте, a%			
Пшеница	42,88±3,08	1,45±0,14	3,07±0,19
Ячмень	6,35±0,41	4,33±0,29	5,49±0,21
Горох	3,52±0,25	2,70±0,12	2,80±0,1

реакцией растений на внедрение этих чужеродных агентов и, безусловно, зависит также от обработки растений различными фунгицидами препаратами. Действительно, при инокуляции семян бактериями такие параметры, как интенсивность колонизации микоризой, изобилие арбускул и везикул, отражающие степень развития гриба в симбиозе, были примерно в 10 раз ниже в сравнении с неинокулированными растениями.

Выявленный негативный эффект влияния эндофитных бактерий на микотрофность корней пшеницы, ячменя, гороха, по-видимому, выступает комплексным показателем проявления различной биологической активности бацилл, например антагонистической, поскольку известно о способности исследуемых штаммов подавлять рост фитопатогенных грибов *in vitro* [6]. Вместе с тем данные о способности разных штаммов *B. subtilis* к мобилизации нерастворимых фосфатов [7] могут свидетельствовать о том, что снижение интенсивности микоризации могут быть следствием включения стойких защитных реакций растительным организмом в ответ на внедрение эндофитных бактерий [6].

Ранее [8] нами было показано, что использование химических фунгицидов, таких как террасил и ТМТД, ведет к угнетению развития везикулярно-арбускулярной микоризы. Обработка семян растений спорами эндофитных бактерий *B. subtilis* шт. 26Д и 11ВМ не уступает по силе ингибирующего влияния на микоризу корней исследованных растений химическим фунгицидам. Несмотря на то, что имеется специфика ответной реакции на обработку бактериями *B. subtilis*, общая тенденция понижения микоризации корней характерна для всех растений.

#### Список литературы

1. Bhardwaj D, Mohammad WA, Ranjan KS, Narendra T. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb Cell Fact.* 2014; 13: 66. doi: 10.1186/1475-2859-13-66
2. Kaewchai S, Soyong K, Hyde KD. Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Div.* 2009; 38: 25-50.
3. Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 2001; 52 (sp. is): 487-511.
4. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Cohn* в агроэкосистемах. М.: Наука. 2007: 147 с.
5. Trouvelot A, Kough C, Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae.* Eds. V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi. Paris: INRA Press. 1986: 217-21.
6. Хайруллин Р.М., Минина Т.С., Иргалина Р.Ш., Загребин И.А., Уразбахтина Н.А. Эффективность новых эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* в повышении устойчивости пшеницы к болезням. *Вестн. Оренбур. гос. унив.* 2009; (2): 133-7.
7. Егоршина А.А., Хайруллин Р.М., Лукьянцев М.А. и др. Фосфат-мобилизирующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы. *Журн. Сиб. фед. унив. Серия «Биология».* 2011; 4(2): 172-82.
8. Курамшина З.М., Хайруллин Р.М., Андреева Ю.В. Влияние протравителей семян на микоризацию корней культурных растений. *Агрехимия.* 2014; 1: 71-4.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ СОРТА КАРТОФЕЛЯ НА АГРЕССИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* (MONT.) DE BARY

Кузнецова М.А., Спиглазова С.Ю., Рогожин А.Н., Сметанина Т.И., Морозова Е.В., Филиппов А.В.  
ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы Московской области

Фитофтороз пасленовых, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, в настоящее время встречается практически во всех картофелеводческих регионах России и остается наиболее вредоносным заболеванием картофеля. В годы эпифитотий потери урожая картофеля могут достигать 70% (Анисимов и др., 2010).

Взросший эпидемиологический потенциал *P. infestans* стал причиной резкого снижения эффективности принятых ранее методов защиты картофеля, включающих выращивание сортов с повышенным уровнем устойчивости к фитофторозу и обработки вегетирующих растений фунгицидами. Известно, что за последние несколько лет существенно возросла агрессивность фитофтороза и болезнь стала поражать сорта картофеля, которые ранее считались устойчивыми (Lees et al., 2009, Кузнецова и др., 2014). Чтобы разработать эффективные стратегии контроля фитофтороза, необходимо учитывать агрессивность популяций *P. infestans* и прогнозировать возможность ее изменения в ближайшем будущем.

Наличие во ВНИИ фитопатологии коллекции изолятов *P. infestans* и набора сортов картофеля, отличающихся по уровню неспецифической устой-

чивости к фитофторозу, позволили нам провести исследования с целью определения влияния устойчивости сорта на уровень агрессивности изолятов *P. infestans*.

Для проведения данного опыта были отобраны сорта картофеля, имеющие различный уровень неспецифической устойчивости к фитофторозу (табл. 1).

Табл. 1. Сорта картофеля, выбранные для испытаний

Сорт	Уровень устойчивости
Escort	Высокоустойчивый
Bintje	Восприимчивый
Удача	Умеренно-восприимчивый
Луговской	Умеренно-устойчивый
Санте	Умеренно-восприимчивый

В зимний и весенний период растения картофеля выращивали в теплице, а летом в полевых условиях.

В качестве инфекционного материала были выбраны изоляты *P. infestans* выделенные в различных географических регионах, с известными характеристиками: расовый состав, тип спаривания, чувствительность к фениламиду, агрессивность (табл. 2).

Таблица 2. Изоляты *P. infestans*, отобранные для проведения опыта.

Изолят	Происхождение, год выделения	Раса	ТС	Чувствительность к фениламиду	Гаплотип	Уровень агрессивности*
КВК-33.01	Кисловодск, Ставропольский край, 2001	1.3.4.7.10.11	A1	S	IIa	MA
КВВ-42.01	Кисловодск, Ставропольский край, 2001	1.2.3.4.7.8.9.10.11	A1	S	Ia	MA
ОРСКЛ-S14	Рязань, 2000	1.3.4.7.10	A2	S	Ia	WA
Сх-40ВВ.03	Сахалин, 2003	1.2.3.4.7.8.10.11	A1	R	Ia	HA

Примечание: \* HA – высокоагрессивный; MA – умеренно-агрессивный; WA – слабо-агрессивный (уровень агрессивности вычислялся в год выделения изолята, средним баллом по испытанию на 30 сортах).

Перечисленные в табл. 2 изоляты *P. infestans* были использованы для инокуляции листьев картофеля в лабораторных условиях. Параллельно листья тех же сортов были инокулированы смесью указанных изолятов в равных пропорциях.

Инокуляцию листьев проводили путем нанесения суспензии конидий на доли листа. Листья помещали во влажную камеру и инкубировали до момента проявления спороношения или образования некрозов. После образования некрозов листья закладывали в

клубни восприимчивого сорта, с которых проводили повторное заражение. Таким образом, была обеспечена непрерывная реинфекция патогена. На промежуточных этапах (5 и 10 генерации) проводили выделение изолятов *P. infestans* в чистую культуру.

Всего было проведено 8–25 (для разных сортов) генераций патогена (табл. 3). После окончания первого вегетационного сезона изоляты были заложены в клубни соответствующих сортов для сохранения и до получения новых растений (по 10 клубней на каж-

Таблица 3. Варианты заражения и количество проведенных пассажей на листьях (суммарно за два сезона)

Наименование изолята	Название сорта				
	Санте	Луговской	Удача	Escort	Sarpo Mira
КВК-33.01	25	20	25	20	8
КВВ-42.01	25	20	25	20	7
ОРСКЛ-S14	25	22	25	20	8
Сх-40ВВ.03	25	23	25	22	10
Смесь всех изолятов	26	22	25	22	10

дый реизолят) и хранились данные клубни в холодильнике при 7 °С.

Весной следующего сезона опыт был продолжен на выращенных в теплице растениях. Изолятами *P. infestans*, выделенными из инфицированных клубней заражали листья соответствующих сортов картофеля. По окончании второго сезона была проведена оценка агрессивности изолятов на изолированных листьях картофеля, по разработанной во ВНИИФ методике (Филиппов и др., 2004).

Определение уровня агрессивности изолятов: листья картофеля сортов Эсорт, Удача, Луговской, Сарпо Мира и Санте заражали испытуемыми изолятами, выделенными после большого количества генерации и, параллельно, исходными изолятами *P. infestans*.

Учитывали следующие показатели: результативность заражения (количество пятен на см<sup>2</sup> поверхности листа), диаметр разрастания некроза и интенсивность спорообразования. На основании этих данных рассчитывали показатель «Расчетные потери урожая».

Расчетные потери урожая переводили в баллы, характеризующие устойчивость сорта к изоляту. В дальнейшем дифференциацию изолятов *P. infestans* по агрессивности проводили в соответствии с приведенной ниже шкалой (табл. 4).

Результаты оценки уровня агрессивности исходных изолятов и реизолятов приведены в табл. 5.

Как видно из представленных данных, практически на всех сортах уровень агрессивности реизолятов был выше, чем у исходных изолятов. Наиболее заметное повышение уровня агрессивности отмечено на сортах Удача и Санте. В двух случаях заметное повышение агрессивности отмечено на сорте Луговской (при заражении изолятами КВК33 и ОРСКЛ S14), в двух случаях – на сорте Эсорт (изолят Сх40 ВВ и смесь изолятов). Возрастание уровня агрессивности изолята можно считать в том случае, если повышение его уровня позволило отнести данный изолят в следующую группу: например, изоляты КВВ42, КВК33, Сх40ВВ и смесь изолятов на сортах Удача и Санте перешли из группы умеренно-агрессивные (МА) в группу высокоагрессивные (НА); изоляты КВВ42, КВК33, Сх40ВВ на сортах Сарпо Мира, Эсорт и Луговской перешли из группы неагрессивного (НА) или слабо агрессивного (WA) в группу умеренно агрессивного (МА).

Табл. 4. Характеристика агрессивности возбудителя фитофтороза

Расчетные потери урожая	Баллы (по 9-балльной шкале)	Уровень агрессивности изолятов <i>P. infestans</i>
< 5%	9-8 баллов	Неагрессивный (NA)
5-15%	7-6 баллов	Слабоагрессивный (WA)
16-35%	5-4 балла	Умеренно-агрессивный (МА)
> 35%	3-1 балл	Высоко агрессивный (НА)

Отдельно стоит отметить значительное (больше, чем в остальных случаях) возрастание агрессивности изолята ОРСКЛ S14 на сорте Луговской – с 3% (NA) до 20% (МА), при том, что на остальных сортах этот изолят незначительно увеличил свою агрессивность. Полученные по каждому изоляту данные были просуммированы по всем изучаемым в опыте сортам (рис. 1).

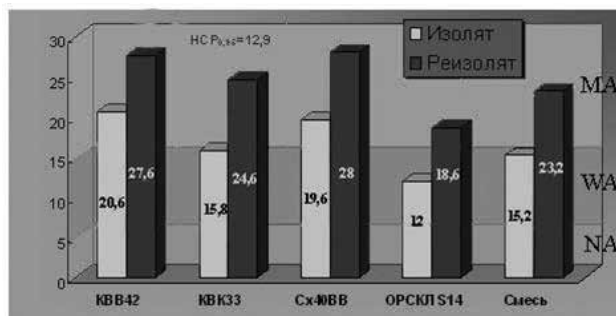


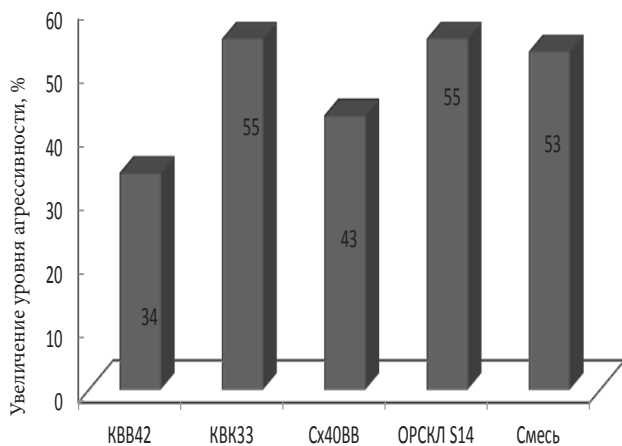
Рис. 1. Средний индекс агрессивности изолятов и реизолятов

Как видно на диаграммах, все изучаемые в опыте изоляты стали более агрессивными, однако для определения степени повышения агрессивности по каждому изоляту, был проведен пересчет в процентах к исходному значению (рис. 2; см. след. стр.).

Наибольший уровень агрессивности исходно имели два изолята – сахалинский (Сх40ВВ) и кисловодский (КВВ 42); второй кисловодский изолят (КВК 33) и рязанский (ОРСКЛ S14) демонстрировали более низкий уровень. Как видно из приведенных данных, изоляты, имевшие более низкий уровень агрес-

Таблица 5. Уровень агрессивности изолятов и реизолятов *P. infestans*

Изолят	Сорт	Исходные изоляты		Реизоляты	
		Расчетные потери урожая, %	Уровень агрессивности	Расчетные потери урожая, %	Уровень агрессивности
<b>КВВ42</b>	Удача	30	МА	38	НА
	Эскорт	18	МА	22	МА
	Луговской	19	МА	22	МА
	Сарпо Мира	2	НА	12	WA
	Санте	34	МА	44	НА
<b>КВК33</b>	Удача	30	МА	40	НА
	Эскорт	7	WA	11	WA
	Луговской	15	WA	26	МА
	Сарпо Мира	4	НА	7	WA
	Санте	23	МА	39	НА
<b>Сх40ВВ</b>	Удача	35	МА	41	НА
	Эскорт	2	НА	16	WA
	Луговской	17	МА	24	МА
	Сарпо Мира	8	WA	16	МА
	Санте	36	НА	43	НА
<b>ОРСКЛ S14</b>	Удача	24	МА	31	МА
	Эскорт	6	WA	10	WA
	Луговской	3	НА	20	МА
	Сарпо Мира	0	НА	3	НА
	Санте	27	МА	29	МА
<b>Смесь</b>	Удача	28	МА	31	МА
	Эскорт	7	WA	22	МА
	Луговской	14	WA	19	МА
	Сарпо Мира	0	НА	4	НА
	Санте	27	МА	40	НА

Рис. 3. Возрастание уровня агрессивности изолятов *P. infestans* по отношению к исходному, %.

сивности демонстрировали более высокий процент ее увеличения (КВК33, ОРСКЛ S14). Напротив – изначально более агрессивные изоляты показывали процент увеличения ниже (Сх40ВВ, КВВ 42).

Таким образом, в ходе двухлетнего эксперимента было показано, что длительное нахождение изолятов *P. infestans* без ротации сортов картофеля приводит к заметному повышению уровня их агрессивности, независимо от исходного уровня агрессивности изолята и уровня устойчивости сорта.

#### Список литературы

1. Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков М.: Картофелевод. 2009: 256 с.
2. Lees AK, Cooke DEL, Stewart JA et al. *Phytophthora infestans* population changes: implications. Proceedings of the 11th EuroBlight Workshop, Hammar, Nor-

- way, October 28-31, 2008. PPO-Spec Rept. 2009; 13: 55-61.
- Кузнецова М.А., Спиглазова С.Ю., Рогожин А.Н. и др. Результаты оценки частичной устойчивости сортов картофеля к фитофторозу. Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Сб. научн. тр. 2014; 8: 378-81.
  - Филиппов А.В., Рогожин А.Н., Кузнецова М.А. и др. Оценка частичной (горизонтальной) устойчивости листьев картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) dBy; вариации агрессивности изолятов патогенна из различных географических регионов. Микол. фитопатол. 2004; 5:74-88.

## ШТАММЫ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЗАЩИТЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР ОТ БОЛЕЗНЕЙ, ВЫЗВАННЫХ ФИТОПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ

Кузнецова Н.И., Кузин А.И., Николаенко М.А., Азизбекян Р.Р.  
ГосНИИгенетика, Москва

Основными патогенами культурных растений являются фитопатогенные грибы, которые уничтожают от 10 до 20% потенциального урожая. Болезни, вызываемые микроскопическими грибами, приводят к серьезным экономическим потерям, так как снижают качество продовольственного и семенного материала сельскохозяйственных растений.

В мире последние годы активизируются попытки выращивания важных сельскохозяйственных растений без применения химических соединений для получения из них так называемых «органических» продуктов питания.

В качестве возможных альтернативных экологически чистых и безопасных для теплоткровных организмов рассматриваются биологические средства защиты растений, основным действующим фактором которых являются микроорганизмы, проявляющих антагонистическую активность по отношению к различным возбудителям болезней растений. Наиболее эффективными продуцентами биологических

средств защиты растений являются спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, подавляющие развитие микроскопических грибов-возбудителей болезней сельскохозяйственных растений.

Проведен поиск штаммов спорообразующих бактерий, обладающих высокой фунгицидной активностью против фитопатогенных грибов. Спектр действия и эффективность фунгицидной активности бацилл определяли тремя методами: методом лунок, методом опрыскивания и методом определения линейного роста тест-грибов.

В качестве тест-грибов использовали: *Magnaporthe grisea*, *Cercospora zeaе-maydis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria tenuis*, *Fusarium oxysporum* и *Botrytis cinerea*.

Оптимизированы условия культивирования, позволяющие увеличить продуктивность бактерий и повысить продукцию фунгицидных факторов. На основе штаммов-продуцентов разрабатываются экологически безопасные биофунгициды для борьбы с грибными болезнями культур.



Контроль 100%



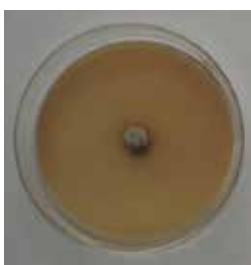
1 – 22,4%



2 – 21,3%



3 – 25,3%



4 – 10,3%



5 – 12,6%



6 – 20,7%



7 – 13,8%

Линейный рост тест-гриба *Alternaria tenuis* после 15 сут совместной инкубации с бациллами

## ВЛИЯНИЕ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ СЕМЯН НА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПРОРОСТКИ ЯРОВОЙ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Лукъянцев В.С., Глинушкин А.П., Сударенков Г.В., Соловых А.А.  
Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург

Реализация продуктивного потенциала пшеницы и зерновых культур во многом определяется посевными качествами семян, ведущий показатель которых – лабораторная всхожесть. Семена – носители всех биологических свойств – в решающей степени определяют качество и количество получаемого урожая. Лабораторная всхожесть семян, по мнению многочисленных ученых и практиков, является главным показателем качества семян. Она необходима для правильного расчета нормы высева и обеспечения наилучшей реализации растениями пшеницы своего продуктивного потенциала [1].

Качественный семенной материал – первый шаг к получению достойного урожая отличного качества. Однако не всякое зерно пригодно для посева. Многочисленными исследованиями в этой области найдены способы повышения жизненного потенциала семян путем воздействия химическими и биологическими веществами, ультразвуком, обработкой СВЧ- и ИК-излучением [2, 3, 4].

Лабораторные исследования позволяют выявить влияние протравителей семян на микрорастения

яровой пшеницы. Данные исследования являются моделью взаимодействия растения (проростка), действующих веществ препаратов, патоконтекста и окружающей среды. Под действием препаратов адаптация растений к неблагоприятным факторам среды, взаимодействию с патогенами, существенно влияют на морфобиологические показатели проростка. Протравливая семена средствами защиты, мы не всегда получаем успешное укоренение, хорошую энергию роста и развития проростка, подавление возбудителей болезней (передающихся как с семенами, так и находящихся в почве). Есть возможности получения дружных здоровых всходов, а это первый элемент для реализации потенциальной продуктивности растения яровой пшеницы [5].

Проведенные нами исследования позволили выявить препараты и смеси препаратов обеспечивающих наилучшую реализацию семян пшеницы по всхожести. Баковая смесь препаратов ТМТД-плюс + Виал ТТ обеспечила наибольшую лабораторную всхожесть 97,0% по сравнению с контрольным вариантом 90,8% (табл. 1).

Таблица 1. Влияние препаратов на растения (УОП ОГАУ, Учитель, 2006-2009 гг.)

Вариант опыта	Норма расхода препарата, л/т	Лабораторная всхожесть, %*	Энергия прорастания, %	Длина растения, см	Длина coleoptilya, см
Контроль	-	90,8±2,0	70,0±2,5	16,3±0,6	6,8±0,3
ТМТД	3	93,5±2,2	71,0±2,0	16,1±0,4	6,8±0,3
ТМТД-плюс	2,5	96,5±1,6	81,3±2,4	18,8±0,5	7,7±0,3
Виал ТТ	0,4	95,2±2,3	71,0±2,8	16,0±0,6	6,1±0,4
Дивиденд Стар	0,75	94,3±2,1	71,5±2,0	15,4±0,7	5,6±0,2
ТМТД-плюс + Виал ТТ	2 + 0,2	97,0±0,8	80,5±2,4	18,1±0,4	7,1±0,3

*Примечание:* \* – НСР<sub>0,5</sub> – 5,28%; P – 1,76% (2006 г.); НСР<sub>0,5</sub> – 3,24%; P – 1,09% (2007 г.); НСР<sub>0,5</sub> – 4,03%; P – 1,36% (2008 г.); НСР<sub>0,5</sub> – 1,38%; P – 0,46% (2009 г.);

Препарат ТМТД-плюс также обеспечивал достоверное повышение лабораторной всхожести увеличивая её до 96,5% (это больше чем в контроле на 5,7%).

Нами установлено, что энергию роста также можно было повысить, обработав семена пшеницы контактным протравителем ТМТД-плюс. Причем повышение реализации свойств семян пшеницы от применения данного препарата достигало 81,3%, что на 11,3% больше по сравнению с контрольным вариантом. Баковая смесь ТМТД-плюс + Виал ТТ обеспечивала энергию роста 80,5%. Немало данных имеется о снижении ростовых процессов развивающихся из семян растений пшеницы в результате применения ряда препаратов [6, 7]. Полученные нами результаты, вероятно, обусловлены несколькими причинами:

комплекс антистрессовых и росторегулирующих веществ препарата ТМТД-плюс повышает энергию роста; контактный механизм действия фунгицидного начала препарата ТМТД-плюс (Тирам) не угнетает ростовые процессы в ростке; фунгицидное начало препарата ТМТД-плюс (Тирам) угнетает рост и развитие патогенных организмов находящихся в семях пшеницы. Наши размышления и учитываемые факты находят подтверждение и случае с изучением используемых доз препаратов. Так, 50%-ная доза препарата Виал ТТ начинает снижать исследуемые и учитываемые показатели (табл. 1), так как в чистом виде ТМТД-плюс обеспечивает большую энергию роста, длину растения и coleoptilya, а в полевых условиях эти доводы подтверждаются и более дружными всходами.

Так, при наблюдениях нами установлено, что наиболее длинные растения были на варианте с протравливанием баковой смесью ТМТД-плюс + Виал ТТ 18,8 см. Не однозначное действие химических препаратов требующих внимательного отношения к их применению подтверждаются при учете показателей протравителя Дивиденд Стар. Длина растений под действием препарата Дивиденда Стар уменьшилась по сравнению с контрольным вариантом и составила 15,4 см (в контроле – 16,3 см).

В условиях засушливого климата Южного Урала просто невозможно учитывать качество семенного материала без изучения изменений колеоптиля развивающегося растения. Длина колеоптиля – определяет предельную и оптимальную глубину посева семян. Нами установлено, что исследуемые препараты различно влияли на данный показатель. Контактный протравитель ТМТД-плюс и баковая смесь ТМТД-плюс + Виал ТТ обеспечивали наибольшую длину колеоптиля (7,7 и 7,1 см соответственно). Системный препарат Дивиденд Стар уменьшил длину колеоптиля в сравнении с контрольным вариантом (5,6 и 6,8 см соответственно). Небольшая длина колеоптиля развивающегося растения в случае заделки семян пшеницы на большую глубину существенным образом может понизить потенциальную продуктивность пшеницы в объемах поля. В индивидуальном рассмотрении маленький колеоптиль при глубокой заделке семян, просто не выполняет своего назначения (прокалывание грунта для свободного выхода на поверхность листочков и стебля пшеницы) и тем самым чаще всего приводит к гибели развивающегося растения.

Анализ проведенных фитоэкспертиз семян говорит о том, что 100% партий семян зерновых культур заражены возбудителями заболеваний. Данная ситуация повсеместна в зерносеющих регионах. На семенах преобладают грибы *B. sorokiniana* Sacc., виды рр. *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, а также возбудители бактериозов [8, 9].

Полученные результаты (рис 1, табл. 2) фитоэкспертизы семян позволили выявить влияние протравителей семян на степень защиты от возбудителей заболеваний. Препарат Дивиденд Стар ежегодно сдерживал зараженность на уровне 11,4%, а уровень развития возбудителей заболеваний составил 4,3%, что на 29,4 и 13,8 % соответственно меньше по сравнению с контролем.

Наименьшее число не проросших семян без патогенных признаков было на контрольном варианте 0,6%, наибольшее на варианте Виал ТТ 1,2%. Препарат ТМТД обеспечивал самую слабую защиту от возбудителей заболеваний, число здоровых проростков составило 77,4%, уровень развития возбудителей 9,2%.

Важным показателем являются не проросшие семена, так от применения ТМТД-плюс в чистом виде и его смеси с Виал ТТ они достигали 1% семян, тогда как в контроле этот показатель составлял 0,6%. Этот показатель говорит о необходимости внимательного

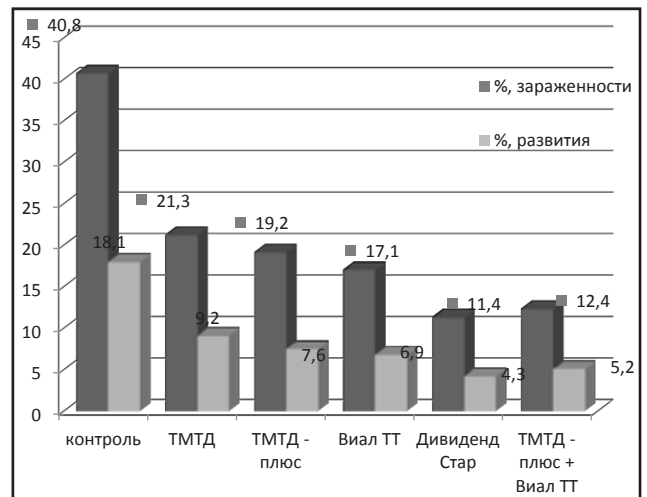


Рис. 7. Потенциальное развитие патогенных организмов на проростках пшеницы и возможности ограничения пестицидами (УОП ОГАУ, Учитель, 2006-2009 гг.)

изучения всех аспектов роста и развития растений пшеницы из семян при применении протравителей.

В ходе исследований было установлено, что за 4 года семена без обработки (контрольный вариант) развивали только 58% здоровых проростков пшеницы. Остальные были поражены возбудителями болезней, включая и наиболее известную *B. sorokiniana*. Препараты повышали количество здоровых проростков: ТМТД до 77,4; ТМТД-плюс до 80; Виал ТТ до 81,7; смесь ТМТД-плюс + Виал ТТ до 86,6%; Дивиденд Стар до 87,6.

Протравители семян снижали показатели распространения болезней и их развития на проростках, так в частности в контрольном варианте эти показатели соответствовали 40,8 и 18,1%; от применения ТМТД – 21,3 и 9,2%; от ТМТД-плюс 19,2 и 7,6%; Виал ТТ 17,1 и 6,9%; ТМТД-плюс+Виал ТТ 12,4 и 5,2%; Дивиденда Стар 11,4 и 4,3%. Применение протравителей семян позволяет в 4 раза как снижать распространенность так и развитие болезней. В случаях конкретных возбудителей нами установлена широкая гамма вредных организмов. Ведущее место среди них кроме *B. sorokiniana* занимают *Fusarium* sp. и *Alternaria* sp. [10].

В результате изучения влияния протравителей семян на поражение семян и формируемых ими проростков растений пшеницы установлено: 100% партий семян имеют в семенном материале возбудителей болезней и в частности корневой гнили ведущее место среди них в условиях Степной зоны Южного Урала кроме *B. sorokiniana* занимают *Fusarium* sp. и *Alternaria* sp.; при проращивании семян без обработки здоровые проростки в среднем развивали только 58% семян, все препараты повышали количество здоровых проростков: ТМТД до 77,4%; ТМТД-плюс до 80%; Виал ТТ до 81,7%; баковая смесь ТМТД-плюс + Виал ТТ до 86,6%; Дивиденд Стар до 87,6%; применение протравителей семян позволяет практиче-

Таблица 2. Поражение семян возбудителями болезней (УОП ОГАУ, Учитель, 2006–2009 гг.)

Вариант опыта	Здоровые проростки, шт.	Непроросшие без патогенных признаков шт.	Валлы поражения по возбудителям																%, зараженности/ развития/				
			<i>Fusarium sp.</i>				<i>V. solitaria</i>			<i>Alternaria sp.</i>				<i>Penicillium sp.</i>				2 и более возбудителей					
			1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	1		2	3	4	
Контроль	58,9	0,6	5,1	2,9	1,9	0,8	2,9	1,7	0,6	0,6	6,9	3,9	2,2	1,3	5,3	1,9	0,5	0,4	1	0,5	0,2	0,3	40,8/ 18,1
ТМТД	77,4	0,9	4,7	2,6	1,4	0,5	1,7	1	0,3	0,1	3,8	2,7	0,9	0,4	0,1	0	0	0	0,7	0,3	0,1	0,2	21,3/ 9,2
ТМТД-плюс	80	1	2,8	1,7	0,8	0,2	1,3	0,6	0,1	0,1	3,8	2,3	0,9	0,5	2,8	0,7	0,1	0	0,6	0,1	0,1	0	19,2/ 7,6
Виал ТТ	81,7	1,2	2,8	1,5	0,8	0,1	0,6	0,5	0,3	0	3,8	1,9	0,8	0,5	2,3	0,9	0,1	0	0,3	0,1	0	0	17,1/ 6,9
Дивиденд Стар	87,6	0,9	2,5	1,6	0,6	0,1	0,6	0,3	0,1	0	3	1,6	0,2	0	0,4	0,1	0	0	0,2	0,1	0,1	0	11,4/ 4,3
ТМТД-плюс + Виал ТТ	86,6	1	2,2	1,9	0,9	0,2	1	0,6	0,2	0	2,7	1,5	0,8	0	0,4	0	0	0	0,1	0,1	0	0	12,4/ 5,2

НСР<sub>05</sub> – 3,76%; P – 6,61% (по зараженности); НСР<sub>05</sub> – 1,86%; P – 8,25% (по развитию) 2006 г.; НСР<sub>05</sub> – 3,13%; P – 4,84% (по зараженности);  
 НСР<sub>05</sub> – 2,26%; P – 8,66% (по развитию) 2007 г.  
 НСР<sub>05</sub> – 4,29%; P – 5,79% (по зараженности) НСР<sub>05</sub> – 2,06%; P – 6,62% (по развитию) 2008 г.; НСР<sub>05</sub> – 3,47%; P – 7,02% (по зараженности)  
 НСР<sub>05</sub> – 1,84%; P – 8,09% (по развитию) 2009 г.



ски в 4 раза как снижать распространенность так и развитие болезней, передающихся с семенным материалом, обеспечивая тем самым возможность реализации биологического потенциала растениями пшеницы по продуктивности и качеству зерна.

#### Список литературы

1. Хадеев Т.Г. Влияние комплексной защиты растений на фотометрические показатели и урожайность яровой пшеницы. Вестн. Казанск. ГАУ. 2011; 2(20): 153-6.
2. Стаценко А.П. Бутылкин Ф.А. Метод определения силы роста семян. Зерн. хоз. 2002; 6: 15-6.
3. Соловых А.А. Влияние протравителей семян на всхожесть и урожайность яровой пшеницы в ландшафтных условиях. Вавиловские чтения. Мат. межд. науч.-практ. конф. Ч. 3. Саратов: Научн. книга. 2008: 210-12.
4. Душкин С.А. Влияние химических и биологических препаратов на всхожесть семян и выживаемость *Triticum aestivum* L. Вестн. Орловск. ГАУ. 2012; 6(39): 30-3.
5. Тютерев С.Л. Обработка семян фунгицидами и другими средствами оптимизации жизни растений. СПб. 2006: 248 с.
6. Глинушкин А.П. Эффективность применения средств защиты в технологиях возделывания яровой мягкой пшеницы. Изв. ОГАУ. 2009; 1: 25-7.
7. Глинушкин А.П. Эффективность методики определения качества семян при производстве яровой мягкой пшеницы. Изв. ОГАУ. 2010; 1: 44-6.
8. Глинушкин А.П. Мониторинг микозов пшеницы в условиях степной зоны Южного Урала. Вест. ОГАУ. 2013; 1: 38-40.
9. Семынина Т.В. Особенности инфицирования семян зерновых культур патогенами. Защ. карант. раст. 2012; 2: 20-3.
10. Лукъянцев В.С. Эффективность защиты яровой пшеницы от корневой гнили и вредителей в центральной зоне Оренбургской области. Изв. ОГАУ. 2011; 4(32): 64-6.

## ВИДОВОЙ СОСТАВ И ВРЕДНОСНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ УКРОПА ПАХУЧЕГО (*ANETHUM GRAVEOLENS* L.)

Макаренко Е.В.

Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Санкт-Петербург

Укроп – однолетнее травянистое растение семейства сельдерейные (зонтичные). Родиной укропа считается Средиземноморье, но благодаря своей холодостойкости эта довольно неприхотливая культура распространилась по всему европейскому континенту и завоевала достойное место среди прочих пряно-ароматических культур. Высокая пищевая и лечебная ценность этого растения обусловлена его богатым биохимическим составом [1].

Болезни зонтичных культур изучены менее других болезней овощных культур. В отношении видового состава фитопатогенов сведения очень бедны. Однако, в отдельные годы, при наличии благоприятных условий некоторые патогены могут быть весьма вредоносными.

Изучение коллекции укропа с целью анализа состава патогенов на культуре проводили в условиях Пушкинских лабораторий ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова в течение 2006–2011 гг. Материал исследований был представлен 144 сортообразцами вида *Anethum graveolens* L. Коллекционные образцы интродуцированы более чем из 40 стран, представляющих почти все мировое разнообразие эколого-географических условий Европы, Азии, Африки, Южной и Северной Америки, Австралии.

В результате обследования сортообразцов укропа идентифицированы 26 видов фитопатогенных организмов. Среди них представители царств: Chromysta, Eumycota, Procaryota.

Наибольший удельный вес имеют виды из царства Eumycota, численность которых соста-

вила 85,2%. Представители этого царства распределены между тремя отделами, шестью классами, восемью семействами. К ним относятся роды: *Olpidium*, *Erysiphe*, *Pleospora*, *Pyrenophora*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Botrytis*, *Verticillium*, *Arthrotrichum*, *Cercospora*, *Scolecotrichum*, *Torula*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phoma*, *Septoria*, *Rhizoctonia*.

На ранних этапах онтогенеза наибольший вред культуре укропа причиняет «черная ножка», вызываемая комплексом патогенов. Ими являются почвенные патогенные грибы: *Pythium ultimum* T., *Rhizoctonia violacea* (Tul.) Pat., *Rhizoctonia solani* Kuehn. С семян в проростки также проникают грибы *Phoma longissima* (P.) West., *Alternaria radicina* M.D. et E. и *Alternaria tenuis* Nees., предварительно поражающие семенники в поле и при созревании, а затем заселяющие семена. «Черной ножкой» поражается корневая шейка всходов и молодых растений. Она темнеет, размягчается, утончается и загнивает. Корни у больных растений развиваются плохо или отмирают полностью, растения полегают и засыхают. Вредоносность состоит в гибели (очагами) до 30% и выше всходов. Такое изреживание посева существенно снижает выход товарной зелени с единицы площади и семенную продуктивность.

Из отдела Ascomycota наиболее вредоносной на растениях укропа оказалась мучнистая роса, вызываемая грибом *Erysiphe umbelliferrarum* f. *anethi* Jacz. Заболевание наблюдалось в фазу цветения – начала созревания семян и отмечено в условиях защищенного грунта. Поражаются все надземные органы:

стебли, листья, черешки, плодоножки, семена. Образуется белый, паутинистый, позже мучнистый налет, представленный мицелием и конидиальным спороношением гриба. При этом листья, покрытые налетом, непригодны в пищу, так как лишены сочности, вкусовых и ароматических свойств, т.е. полностью теряют товарные качества. Образование сумчатой стадии отмечено нами не было.

Патогены из отдела Deuteromycota составили наиболее многочисленную и вредоносную группу возбудителей болезней на укропе (70,3%). Среди них представители семейств: Moniliaceae (19,4%), Dematiaceae (18,5%), Tuberculariaceae (18,5%), Sphaeropsidaceae (7,4%), *Mycelia sterilia* (7,4%).

Ежегодно на всех этапах онтогенеза наблюдалось поражение растений укропа грибами из родов *Fusarium* и *Verticillium*. Возбудители вызывали трахеомикозный вилт, соответственно фузариозной и вертициллезной этиологии. В годы исследований преимущественно преобладал фузариоз. Так, в 2006 г. при детальном анализе пораженных образцов частота встречаемости фузариозного увядания составляла 22,4%, а вертициллезного увядания – 3,9%. В 2009 г. распространение увядания, вызванного грибами рода *Fusarium* составило 45,8%, *Verticillium albo-atrum* только 2,1%. На такое соотношение возбудителей, вероятно, сказывался комплекс почвенно-климатических факторов.

Растения, пораженные грибами из рода *Fusarium*, становятся хлоротичными, отдельные листья приобретают антоциановый оттенок. Поражение начинается с нижних листьев, затем распространяется на верхние и захватывает цветки. Через несколько дней растения увядают и засыхают, при этом сосуды окрашиваются в бурый или желто-бурый цвет, что хорошо диагностируется на поперечных срезах. При закладке во влажную камеру через 2 – 3 дня из пораженных сосудов выступает беловатый налет мицелия и спороношения возбудителя. Заболевание носит очаговый характер. Уязвимая фаза – три-четыре настоящих листа.

Гриб накапливается и сохраняется в почве. Проникновению возбудителя способствует повреждение корней нематодами. Так, при диагностике растений с симптомами фузариозного вилта, наблюдали присутствие гриба из рода *Arthrobotrys* и наличие почвообитающих нематод в сосудистой системе укропа.

При вертициллезном увядании кончики листьев укропа желтеют, со временем становятся бурыми и засыхают. Инфицированные растения в жаркие часы привядают, так как гриб поражает сосудистую систему, вызывая её закупорку и интоксикацию. Чаще болезнь проявляется к периоду бутонизации, началу формирования зонтиков, цветению, хотя в растениях гриб проникает значительно раньше.

В 2009 г. на коллекционных образцах укропа отмечены возбудители церкоспороза – *Cercospora depressa* (Berk. et Dr.) и фомоза – *Phoma longissima* (P.) West. из отдела Deuteromycota. Данные виды грибов представляют серьезную опасность для культуры укропа, так как зеленая масса, употребляемая в пищу, становится непригодной из-за многочисленных грязно-коричневых или бурых сливающихся пятен на листьях, стеблях. Кроме того, инфицируются и семена, которые в дальнейшем служат источником инфекции. Однако в последующие годы эти заболевания зарегистрированы нами не были.

Выявлено существенное значение для культуры укропа семенной инфекции. Фитопатологический анализ семян показал, что они в сильной степени инфицированы различными патогенами. Помимо *Cercospora depressa* (Berk. et Dr.) и *Phoma longissima* (P.) West. на семенах часто встречаются возбудители: *Aspergillus niger* Tiedh, *Monilia sitophila* (Mont.) Sacc, *Botrytis cinerea* Pers. et Fr, грибы из рода *Alternaria* (*Alternaria radicina* M. D. et E, *Alternaria tenuis* Nees.).

Также на семенах укропа зарегистрированы представители царства Procaryotae отдела Gracillicutes класса Scotobacteria. Помимо инфицирования семян, виды: *Erwinia carotovora* (Jones) Holl, *Xanthomonas* sp. и *Pseudomonas solanacearum* (E. F. Sm.) Bergey вызывают увядание всего растения или его частей в фазу образования листьев розетки.

В результате сравнительного анализа частоты встречаемости и вредоносности фитопатогенов на растениях укропа нами установлено, что основными наиболее вредоносными и распространенными болезнями в годы исследований являлись: фузариозный вилт, фомоз, бактериальное увядание, вызываемые названными выше патогенами.

#### Список литературы

1. Буренин В.И. Овощи – родник здоровья. Л.: Лениздат. 1990: 225 с.

## ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГИБРИДОВ ХЛОПЧАТНИКА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ

Мамедова Н.Х., Шихлинский Г.М.  
Институт генетических ресурсов НАНАз, Баку

Основы селекции растений на иммунитет были заложены Н.И. Вавиловым, работы которого дают селекционерам ключ к нахождению иммунных к болезням форм растений в природе. Ежегодные потери

сельскохозяйственной продукции в мире от вредителей, болезней и сорняков достигает 40–45% урожая. Поэтому система мероприятий, позволяющих свести эти потери к минимуму, равнозначна введению 20-

30% дополнительных посевных площадей. Защита растений от вредителей и болезней – одно из важнейших мероприятий по превращению потенциальной продуктивности сельскохозяйственных растений в реальную [1].

Общая задача селекционеров, иммунологов и генетиков – найти пути сочетания высокой продуктивности и других хозяйственно ценных признаков с признаками устойчивости. В идеале устойчивый сорт должен обладать признаками, обеспечивающими снижение степени привлекательности сорта для вредителей, свойствами антибиотического воздействия растения на вредные организмы и выносливостью к ним. При определении программ по селекции устойчивых сортов не всегда должна ставиться задача получения их с абсолютным иммунитетом к вредителям. Важно, чтобы вновь создаваемый сорт был существенно устойчивее, своего предшественника. При создании устойчивых сортов необходимо, чтобы они обладали достаточной экологической адаптивностью [2].

Среди заболеваний хлопчатника наибольший ущерб наносят корневая гниль, гоммоз и вилт (увядание). Особенно вредоносным заболеванием хлопчатника является инфекционное увядание (вилт), которое вызывается *Verticillium* и *Fusarium*, в связи с чем различают вертициллезный и фузариозный вилт. Сорта средневолокнистого хлопчатника (*G. hirsutum* L.) поражаются преимущественно вертициллезным вилтом, а тонковолокнистого (*G. barbadense* L.) – фузариозным. Процент поражаемости средневолокнистого – хлопчатника вертициллезным вилтом может превышать 60%, а тонковолокнистый хлопчатник хотя и поражается вертициллезным вилтом, проявляет известную толерантность к *Verticillium dahliae* Klebahn, поэтому потери его урожая от болезни значительно меньше [3, 4].

Одним из основных мероприятий по защите хлопчатника от вилта является культивирование устойчивых и толерантных к болезням сортов. Продолжительное сохранение устойчивости сортов, сдерживание накопления более вирулентных форм возбудителей возможно при возделывании хлопчатника в севообороте и при соблюдении комплекса мероприятий, способствующих снижению инфекционного запаса возбудителя в почве и повышению сезонной устойчивости растений к заболеванию. Влияние посевов люцерны в севообороте на заболеваемость хлопчатника вилтом изучалось многими исследователями. Установлено, что при посеве хлопчатника после люцерны распространенность и вредоносность заболевания снижается в 1,5 раза. Против вертициллезного вилта важно чередование посевов хлопчатника с непоражаемыми культурами, такими как кукуруза, сорго, рапс, пшеница, ячмень, рожь [5].

При заболевании хлопчатника вертициллезным вилтом не только снижается урожай, но и в значительной мере ухудшается его качество – длина, крепость и растяжимость волокна, масличность, энер-

гия прорастания, всхожесть семян. Наибольший недобор числа коробочек хлопчатника отмечается при заболевании растений в более ранние периоды вегетации. Абсолютные показатели недобора урожая зависят от устойчивости сорта и фазы развития, в которую проявилось заболевание [6, 7].

Оценку устойчивости гибридных форм хлопчатника на поражаемость вертициллезным вилтом проводили по установленной Ф.В. Войтеноком методике, то есть пятибалльной шкале [8]. Для исследования были взяты гибридные формы хлопчатника в количестве 90 сортообразцов, относящихся к двум культивируемым видам *G. hirsutum* L. и *G. barbadense* L., то есть внутри (*G. hirsutum* L. × *G. hirsutum* L.) – 29, (*G. barbadense* L. × *G. barbadense* L.) – 6 и межвидовые (*G. hirsutum* L. × *G. barbadense* L.) – 55 гибриды хлопчатника.

Среди большого разнообразия имеющихся форм хлопчатника, имеется заметное различие по степени устойчивости к заболеванию [9–11]. Цель данного исследования – выявить, среди этих гибридов формы, обладающие иммунитетом или устойчивостью к вертициллезному вилту для селекционных программ. Фитопатологическая оценка поражаемости вилтом внутри- и межвидовых гибридов хлопчатника показала, что среди внутривидовых гибридов *G. hirsutum* L. × *G. hirsutum* L. 17,2% были иммунными, 24,1% – устойчивыми, 44,8 – толерантными и 13,9% – восприимчивыми. У внутривидовых гибридов *G. barbadense* L. × *G. barbadense* L. 16,7% были иммунными, 66,7% – устойчивыми, 16,7% – толерантными. Межвидовые гибриды хлопчатника *G. hirsutum* L. × *G. barbadense* L. имели следующие показатели устойчивости к вилту: 12,7% – иммунные, 54,6% – устойчивые, 21,8% толерантные 1,8% – неустойчивые.

Сравнительная оценка данных устойчивости к вилту, различных гибридов хлопчатника, относящихся к видам *G. hirsutum* L. и *G. barbadense* L., по трем вариантам опыта, показала, что болезнь больше распространяется на внутривидовых гибридах хлопчатника *G. hirsutum* L. × *G. hirsutum* L., которые имеют наибольшее значение в хлопководстве. В меньшей степени болеют межвидовые гибриды *G. hirsutum* L. × *G. barbadense* L., где участвует вид *G. barbadense* L. который устойчив к заболеванию вертициллезом. А внутривидовые гибриды *G. barbadense* L. × L. проявили самую большую устойчивость к этой болезни.

Устойчивые к заболеванию вилтом гибриды реагируют на воздействие гриба-паразита в меньшей степени, проявляя большую стабильность, чем восприимчивые. Замена восприимчивых сортов хлопчатника относительно вилтоустойчивыми дает положительный эффект в отношении снижения вилта. Большинство исследователей допускают, что внедрение относительно вилтоустойчивых сортов является наиболее эффективным мероприятием, которое может решить проблему вилта.

Таким образом, выделенные нами в результате фитопатологической оценки устойчивости к вилту

гибридные формы хлопчатника могут быть использованы в селекционном процессе, как доноры устойчивости к вертициллезному вилту.

#### Список литературы

1. Дьяков Ю.Т., Успенская Г.Д., Дементьева М.И. и др. Общая и сельскохозяйственная фитопатология. М.: Колос. 1984: 495 с.
2. Шапиро И.Д., Вилкова Н.А. Иммуитет растений к вредителям и болезням. Л.: Агропромиздат. 1986: 191 с.
3. Бенкен А.А., Хохряков М.К., Малинин В.М. Вилт хлопчатника. Л.: Колос. 1974: 119 с.
4. Доброзракова Т.Л. Сельскохозяйственная фитопатология. Л.: Колос. 1966: 327 с.
5. Мирпулатова Н.С., Камилова М.Х. Мероприятия по сохранению устойчивости хлопчатника к вертициллезному вилту. М. 1973: 40 с.
6. Пересыпкин В.Ф. Болезни технических культур. М.: Агропромиздат. 1986: 317 с.
7. Пересыпкин В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. М.: Агропромиздат. 1989: 480 с.
8. Войтенко Ф.В. Методика долгосрочного прогноза вертициллезного вилта хлопчатника. М.: Колос. 1970: 15 с.
9. Г.М., Мамедова Н.Х., Мамедова А.Д., Абдулалиева Г.С., Гасанова Г.И. Сравнительная оценка устойчивости внутри- и межвидовых гибридов хлопчатника к биотическим и абиотическим факторам среды. Сб. научн. тр. «Факторы экспериментальной эволюции организмов». К.: Логос. 2010; 8: 468-71.
10. Мамедова Н.Х. Фитопатологическая оценка устойчивости гибридов хлопчатника к вертициллезному вилту. Первые Международные Беккеровские чтения. Волгоград. 2010; Ч. 1: 140-1.
11. Мамедова Н.Х. Сравнительная оценка гибридных форм хлопчатника на устойчивость к фитопатогенам. Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2010; 1: 117.

## ИСПЫТАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ КЛЯСТЕРОСПОРИОЗА СЛИВЫ

Маслиенко Л.В., Якуба Г.В., Мищенко И.Г., Ковчигина М.А.

ВНИИ масличных культур имени В.С. Пустовойта, Краснодар  
Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства, Краснодар

С целью разработки биологизированной системы защиты от клястероспориоза (*Clasterosporium carpophilum* Lev. Aderh.) сливы испытывались полифункциональные микробиопрепараты, разработанные в ВНИИМК: Вермикулен (Рк-1-3 *Penicillium vermiculatum* Dang.), Хетомин (ХК-1-4 *Chaetomium olivaceum* Cook et Ellis), Веррукозин (PV-3 *Penicillium verrucosum* Dierckx var. *cyelopium* Westling, Samson et al.), Фуникулозум (PF-1 *Penicillium funiculosum* Thom.) и Бациллин (В-5 *Bacillus licheniformis*) [1].

Испытания проведены в СКЗНИИСиВ в мелкоделных опытах в 2008–2009 гг. в ОАО «Садовод» Тимашевского района на сорте Стенлей, средневосприимчивому к клястероспориозу, по стандартным методикам [2, 3]. Микробиопрепараты испытывали в препаративной форме жидкая культура (ЖК), с нормой расхода 3,0 л/га, расход рабочей жидкости 1000 л/га, повторность опытов трёхкратная. Химический стандарт – Полирам, ДФ 2,0 кг/га [4].

В 2008 г. на фоне умеренного развития клястероспориоза сливы через 10 сут после применения ( $P - 48,4\%$ ;  $R - 29,3\%$ ), при эффективности химического стандарта – 86,0% все испытанные микробиопрепараты обеспечили достаточно высокий уровень защиты. Так, у Веррукозина биологическая эффективность составила 87,9%, Фуникулозума – 85,7%, Хетомина – 80,5% и Вермикулена – 74,1%.

На более низком фоне развития клястероспориоза сливы в 2009 г. ( $P - 21,6\%$ ,  $R - 14,8\%$ ), биологи-

ческая эффективность как химического стандарта, так и микробиопрепаратов была выше. Так, при эффективности Полирама ДФ 94,5%, эффективность Бациллина составила 93,5%, Веррукозина – 92,8%, Фуникулозума – 90,3 %, Хетомина – 86,7%, и Вермикулена – 81,6 %.

Таким образом, микробиопрепараты Бациллин, Веррукозин и Фуникулозум не уступали по эффективности химическому фунгициду, а препараты Вермикулен и Хетомин показали эффективность несколько ниже этого уровня. Все испытанные микробиопрепараты показали достаточно высокий уровень блокирования одного из доминирующих заболеваний сливы – клястероспориоза.

#### Список литературы

1. Маслиенко, Л.В. Перспективные микробиопрепараты полифункционального типа действия для защиты масличных и других сельскохозяйственных культур от болезней. Совр. сост. и персп. разв. микробиол. биотехнол.: мат. VII межд. науч. конф. (31 мая – 4 июня, 2010). Минск. 2010: 421-3.
2. Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов, антибиотиков, и протравителей семян с/х культур. М. 1985: 62 с.
3. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве. СПб.: 378 с.

## ВЛИЯНИЕ СОРТА И МЕТЕОУСЛОВИЙ ГОДА НА ЗАРАЖЕННОСТЬ СЕМЯН СОРГО ГРИБАМИ РОДА *FUSARIUM* И *ALTERNARIA* В ЛЕСОСТЕПИ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

Матвиенко Е.В.

Поволжский НИИ селекции и семеноводства им. П.Н. Константинова, Кинель

Неблагоприятное воздействие факторов внешней среды вызывает ослабление иммунитета у растений и приводит к активизации грибной и бактериальной патогенной микробиоты (Ischenko, 2001). В связи с этим широкое распространение получают различные болезни сельскохозяйственных растений. При этом отмечено увеличение в микоценозах плодовых культур условно-патогенных грибов, которые входят в состав комплексов микроорганизмов.

Таким образом, имеет место ассоциативное поражение растений микробиотой, что является причиной корневых гнилей, усыханий и увяданий не только отдельных побегов, но и всего растения в целом (Смолякова, 2008; Прах, 2013). Это осложняет диагностику болезней в связи с искажением характерных симптомов, а также затрудняет борьбу с патогенными микроорганизмами в связи с принадлежностью их к различным группам как в систематическом отношении, так и по их трофическому статусу.

Подобные тенденции эволюции патогенной микробиоты обуславливают необходимость регулярного мониторинга фитосанитарного состояния садов с целью выявления наиболее вредоносных фитопатогенных объектов, изучения особенностей их биологии, динамики развития, характера взаимодействия друг с другом и растением-хозяином, что является необходимым для адекватного понимания механизмов взаимодействия структурных элементов в системе «среда – хозяин – паразит» и определения стратегии оптимизации фитосанитарного состояния насаждений сельскохозяйственных культур.

Изучение состава эндофитной микробиоты, проводимое путем ее выделения из растительных эксплантов после поверхностной стерилизации (спирт, фламбирование), было установлено, что из ветвей вишни, черешни, сливы, алычи, абрикоса с симптомами поражения и без них выделяется бактерия *Pseudomonas* и грибы *Alternaria*, *Fusarium*, *Monilia*, *Cytospora*. Таким образом, грибные патогены встречаются в комплексе с бактериальной микробиотой. При этом частота тестирования бактерии составила в среднем 59,8%, грибной микробиоты 25,4%.

Методом посева гриба-тестера на среды с бактериальным токсином установлено антагонистическое действие эндофитной бактерии в отношении ряда фитопатогенных грибов. Оценка состояния грибных колоний показала, что на средах с токсинами бактерии из рода *Pseudomonas* у них наблюдаются выраженные признаки деградации (лизис мицелия, отсутствие спороношения и др.). На средах с токсинами сила роста мицелия была снижена. Токсическую активность (At) бактерии в отношении гриба-тестера определяли по степени подавления развития грибной

колонии в опыте в сравнении с контролем и выражали в процентах. Наиболее выраженная токсическая активность бактериальных штаммов была отмечена в отношении грибов *Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc. (At=75,0%) и *Alternaria alternate* Keissl. (At=65,6%). Более устойчивыми к действию бактериальных метаболитов оказались *Fusarium oxysporum* Schlecht. и *Monilia cinerea* Bonord., токсическая активность бактерии в отношении этих патогенов составила 59,6 и 50,9% соответственно, что объясняет их доминирование в микоценозах косточковых растений.

В связи с тем, что из растений как с симптомами поражения, так и без них тестируется бактериальная и грибная микробиота, необходимым является определение характера влияния токсинов чистых культур патогенов и их ассоциаций на хозяина. Действие культурального фильтрата микроорганизмов на хлорофиллсодержащие ткани растения-хозяина оценивалось по их фотосинтетической активности неразрушающим способом на портативном хлорофиллфлуориметре РАМ-Junior (Германия, Heinz Waiz GmbH), работающем по типу амплитудно-импульсной модуляции флуоресценции хлорофилла – метод РАМ.

Оценка токсичности фильтрата культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas*, а также фитопатогенных грибов *M. cinerea*, *A. alternate* и *F. oxysporum* по отношению к растению-хозяину с использованием листовых высечек вишни показала, что по сравнению с бактерией фитотоксичность грибов выражена в наибольшей степени. Фотосинтетическая активность тканей листа на 6 сутки инкубирования в 10%-ном растворе токсических метаболитов *Pseudomonas* составил 0,69 у.е., при этом показатели в опыте с растворами культуральных фильтратов грибных патогенов *A. alternate*, *M. cinerea* и *F. oxysporum* были равны 0,43; 0,42 и 0,28 у.е. соответственно.

В лабораторных условиях проводилось изучение фитотоксичности метаболитов искусственно созданных бактериально-грибных ассоциаций. При совместном культивировании на жидкой питательной среде бактерии *Pseudomonas* и грибов *A. alternate*, *M. cinerea*, *F. oxysporum* установлено ослабление фитотоксичности метаболитов ассоциаций по сравнению с фильтратами чистых культур. После инкубирования листовых высечек в течение 6 сут в растворах токсических метаболитов искусственно созданных микробных ассоциаций (*Pseudomonas* + *A. alternate*; *Pseudomonas* + *M. cinerea*; *Pseudomonas* + *F. oxysporum*) фотосинтетическая активность растительных тканей была выше, чем в вариантах с чистыми культурами грибов и составила 0,56; 0,51 и 0,37 у.е. соответственно. Это связано с ослаблением физиологической ак-

тивности грибных патогенов под влиянием бактерии рода *Pseudomonas* при их совместном культивировании (рисунок).

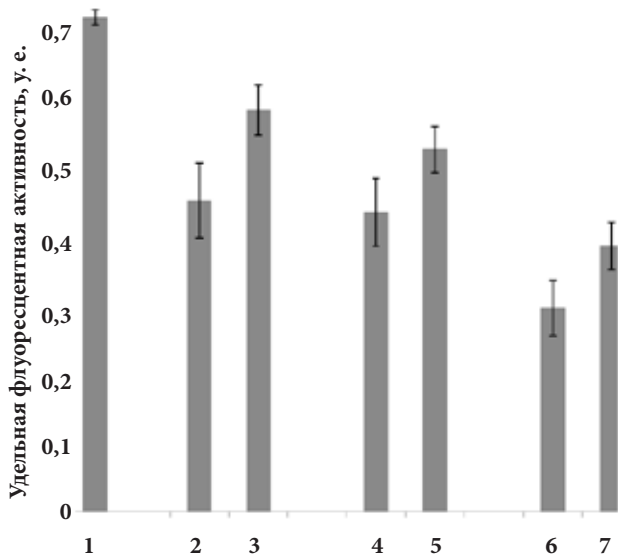


Рис. Фотосинтетическая активность листьев вишни инкубируемых в течение 6 сут в токсических метаболитах микроорганизмов и их ассоциаций

1 – *Pseudomonas*, 2 – *A. alternate*, 3 – *Pseudomonas* + *A. alternate*, 4 – *M. cinerea*, 5 – *Pseudomonas* + *M. cinerea*, 6 – *F. oxysporum*, 7 – *Pseudomonas* + *F. oxysporum*.

Таким образом, выделенная нами эндофитная бактерия из рода *Pseudomonas* выполняет роль протектора и предотвращает развитие грибной инфекции у косточковых культур благодаря наличию токсинов фунгицидного и фунгистатического действия, что определяет ценность данных бактериальных штаммов в биоконтроле болезней сельскохозяйственных культур. Так как паразитизм выделенных эндобактерий в отношении растения-хозяина не

имеет такой выраженной формы и активности в отличие от грибов, присутствие в латентном состоянии бактериальной микробиоты в сосудах растений помогает растениям в борьбе с грибными болезнями. Такой иммунитет в литературе определен как протективный (Макаров, 1994; Ischenko, 2001). Но, несмотря на это, следует с высокой степенью настороженности относиться к тому, что в бессимптомных растениях системно присутствует бактерия из рода *Pseudomonas*, так как существует опасность вспышки бактериозов при изменении условий среды и ослаблении защитных свойств растений.

Проведенные исследования по изучению антифунгальной активности эндофитных бактерий косточковых культур являются теоретическим основанием для разработки методологических и практических подходов к интегрированной защите растений от болезней. Выявленные закономерности взаимодействия элементов в системе среда – хозяин – паразит позволят эффективно оценить и использовать потенциал биологических объектов при создании новых методов подавления патогенных организмов, что в свою очередь обеспечит стабильность агроценозов.

#### Список литературы

1. Смольякова В.М., Пузанова Л.А., Якуба Г.В. и др. Оптимизация структуры патосистем и регулирования численности вредных организмов в плодовом агроценозе. Садов. виногр. 2008; 5: 20-1.
2. Прах С.В., Мищенко И.Г. Основные тенденции формирования мико-энтомоценозов косточковых насаждений в Краснодарском крае. Плодов. виногр Юга России. Краснодар: СКЗНИИСиВ. 2013; 20(2).
3. Макаров В.В., Бакулов И.А., Семенихин В.В., Филиппов А.Л. Внутриклеточный паразитизм и протективный иммунитет. Вест. РАСХН. 1994; 3: 45-9.
4. Ischenko LA. Protective immunity of fruit plants. Eucarpia Fruit Breed, Sect Newslet. 2001; 5: 32-3.

## ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПОСЕВА (С ПОЛИВОМ И БЕЗ ПОЛИВА) И ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН СОРГО ПРЕПАРАТАМИ НА РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ИНТЕНСИВНОСТЬ РАЗВИТИЯ АЛЬТЕРНАРИОЗА В ЛЕСОСТЕПИ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

Матвиенко Е.В.

Поволжский НИИ селекции и семеноводства им. П.Н. Константинова, Кинель

В последние годы в связи с широким распространением нулевых и минимальных технологий и изменением климатических условий в Среднем и Нижнем Поволжье резко нарастает распространенность и вредоносность альтернариоза практически на всех с.-х. культурах. В связи с тем, что большинство грибов *Alternaria* являются факультативными паразитами и сапрофитами, к ним практически отсутствуют устойчивые сорта. Из-за сильного поражения сорговые культуры сами стали накопителями многих

инфекций, поэтому получение здорового семенного материала в настоящее время очень актуально. Для разработки сбалансированных систем защиты сорговых культур от болезней необходима комплексная оценка источников инфекции болезни.

Цель исследований – изучить влияние сорта, и метеоусловий вегетационного периода на пораженность семян сорго патогенными грибами рр. *Alternaria* и *Fusarium* в условиях лесостепи Самарской области.

Таблица 1. Поражённость семян зернового и сахарного сорго грибами *Alternaria* и *Fusarium* в 2011-2012 гг.

Сорт	2011 г.			2012 г.		
	Заражённость семян, %		Лабораторная всхожесть, %	Заражённость семян, %		Лабораторная всхожесть, %
	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.		<i>Fusarium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	
<b>Зерновое сорго</b>						
Славянка	8,4±0,7	35,4±2,8	64±5	6,8±0,5	20,6±1,8	83±6
Рось	10,2±0,8	98,6±7,6	56±4	6,0±0,4	42,1±3,4	80±5
Премьера	10,0±0,6	92,6±8,2	65±5	2,0±0,1	37,0±2,8	93±8
В среднем	<b>9,5</b>	<b>75,5</b>	<b>61,7</b>	<b>4,9</b>	<b>33,2</b>	<b>85,3</b>
<b>Сахарное сорго</b>						
Кинельское 4	1,5±0,1	5,3±0,3	78,1±6,2	4,6±0,3	8,6±0,7	90,3±8,4
НСР <sub>05</sub>	2,4	14,6	4,3	1,5	8,4	2,8
Коэффициент корреляции между лабораторной всхожестью и поражённостью семян болезнями	-0,923	-0,832	-	-0,884	-0,270	-

Проведены исследования по влиянию сорта, метеоусловий года на поражённость семян сорго грибами родов *Alternaria* и *Fusarium*.

Влияние сорта и метеоусловий года на поражённость семян сорго несовершенными грибами родов *Alternaria* и *Fusarium* изучали в 2010–2012 гг. на опытных полях Поволжского НИИ селекции и семеноводства им. П.Н. Константинова, лабораторные – на кафедре химии и защиты растений СГСХА. Исследования проводились в основном на сортах зернового сорго Премьера, Славянка, Рось, а также сахарного сорго Кинельское 4, все сорта местной селекции.

На одном сорте по диагонали поля через равномерные промежутки для анализа брали 3 пробы по 10 растений. Степень заражённости семян фитопатогенными грибами после уборки определяли по методу рулонов на фильтровальной бумаге [1]. Для этого брали полоски фильтровальной бумаги размером 10×55 см, где на расстоянии 2–3 см от верхнего и боковых краев бумаги в одну линию с интервалом 1–2 см в 3-кратной повторности раскладывали по 50 семян зародышами вниз.

Сверху семена покрывали такой же полоской бумаги, увлажненной до полной влагоемкости, и сворачивали в рулоны, которые ставили вертикально в стаканы со слоем воды около 0,5–1 см и помещали в термостат при температуре 22–25 °C [2]. К признакам развития грибов рода *Alternaria* на семенах в лабораторных условиях относили развитие на семенах и бумаге мицелия темно-оливкового и черного цвета, для *Fusarium* – беловато-розового мицелия.

Метеоусловия вегетационного периода 2010 г. были острозасушливыми, крайне неблагоприятными для развития сельскохозяйственных культур. Фи-

тоэкспертиза семян показала, что они практически не были поражены грибами *Alternaria* и *Fusarium*.

Метеоусловия вегетационного периода 2011 г. были сравнительно влажными с засушливым июлем, что создало благоприятные условия для развития грибов рода *Alternaria*. В начале происходило поражение листьев, что проявлялось в виде коричневых некротических пятен. Первые проявления фитопатогенных грибов *Alternaria* и *Fusarium* на зерне во время вегетации сорго были отмечены в конце августа – начале сентября, и в дальнейшем под влиянием чередования жаркой и дождливой погоды складывались благоприятные условия для быстрого нарастания эпифитотического процесса, что способствовало сильному заражению ими семян зернового сорго сортов Рось и Премьера (более 90%) и обусловило низкую лабораторную всхожесть семян (56–65%) (табл. 1).

Метеоусловия вегетационного периода 2012 г. были сравнительно засушливые, но количество осадков было близко к среднегодовым нормам, однако май был сухим, чередование погодных условий и сказалось на развитии грибов рода *Alternaria* и *Fusarium*. В 2012 г. поражённость зерна грибами рода *Fusarium* у сортов зернового сорго Славянка и Рось составило (6,8 и 6,0% соответственно), в меньшей степени поражен сорт Премьера (2,0%). Сахарное сорго сорта Кинельское 4 поражалось грибами рода *Fusarium* в средней степени (4,6%). Поражённость зерна альтернариозом была более высокой. Относительную устойчивость к альтернариозу проявили сорт зернового сорго Славянка (20,6%) и сахарного сорго Кинельское 4 (8,6%). Поражённость зерна зернового сорго сортов Рось и Премьера составляла 37–42,1%. Лабораторная всхожесть была более высокой по сравнению с 2011 г. и составила на сортах

зернового сорго 83–93%, а на сорте сахарного сорго Кинельское 4–90% [3].

В заключение следует отметить, что в Среднем Поволжье оптимальные условия для развития альтернариоза на семенах сорговых культур складываются при повышенном количестве осадков в июне, августе и сентябре в сочетании с жарким и засушливым июлем, что и наблюдалось в 2011 г.

Средняя пораженность семян зернового сорго грибами рода *Alternaria* в острозасушливом 2010 г. составила около 2,0%, влажном 2011 г. с засушливым июлем – 75,5%, и сравнительно засушливом 2012 г. – 33,2%. Грибница грибов рода *Alternaria* находится в основном в плодовой оболочке, но при сильном поражении проникает в эндосперм, рода *Fusarium* поражает эндосперм на более ранней стадии, что резко снижает кормовые и посевные качества зерна сорго. Лабораторная всхожесть семян зернового сорго снижается в 2011 г., в среднем на 38%, а в 2012 г. – на 15%.

Для выявления и учета альтернариозов сельскохозяйственных культур рекомендуется проводить маршрутные обследования посевов сорго несколько раз за сезон, начиная обычно после появления второй пары настоящих листьев и до созревания.

Можно отметить, что значительно более высокая пораженность зерна зернового сорго, по сравнению с сахарным, обусловлено тем, что семена зернового сорго голые, а сахарного сорго – пленчатые.

Этот признак важно учитывать, при селекции устойчивых к этим заболеваниям сортов. Относи-

тельную устойчивость к альтернариозу проявили сорт зернового сорго Славянка и сахарного сорго Кинельское 4. Пораженность зерна зернового сорго сорта Рось была в высокой степени за все годы исследований. Сорго проявил неустойчивость к грибам рода *Alternaria* и *Fusarium*, это может быть связано с белозерной окраской зерна по сравнению с желтовато-бурой на Премьере и коричневой окраской на Славянке.

Выявлены в лабораторных условиях в семенах сорго несовершенные фитопатогенные грибы *Alternaria*: чаще встречался *A. tenuissima*, реже *A. arborescens*, и группы '*A. infectoria*'.

*Выражаю искреннюю благодарность Ф.Б. Ганнибалу за помощь в определении грибов рода Alternaria.*

#### Список литературы

1. Чулкина В.А. Агротехнический метод защиты растений (экологически безопасная защита растений). Под ред. А.Н. Каштанова. М.: Маркетинг, 2000: 336 с.
2. Каплин В.Г. Фитосанитарный контроль и защита семян зерновых злаковых культур от болезней и вредителей. Учеб.-метод. пособие. 2000: 21-44.
3. Матвиенко Е.В. Влияние сорта, мезоформ рельефа и метеоусловий года на зараженность семян сорговых культур грибами рр. *Fusarium* и *Alternaria* в лесостепи Самарской области. Вестн. Алт. ГАУ. 2013; 7: 39-43.

## СТРУКТУРА СЕВЕРОКАВКАЗСКОЙ И СЕВЕРОЗАПАДНОЙ ПОПУЛЯЦИЙ *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS* ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ДНК-МАРКЕРАМ

*Мироненко Н.В., Михайлова Л.А., Баранова О.А., Коваленко Н.М.  
ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин*

Желтая пятнистость, вызываемая аскомицетным грибом *Pyrenophora tritici-repentis* [(Died.) Drechs., анаморфа *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker] является одной из наиболее вредоносных болезней пшеницы. Эпифитотии этого заболевания наблюдали во многих странах мира. С 80-х гг. она известна в европейских странах (Cook, Yarham, 1989; Leisova et al., 2008). В России желтая пятнистость была зарегистрирована в Краснодарском крае в 1985 г. (Гранин и др., 1989), в настоящее время она широко распространилась практически по всей территории России.

Ранее нами на основании анализа частот вирулентных изолятов к эмпирически подобранным сортам-дифференциаторам, а также величинам клональной фракции изолятов по признаку вирулентности было выдвинуто предположение о существовании в определенной мере изолированных северокавказской и северозападной популяций патогена (Михайлова и др., 2014). Эти популяции различаются также по частоте встречаемости в изолятах гена ToxA, ответственного за синтез токсина

Ptr ToxA, индуцирующего некроз листьев восприимчивых сортов пшеницы: в северокавказской популяции: он обнаружен у 95% некроз индуцирующих изолятов, а в северозападной у 50% изолятов (Мироненко и др., 2015, в печати).

**Цель исследования** – изучение структуры этих популяций патогена с использованием нового типа молекулярных маркеров для микросателлитных последовательностей (SSR = simple sequence repeats) и оценка уровня генетического разнообразия и генного потока между популяциями.

**Материалы и методы.** Материалом исследований послужили образцы популяций патогена, собранные в фазу молочно-восковой спелости с яровой пшеницы на территории северо-запада (Ленинградская, Псковская и Новгородская области) и озимой – на Северном Кавказе (Дагестан, Краснодарский край) в 2013 году. Изоляты гриба выделяли по методу Л.А. Михайловой и сотр. (2002).

Вид гриба идентифицировали по морфологическим признакам конидий и методом молекулярной



идентификации с использованием видоспецифичных к *P. tritici-repentis* затравок:

PtrUniqueF2  
(5'-GGACTTTGGCTTTCTATTGTGC-3')

и

PtrUniqueR2  
(5'-CTTGGTGAATGGTGAAGATGG-3')  
(Antoni et al., 2010).

Для контроля ДНК на способность к амплификации использовали затравки

CHS-79F  
(5-TGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG-3)

и

CHS-354R  
(5-TGGAAGAACCATCTGTGAG AGTTG-3)

на ген «домашнего хозяйства» хитинсинтазы CHS-1 (Andrie et al., 2007). Для анализа полиморфизма микросателлитных локусов использовали праймеры для 12 SSR локусов, картированных на разных хромосомах гриба (Gurung et al., 2013). ДНК изолятов грибов выделяли известным методом (Murray, Thompson, 1980). Условия ПЦР анализа приведены в оригинальных источниках. Для амплификации использовали термоциклер MyCycler™ (BIO-RAD).

Разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1,7%-ных агарозных гелях и в 6%-ном ПААГ, окрашенных бромистым этидием, при напряжении 100 В в течение 3 ч в 0,5 × ТБЕ-буфере. В качестве маркеров молекулярных масс использовали GeneRuler™ 50 п.о. DNA Ladder фирмы «Fermentas».

Авторы SSR-праймеров (Gurung et al., 2013) использовали в своей работе метод анализа продуктов амплификации SSR-локусов в агарозном и полиакриламидном гелях, что значительно облегчает работу по сравнению с использованием капиллярного электрофореза. Для статистического анализа популяций по SSR маркерам построили матрицу признаков по размерам амплифицированных фрагментов ДНК. Фрагменты ДНК одинакового размера считали одинаковыми аллелями для каждого SSR маркера.

Анализ структуры популяций патогена по SSR-маркерам рассчитывали с помощью алгоритма AMOVA (analysis of molecular variance) компьютерной программы Arlequin v. 3.1. Для построения дендрограмм генетического родства изолятов *P. tritici-repentis* использовали метод ближайшего соседа (neighbor-joining – NJ) с использованием программного обеспечения Treecon v.3.1b. Надежность топологии дендрограммы была оценена с помощью бутстрэп-анализа с 1000 повторностей.

**Результаты и обсуждение.** Для анализа популяций были отобраны 9 наиболее полиморфных SSR локусов. Мономорфным оказался локус SSR-14, слабополиморфными – SSR-18 и SSR-13. Всего тестировали 72 изолята, представляющие две географические популяции патогена в России – северокавказскую (39 изолятов) и северозападную (33) на предмет полиморфизма по 9 SSR локусам. Общее число аллелей

для каждого локуса варьировало от 6 до 12 (табл.), их размер находился в пределах 200–410 п.н.

Табл. 1. Распределение аллелей микросателлитных локусов в географических популяциях *P. tritici-repentis* (NW – популяция северо-запада РФ и S – популяция Северного Кавказа).

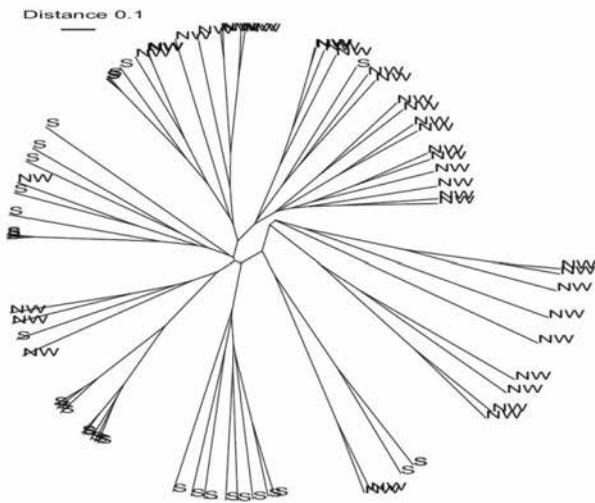
Локус	Число аллелей в популяции		Общее число аллелей
	NW	S	
SSR-15	8	5	8
SSR-06	9	7	9
SSR-12	6	3	7
SSR-09	3	5	5
SSR-16	6	5	6
SSR-05	6	6	6
SSR-07	9	7	11
SSR-01	7	6	9
SSR-03	11	7	12

Большинство тестируемых изолятов представляли собой уникальные гаплотипы по 9 микросателлитным локусам. Из 80 выявленных аллелей 20 оказались специфичными для северозападной популяции и 7 – для северокавказской, что свидетельствует о более разнообразном составе аллелей в северозападной популяции.

По всем проанализированным локусам, за исключением локуса SSR-05 были выявлены аллели специфичные для каждой популяции. Среднее генное разнообразие на локус в обеих популяциях было очень высоким и составило 0,75 для каждой, что значительно превышает опубликованные данные по этому критерию для глобальных популяций Европы (0,44), Австралии (0,36), Южной и Северной Америки (0,38 и 0,43) (Gurung et al., 2013).

Показано, что популяции различаются по частотам отдельных аллелей. Например, аллель SSR-09-220 встречается у 30% изолятов северокавказской популяции и отсутствует в северозападной. Редкая аллель SSR12-400 встречается только у северозападных изолятов. Аллель SSR-09-300 встречается в 2 раза чаще в северозападной, чем в северокавказской популяции. С использованием анализа AMOVA среди 33 северозападных изолятов выявлено 28 гаплотипов, клональная фракция составила 15%, тогда как в северокавказской популяции выявлено 37 гаплотипов и клональная фракция составила 5%.

Считается, что микросателлиты являются наиболее быстро эволюционирующей частью генома грибов. С появлением в базе данных полностью секвенированного генома гриба *P. tritici-repentis* (Manning et al., 2013) появилась возможность анализа полиморфизма микросателлитных локусов в популяцион-



ных исследованиях. SSR-маркеры имеют 2 основных преимущества перед RAPD- и AFLP-маркерами: они кодоминантны, позволяют выявить множественные аллели и одновременно высоко воспроизводимы.

С использованием SSR маркеров было показано, что изоляты *P. tritici-repentis* группируются согласно географическому происхождению, но в то же время эти группы характеризуются одинаковым уровнем генетического разнообразия (Aboukhaddour et al., 2011). Авторы, использовавшие для анализа популяций патогена AFLP маркеры, не обнаружили различий между популяциями разного географического происхождения (Friesen et al., 2005; Leisova et al., 2008). Дифференциация популяций была показана только в глобальном масштабе – между различными континентами – в работе Gurung et al. (2013) на примере изменчивости 12 микросателлитных локусов патогена.

Выявленные в нашей работе различия между популяциями по разнообразию аллельного состава изучаемых SSR-локусов, наличие 34% специфичных для популяций аллелей, существенные различия по 3-м SSR-локусам и кластеризация большинства изолятов по их географическому происхождению позволяют утверждать, что северокавказская и северозападная популяции *P. tritici-repentis* генетически различаются, что подтверждается также выявленными нами ранее различиями по вирулентности (Михайлова и др., 2014).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-00399\_a.

#### Список литературы

1. Cook RJ, Yarham DJ. Occurrence of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* on wheat in England and Wales in 1987. *Plant Pathol.* 1989; 38: 101-2.
2. Leisová L, Hanzalová A., Kucera L. Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis. *J Plant Pathol.* 2008; 90(2): 233-45.
3. Гранин Е.Ф., Монастырская Э.М., Краева Г.А., Кочубей К.Ю. Пиренофороз озимой пшеницы на Северном Кавказе. *Защ. раст.* 1989; 12: 21.

Рисунок. На основе бинарной матрицы различий по 80 аллелям для 9 SSR-локусов была построена дендрограмма генетического родства северозападных (NW) и северокавказских (S) изолятов, на которой показано, что наряду со смешанными кластерами присутствуют кластеры, состоящие только из северокавказских или северо-западных изолятов. Однако статистической поддержки такой кластеризации не было. Достоверные значимые различия между двумя популяциями выявлены для трех микросателлитных локусов – SSR-15, SSR-09 и SSR-07 ( $F_{st}=0,11$ ).

4. Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Популяции *Pyrenophora tritici-repentis* на северном Кавказе и северо-западе России: расовый состав и динамика вирулентности. *Микол. фитопатол.* 2014; 48(6): 397-400.
5. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Михайлова Л.А. Распространение гена некроза ToxA в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России. *Микол. фитопатол.* 2015 (в печати.)
6. Михайлова Л.А., Гульятыева Е. И., Кокорина Н. М. Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repentis*. *Микол. и фитопатол.* 2002; 36(1): 63-7.
7. Antoni EA, Rybak K, Tucker MP et al. Ubiquity of ToxA and absence of ToxB in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Austral Plant Pathol.* 2010; 39: 63-8.
8. Andrie RM, Pandelova I, Ciuffetti LM. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology.* 2007; 97: 694-701.
9. Gurung S, Short DPG, Adhikari TB. Global population structure and migration patterns suggest significant population differentiation among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Fungal Genet Biol.* 2013; 52: 32-41.
10. Murray HG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucl Acids Res.* 1980; 8: 4321-5.
11. Manning VA, Pandelova I, Dhillon B et al. Comparative Genomics of a plant-pathogenic fungus, *Pyrenophora tritici-repentis*, reveals transduplication and the impact of repeat elements on pathogenicity and population divergence. *G3 Genes-Genomes-Genetics.* 2013; 3: 41-63.
12. Aboukhaddour R, Cloutier S, Lamari L, Strelkov SE. Simple sequence repeats and diversity of globally distributed populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canad J Plant Pathol.* 2011; 33: 389-99.
13. Friesen TL, Ali S, Klein KK, Rasmussen JB. Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology.* 2005; 95: 1144-50.

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ АМИНОСУЛЬФИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ЗАЩИТЫ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ФУЗАРИОЗНОЙ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ

Набеева Р.А.<sup>1</sup>, Фархутдинов Р. Г.<sup>1</sup>, Хайруллина Р.Р.<sup>2</sup>, Ямалеева А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, Уфа

<sup>2</sup>Институт нефтехимии и катализа Российской академии наук, Уфа

В последние годы ряд авторов отмечает усиление вредоносности корневых гнилей на зерновых культурах. Одним из опасных заболеваний яровой пшеницы является фузариозная корневая гниль, вызываемая грибом *Fusarium graminearum*, приводящая к поражению первичных, вторичных корней, эпикотила и основания стебля. У растений с большими подземными органами снижается водоснабжение и эффективность усвоения элементов минерального питания, а также уменьшается количество хлорофилла в листьях. Ограничение роста и развития растений связана с поражением эпикотила, что способствует ослаблению связи и ухудшению деятельности первичных и вторичных корней [1].

В последние годы возрос интерес к соединениям, содержащим в своей структуре атомы азота и серы, согласно литературным данным они являются перспективными в качестве эффективных средств защиты растений и занимают одно из лидирующих позиций в производстве препаратов, обладающих противогрибной активностью [2].

В связи с этим с целью их создания в Институте нефтехимии и катализа РАН был осуществлен синтез серосодержащих аналогов «Бисола» и «Купробисана» реакцией аминотилирования тиолов с помощью доступных гем-диаминов под действием катализатора на основе редкоземельных и переходных металлов [3], а затем на их основе получены стабильные водорастворимые соли с щавелевой кислотой и медным купоросом.

Целью исследования являлось установление биологической эффективности и механизмов физиолого-биохимического действия аминотилированных соединений на растениях пшеницы (сорт Башкирская 26 имеющий около 30 % зараженных семян *Fusarium graminearum*) при использовании их в качестве неспецифических протектантов. В спектр механизмов физиолого-биохимического входило изучение их действие на абсорбцию света хлорофилл-белковыми комплексами, гемагглютинирующую активность лектинов, содержание глюкозы и микроэлементов.

Снижение зараженности проростков корневыми гнилями составило от 5 до 80% от контроля. Удалось установить, что физиологическое действие аминотилированных соединений на растительный организм имеет комбинированный характер и складывается из их фунгицидного и геномного влияния на синтетические процессы в клетках. Молекулярные механизмы, обусловившие данный эффект, несомненно, носят гетерогенный характер и в нем однозначно участвуют множество факторов. Так, было выяснено, что аминотилированные соединения влияют на те же этапы метаболизма растений, которые сопряжены с изменением ак-

тивности лектинов мембран хлорофилл-белковых комплексов и оптических свойств листьев. Оптические параметры листьев отражают функциональное состояние хлорофилла и позволяют определить его количество. Обнаружены различия по гемагглютинирующей активности, в оптических характеристиках и содержанию глюкозы в ХБК листьев между образцами, подвергнутые предпосевной обработке различными соединениями.

Проведенные исследования по определению содержания хлорофилла, измеренного путем абсорбции листьями лазерного излучения, показали возможность определения уровня болезнестойчивости. Выявлено, что аминотилированные соединения уменьшают диффузное отражение листьев, при этом происходит снижение показателей лучей, прошедших сквозь листовую пластинку, увеличивается коэффициент абсорбции хлорофилл-белковых комплексов лазерного излучения и снижается развитие листовых болезней (табл.1). Коэффициент диффузного отражения показывает изменение постоянства внутренней структуры листа [4]. Известно, что лектины способны индуцировать или модифицировать ряд процессов, осуществляемых на мембранах различного типа, в том числе и хлоропластах и вызывать изменения в их структурной организации [5]. Согласно литературным данным, существует две гипотезы относительно механизмов такой регуляции. Первая, предполагает взаимодействие лектинов с галактолипидами мембран тилакоидов. При этом меняется текучесть мембран и их конформация, что определяет эффективность передачи электронов от светособирающего комплекса на реакционные центры [5]. Вторая, утверждает взаимодействие между пигмент-лектиновым комплексом тилакоидной мембраны и РБФК. Обе гипотезы базируются на экспериментально доказанном наличии в ССК1 белков с лектиновой активностью, изменения которых коррелировали с изменением некоторых характеристик транспорта электронов и активностью в РБФК. Таким образом, образование лектин-рецепторного комплекса на тилакоидах существенно влияет на процесс фотосинтеза, о чем доказывают полученные данные.

Результаты исследований позволили нам предположить, что аминотилированные соединения, проникая через плазматическую мембрану внутрь клетки, аминотилированные соединения, возможно, выступают в качестве регуляторов транскрипции генов лектинов, образуя с соответствующими белками-рецепторами сложные комплексы, способные достигать участков хроматина в ядре. Снижение активности лектинов находится во взаимосвязи со степенью разрушения листа, которая, в свою очередь, отражает уровень структурных

Таблица 1. Фунгистатическое и иммуностимулирующее действие аминосульфидов на проростки пшеницы.

Препарат	Пораженность растений, %	Поглощение света ХБК, %	Диффузное отражение ХБК, %	Гемагглютинирующая активность, титр	Глюкоза, моль/л
Аминосульфид	31,2	69,42	11,26	1/128	30,36
Контроль	100	60,1	17,85	1/32	10,44

Таблица 2. Влияние аминосульфида на содержание микроэлементов в проростках пшеницы (мг/кг)

Варианты	Cu	Zn	Fe	Mn	Co	Cd
Аминосульфид	16,4±0,1	45,5±3,5	68,8±8,9	38,3±1,5	0,5±0,02	0,019
контроль	9,1±0,6	34,4±2,3	61,1±6,4	36,8±1,4	0,46 ±0,02	0,02

изменений хлорофилл-белковых комплексов под влиянием инфекционных структур гриба. В листьях, пораженных корневой гнилью, нарушается процесс образования пигментных комплексов, наступает депрессия в синтезе хлорофилла и белка, усиливается деградация белков. Возможно, изоформы аминосульфидного рецептора стабилизируют пространственную структуру и участвуют в образовании надмолекулярных белковых комплексов. Усиление активности молекулярных конструкций аминосульфидных систем может быть достигнуто введением дополнительных областей трансактивации.

Как известно, микроэлементы принимают самое активное участие во многих жизненных процессах, происходящих в растениях на молекулярном уровне. Обработка семян некоторыми аминосульфидами привела к увеличению содержания меди, что коррелировало с биологической эффективностью: чем больше этот показатель, тем больше меди накапливалось в проростках (на табл. 2 представлен один из вариантов аминосульфида). Известно, что ионы меди влияют на механизмы, определяющие устойчивость к растениям к грибным заболеваниям [6]. Также нами было установлено, что у проростков обработанных высокоэффективными аминосульфидами происходило накопление железа в проростках пшеницы, которое также способствовало повышению устойчивости к фитопатогену.

Известно, что цинк также относится к микроэлементам необходимым для формирования биологических защитных систем [6]. Накопление микроэлемента наблюдалось у самого высокоэффективного в нашем эксперименте соединения. Марганец, как и железо и цинк, относится к группе необходимых для растений микроэлементов. Он является активатором ферментов, вовлеченных в фотосинтез, дыхание, синтез белков и углеводов [7]. Определение содержания марганца показало на зависимость между количеством поглощенного света и содержанием данного микроэлемента. Количество марганца было прямо пропорционально поглощенному свету ХБК.

Смит и Карсон, обобщив информацию из разных источников, не смогли сделать однозначного вывода о влиянии кобальта на не бобовые растения [8]. На-

сколько благотворно влияние низких концентрации кобальта на метаболизм растений, пока не ясно.

Кадмий считается токсичным элементом для растений, и основная причина его токсичности связана с нарушением энзиматической активности. Сообщалось о подавлении антоцианина и хлорофилловых пигментов в растениях, которые были обработаны кадмием [9]. Известно, что высокие значения кадмия в растениях способствуют предрасположенности к грибным инвазиям [6]. Нами не было установлено влияние аминосульфидов на накопление тяжелого металла (табл. 2).

На основе проведенных исследований мы сделали предположение, что аминосульфиды, также, обеспечивают устойчивость растений пшеницы к корневой гнили через влияние на защитные системы растения посредством образования аминосульфид-лектиновых комплексов [10]. Способность к связыванию лектинов с аминосульфидами объясняется наличием потенциальных сайтов N-гликолизирования, которые позволяют находить маскированные конфигурации углеводов и другие конформации биомолекул, что приводит к реализации полифункциональной и специфичной роли лектинов в формировании механизмов устойчивости сельскохозяйственных культур при взаимоотношениях растения-хозяина и патогена.

Впервые выявлена биологическая эффективность аминосульфидов по обеспечению устойчивости растений к корневым гнилям через влияние на защитные системы, такие как активность лектинов, изменение оптических свойств ХБК, содержание глюкозы, и по механизму действия препараты являются активаторами не только болезнеустойчивости, но и потенциальной продуктивности растений. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения аминосульфидсодержащих препаратов для снижения развития и распространения грибных фитопатогенов.

#### Список литературы

1. Сурин Н.А., Сорокатая Е.И., Громовых Т.И., Зобова Н.В. Необходимость повышения устойчивости к корневым гнилям сортов ярового ячменя в Красноярском крае. Докл. РАСХН. 2001; 3: 16-8.

2. Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г., Сурина О.Б., Максимов И.В. Индикаторы устойчивости растений и активные формы кислорода. III. Влияние бисола-2 и байтана на морфогенез и защитный ответ клеток неморфогенных каллусов пшеницы, инфицированных возбудителем твердой головни. Цитология, 2006; 48(6): 495-9.
3. Хайруллина Р.Р., Акманов Б.Ф., Тюмкина Т.В. и др. N,N,N',N'-тетраметилметандиамин – эффективный реагент для аминометилирования тиолов. Журн. орг. хим. 2012; 48(2): 189.
4. Lisker JS. New physical methods and system for automatic determination of state of plant and seeds. In: Automatic control of food and biological processes. Paris: Elsevier. 1994: 75-82.
5. Жесткова И.М., Молотковский Ю.Г. Влияние лектина из семян сои на структуру и энерготранспортирующие реакции хлоропластов. Уч. зап. Тартуского ун-та. 1989; 2(870): 108-13.
6. Kabata-Pendias A. Soil factors affecting phyto availability of trace elements. Macro and Trace Elements. 20. Workshop 2002. Friedrich Schiller Univ, Jena. 2002: 54-61.
7. Mukhopadhyay MJ, Sharma A. Manganese in cell metabolism of higher plants. Bot Rev. 1991; 57: 117-49.
8. Smith IC, Carson BL. Trace metals in the environment. Ann Arbor Sci Publ, Ann Arbor, MI. 1981, 6: 1202 p.
9. Baszynski T, Wajda L, Krol M et all. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. Physiol. Plant 1980; 4: 365.
10. Ямалеева А.А., Мустафина М.К. Углеводная специфичность и N-концевые аминокислоты лектинов растений. III Съезд биохим. общ. СПб. 2002: 322-3.

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS* НА ЗЕРНЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Нечай Н.Л.

Казахский НИИ переработки сельскохозяйственной продукции, Астана

Проблема микотоксикозов сельскохозяйственных животных и человека находится в центре внимания. Виды грибов рода *Aspergillus* являются одними из самых распространенных во всем мире. Они мало избирательны по отношению к абиотическим условиям роста, могут расти в широком диапазоне температуры (6–55 °С) и при относительно низкой влажности. Свойственная грибам этого рода широкая экологическая амплитуда дает возможность для развития тех или иных видов при различных условиях окружающей среды. Широкий набор ферментов позволяет аспергиллам осваивать самые разнообразные субстраты, а антибиотические вещества, продуцируемые ими, обеспечивают успешную борьбу с возможными конкурентами [1].

Виды рода *Aspergillus* способны производить микотоксины: афлатоксины, охратоксины, стеригматоцистин (СТС), циклопьязониновую кислоту, патулин и др. [2–4].

Правильная идентификация видов в популяции *Aspergillus* является важным, поскольку близкородственные виды могут сильно отличаться по токсинообразованию, что приводит к различным рискам для сельскохозяйственной и пищевой продукции [5].

Исследование генетических основ продуцирования токсина штаммами *Aspergillus* позволяют разделить популяции на токсин-образующие и нет.

В научных работах исследователи приводят данные, доказывающие, что продуцирование токсинов, их количество и разнообразие может зависеть от географического распространения видов *Aspergillus*, субстрата выделения, вида сельскохозяйственной культуры. Доля токсигенных штаммов в составе по-

пуляции одного вида может изменяться в зависимости от агроэкологических зон [5-9].

Информация о плотности популяции токсин-образующих грибов, в том числе продуцентов афлатоксинов, имеет существенное значение для оценки степени загрязнения зерна микотоксинами, а также разработки способов снижения контаминации [10].

Высокая контаминация зерна и значительное распространение дают все основания считать проблему изучения эколого-географической популяции токсинообразующих грибов рода *Aspergillus* актуальной.

Согласно Конвенции о биологическом разнообразии, актуальным является выделение изолятов различных видов грибов рода *Aspergillus* для сохранения генофонда микроорганизмов, как объектов биотехнологических исследований.

С целью проведения мониторинга распространения микроскопических грибов и пополнения коллекции микроорганизмов ТОО «Казахский НИИ переработки сельскохозяйственной продукции» новыми штаммами в период с 2012 по 2014 гг. было проанализировано 163 пробы зерна различных культур, возделываемых на территории Казахстана. Пробы зерна отбирались на предприятиях АПК Казахстана в соответствии с ГОСТ 13586-83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб».

В результате мониторинга численности микроскопических грибов на поверхности зерна (пшеницы, ячменя, овса, ржи, проса, кукурузы, рапса, льна, сои, подсолнечника, гороха, нута, сафлора, сорго) было установлено, что их количество варьировало в пределах 0,03 – 51,5 тыс. КОЕ/г. Наиболее часто на поверхности зерна различных культур присутство-

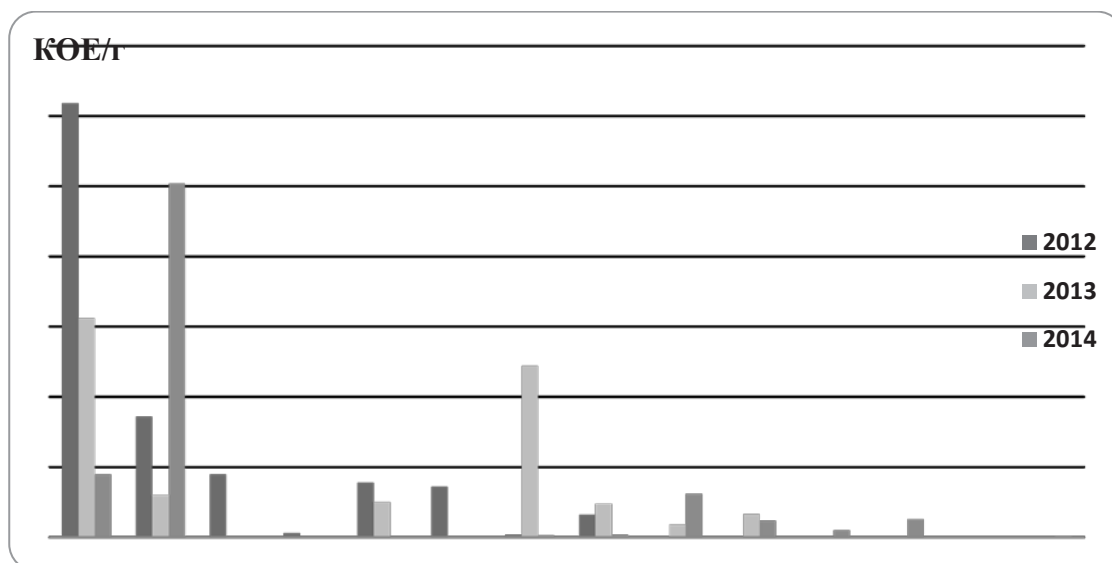


Рисунок 1. Численность грибов рода *Aspergillus* на поверхности зерна различных культур.

вали представители родов: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Acremonium*, *Talaromyces*.

Среди микроскопических грибов в период хранения зерна преобладали представители рода *Aspergillus*, их численность варьировала в пределах от 0,001 до 39,3 тыс. КОЕ/г (рис. 1). Высокая численность грибов рода *Aspergillus* отмечалась на зерне пшеницы и ячменя – до 30 тыс. КОЕ/г.

Анализ зерна различных культур на наличие желто-зеленая флуоресценция (ЖЗФ), которая свидетельствует о наличии афлатоксина, показал, что, частота обнаружения ЖЗФ-зерен составляла 48,9 % (46 проб из 94 исследованных). В основном ЖЗФ отмечалось в пробах зерна кукурузы, пшеницы, ячменя, ржи. Идентификация позволила установить следующие виды грибов рода *Aspergillus* на зерне различных культур, возделываемых в Казахстане: *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. candidus*.

На зерне пшеницы среди микроскопических грибов частота встречаемости *A. flavus* в отдельных случаях превышала 50%. Следовательно, широкое распространение грибов рода *Aspergillus* на зерне различных культур обуславливает накопление микотоксинов, что может оказать негативное влияние на качество пищевых продуктов.

#### Список литературы

1. Amare MG, Keller NP. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genet Biol.* 2014; 66: 11-8.
2. Keller LAM, González PML, Kellerb KM. et al. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *J Stored Prod Res.* 2013; 52: 42-7.
3. Zhao X, Schaffner DW, Yue T. Quantification of aflatoxin risk associated with Chinese spices: Point and probability risk assessments for aflatoxin B1. *Food Control.* 2013; 33: 366-77.
4. Golge O, Hepsag F, Kabak B. Incidence and level of aflatoxin contamination in chilli commercialised in Turkey. *Food Control.* 2013; 33: 514-20.
5. Commission of the European communities (2006). Commission regulation (EC) N°1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official J Eur Union*, L364, 5–24.
6. Suscaa A, Morettia A, Steaa G et all. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. *Intern J Food Microbiol.* 2014; 188(1): 75-82.
7. Ezekiel CN, Atehnkenga B, Odebodec AC, Bandyopadhyaya R. Distribution of aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* in commercial poultry feed in Nigeria. *Intern J Food Microbio.* 2014; 189(17): 18-25.
8. Cardwell KF, Cotty PJ. Distribution of *Aspergillus flavus* section *Flavi* among soils from the four agroecological zones of the Republic of Bénin, West Africa. *Plant Dis.* 2002; 86: 434-9.
9. Soares C, Rodrigues P, Peterson SW et all. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia.* 2012; 104: 682-97.
10. Monyoa ES, Njorozea SMC, Coeb R et all. Occurrence and distribution of aflatoxin contamination in groundnuts (*Arachis hypogaea* L) and population density of Aflatoxigenic *Aspergilli* in Malawi. *Crop Protect.* 2012; 42(S): 149-55.

## МИКРОМИЦЕТНЫЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМОВ НА КОРНЕВОЙ СИСТЕМЕ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ В ПОСЕВАХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

Осетрова Е.П.<sup>1</sup>, Марьин Г.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Марийский НИИСХ, Руэм, Республика Марий Эл

<sup>2</sup>Марийский государственный университет, Йошкар-Ола

Сорные растения, произрастающие на сельскохозяйственных угодьях, оказывают на возделываемые культуры прямое или косвенное отрицательное влияние. Прямое неблагоприятное воздействие сорняков выражается в том, то они непосредственно ухудшают условия жизни культурных растений, перехватывая у них влагу, элементы минерального питания и свет [3].

В формировании инфекционного потенциала почвы участвуют и сорные растения, так как на со-

рняках развиваются патогены, способные в определенных условиях поражать культурные растения [1]. При этом многоядные организмы-патогены, развиваясь на сорняках или других дикорастущих растениях, могут быть источниками возникновения и эпифитотических заболеваний на возделываемых растениях [2].

Для определения микромицетного состава корней сорных растений был проведен микробиологический анализ (табл. 1).

Таблица 1. Видовой состав микромицетов на корнях сорных растений посевов яровой пшеницы, КОЕ тыс шт. живых начал/г почвы, 2009–2011 гг.

№	Виды сорных растений	Вьюнок полевой			Хвощ полевой			Осот полевой			Одуванчик			Всего
		В	К	Д	В	К	Д	В	К	Д	В	К	Д	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.	<i>Alternaria atrans Gibson</i>	0	0	0	0	1,1	0	0	3,3	0	0	0	0	4,4
2.	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.	1,1	1,1	0	2,2	0	1,1	0	0	0	0	0	0	5,5
3.	<i>Aspergillus repens</i> D.B.	1,1	1,1	0	0	2,2	1,1	1,1	1,1	1,1	0	2,2	0	11
4.	<i>Bipolaris sorokiniana</i> Shoem.	0	0	0	1,1	1,1	0	1,1	0	1,1	0	1,1	0	5,5
5.	<i>Penicillium brevi-compactum</i> Dierckx	5,5	0	0	2,2	0	2,2	0	1,1	0	0	0	0	11
6.	<i>Penicillium expansum</i> Link	8,8	0	0	0	0	2,2	0	0	0	0	0	0	11
7.	<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	7,7	0	2,2	3,3	1,1	4,4	0	0	0	0	0	0	18,7
8.	<i>Penicillium lanosum</i> Westl	4,4	0	3,3	3,3	0	2,2	1,1	3,3	5,5	0	4,4	0	27,5
9.	<i>Rizopus nigricans</i> Ehr.	0	0	0	1,1	2,2	0	0	0	0	0	1,1	0	4,4
10.	<i>Trichoderma lignorum</i> Tode	0	1,1	1,1	0	1,1	2,2	1,1	0	1,1	0	1,1	0	8,8
Всего		28,6	3,3	6,6	13,2	8,8	15,4	4,4	8,8	8,8	0	9,9	0	107,8

Примечание: В – 46,2 К – 30,8 Д – 30,8 (всего грибов, КОЕ тыс шт. живых начал/г почвы), где В – вспашка, К – поверхностная обработка: культивация, Д – поверхностная обработка: дискование.

Таблица 2. Заселенность корней сорных растений микромицетам

Обработка почвы	биомасса сорных растений, г/м <sup>2</sup>	Число микромицетов, КОЕ тыс шт. живых начал/ г почвы			
		патогены	сапротрофы	всего	Сапротрофы/ патогены
Вспашка	9,4	2,2	44,0	46,2	20,0
Поверхностная обработка: культивация	17,8	6,6	24,2	30,8	3,7
Поверхностная обработка: дискование	13,0	1,1	29,7	30,8	27,0

В результате исследований установлено, что больше всего микромицетов находится на вспашке полем –  $38,5 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы (табл. 1). Патогены отсутствуют на всех вариантах обработки почвы. Причем на вспашке находится наибольшее число микромицетов –  $28,6 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы, что в 8,7 раз больше, чем на поверхностных обработках: культивации и в 4,3, чем на дисковании.

Среди сапротрофов преобладающими являются – *Penicillium* spp. Число микромицетов на хвоще составляет –  $37,4 \times 10^3$  КОЕ. живых начал/г почвы. При культивации грибы *A. atrans* Gibson –  $1,1 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы. *B. sorokiniana* Shoem. при вспашке и культивации –  $1,1 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы. В итоге наибольшее число патогенов находится при культивации. Больше всего микромицетов хвоща находится при дисковании –  $15,4 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы, что в 1,2 выше, чем при вспашке и – 1,8 раз, чем при культивации.

На корнях осота наибольшее количество микроорганизмов находится и при культивации, и при дисковании ( $8,8 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы), что в 2 раза выше, чем на вспашке. *A. atrans* Gibson в количестве  $3,3 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы находится при культивации, *B. sorokiniana* Shoem., при вспашке и дисковании –  $1,1 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы. Следовательно, количество патогенов на осоте составляет  $5,5 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы. При культивации корней одуванчика –  $9,9 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы. Из них *Bipolaris sorokiniana* Shoem. составляет  $1,1 \times 10^3$  КОЕ. живых начал/г почвы.

Таким образом, среди сорных растений, наиболее заселен микромицетами вьюн полевой, количество которого выше в 4 раза, чем на одуванчике. Патогены в наибольшем количестве встречаются на осоте ( $5,5 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы). На вьюне полевом не было ни одного патогена. При вспашке на корнях вьюна полевого отмечается наибольшее количество микромицетов, что в 8,7 раз выше, чем при культивации.

Грибы *A. atrans* Gibson были обнаружены при культивации у хвоща и осота ( $4,4 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы), у *B. sorokiniana* Shoem. – при вспашке

( $2,2 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы) у хвоща и осота при культивации ( $1,1 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы) хвоща, дисковании ( $1,1 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы) осота. Следовательно, наибольшее количество *A. atrans* Gibson характерно для поверхностной обработки: культивации, а *B. sorokiniana* Shoem. – для вспашки. Грибы рода *Fusarium* spp. не были обнаружены ни на одном корне сорного растения.

В дальнейшем число микромицетов разделили отдельно на патогенов и сапротрофов в зависимости от обработки почвы и биомассы растений (табл. 2).

Биомасса растений на вспашке наименьшая, а число сапротрофов наибольшее, как и общее количество микромицетов. Так, масса сорных растений на вспашке в 1,9 раза меньше чем при культивации и в 1,4 раза – при дисковании. Сапротрофов больше в 1,8 раз, чем при поверхностной обработках (культивация) и в – 1,5 раз при дисковании. При культивации биомасса сорных растений наибольшая ( $17,8$  г/м<sup>2</sup>), как и число патогенов, но число сапротрофов – наименьшее ( $24,2 \times 10^3$  КОЕ живых начал/г почвы). Патогенов в наименьшем количестве встречается при дисковании, что в 6 раз меньше чем при культивации и в 2 раза, – чем при вспашке.

Значит, среди обработок почвы наименее благоприятной является поверхностная обработка в виде культивации. Соотношение сапротрофы/патогены составляет 3,7, что в 7,3 раза меньше чем на поверхностной обработке: дискование и в 5,4 раз, чем на вспашке. Наиболее благоприятной среди обработок почвы является дискование, но основной недостаток – это засоренность посевов, которая ниже, чем при культивации только в 1,4.

#### Список литературы

1. Коршунова А. Ф., Чумаков А.Е., Щекочихин Р.И. Защита пшеницы от корневых гнилей. Л.: Колос, 1976: 184 с.
2. Марьина-Чермных О.Г. Защита зерновых культур: экологическое обоснование. Монография. Йошкар-Ола. 2005: 216 с.
3. Туликов А.М. Сорные растения и борьба с ними. М.: Моск. раб. 1982: 157 с.



## ГРИБЫ РОДА *FUSARIUM* НА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУРАХ: ВИДОВОЙ СОСТАВ И ВНУТРИВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

Овсянкина А.В.

ВНИИ фитопатологии, Большие Вязёмы

Грибы рода *Fusarium* относятся к несовершенным грибам: класс Deuteromycetes, порядок Moniliales, семейство Tuberculariaceae [1]. Фузариозные возбудители повсеместно встречаются на посевах зерновых культур и в течение всего вегетационного сезона вызывают различные заболевания зерновых культур: снежную плесень у озимых культур, корневые гнили, листовые пятнистости, фузариоз колоса у озимых и яровых культур [2–8]. По характеру взаимоотношений с растениями виды *Fusarium* относятся к факультативным паразитам. [9]. Виды *Fusarium*, вызывающие корневые и прикорневые гнили, могут вызывать и фузариоз колоса [10], однако сильное поражение фузариозом колоса в разных странах чаще связывают с видами *F. graminearum* и *F. culmorum* [11, 12].

Необходимо отметить, что род *Fusarium* – наиболее вариабельный из родов в классе *Deuteromyces*, и для его видов характерна вся гамма переходных форм от сапрофитов до факультативных паразитов. У многих видов *Fusarium* имеется только конидиальное спороношение, которое разнообразно по морфологии и способу образования конидий (макро- и микроконидии). Некоторые виды этого рода имеют половую (сумчатую) стадию. У отдельных видов *Fusarium* в мицелии (а иногда в конидиях) образуются хламидоспоры – одноклеточные части гиф, обособляющиеся от остальных клеток толстой оболочкой; на растительных остатках в тканях субстрата образуются склероции – тесное скопление гиф. В таком покоящемся состоянии гриб зимует в почве, на растительных остатках, переживает неблагоприятные погодные условия [13, 14].

Монокультуры, севообороты с короткими ротациями, высокие нормы удобрений и другие приемы интенсификации растениеводства, внедряемые в последние годы в России без необходимой научной проработки, подняли огромный пласт фитосанитарных проблем. Для зерновых культур – это усиление развития корневых и прикорневых гнилей [15]. Расширились ареалы и зоны вредоносности фузариевых фитопатогенных грибов – возбудителей фузариоза колоса (*Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. langsetiae* и др.), продуцирующих опасные токсины Т-2, ДОН, зеараленон и др.) [16–19]. Наибольшую опасность представляют сформировавшиеся в агроценозах патоккомплексы видов токсинообразующих грибов фузариев, альтернарии, аспергиллов, пенициллов и мукора. В среднем, потери от поражения этими патогенами и их микотоксинами составляет 80% всех потерь зерна в процессе его производства, хранения и реализации [20].

Проявления фузариозных грибов зависят от видового и внутривидового разнообразия возбудителей, от их специфической физиологической ак-

тивности (патогенности, токсичности), от уровня инфекционной нагрузки на растение-хозяина, от физиологического состояния растений, от степени устойчивости или толерантности растения-хозяина, а также от погодных условий, в которых развивались возбудители.

**Цель исследований** – изучение видового состава фузариозных грибов, вызывающих заболевания зерновых культур и оценка внутривидового разнообразия возбудителей по токсинообразующей способности, морфолого-культуральным и патогенным свойствам.

**Методика.** Для оценки фитосанитарного состояния посевов и определения видового состава возбудителей ежегодно (1995–2014 гг.) проводились выборочные маршрутные обследования посевов зерновых культур на европейской территории России. За образец или пробу принимали не менее 10 растений одного сорта, собранных на одном участке поля.

С целью выделения фузариозных грибов в чистую культуру с каждого сортообразца закладывали до 100–150 фрагментов поражённой ткани на агаризованную питательную среду и выращивали их в течение двух недель при температуре 18–22 °С. Идентификацию видов осуществляли методом микроскопирования по морфологии конидий, учитывая частоту встречаемости видов [1].

Внутривидовую изменчивость возбудителей изучали с использованием монокультуры, полученных методом клонирования [21]. Внутривидовые особенности *Fusarium* – по токсинообразующей способности и патогенным свойствам – изучали в лабораторных и полевых условиях [22]. Для ПЦР исследований были выбраны типовыми представители своих групп по месту выявления, биохимическим, морфологическим и физиологическим свойствам, вирулентности. Использовали также молекулярно-генетические методы, включая ПЦР-анализ с арбитражными праймерами (ISSR b AP-PCR), проведен также анализ последовательности фрагмента гена фактора элонгации трансляции 1-альфа.

**Результаты.** В результате микологического анализа около 500 сортообразцов зерновых культур (рожь, пшеница, ячмень, овес), выделено в чистую культуру на картофельно-декстрозный агар и идентифицировано более 40000 изолятов грибов, в том числе рода *Fusarium*, вызывающих снежную плесень, корневую гниль, фузариоз колоса.

Фузариозные грибы в течение всего вегетационного периода активно поражают растение-хозяина, нанося существенный урон урожаю. Весной на посевах озимых зерновых культур повсеместно встречается «снежная плесень», которая является вредоносным заболеванием, особенно для ржи. Поражение

посевов озимой ржи снежной плесенью в различных регионах связывают в основном с несколькими видами. Вид *Microdochium nivale* (Fries) Samuels & Hallet) (= *Fusarium nivale* (Fr.) Ces.) доминировал во всех обследованных регионах (до 90%). Вид *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc., встречался в Северо-Восточном и Центральном регионах, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., – в Центральном-Черноземном регионе (до 10%).

Поражение растений снежной плесенью озимых зерновых культур бывает достаточно сильным, до 70–90%. Гибель растений от данного заболевания составляет от 25–30%. Эпифитотии снежной плесени наблюдаются каждые 2–3 года. Инфекция гриба сохраняется на растении-хозяине в течение длительного времени. Неоднократно при определении видового состава возбудителей с образцов, собранных в течение всего вегетационного периода, выделяли *M. nivale*. Это характерно для озимых, выращенных в Северо-Восточном регионе России. Например, в 1997, 2000, 2005 гг. при микологическом анализе сортообразцов озимой ржи, собранных в фазу цветения в Кировской области, из корневой системы растений и стебля выделялся гриб *M. nivale*. Отмечены также случаи поражения *M. nivale* колоса и зерна.

По результатам многолетнего мониторинга фитосанитарного состояния посевов определена видовая структура популяций возбудителей корневой гнили. Корневую гниль зерновых колосовых культур в различных регионах Российской Федерации вызывал комплекс патогенов, преобладающее положение в котором занимал род *Fusarium*. Идентифицированы виды: *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans., *F. heterosporum* Nees., *F. sporotrichiella* nom. nov. Bilai., *F. nivale* (Fr.) Ces., *F. gibbosum* App. et Wr. emend Bilai., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. moniliforme* Sheld., *F. sambucinum* Fuck., *F. semitectum* Berk. et Rav., *F. redolens* Wr., *F. solani* (Mart.) App. et Wr., *F. javanicum* Koord., *F. lateritium* Nees. Одновременно были выявлены возбудители *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem и *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. Ito, *Alternaria* sp., сопутствующие сапрофитные грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rizopus*, *Gliocladium*, *Trichothecium* и полусапрофитные бактерии сем. Enterobacteriaceae (*Ervinia*, *Bacillus*). Частота встречаемости видов в изученных регионах была различной. Болезнь внешне проявляется в виде побурения корней, подземного междоузлия, узла кущения, основания стебля и влагалища нижних листьев. Пораженные растения теряют свою прочность, становятся рыхлыми, хрупкими и обламываются при выдергивании растений из почвы. Продуктивность больных стеблей снижается на 50–70%. Потери урожая от корневой гнили ежегодно составляют 10–15%.

Наиболее распространённым в патогенных комплексах всех регионов России являлся вид *F. culmorum* и *F. oxysporum*, отличающиеся большей адаптивностью к абиотическим факторам. Соотношение видов в различных регионах Российской Федерации было различным. Так, например, в Волго-Вятском, Нижневолжском и Центральном реги-

онах на посевах зерновых чаще встречаются виды *F. culmorum* (до 30%), *F. oxysporum* (до 20%); в Центральном-Черноземном и Средневолжском регионах – *F. heterosporum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichiella*, *F. gibbosum*. Озимые зерновые культуры интенсивней поражаются фузариозными возбудителями, которые активно развиваются после перезимовки в холодный и влажный период. Яровые зерновые, особенно ячмень, чаще поражается возбудителями *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem и *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. Ito. За последние 5–8 лет возросла частота встречаемости в популяциях грибов рода *Alternaria*. Овес менее подвержен поражению фузариозными возбудителями.

Наблюдения показали, что соотношение возбудителей в популяциях корневой гнили зависят не только от растения-хозяина, но в большей степени от климатических и эдафических факторов. Удалось проследить изменения в соотношении видов в популяции в зависимости от эколого-географической зоны и погодных условий вегетационного периода [23].

Следующим этапом распространения фузариозной инфекции на посевах зерновых культур является поражение листовой поверхности и колоса. Конидии фузариозных грибов распространяются ветром на достаточно большие расстояния. Попав на колос во время или вскоре после цветения при теплой погоде и повышенной влажности, споры фузариозных грибов распространяются по чешуям и другим частям колоса. Фузариоз колоса так же вызывается комплексом патогенов. Потери урожая при развитии инфекции могут достигать 5–30%. Фузариозные зерна обычно легковесные и плохого качества, теряют жизнеспособность. Поражения зерна фузариозными возбудителями приводит к накоплению токсических метаболитов (микотоксинов), опасных для здоровья людей и животных. Основные признаки, характеризующие фузариоз зерна: пораженные зерна щуплые, морщинистые с вдавленной глубокой бороздкой и заостренными бочками; поверхность зерна обесцвеченная (белесая) меловидная, без блеска; эндосперм рыхлый, крушащийся; низкая стекловидность зерна или полная ее потеря; в бороздке и особенно в зародышевой части зерна имеется паутинообразный налет мицелия гриба, белого или розового цвета и подушечки скопления конидий; зародыш зерна нежизнеспособный, на срезе темного цвета.

Большинство видов *Fusarium* являются продуцентами токсинов ДОН, 3-ацетил-ДОН, 15-ацетил-ДОН, 7-дезоксид-ДОН, накапливаются токсины из группы бутенолидов 5-ацетамидо-2(5Н) фуранона (5-ААФ). Отравление человека и животных фузариозным зерном ведет к серьезным заболеваниям. Изучение внутривидовой изменчивости наиболее распространенных и вредоносных в патогенном комплексе фузариозных возбудителей *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. heterosporum*, *F. nivale* позволило разделить каждый вид по морфолого-культуральным признакам на морфотипы, выявить наиболее распространенные формы грибов и определить уровень

гетерогенности каждого вида. Наиболее изменчивым по морфолого-культуральными признакам является вид *F. culmorum*.

Колонии природных изолятов гетерогенны и, как правило, состояли из разных типов мицелия, поэтому тип колоний определяли по преобладающему признаку. Виды *F. oxysporum*, *F. heterosporum*, *M. nivale* характеризуются меньшей изменчивостью морфоло-культуральных свойств колоний. В результате изучения токсичности фильтрата культуральной жидкости (ФКЖ) разных по морфолого-культуральным особенностям штаммов подобрана оптимальная концентрация ФКЖ позволяющая дифференцировать культуры гриба по уровню токсиногенности и сорта ржи по устойчивости к метаболитам. Наиболее дифференцированное воздействие на растения оказывал 5-суточный фильтрат культуральной жидкости с концентрацией 25 %.

Внутри вида *F. culmorum* и *M. nivale* идентифицированы штаммы с различным уровнем токсинообразующей способности. Проведена дифференциация изолятов на группы с разным уровнем патогенности: слабо, средне и высокопатогенные. Выявлена корреляция между патогенными свойствами культур гриба и их токсинообразующей способностью. Выявлено содержание токсинов дезоксиниваленона (ДОН) и его ацетильных производных (Ас-ДОН) в фильтратах культуральной жидкости *F. culmorum* и *M. nivale*.

Видовая принадлежность штаммов была подтверждена генетическим анализом по последовательности фрагмента гена фактора элонгации трансляции 1-альфа. Сравнение результатов группировки штаммов по последовательности фрагмента гена фактора элонгации трансляции 1-альфа и сходства штаммов по данным ПЦР-фингерпринта показывает, что для ряда видов отмечается высокая внутривидовая изменчивость, вероятно, связанная с процессами генетической адаптации к изменяющимся экологическим условиям и смене растения-хозяина.

**Выводы.** Выявлен и изучен видовой состав возбудителей фузариоза, поражающих зерновые культуры в основных зонах их возделывания. Наиболее распространенными в патогенном комплексе фузариозных возбудителей являются виды: *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. heterosporum*, *F. gibbosum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichiella*. Отмечена высокая внутривидовая изменчивость грибов рода *Fusarium* по морфолого-культуральными признаками, токсинообразующей способности и патогенным свойствам, что необходимо учитывать при изучение видовой состава патогенного комплекса возбудителей и при создании искусственных инфекционных фонов для иммунологических исследований.

#### Список литературы

1. Билай В.И., Курбатская З.А. Определитель токсинообразующих микромицетов. Киев. 1990: 236 с.
2. Шипилова Н.П., Гагкаева Т.Ю. Фузариоз колоса и зерна в северо-западном регионе России. Защ. раст. 1992; 11: 7-8.
3. Гагкаева Т.Ю. Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур. Защ. и карант. раст. (прилож.). 2011; 5: 70-119
4. Жалиева Л.Д. Грибы рода *Fusarium* в агроценозе озимой пшеницы в условиях Краснодарского края. Паразитизм и симбиоз. Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2010; 1: 101-4.
5. Заушинцева А.В., Бражников П.Н., Сайнакова А.Б. Болезни озимой ржи в таежной зоне Западной Сибири. Вестн. АГАУ. 2011, 2(76): 35-9.
6. Лухменев В.П. Защита зерновых культур от вредителей, болезней и сорняков на Южном Урале, Оренбург. 2000.
7. Платонова Ю.В., Сурин Н.А. География грибов рода *Fusarium*. Фундам. исслед. 2004; 4: 95-7.
8. Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю., Буркин А.А., Кононенко Г.П. Зараженность грибами рода *Fusarium* и контаминация микотоксинами зерна овса и ячменя на севере Нечерноземья. Сельскохозяйств. биол. 2009; 6: 89-93.
9. Билай В. И. Фузариоз. Киев, 1977: 433 с.
10. Соколова Г.Д. Физиолого-биохимические особенности взаимодействия фитопатогенных видов *Fusarium graminearum* и *F. culmorum* с зерновыми культурами. В сб.: «50 лет на страже продовольственной безопасности страны». Большие Вяземы, 2008: 415-29.
11. Kang Z, Buchenauer H. Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. Eur J Plant Pathol. 2002; 108(7): 653-60.
12. Wanyiru WM, Kang ZS, Buchenauer H. Importance of cell-wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. Eur J Plant Pathol. 2002; 108(8): 803-10.
13. Горленко М.В. О некоторых направлениях эволюции фитопатогенных грибов. Микол. фитопатол. 1995; 29(1): 87-94.
14. Билай В. И. Основы общей микологии. Киев, 1989.
15. Санин С.С. Контроль болезней сельскохозяйственных растений – важнейший фактор интенсификации растениеводства, Вестн. защ. раст. 2010; 1: 3-14.
16. Павлюшин В.А. Фитосанитарные биотехнологии для стабилизации зерновых агробиоценозов. Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем». Краснодар. 2012; 7: 23-6.
17. Kononenko G, Burkin A. T-2 production as a possible taxonomy marker for *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium poae* species. Proc. Eur Fusarium Sem 19–22 Sept 2006 (Book of abstracts). Netherlands. 2006: 51.
18. Thrane U, Adler A, Clasen PE et al. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. Int J Food Microbiol. 2004; 95: 257-66.
19. Mesterhazy A. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* in resistance to *Fusarium* head blight. Eur J Plant Pathol. 2002; 108: 675-84.

20. Кузнецова Е.В., Монастырский О.А. Современные и перспективные биотехнологии защиты зерна злаковых культур в почве, колосе и при хранении от поражения видами токсиногенных грибов и загрязнения микотоксинами. Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем». Краснодар. 2012; 7: 393-97.
21. Овсянкина А.В., Коваленко Е.Д. Рекомендации по оценке и отбору исходного материала для создания сортов ржи, устойчивых к корневой гнили М.: Россельхозакадемия. 2004: 24 с.
22. Овсянкина А.В., Казакевич Г.Д. и др. Модифицированный экспресс-метод лабораторной оценки устойчивости зерновых культур к возбудителям корневой гнили. В: «Новые методы селекции и создание адаптивных сортов сельскохозяйственных культур: результаты и перспективы». Тез. докл. науч. сессии. Киров. 1998: 126-27
23. Карты распространения вредных организмов, патотипов, генов вирулентности возбудителей болезней, фитофагов, энтомопатогенов на территории Российской Федерации. Под ред. В.А. Захаренко. М. 2003: 64 с.

## ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ В АГРОЦЕНОЗАХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ

*Герасимов С.В., Овсянкина А.В.*

*ВНИИ фитопатологии. Большие Вязёмы. Московская область*

Грибы и бактерии, находящиеся в почве, проникающие и развивающиеся на вегетационных органах зерновых культур, активно влияют на фитосанитарное состояние биоценоза хлебного поля и во многом определяют величину урожая и его безопасность. Многолетние обследования посевов зерновых культур во Владимирской области в 2005–2014 гг. позволили определить видовое разнообразие и степень распространения возбудителей болезней зерновых культур, их вредоносность, выделить группу наиболее опасных возбудителей, вызывающих эпифитотии и значительные потери урожая и сохраняющихся в почве и на растительных остатках.

К ним можно отнести гельминтоспориозные и фузариозные заболевания зерновых. Процентное соотношение распространения и развития возбудителей болезней варьировало в зависимости от климатических условий вегетационного периода, культуры, сорта. Пониженные температуры и бесснежный осенне-зимний период приводили к вымерзанию посевов озимых зерновых культур (пшеница,

рожь, тритикале). Распространение снежной плесени (*Fusarium nivale* (Fr.) Ces. = *Microdochium nivale* (Fries) Samuels & Hallet) на посевах озимых зерновых культур в 2005, 2007 гг. достигало 50–70%.

Основу патогенного комплекса пшеницы составляют бурая ржавчина (*Puccinia recondite* Desm), септориоз (*Septoria nodorum* Berk), мучнистая роса (*Erysiphe graminis* March). Бурая ржавчина распространена повсеместно, встречается ежегодно и её доля в популяции может составлять до 50%. За период наблюдения пик распространения и развития бурой ржавчины был отмечен в 2005 и 2010 гг. Доля септориозных заболеваний в популяции составляла от 5 до 30%. В 2005, 2007 гг. распространение септориоза на посевах зерновых культур достигало 30–50%, однако развитие на посевах пшеницы составило не более 10%. Отмечено ежегодное незначительное (до 10–15%) распространение мучнистой росы. На ячмене патогенный комплекс представлен сетчатой пятнистостью (*Drechslera teres* (Sacc) Shoem Ito, темно-бурой пятнистостью (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc)

Таблица 1. Частота встречаемости грибов и бактерий в ризосфере зерновых культур.

Культура	Частота встречаемости (%) грибов и бактерий в ризосфере зерновых культур-(2005–2014 гг.)				
	<i>Fusarium</i>	<i>Bipolaris</i>	<i>Alternaria</i>	Другие грибы	Бактерии
озимая рожь	50-60	5-10	5-10	5-10	1-5
озимая пшеница	40-50	30-40	10-15	5-10	1-5
озимая тритикале	10-20	10-20	10-20	5-10	1-5
яровой пшеницы	30-40	30-40	10-15	5-10	1-5
ярового ячменя	40-50	40-50	10-15	5-10	1-5
ярового овса	10-20	10-20	10-20	5-10	15-25
яровой тритикале	10-20	10-20	10-20	5-10	1-5

Таблица 2. Микробиологический анализ почвы, вегетативных органов и колоса зерновых культур (2014 г.)

Встречаемость микроорганизмов				
В корне	На узле кущения	В стебле	Колосе	В почве, %
<b>Пшеница</b>				
Mucor spp. Penicillium spp Verticillium albo-atrum F. oxysporum F. solani Mycelia sterilia Alternaria tenuis Pseudomonas syringae Bacillus sp. Pseudomonas sp.	Mucor spp. F. sambucinum Alternaria tenuis F. solani Verticillium albo-atrum Mycelia sterilia Pseudomonas syringae Bacillus sp. Pseudomonas sp.	Mucor spp. Alternaria tenuis Bipolaris sorokiniana Mycelia sterilia Bacillus sp. (единично)	Mucor spp. Alternaria tenuis Bipolaris sorokiniana Fusarium heterosporum	Mucor spp. .... 46 F. solani ..... 20 F. sambucinum ..... 30 Bipolaris sorokiniana ..... 10 Mycelia sterilia ..... 30 Myrothecium verrucaria ..... 10 F. heterosporum ..... 10 Pseudomonas sp. ... 20 Pseudomonas syringae ..... 30 Bacillus sp. .... 80
<b>Овес</b>				
Mycelia sterilia F. sambucinum Pseudomonas syringae Bacillus sp.	Mucor spp. F. sambucinum Pseudomonas syringae Bacillus sp. Pseudomonas sp.	Mucor spp. Fusarium heterosporum Alternaria tenuis Fusarium sporotrichiella	Alternaria tenuis Penicillium spp. Pseudomonas sp. Bacillus sp.	Mucor spp. .... 29* F. solani..... 10 F. avenaceum ..... 70 Mycelia sterilia ..... 10 F. sambucinum ..... 10 Pseudomonas syringae..... 10 Bacillus sp..... 90
<b>Ячмень</b>				
F. oxysporum F. solani Penicillium spp. Pseudomonas syringae Bacillus sp.	Mucor spp. ** Bipolaris sorokiniana F. oxysporum Penicillium spp. F. sambucinum*** Pseudomonas syringae Bacillus sp. Erwinia sp. Pseudomonas sp.	Bipolaris sorokiniana Fusarium heterosporum	Alternaria tenuis Fusarium heterosporum Mycelia sterilia	Mucor spp. .... 34 F. oxysporum ..... 40 Verticillium albo-atrum ..... 10 F. avenaceum ..... 40 Mycelia sterilia ..... 20 F. solani ..... 10 Pseudomonas syringae ..... 30 Bacillus sp..... 40 Pseudomonas sp. .... 10
<b>Тритикале</b>				
Mucor spp. F. oxysporum Verticillium albo-atrum Penicillium spp F. sambucinum Bacillus sp. Pseudomonas Pseudomonas syringae	Mucor spp. F. oxysporum F. avenaceum F. sambucinum Rhizoctonia solani	Mycelia sterilia Bipolaris sorokiniana Fusarium heterosporum F. sambucinum Alternaria tenuis Pseudomonas sp. Bacillus sp.	Alternaria tenuis Cladosporium herbarum Mycelia sterilia Fusarium sporotrichiella Pseudomonas sp.	Mucor spp. .... 32 F. sambucinum ..... 10 Verticillium albo-atrum ..... 30 F. solani..... 10 F. avenaceum..... 20 Mycelia sterilia ..... 30 Pseudomonas sp. .... 10 Bacillus sp..... 50 Actinomyces sp. .... 10

Shoem и ринхоспориозом (*Rhynchosporium secalis* (Oud)) Davig). Данные заболевания отмечались во все годы обследования посевов с наибольшим пиком распространения и развития в 2005 г. В 2009–2010 гг. наблюдалась тенденция к наиболее активному (40–60%) распространению темно-бурой пятнистости

ячменя. На посевах овса в 2005–2007 гг. и 2009 гг. отмечалось распространение красно-бурой пятнистости. Возбудитель болезни – несовершенный гриб *Drechslera avenae* Но (син. *Helminthosporium avenae* Eidam). Повсеместно на посевах зерновых культур отмечалось поражение корневой и прикорневой

зоны растений возбудителями корневой гнили. Корневую гниль на посевах зерновых культур вызывали грибы *Fusarium* и *Bipolaris*. Фузариозные грибы поражали листья растений, а также колос. Наиболее распространенными на посевах зерновых культур оказались следующие виды: *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans. и *F. heterosporum* Nees.

Грибы *Fusarium* находятся в постоянном взаимодействии в агробиоценозах. Они характеризуются пластичностью и поэтому часто преобладают в патогенных комплексах. Они поражают более 150 видов растений. На посевах озимых зерновых (рожь, пшеница) *Fusarium* составляют до 80–90%, вызывая снежную плесень, до 60–70% в популяциях корневой гнили и до 50–60% при поражении колоса. На посевах яровых зерновых культур *Fusarium* чаще выделяли с яровой пшеницы; *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem и *Drechslera teres* – с ячменя. Частота встречаемости видов *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoem и *D. teres* (Sacc.) Shoem. Ито на посевах ячменя составляла 50–80%; на яровой и озимой пшенице до 10–20%. Менее подвержен заболеваниям яровой овес. По данным нашего анализа, в патогенном комплексе возбудителей, заселяющих ризосферу зерновых, 10–15% составляет грибы *Alternaria* sp., сопутствующие сапрофитные грибы *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rizopus*, *Gliocladium*, *Trichothecium* и полусапрофитные бактерии сем. Enterobacteriaceae (*Ervinia*, *Bacillus*; табл. 1).

Бактерии *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum* являются антагонистами *Fusarium*.

В 2014 г. при проведении микробиологического анализа почвы, вегетативных органов и зерна различных зерновых культур было отмечено, что обитающие в почве и заселяющие растения грибы и бактерии по разному проявляют свои свойства, в том числе патогенные (табл. 2). Например, пшеница: корневая система в значительной степени колонизирована сапротрофными мукоровыми грибами, патогенными грибами *F. oxysporum* (возбудитель корневой и прикорневой гнили, закупорки сосудов проводящей системы, активный фитотоксикант, продуцент микотоксина Т-2, наиболее опасный патоген двудольных растений, но вредоносен и на зерновых), *F. solani*, среднепатогенными псевдомонодами.

В меньшей степени отмечалась колонизация корней возбудителем черни и черного зародыша – грибом альтернария. Встречается в большом количестве возбудитель вертициллезного увядания двудольных грибов вертицилл (*Verticillium albo-atrum*). Колонизация узла кущения патогенными грибами и бактериями также значительная. В стебле и колосе много альтернарии и биполяриса (возбудитель гельминто-

спориозной корневой гнили, черного зародыша зерновых). В почве много патогенных грибов из рода *Fusarium*, встречается биполярис, довольно много среднепатогенных псевдомонод.

**Овес.** Корневая система и узел кущения в значительной степени колонизирована неспорулирующими сапротрофными грибами, патогенным грибом *F. sambucinum* (возбудитель корневой и прикорневой гнили, закупорки сосудов проводящей системы, активный фитотоксикант, опасный патоген однодольных и двудольных растений), среднепатогенными псевдомонодами. В стебле доминируют сапротрофные мукоровые грибы и условнопатогенный фузариум. Меньше альтернарии и токсичного фузариума – споротрихиеллы. В колосе много альтернарии и пенициллов (плесневые грибы, продуценты окмикотоксинов, из присутствие в колосе и на зерне крайне нежелательно). В почве много патогенных грибов из рода *Fusarium*, среди них один из самых опасных – высокопатогенный *F. avenaceum* (продуцент микотоксина дезоксиниваленол), отмечено наличие среднепатогенных псевдомонод.

**Ячмень.** корневая система сильно колонизирована патогенными грибами *F. oxysporum*, *F. solani*, токсичными пенициллами и среднепатогенными псевдомонодами. В меньшей степени отмечается колонизация корней возбудителем черни и черного зародыша – грибом альтернария. Колонизация узла кущения патогенными грибами и бактериями также значительная. Здесь очень много биполяриса, фузариев, встречаются патогенные псевдомоноды и эрвиния. В стебле и колосе доминирует биполярис (возбудитель гельминтоспориозной корневой гнили, черного зародыша зерновых). В почве много патогенных грибов из рода *Fusarium*, среди них один из самых опасных – высокопатогенный *F. avenaceum* (продуцент микотоксина дезоксиниваленол), отмечено наличие среднепатогенных псевдомонод. Встречается патоген двудольных – вертицилл.

Корневая система сильно колонизирована патогенными грибами *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, токсичными пенициллами и, в меньшей степени, среднепатогенными псевдомонодами. Много вертициллов. Колонизация узла кущения патогенными грибами и бактериями также значительная. Здесь очень много фузариев (в т.ч. *F. avenaceum*), встречаются ризоктония – возбудитель корневой и прикорневой гнили. В стебле среди доминирующих биполярис (возбудитель гельминтоспориозной корневой гнили, черного зародыша зерновых), довольно много фузариев, встречается альтернария. Патогенные бактерии не выделены. В почве много патогенных грибов *Fusarium* spp.), отмечено наличие среднепатогенных псевдомонод, встречается вертицилл.

## ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПТОРИОЗА НА ПОСЕВАХ ПШЕНИЦЫ В РФ

Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н., Акимова Е.А., Санина А.А.  
ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы, Московская область

Септориоз занимает доминирующее положение в патогенном комплексе листостебельных грибных болезней пшеницы. В эпифитотийные годы потери урожая от этого заболевания могут составлять до 40% [1]. Среди возбудителей наиболее известными являются виды *Septoria tritici* Rob. et Desm., *Stagonospora nodorum* [Berk.] Castellani & E.G. Germano и *Stagonospora avenae* Bissett f. sp. triticea T. Johnson. О их распространении на территории России говорилось еще в 1-й половине прошлого столетия [2–5].

Во ВНИИФ в течение многих лет ведется ежегодный мониторинг видового состава возбудителей септориоза пшеницы на территории России с целью изучения ареалов их распространения. На европейской части страны исследования проводятся с 1986 года, на азиатской – с 1998 г. [6–9]. За это время собрано и проанализировано более 2,5 тыс. пораженных сортообразцов пшеницы из 8 зерносеющих районов РФ (Центральный, Центрально-Черноземный, Северо-Кавказский, Северный, Северо-Западный, Волго-Вятский, Поволжский, Западно-Сибирский). Образцы собирали на полях фермерских и кооперативных хозяйств, научно-исследовательских институтов и селекционных станций в разные фазы вегетации растений.

На основании многолетних данных (1986–2014 гг.) установлено, что в Центральном районе примерно в равном количестве распространены виды *S. tritici* и *S. nodorum*. Их средняя частота встречаемости составила 40,8 и 42,0% соответственно, но в отдельные годы соотношение видов варьировало в ту или другую сторону. Ежегодная представленность *S. avenae triticea* находится в пределах от 1,9 до 21,2%.

В Северо-Кавказском и Центрально-Черноземном районах постоянно доминирует *S. tritici*, составляя в среднем 65,9 и 73,1% соответственно. На долю *S. nodorum* и *S. avenae triticea* приходится лишь от 11,6 до 17,9%.

Вид *S. tritici* по средним показателям несколько преобладает и в Поволжье (53,8%); 2-м по частоте встречаемости является *S. nodorum* (29,2%), 3-м – *S. avenae triticea* (17,0%). Однако в отдельные годы в этом районе наблюдалась примерно одинаковая частота встречаемости всех трех видов гриба.

На севере и востоке европейской части страны основное место в патогенном комплексе занимает *S. nodorum*. В Северном районе он достигает 81,3%, в Северо-Западном и Волго-Вятском составляет 59,7–64,9%. На долю *S. tritici* в этих районах приходится от 7,1 до 28,1%, а на долю *S. avenae triticea* – от 7,0 до 16,2%.

В Западной Сибири также заметно превалирует *S. nodorum* (63,4%), а *S. tritici* и *S. avenae triticea* по

средним показателям составляют 22,2 и 14,4% соответственно.

Таким образом, основными по частоте встречаемости на территории России являются виды *S. tritici* и *S. nodorum*. Возбудитель *S. avenae triticea* во всех исследованных районах встречается реже.

Представленность видов септории имеет выраженный зональный характер, связанный со структурой посевных площадей пшеницы. На юге России (Северо-Кавказский и Центрально-Черноземный районы), где выращиваются озимые хлеба, как правило, доминирует *S. tritici*.

По направлению к более северным и восточным районам страны, характеризующимся преимущественным возделыванием яровой пшеницы (Северный, Северо-Западный, Волго-Вятский и Западно-Сибирский районы), соотношение возбудителей меняется в сторону *S. nodorum*. Это связано с разной системой возделывания озимых и яровых культур, погодно-климатическими факторами и эпидемиологическими особенностями патогенов.

Инфекция *S. tritici* предпочитает прохладные влажные условия. Заражая осенью посеы озимых, грибок перезимовывает на них и интенсивно развивается до наступления жаркой и сухой погоды. Если погода благоприятная, то развитие возбудителя идет в течение всей вегетации. В регионах возделывания яровой пшеницы популяции гриба длительный период остаются без хозяина: от уборки урожая с конца лета до появления новых посевов весной. Инфекция перезимовывает на растительных остатках, однако, по нашим наблюдениям, *S. tritici* при таком способе перезимовки выживает хуже, чем на растениях озимых культур, и к весне запас инфекционного начала заметно сокращается.

Поэтому в зонах, где возделывается только яровая пшеница, условия для развития *S. tritici* менее благоприятны, особенно в более суровом климате северных районов и Сибири. В этих зонах его нишу занимает *S. nodorum*, который, в отличие от *S. tritici*, способен сохраняться в зерне, что дает ему преимущество при первичном заражении посевов. Этот вид может развиваться в более широком диапазоне температур, однако имеет выраженную онтогенетическую приуроченность.

Хотя *S. nodorum* поражает растения в начале их развития, но на ранних стадиях вегетации растений инфекция находится в латентном состоянии и наиболее интенсивно проявляется в фазу колошения. *S. nodorum* считается принципиальным агентом флаг-листа и колоса. Низкая встречаемость *S. nodorum* в южной зоне связана с тем, что этот патоген не успевает в полной мере развиваться из-за слишком жаркой и сухой погоды во второй полови-

не вегетации растений и при относительно быстром созревании культур. В Центральном районе, где погодно-климатические условия более благоприятные, оба вида гриба распространены одинаково. Наблюдения, проводимые нами в течение вегетационного периода в 2006–2009 гг. на разных сортах озимой пшеницы в условиях Московской области, подтвердили сезонную встречаемость видов септории. В первую половину вегетации (ф. 21-59) на растениях превалировал *S. tritici*, после цветения (ф. 60-69) интенсивно нарастало количество *S. nodorum*, и к концу вегетации их соотношение выравнивалось. Во время формирования зерна (ф. 71) на стареющих листьях, стеблях и колосьях растений отмечался *S. avenae triticea*.

По нашим предположениям, онтогенетическая приуроченность видов септории может быть связана с продолжительностью светлого времени суток и более высокой солнечной активностью в летний период на момент созревания растений. Из практики известно, что спорующая активность *S. nodorum* и *S. avenae triticea* в большой степени зависит от освещения. В культуре штаммы этих видов гриба образуют споры только при наличии дополнительного облучения, близкого к ультрафиолетовому, тогда как культуры *S. tritici* способны споровать практически в темноте.

Полученные многолетние результаты по видовой структуре популяций возбудителей септориоза могут быть использованы при создании искусственных инфекционных фонов для оценки сортов пшеницы на устойчивость к заболеванию в региональных полевых питомниках. Для этих целей рекомендуется отбирать в первую очередь изоляты того вида гриба, который преобладает на данной территории.

### Список литературы

1. Санин С.С., Назарова Л.Н. Фитосанитарная обстановка на посевах пшеницы в Российской Федерации (1991–2008 гг.). Защ. карант. раст. (прилож). 2010; 2.
2. Демидова З. Наблюдения над видами *Septoria* на злаках. Мат. микол. фитопатол. 1926; 2: 1333-157.
3. Васецкая М.Н., Куликова Г.Н., Борзионова Т.И. Виды септориальных грибов, распространенные на сортах пшеницы в СССР. Микол. фитопатол. 1983;17(3): 210-13.
4. Кашуба О.В. Видовой состав и вредоносность возбудителей септориоза яровой пшеницы. В сб.: «Болезни сельскохозяйственных культур и борьба с ними в Сибири». 1989: 50-5.
5. Борзионова Т.И., Васецкая М.Н., Судникова В.П., Алипбекова Ч.А. Видовой состав возбудителей септориоза на территории Казахстана, Западной Сибири, Южного Урала и Кыргызстана. Сиб. вестн. с-х н. 1991; 3: 106-8.
6. Санина А.А., Анциферова Л.В. Видовой состав грибов рода *Septoria* Sacc. на пшенице в европейской части СССР. Микол. фитопатол. 1991; 25(3): 250-2.
7. Коваленко Е.Д., Санина А.А., Пахолкова Е.В. Иммунологические методы создания болезнестойчивых сортов зерновых культур. 2. Видовая и внутривидовая структура популяций возбудителей септориоза на посевах пшеницы. Агро XXI, 2000; 5: 10-11.
8. Санина А.А., Пахолкова Е.В. Видовая структура популяций возбудителей септориоза пшеницы в различных регионах России. Сб. тр. I-го съезда микологов России. М.: 2002. Разд. 7: 221.
9. Санин С.С., Санина А.А., Мотовилин А.А. и др. Защита пшеницы от септориоза. Защ. карант. раст. (прилож). 2012; 4.

## ХРАНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПТОРИОЗА ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ

Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н., Куркова Н.А., Санина А.А.  
ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы, Московская область

В государственной Коллекции фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ содержится 286 штаммов возбудителей септориоза пшеницы и ячменя, относящихся к видам *Stagonospora nodorum* [Berk.] Castellani&E.G. Germano, *Septoria tritici* Rob. et Desm. и *Stagonospora avenae* Bissett f. sp. triticea T. Johnson.

Штаммы выделены из разных регионов РФ и стран ближнего зарубежья, имеют характеристики по морфолого-культуральным признакам и патогенности в соответствии с разработанными методиками [1–3].

Возбудители септориоза, как и многие факультативные грибы, обладают значительной изменчивостью, поэтому важное значение имеет выбор оптимальных способов хранения коллекционных

культур длительный период времени без потери их основных свойств.

Культуры штаммов содержатся в пробирках на косяках картофельно-глюкозной агаризованной среды (КГА) в холодильниках при температуре +4–8 °С. Жизнеспособность гриба в таком виде сохраняется в течение 2–3 лет без пересева на свежую питательную среду. Культуры *S. nodorum* и *S. avenae triticea* могут длительное время выживать даже на высохшем агаре, однако, как показала практика, при восстановлении они чаще всего утрачивают способность споровать.

Заливка косяков с культурой гриба слоем стерильной воды препятствовала высыханию агара и уменьшала доступ к ней кислорода.



В результате срок хранения штаммов *Septoria* spp. увеличивался до 5 лет, и при этом не терялась их спорулирующую активность.

По литературным сведениям известно, что микроорганизмы дольше сохраняются в замороженном состоянии, т.к. при температурах ниже 0 °С жизнедеятельность клеток замедляется [4]. В нашем случае пробирки с изолятами *Septoria* spp., выращенными на косяках питательной среды (КГА), помещали в морозильную камеру холодильника с температурой минус 15–20 °С. Однако для большинства штаммов срок 3–4 г. при данном способе хранения оказался критическим.

Наиболее эффективным в плане длительности показал себя способ хранения гриба в почве в виде спор [5]. Пробирки со стерильной почвой, засеянной споровой суспензией, содержатся в холодильнике при температуре +4–8 °С. Данный способ хранения хорошо подходит для штаммов *S. nodorum* и *S. avenae triticea*. На сегодняшний день в коллекции ВНИИФ есть культуры, хранящиеся в почве более 20 лет без потери основных свойств и в том числе патогенности. Штаммы *S. tritici*, как показали наблюдения, теряют жизнеспособность через 5–7 лет.

В настоящее время во всем мире в качестве основного метода длительного хранения микроорганизмов используется лиофилизация. С 2008 г. мы начали применять ее для коллекционных штаммов *Septoria* spp. Для этого спорулирующую культуру гриба, выращенную на стерильных полосках фильтровальной бумаги размером 0,5 × 3 см, помещали в криопробирки и закладывали на хранение в морозильные камеры при температуре минус 80 °С [6]. Проводятся испытания продолжительности хранения лиофилизированных штаммов в морозильной камере обычного бытового холодильника при температуре примерно –15–20 °С.

Результаты показали 100%-ную жизнеспособность штаммов *S. nodorum* после 5 лет хранения в таких условиях, при этом патогенность у большинства из них осталась на прежнем уровне. У штаммов *S. tritici* жизнеспособность была достаточно высокой (88,6%), однако патогенность отдельных штаммов несколько снизилась.

С целью сохранения или восстановления патогенных свойств проводятся пассажи штаммов через растение-хозяина. Зараженные образцы растений также служат одним из способов хранения гриба.

Для этого листья с хорошо выраженными пятнами (для *S. tritici* обязательно наличие пикнид) гербаризируют, помещают в бумажные пакеты и хранят в холодильнике при температуре +4–8 °С. Наблюдения показали, что реизоляция *S. nodorum* и *S. avenae triticea* успешно осуществлялась при сроке хранения гербарных образцов до 5 лет. Максимальный срок хранения штаммов может составлять 9–10 лет, хотя доля успешных реизоляций при этом заметно сокращается. Оптимальный срок хранения *S. tritici* на высушенных растениях составляет в среднем 3–4 года, максимальный – 6–7 лет.

Все вышеперечисленные методы показали, что срок хранения штаммов зависит от вида гриба. *S. nodorum* и *S. avenae triticea* дольше сохраняют свою жизнеспособность по сравнению с *S. tritici*, так как лучше приспособлены к сапрофитному образу жизни. Лучшими, на наш взгляд, для возбудителей септориоза являются способ хранения в почве и на гербарных образцах растений. Достаточно простым и удобным методом является также лиофилизация культур на полосках фильтровальной бумаги, но она требует дальнейших испытаний в отношении длительности выживания гриба. В любом случае для обеспечения надежной сохранности коллекционных штаммов следует применять одновременно несколько разных способов.

#### Список литературы

1. Пыжикова Г.В., Санина А.А., Супрун Л.М. и др. Методы оценки устойчивости селекционного материала и сортов пшеницы к септориозу. Метод. указ. М. 1989: 43 с.
2. Санина А.А., Анциферова Л.В. Способы выделения и хранения возбудителей септориоза пшеницы. Микол. фитопатол. 1989; 23(2): 172–5.
3. Санина А.А., Анциферова Л.В. Определение патогенных свойств изолятов *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. и *S. tritici* Rob et Desm на пшенице. Микол. фитопатол. 1991; 25(2): 156–60.
4. Красильников Н.А. Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. 1967.
5. Shearer BL, Zeyen RJ, Ooka JJ. Storage and behavior in soil of *Septoria* species isolated from cereals. Phytopathology. 1974; 64: 163–7.
6. Goodwin SB, Dunkle LD, Zismann VL. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. Phytopathology, 2001; 91: 648–58.

## ПОРАЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ *ALCEA ROSEA* L. ГРИБОМ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY

Пиковский М.И., Кирик Н.Н.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

Растения шток-розы (*Alcea rosea* L.) распространены во многих странах и широко используются в цветоводстве [1]. Они имеют ценные декоративные свойства, которые предопределены их габитусом, расцветкой лепестков, а также длительным периодом цветения. Однако вид *A. rosea* поражается различными фитопатогенными грибами, которые снижают декоративные качества и продуктивность растений, вызывают их ослабление, а также гибель [2–4].

Отдельные исследователи в своих публикациях указывают о высокой вредоносности на шток-розе белой гнили, вызываемой грибом *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Young P.A., 1934; Sharma B.V., 1958). Последний паразитирует на растениях 64 семейств, относящихся к 225 родам и 361 виду, среди которых много цветочных и декоративных растений (Boland G.J., Hall R., 1994). В целом, научная информация относительно различных аспектов белой гнили шток-розы ограничена. Первое сообщение об этой болезни датируется 1934 г. В частности, Young [5] наблюдал поражения стеблей *A. rosea* грибом *S. sclerotiorum* в условиях Северной Америки. Следующая информация по белой гнили на *A. rosea* касается Индии, где Sharma [6] в 1951 г. отметил распространение болезни на 12% исследованных растений. В то же время во многих источниках, изданных в разных странах мира и освещающих болезни цветочно-декоративных растений, отсутствует информация о поражаемости растений шток-розы грибом *S. sclerotiorum* [3, 8, 9]. В условиях Украины этот фитопатологический объект также не изучен.

Мониторинг белой гнили на растениях *A. rosea* проводили путем маршрутных обследований во время вегетационных периодов 2011–2014 гг. в условиях Киевской области и г. Киева. Изучение симптомов болезни осуществляли на растительных образцах, которые были поражены в естественных условиях. Диагностику заболевания, а также определение его вредоносности, осуществляли в лаборатории "Микологии и фитопатологии" с применением макро-, микроскопического, биологического и культурального методов [10, 11].

Во время мониторинга фитопатологического состояния *A. rosea* нами выявлено паразитирование на растениях гриба *S. sclerotiorum*. Так, за время проведения исследований максимальная частота встречаемости патогена наблюдалась в 2013 г. и составляла 21%. Признаки белой гнили проявлялись главным образом на стеблях. Последние поражались на разном расстоянии от поверхности почвы. Первые, визуально видимые симптомы болезни, характеризовались образованием мокрых пятен, которые со временем увеличивались в размерах и покрывались белой ватообразной грибницей. Ее распростране-

ние происходило вверх и вниз от места проникновения патогена, при этом стебли окольцовывались пораженными тканями. Длина пораженного участка стебля составляла от нескольких до 50 см. На поверхности и внутри инфицированных стеблей формировались склероции гриба, размер которых был в диапазоне от 3×3 мм до 14×3 мм. В случае подсыхания пораженных участков склероции, которые находились на стеблях, они массово осыпались на поверхность почвы, потому на конечных этапах патологического процесса они отсутствовали на пораженных тканях.

Биометрический анализ растений *A. rosea*, пораженных белой гнилью, свидетельствовал о снижении их высоты на 6,4–47,0 см в сравнении со здоровыми, что зависело от интенсивности развития заболевания. Во время визуальной диагностики белой гнили на *A. rosea* ее типичные симптомы (белая грибница и склероции) можно наблюдать лишь в начале развития болезни и высокой относительной влажности воздуха. В дальнейшем, как правило, в большинстве случаев, с наступлением сухой погоды, пораженные участки обесцвечивались, белый мицелий на них был слабо выражен, а склероции на поверхности стеблей часто отсутствовали. В таких условиях также можно наблюдать проявление зональности на стеблях. В конечном результате, при сильном поражении стеблей происходило размочаливание пораженных тканей и гибель растений.

Сильное поражение грибом *S. sclerotiorum* стеблей растений *A. rosea* приводит к переходу мицелия патогена на плоды (семенные коробочки). Отмеченная нами динамика изменения симптомов болезни на последних следующая: появление белой ватообразной грибницы, обесцвечивание пораженных тканей, формирования склероциев на поверхности и внутри коробочек. Размер покоящихся структур на этих частях растений составлял от 1×1 мм до 3×2 мм. В семенных коробочках, пораженных белой гнилью, зрелые плодики не распадаются, а часто оставались словно бы склеенными. Внешне пораженные плодики характеризуются изменением расцветки, которая по всей их площади становится однородной бледно-серо-розовой, тогда как в здоровых – центральная часть более темная, а периферийная – более светлая. Поражение коробочек до начала созревания семян приводит к их щуплости, тогда как семена, пораженные во время созревания, практически не отличаются от здоровых размерами. При сильной степени поражения стеблей шток-розы белой гнилью масса 1000 плодиков уменьшалась на 6,83 г в сравнении с здоровыми.

В случае проникновения грибницы *S. sclerotiorum* в семена *A. rosea*, их оболочка приобретает белесо-

ватый оттенок, частично может разрушаться. При прорастивании пораженных белой гнилью плодиков *A. rosea*, на последних сначала появляется белая ватообразная грибница, которая со временем начинает уплотняться в виде белых комочков которые постепенно превращаются в склероции. В наших исследованиях семена в пораженных плодиках полностью теряли способность к прорастанию.

Таким образом, в результате фитопатологического мониторинга шток-розы в условиях Украины удалось выявить поражение растений грибом *S. sclerotiorum*. Установлено, что диагностические признаки белой гнили на *A. rosea* изменчивы и зависят от условий окружающей среды. Вредоносность болезни заключается в преждевременной гибели растений, уменьшении их высоты, а также потери всхожести семян.

#### Список литературы

1. Головкин Б.Н., Китаева Л.А., Немченко Э.П. Декоративные растения СССР. Справочники-определители географа и путешественника. М.: Мысль. 1986: 368 с.
2. Saniewska A, Jarecka A, Marasek A. Influence of bio-preparation Biosept 33 SL on the development of *Alcea rosea* L. rust. Postęp w produkcji roślin ozdobnych. – Warszawa. 2005; Cz. 2: 689-96.
3. Horst RK. Westcott's Plant Disease Handbook. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 2008: 1343 p.
4. Gavériaux JP. Puccinia malvacearum Montagne (1872) responsable de la rouille de la rose trémière (*Alcea rosea* (L.) Cav.). Bull. Soc. Mycol. Nord Fr. 2012; 90: 13-9.
5. Young PA. Stem canker of hollyhock caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology. 1934; 24: 538-43.
6. Sharma BB. Stem-canker, a sclerotial disease of Hollyhock (*Alcea rosea* Cav.) from India. Curr Sci. 1958; 27: 304-5.
7. Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can J Plant Pathol. 1994; 16: 93-108.
8. Горленко С.В. Определитель болезней цветочно-декоративных растений. Минск: Урожай. 1969: 158 с.
9. Станчева Й., Роснев Б. Атлас болезней сельскохозяйственных культур. Т. 5. Болезни декоративных и лесных культур. София-Москва. 2005: 247 с.
8. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. Пер. с нем. К.В. Попковой, В.А. Шмыгли. М.: Агропромиздат. 1987: 224 с.
9. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. Методы экспериментальной микологии. Под ред. В.И. Билай. К.: Наук. думка. 1982: 452 с.

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ В СЕНАЖЕ ГРИБОВ РОДОВ *ASPERGILLUS* И *PENICILLIUM*

Пирязева Е.А.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ВНИИВСГЭ), Москва

Сенаж представляет собой мелкоизмельченный, сыпучий продукт, полученный в результате консервирования зеленых кормов, при этом основными факторами, препятствующими развитию микробиологических процессов, являются физиологическая сухость среды и герметизация сенажной массы. Нарушение сроков закладки и допустимых параметров влажности корма, герметичности консервирования и условий хранения способствует интенсивному развитию грибов, среди которых токсигенные и патогенные виды.

На сенажируемых зеленых кормах, помимо «полевых» грибов, в основном факультативных паразитов вегетирующих растений (виды *Fusarium*, темноокрашенные гифомицеты), присутствуют также грибы-космополиты, называемые «плесенями хранения», попадающие на растения с пылью и дождем из почвы (в частности, виды родов *Aspergillus* и *Penicillium*).

Нарушение правил заготовки, хранения или выемки сенажа обычно способствует развитию плеснеобразующих грибов, происходящему большей частью в плохо утрамбованных участках, в поверхностном слое корма, хранящегося в траншеях, в пристеночных

участках, а также в сенаже с пониженной влажностью. Присутствие таких грибов приводит к снижению питательности и переваримости корма, а также к изменению санитарного качества корма в связи с наличием токсигенных и патогенных свойств у некоторых микромицетов. Так, определенную опасность могут представлять термотолерантные грибы, обладающие патогенными свойствами, например, *A. fumigatus* – известный возбудитель аспергиллеза животных, в том числе молодняка крупного рогатого скота.

С целью изучения распространенности *Aspergillus* spp. и *Penicillium* spp. в 2013–2014 гг. проведено микологическое исследование 193 проб сенажа различного ботанического состава (злаковые, бобовые, бобово-злаковые смеси) из 98 хозяйств 30 районов Московской области.

Каждую пробу подвергали микологическому анализу, включающему первичное выделение грибов, выделение их в чистые культуры и идентификацию.

Первичное выделение грибов проводили путем непосредственного помещения материала, предварительно нарезанного на отрезки (2 см), в чашки Петри на поверхность агара Чапека-Докса, содержащего медицинскую консервированную желчь и

антибиотики. Инкубирование посевов проводили в течение 7–10 сут при 23 и 37 °С для выявления как мезофильных, так и термотолерантных грибов.

Грибы рода *Penicillium* обнаружены в 133 пробах (68,9% изученных проб), при этом доминировал вид *P. roqueforti* Thom (116 проб, 60,1%), другие виды, такие как *P. cyclopium* Westling, *P. urticae* Bainier, I Thom, *P. brevi-compactum* Dierckx, *P. martensii* Biourge, *P. aurantio-virens* Biourge, *P. palitans* Westling, *P. expansum* Link, встречались значительно реже (в 0,5 – 4,7% проб).

Приблизительно с такой же частотой выявляли представителей рода *Aspergillus* (122 пробы, 63,2%),

среди которых преимущественное распространение имел вид *A. fumigatus* Fresenius (89 проб, 46,1%).

Пятая часть проб (20,2%) контаминирована грибами из группы *Aspergillus glaucus*, а именно *A. pseudoglaucus* Blochwitz (13,5%), *A. amstelodami* (Mangin) Thom et Church (3,6%), *A. chevalieri* (Mangin) Thom et Church (2,6%) и *A. repens* (Corda) De Bary (1,0%). Часто встречающиеся в зерновых кормах виды *A. niger* van Tieghem, *A. candidus* Link, *A. flavus* Link не имели широкого распространения в сенажированных кормах, их обнаруживали в 3,6 – 4,7% проб. Также редко выявлялись виды *A. nidulans* Eidam (4,1%), *A. versicolor* (Vuill.) Tiraboschi (2,1%) и *A. wentii* Wehmer (0,5%).

## ПОРАЖАЕМОСТЬ КЛЕНА ОСТРОЛИСТНОГО (*ACER PLATANOIDES* L.) ПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ В ЛЕСНЫХ СООБЩЕСТВАХ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Волков Д.Э., Мелькумов Г.М., Сигитова О.М.  
Воронежский государственный университет, Воронеж

В последние десятилетия происходят существенные изменения экологических условий в различных экосистемах, что сказывается на дендрофлоре, которая становится менее резистентна к воздействию биогенных факторов. Это в свою очередь приводит к снижению ее устойчивости к поражению фитопатогенами [1–5].

Объект исследования – патогенные грибы, паразитирующие на вегетативных органах молодых и стареющих деревьев *Acer platanoides*. Сборы проводились на территории лесных сообществ Усманского

бора в окрестностях Биологического учебно-научного центра (БУНЦ) «Веневитиново» в июне–июле 2014 г. на трех стационарных площадках:

участок 1 – 51°48'41"N, 39°24'51"E;  
участок 2 – 51°49'12"N, 39°24'39"E,  
участок 3 – 51°48'45"N, 39°23'6"E.

В результате микологических исследований на данной территории выявлено 12 видов фитопатогенов, относящихся к 2 отделам, 2 классам, 6 порядкам, 6 семействам и 8 родам (табл. 1).

Таблица 1. Таксономическая структура видового состава патогенных грибов, отмеченных на клене остролистном в лесной зоне Воронежской области (2014 г.)

№	Отдел	Классы грибов	Порядки	Семейства	Общее число	
					родов	видов
1	Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaerales	Botryosphaeriaceae	2	2
			Erysiphales	Erysiphaceae	1	2
			Rhytismatales	Rhytismataceae	1	2
2	Basidiomycota	Agaricomycetes	Hymenochaetales	Schizoporaceae	1	1
			Polyporales	Polyporaceae	2	4
			Russulales	Stereaceae	1	1

Большинство выявленных видов относятся к порядку Polyporales (4 вида; 33,3% от общего их числа видов). Он представлен 1 семейством (16,7% от общего числа семейств) и 2 родами (25,0% от общего числа родов). Меньшим числом видов характеризуются порядки Hymenochaetales и Russulales (1 вид; 8,3%), включающие 1 семейство (16,7%) и 1 род (12,5%).

Наибольшее число видов возбудителей болезней клена остролистного относится к семейству Polyporaceae

(4), что составляет 33,3%, Botryosphaeriaceae, Erysiphaceae, Rhytismataceae (2; 16,7 %).

По одному виду представлено у Schizoporaceae и Stereaceae, что соответствует 8,3%.

Больше всего видов относится к роду *Trametes* (3; 25,0%). *Rhytisma* и *Sawadaea* представлены 2 видами (16,7%), а *Asteromella*, *Fomes*, *Oxyporus*, *Phyllosticta*, *Stereum* – всего лишь по 1 виду (8,3 %).

## Список выявленных патогенов

Fungi

Ascomycota

Dothideomycetes

Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae

1. *Asteromella platanoidis* (Sacc.) Pers. – на живых листьях, Воронежская обл., Новоусманский район, участок 2, массово. (Pf).
  2. *Phyllosticta minima* (Berk. & M.A. Curtis) Underw. & Earle. – на живых листьях, Воронежская обл., Новоусманский район, окр. БУНЦ «Веневитиново», участок 3. (Pf).
- Erysiphales, Erysiphaceae
3. *Sawadaea bicornis* (Wallr.) Miyabe. – на живых листьях, Воронежская обл., Новоусманский район, участок 2, массово. (Pf).
  4. *S. tulasnei* (Fuckel) Homma. – на живых листьях, Воронежская обл., Новоусманский район, участок 2, массово. (Pf).
- Rhytismatales, Rhytismataceae
5. *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fr. – на живых и опавших листьях, Воронежская обл., Новоусманский район, участки 2 и 3, массово. (Pf).
  6. *Rh. punctatum* (Pers.) Fr. – на живых и опавших листьях, Воронежская обл., Новоусманский район, окр. БУНЦ «Веневитиново», участок 3, массово. (Pf).

Basidiomycota

Agaricomycetes

Hymenochaetales, Schizoporaceae

7. *Oxyporus populinus* (Schumach.) Donk. – у основания ствола живого дерева, Воронежская обл., Новоусманский район, участок 2, единично. (P, Le).
- Polyporales, Polyporaceae
8. *Fomes fomentarius* (L.) Fr. – на стволе живого дерева, Воронежская обл., Новоусманский район, участок 1, единично. (Lei, P).
  9. *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. – у основания пня, Воронежская обл., Новоусманский район, окр. БУНЦ «Веневитиново», участок 3, единично. (Le).
  10. *Tr. hirsuta* (Wulfen) Lloyd. – на стволе упавшего дерева, Воронежская обл., Новоусманский район, участки 2 и 3, единично. (Lei, P).
  11. *Tr. versicolor* (L.) Lloyd. – на ветвях и у основания живых деревьев, Воронежская обл., Новоусманский район, участки 1 и 2, массово. (Lei, Lep).
- Russulales, Stereaceae
12. *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. – на стволе упавшего дерева, Воронежская обл., Новоусманский район, участок 2, единично. (Lei, P).

В приведенном аннотированном списке указаны систематическое положение, современное латинское название, местонахождение и встречаемость каждого выявленного патогена. Названия таксонов грибов приведены в соответствии с базой данных Интернет-ресурса СABI Bioscience Database – <http://www.mycobank.org> (по состоянию на 21.01.2015). Для определения трофической приуроченности макро- и микромицетов использовалась шкала трофических групп (Коваленко, 1980), с некоторыми модификациями и изменениями (Сарычева и др., 2009).

Выявленные патогенные грибы оказывают существенный вред молодым и стареющим деревьям клена, что связано с низкой экологической адаптацией последних. Как видно из приведенного выше списка, наибольшее количество представителей проявляет себя в качестве паразитов листьев (6 видов; 50,0 %), меньшее относится к сапротрофам (2; 16,7 %), остальные меняют свой тип питания в зависимости от условий среды их обитания (4; 33,3 %). При анализе территориальной структуры отмечено, что большее разнообразие видов грибов встречается на 2 (7; 58,3 %) и 3 (5; 41,6 %) участках, меньшее – на 1 пробной площадке (2; 16,7 %).

Для предотвращения или уменьшения распространения и развития патогенов клена следует проводить следующие лечебно-профилактические мероприятия: (1) фитосанитарный мониторинг и соблюдение строгого контроля над состоянием деревьев в различных экосистемах и (2) сбор, сжигание опавших или живых листьев и ветвей в местах массового поражения микозами (Мелькумов, Агафонов, 2010).

## Список литературы

1. Мелькумов Г.М. Распространенные микозы древесных паркоценозов города Воронежа и их возбудители. Иммунол, аллергология, инфектол. 2010; 1: 118.
2. Мелькумов Г.М. Субстратная специализация возбудителей болезней древесного компонента парковых зон города Воронежа. Вестн. ВГАУ. 2014; 1-2 (40-41): 57-62.
3. Мелькумов Г.М., Агафонов В.А. Зависимость состояния древесных растений парковой зоны города Воронежа от уровня загруженности улиц автотранспортом. Вестн. ВГУ. Сер.: Химия. Биология. Фармация. 2012; 1: 116-20.
4. Мелькумов Г.М., Волков Д.Э. Флуктуирующая асимметрия листовых пластинок клена остролистного (*Acer platanoides* L.) как тест экологического состояния паркоценозов городской зоны. Вестн. ВГУ. Сер.: География. Геоэкология. 2014а; 3: 95-8.
5. Мелькумов Г.М., Волков Д.Э. Эколого-морфологические особенности листовых пластинок клена остролистного (*Acer platanoides* L.) на территории памятников природы Воронежской области. Совр. проблемы особо охраняемых природных территорий регионального значения и пути их решения. Мат. межрег. н.-практ. конф., Воронеж 18 дек. 2014, Воронеж; 2014б: 159-63.
6. Коваленко А.Е. Экологический обзор грибов из порядка Polyporales s. str., Agaricales s. str., Russulales в горных лесах центральной части Западного Кавказа Микол. фитопатол. 1980. 14; 4: 300-14.
7. Сарычева Л.А., Светашева Т.Ю., Булгаков Т.С. и др. Микобиота Липецкой области. Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2009: 287с.
8. Мелькумов Г.М. В.А. Агафонов Влияние экологических факторов на древесный компонент паркоценозов города Воронежа. Вестн. ВГУ. Сер.: География. Геоэкология. 2010; 2: 140-43.

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СОСТАВ МЕТАБОЛИТНОГО КОМПЛЕКСА И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГРИБА *Pyrenophora tritici-repentis* – ВОЗБУДИТЕЛЯ ЖЕЛТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ

Полуэктова Е.В.<sup>1</sup>, Мусаева Т.Д.<sup>2</sup>, Мушенко В.М.<sup>2</sup>, Шимирбекова Б.А.<sup>2</sup>,  
Мироненко Н.В.<sup>1</sup>, Берестецкий А.О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина, Санкт-Петербург

Гриб *Pyrenophora tritici-repentis* является возбудителем жёлтой пятнистости листьев пшеницы. Известны как высокомолекулярные селективные, так и низкомолекулярные неселективные фитотоксины гриба (из групп полигидроксиантрахинонов и алкалоидов), действующие как факторы патогенности. В РФ токсикообразование этого гриба не изучалось.

Для восполнения этого пробела изучили влияние различных факторов на состав метаболитного комплекса и биологическую активность *P. tritici-repentis*.

В работе использовали штамм *P. tritici-repentis* Vol 2. Гриб культивировали при помощи жидкофазной и твердофазной ферментации. Использовали две жидкие синтетические питательные среды (среда Люка и MID), а также жидкую среду V-8 на основе смеси овощных соков. В качестве субстратов для твердофазной ферментации *P. tritici-repentis* использовали пшённую, перловую и рисовую крупы.

Экстракцию метаболитов гриба из культурального фильтрата проводили хлористым метиленом через 2 и 3 нед после посева, из высушенного мицелия – ацетоном. Экстракты из колонизированного мицелием *P. tritici-repentis* зернового субстрата на 10-е и 20-е суткультивирования гриба получали 50%-ным водным ацетоном с последующей переэкстракцией хлористым метиленом после упаривания ацетона.

Сравнительное изучение метаболитных профилей экстрактов изучали методом тонкойслойной хроматографии.

Метаболитные профили экстрактов из культурального фильтрата и мицелия, полученного в жидкой культуре, существенно различались.

Заметное влияние на разнообразие метаболитов оказали сроки культивирования и состав питательной среды. Наиболее бедными по составу веществ были экстракты из культурального фильтрата и мицелия гриба, выращенного на среде V8. Состав твердого субстрата оказал незначительное влияние на качественный состав метаболитов гриба. Максимальное накопление экстрактивных веществ отметили при культивировании *P. tritici-repentis* на пшённой крупе. Заметный эффект на качественный состав метаболитов гриба оказала продолжительность культивирования.

Все экстракты гриба проявили неспецифическую фитотоксическую (в отношении (резуховидки Таля и пырея ползучего) и антимикробную активность (в отношении *Candida tropicalis*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*). Наиболее высокий уровень фитотоксической и антимикробной активности был отмечен у экстрактов из культурального фильтрата гриба, полученного на среде Люка на 3-ю нед культивирования. При выращивании *P. tritici-repentis* на зерновых субстратах высокую активность проявил экстракт из 3-нед культуры гриба на пшеничной крупе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 14-04-00399.

## ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ НА БИОЛОГИЮ ГРИБНЫХ ПАТОГЕНОВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

Маслова М.В.

Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск-наукоград

Неблагоприятное воздействие факторов внешней среды вызывает ослабление иммунитета у растений и приводит к активизации грибной и бактериальной патогенной микробиоты (Ischenko, 2001). В связи с этим широкое распространение получают различные болезни сельскохозяйственных растений. При этом отмечено увеличение в микоценозах плодовых культур условно-патогенных грибов, которые входят в состав комплексов микроорганизмов. Таким образом, имеет место ассоциативное поражение растений микробиотой, что является причиной корневых гнилей, усыханий и увяданий не только отдельных побегов, но и всего растения в целом (Смолякова, 2008; Прах,

2013). Это осложняет диагностику болезней в связи с искажением характерных симптомов, а также затрудняет борьбу с патогенными микроорганизмами в связи с принадлежностью их к различным группам как в систематическом отношении, так и по их трофическому статусу.

Подобные тенденции эволюции патогенной микробиоты обуславливают необходимость регулярного мониторинга фитосанитарного состояния садов с целью выявления наиболее вредоносных фитопатогенных объектов, изучения особенностей их биологии, динамики развития, характера взаимодействия друг с другом и растением-хозяином, что является необ-

ходимым для адекватного понимания механизмов взаимодействия структурных элементов в системе «среда – хозяин – паразит» и определения стратегии оптимизации фитосанитарного состояния насаждений сельскохозяйственных культур.

Изучение состава эндофитной микробиоты, проводимое путем ее выделения из растительных эксплантов после поверхностной стерилизации (спирт, фламбирование), было установлено, что из ветвей вишни, черешни, сливы, алычи, абрикоса с симптомами поражения и без них выделяется бактерия рода *Pseudomonas* и грибы из родов *Alternaria*, *Fusarium*, *Monilia*, *Cytospora*. Таким образом, грибные патогены встречаются в комплексе с бактериальной микробиотой. При этом частота тестирования бактерии составила в среднем 59,8%, грибной микробиоты 25,4%.

Методом посева гриба-тестера на среды с бактериальным токсином установлено антагонистическое действие эндофитной бактерии в отношении ряда фитопатогенных грибов. Оценка состояния грибных колоний показала, что на средах с токсинами бактерии из рода *Pseudomonas* у них наблюдаются выраженные признаки деградации (лизис мицелия, отсутствие спороношения и др.). На средах с токсинами сила роста мицелия была снижена. Токсическую активность (At) бактерии в отношении гриба-тестера определяли по степени подавления развития грибной колонии в опыте в сравнении с контролем и выражали в процентах.

Наиболее выраженная токсическая активность бактериальных штаммов была отмечена в отношении грибов *Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc. (At=75,0%) и *Alternaria alternata* Keissl. (At=65,6%). Более устойчивыми к действию бактериальных метаболитов оказались *Fusarium oxysporum* Schlecht. и *Monilia cinerea* Bonord., токсическая активность бактерии в отношении этих патогенов составила 59,6 и 50,9% соответственно, что объясняет их доминирование в микоценозах косточковых растений.

В связи с тем, что из растений как с симптомами поражения, так и без них тестируется бактериальная и грибная микробиота, необходимым является определение характера влияния токсинов чистых культур патогенов и их ассоциаций на хозяина. Действие культурального фильтрата микроорганизмов на хлорофиллсодержащие ткани растения-хозяина оценивалось по их фотосинтетической активности неразрушающим способом на портативном хлорофилл-флуориметре PAM – Junior (Германия, Heinz Waiz GmbH), работающем по типу амплитудно-импульсной модуляции флуоресценции хлорофилла – метод PAM (pulse-amplitude modulation).

Оценка токсичности фильтрата культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas*, а также фитопатогенных грибов *M. cinerea*, *A. alternata* и *F. oxysporum* по отношению к растению-хозяину с использованием листовых высечек вишни показала, что по сравнению с бактерией фитотоксичность грибов выражена в наибольшей степени. Фотосинтетическая активность тканей листа на 6 сутки инкубирования в 10%-ном растворе токсических метаболитов бактерии *Pseudomonas* составил 0,69 у. е., при этом показатели в опыте с растворами культуральных фильтратов грибных патогенов

нов *A. alternata*, *M. cinerea* и *F. oxysporum* были равны 0,43; 0,42 и 0,28 у.е. соответственно.

В лабораторных условиях проводилось изучение фитотоксичности метаболитов искусственно созданных бактериально-грибных ассоциаций. При совместном культивировании на жидкой питательной среде бактерии *Pseudomonas* и грибов *A. alternata*, *M. cinerea*, *F. oxysporum* установлено ослабление фитотоксичности метаболитов ассоциаций по сравнению с фильтратами чистых культур.

После инкубирования листовых высечек в течение 6 сут в растворах токсических метаболитов искусственно созданных микробных ассоциаций (*Pseudomonas* + *A. alternata*; *Pseudomonas* + *M. cinerea*; *Pseudomonas* + *F. oxysporum*) фотосинтетическая активность растительных тканей была выше, чем в вариантах с чистыми культурами грибов и составила 0,56; 0,51 и 0,37 у. е. соответственно. Это связано с ослаблением физиологической активности грибных патогенов под влиянием бактерии рода *Pseudomonas* при их совместном культивировании (рисунок).

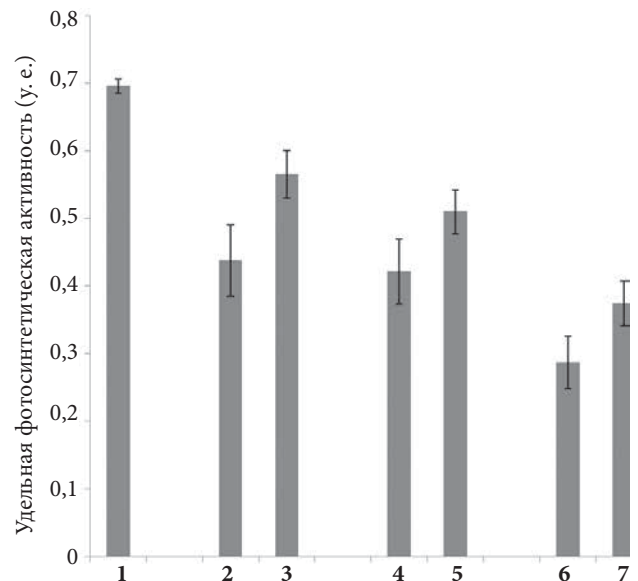


Рис. Фотосинтетическая активность листьев вишни, инкубируемых в течение 6 сут в токсических метаболитах микроорганизмов и их ассоциаций 1 – *Pseudomonas*, 2 – *A. alternata*, 3 – *Pseudomonas* + *A. alternata*, 4 – *M. cinerea*, 5 – *Pseudomonas* + *M. cinerea*, 6 – *F. oxysporum*, 7 – *Pseudomonas* + *F. oxysporum*

Таким образом, выделенная нами эндофитная бактерия из рода *Pseudomonas* выполняет роль протектора и предотвращает развитие грибной инфекции у косточковых культур благодаря наличию токсинов фунгицидного и фунгистатического действия, что определяет ценность данных бактериальных штаммов в биоконтроле болезней сельскохозяйственных культур. Так как паразитизм выделенных эндобактерий в отношении растения-хозяина не имеет такой выраженной формы и активности в отличие от грибов, присутствие в латентном состоянии бактериальной микробиоты в сосудах растений помогает растениям в борьбе с грибными болезнями. Такой иммунитет в

литературе определен как протективный (Макаров, 1994; Ischenko, 2001). Но, несмотря на это, следует с высокой степенью настороженности относиться к тому, что в бессимптомных растениях системно присутствует бактерия из рода *Pseudomonas*, так как существует опасность вспышки бактериозов при изменении условий среды и ослаблении защитных свойств растений.

Проведенные исследования по изучению антифунгальной активности эндофитных бактерий косточковых культур являются теоретическим основанием для разработки методологических и практических подходов к интегрированной защите растений от болезней.

Выявленные закономерности взаимодействия элементов в системе среда–хозяин–паразит позволят эффективно оценить и использовать потенциал биологических объектов при создании новых методов подавления патогенных организмов, что в свою очередь обеспечит стабильность агроценозов.

### Список литературы

1. Смольякова В.М., Пузанова Л.А., Якуба Г.В. и др. Оптимизация структуры патосистем и регулирования численности вредных организмов в плодовом агроценозе. Садоводство и виноградарство. 2008; 5: 20-1.
2. Прах С.В., Мищенко И.Г. Основные тенденции формирования мико-энтомоценозов косточковых насаждений в Краснодарском крае. Плодов. и виногр. Юга России [Электр. ресурс]. Краснодар: СКЗНИИСиВ. 2013. №20(2). Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/13/02/08.pdf>. Дата доступа: 15.03.2013.
3. Макаров В.В., Бакулов И.А., Семенихин В.В., Филлипов А.Л. Внутриклеточный паразитизм и протективный иммунитет. Вестн РАСХН. 1994; 3: 45-9.
4. Ischenko L.A. Protective immunity of fruit plants. Eucarpia Fruit Breeding, Section Newsletter, 2001;5: 32-3.

## ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ТОМАТА ИНДУКТОРАМИ УСТОЙЧИВОСТИ И ДРУГИМИ БАВ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СФЕРУ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

Поликсенова В.Д.

Белорусский государственный университет, Минск

Современные технологии возделывания сельскохозяйственных растений насыщены средствами химической защиты, что оправдывается постоянной циркуляцией в агроценозах возбудителей заболеваний разной этиологии. В связи с неизбежностью применения фунгицидов и, как следствие, угрозой накопления остаточных количеств ядохимикатов в урожае, попадания их в окружающую среду, предпринимаются попытки снизить пестицидный пресс. Наряду с селекцией болезнестойчивых сортов этот путь включает использование в технологии возделывания различных биологически активных веществ, оказывающих положительное влияние на продуктивность и устойчивость растений к биотическим факторам среды.

Установлено, что в качестве индукторов устойчивости может выступать широкий круг веществ из большой группы структурно несходных соединений органической и неорганической природы: вторичные метаболиты микроорганизмов (бактерий *Bacillus*, грибов р. фузариум, симбиотрофных грибов-эндофитов, трутовых грибов и др.) и растений (брасиностероиды, флавоноиды, стероидные гликозиды, тритерпеновые и гидроксикоричные кислоты и др.), гетерополисахариды клеточной стенки грибов, гуматы торфа, микроэлементы, фенолы, системные фунгициды и многое другое. В ряде исследований показано, что многие из них влияют на ростовые процессы, обладают фитогормональной активностью.

И, наоборот, нередко регуляторы роста обладают способностью повышать устойчивость растений к патогенам [1]. Растения, обработанные индуцирующими агентами, активизируют множественные защитные

ответные реакции, которые формируют химические или физические барьеры против проникновения и развития патогена [2]. В некоторых публикациях, касающихся препаратов системного действия, указано, что при обработке ими растений происходит не только ингибирование прорастания спор и развития мицелия, но и нарушается репродуктивная функция патогенов.

Например, препарат строби предотвращает прорастание спор и споруляцию пероноспорных, ржавчинных и мучнисторосяных грибов; азоксистробин оказывает антиспорулирующее действие на патогены из отделов Oomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Deuteromycota [3, 4]. Комбинированные фунгициды арцерид, ридомил, сандофан не влияют на прорастание спор, но эффективно подавляют рост мицелия и образование зооспорангиев, ооспор и хламидоспор [3].

В наших многолетних исследованиях (с 1984 г.) в качестве потенциальных иммуномодуляторов исследовался широкий круг веществ биогенной и абиогенной природы: стероидные гликозиды, системные фунгициды, микроэлементы, различные фенольные соединения, микробиологические препараты, СВЧ-облучение, продукты метаболизма патогенных и сапротрофных грибов, экстракт рейнутрии сахаринской, соединения гуанидина. Обработка семян томата разных сортов для открытого и защищенного грунта в большинстве случаев приводила к повышению общей урожайности и увеличению доли здоровых плодов в структуре урожая. Вместе с тем, нами отмечено заметное угнетение репродуктивной функции грибов (количество образовавшихся спор), причем, как у патогенных, так и у



вторичных сапротрофных на листьях с симптомами заражения. Так, наименьшая интенсивность спорообразования комплекса разных грибов по сравнению с контролем (замачивание семян в воде) наблюдалась в вариантах с обработкой семян стероидным гликозидом (фитогормоном) пурпуреагитозидом (39,9 %) и системным фунгицидом сандофаном (39,8 %).

В более слабой степени ингибировали спорообразование микобиоты стероидные гликозиды мелонгозид (55 %) и капсикозид (67,4 %). В табл. 1 представлена интенсивность спороношения *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в эксперименте с искусственным заражением листьев.

Такого же плана результаты были получены при исследовании эффектов влияния металлокомплексов

Табл. 1. Влияние обработки семян томата стероидными гликозидами и системными фунгицидами на репродуктивную функцию *Ph. infestans*.

Вариант	Поражение листьев фитофторозом	
	Средний балл поражения	Интенсивность спороношения патогена, шт./см <sup>2</sup>
Контроль (вода)	2,0	217,4
Пурпуреагитозид	<b>1,4</b>	<b>24,7</b>
Капсикозид	<b>1,0</b>	135,9
Томатозид	<b>1,3</b>	113,2
Мелонгозид	1,7	169,0
Сандофан М	<b>1,3</b>	125,4
Ридомил МЦ	<b>1,0</b>	<b>16,3</b>
Строби	<b>1,1</b>	<b>18,6</b>

Таблица 2. Влияние обработки семян комплексными препаратами на основе гуанидинов на поражение томата альтернариозом и спороношение возбудителя *A. solani*.

Вариант	Альтернариоз (пятнистость листьев)		
	Поражение растений, балл	Кол-во спор/0,01 мл смыва с 1 см <sup>2</sup> некроза	Среднее количество ростковых гиф/спору
Контроль (вода)	4,1	3	5,9
Стандарт (KMnO <sub>4</sub> )	6,1	9,6	5
ПГМГХ	1,9	4	5,8
ПГМГХ+K1 (содержание Cu <sup>2+</sup> ± 1% масс.)	6,2	1,3	2,2
ПГМГХ+K2 (содержание Cu <sup>2+</sup> ± 2% масс.)	3,7	0	-
ПГМГХ+K5 (содержание Cu <sup>2+</sup> ± 5% масс.)	2,2	0	-

полигексаметиленгуанидинхлорида (ПГМГХ) с ионами меди (варианты K1, K2, K5) на поражение томата альтернариозом (возбудитель – *Alternaria solani* Ell. Et Mart.).

Анализ формирования вторичной инфекции показал, что на листьях, пораженных альтернариозом, в вариантах обработанных ПГМГХ+K2 и ПГМГХ+K5 вообще не образуется спороношение, а при обработке ПГМГХ+K1 их количество меньше, чем у стандарта в 7 раз (табл. 2).

Дальнейшее развитие инфекционного процесса на плантации зависит не только от интенсивности спорообразования патогена на пораженных растениях, но и от качества вторичного инокулюма.

Оказалось, что споры, образовавшиеся на растениях, обработанных ПГМГХ, не прорастают, в отличие от контрольных вариантов, в течение часа, но спустя 3 часа прорастают так же, как и в контрольных вариантах. Подобная задержка в прорастании спор может иметь в естественных условиях большое значение с точки зрения эпифитотиологии.

Дело в том, что оптимальными условиями для заражения томата являются короткие теплые дожди. Т.е. в естественных условиях активное прорастание спор и заражение происходит вскоре после дождя. После высыхания дождевых капель процесс прорастания спор резко тормозится. Таким образом, замедленное прорастание спор с обработанных растений снижает угрозу вторичного заражения томата.

Учитывая, что споры возбудителя альтернариоза многоклеточные и образуют по несколько ростковых гиф, способных проникнуть в ткани растения, нами определено, какое же их количество образуется у спор, смытых с листьев разных вариантов опыта (там, где они вообще сформировались).

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что при обработке семян ПГМГХ+K1 количество ростковых гиф у многоклеточных спор возбудителя снижается по сравнению с контролем в 2,7 раза.

Отличную от приведенных реакцию мы получили при обработке семян препаратом Церера, полученным на основе эхинацеи бледной. Она стимулировала ростовые процессы растений, привела к повышению раннеспелости, увеличению отдачи раннего урожая в 2,3 раза по сравнению с контролем, однако одновременно привела к раннему и в целом значительному поражению растений, сопровождалась повышением пораженности плодов фитофторозом в 2,4 раза, снижением устойчивости растений к возбудителю альтернариоза.

Количество образовавшихся спор патогена *A. solani* на пораженной ткани превысило вариант-стандарт в 10 раз, они обладали наиболее высокой энергией прорастания, которая превышала все остальные варианты, включая контроль.

Таким образом, повышение устойчивости растений к патогенам при обработке биологически активными препаратами и соединениями проявляется не только

снижением количества точек проникновения патогенов и размером площади некротической ткани (балл поражения), но и угнетением репродуктивной способности грибов и грибоподобных организмов, а также энергии прорастания образовавшихся спор.

#### Список литературы

1. Поликсенова В.Д. Микозы томата: возбудители заболеваний, устойчивость растений. Минск: БГУ, 2008: 157 с.
2. Тарчевский И.А., Чернов В.М. Молекулярные аспекты фитоиммунитета. Микол. фитопатол. 2000; 34(3): 1-7.
3. Защита растений от болезней в теплицах (справочник) под ред. А.К. Ахатова. М. 2002: 464 с.
4. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа. 2001: 160 с.

## ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФИТОФТОРОЗА И АЛЬТЕРНАРИОЗА ТОМАТА

Райчук Т.Н.

Центральная фитосанитарная лаборатория. Киев, Украина

Томат принадлежит к числу основных овощных культур, которые выращивают в Украине. Получению высокого урожая этой культуры, в значительной степени препятствуют множество грибных болезней, из которых фитофтороз и альтернариоз являются одними из наиболее распространенных и вредоносных. Потери от альтернариоза в Украине в среднем составляет 30–50%, а от фитофтороза, в годы благоприятные для его развития – 50–100%.

Изучение микобиоты томата проводилось путем регулярных исследований культур в периоды вегетации 2006–2013 гг. Материалом для исследований служили инфицированные листья, стебли, плоды, чашелистики, плодоножки, собранные в Киевской области (зона северной Лесостепи Украины). Выделение изолятов в чистую культуру проводили по общепринятой методике. Идентификация микромицетов проводилась в соответствии с культуральными и морфологическими признаками [1, 2, 4].

Известно, что частота и интенсивность вспышки болезней отличается по годам, регионам и зависит от климатических факторов. Проявление фитофтороза за время исследований было кратковременным и не приносило ощутимого вреда растениям. Были идентифицированы 4 вида *Alternaria*: *A. solani*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*, *A. alternata*. Первые два, из которых преобладали на листьях томатов.

Обработка семян растений томата биологически активными веществами положительно влияет на энергию прорастания и всхожесть семян, стимулируется рост и развитие растений, повышается адаптация к неблагоприятным факторам окружающей среды, урожайность, улучшается качество продукции.

В 2009–2013 гг. мы провели вегетационные исследования по изучению характера действия нескольких

биологически активных веществ, таких как: иммуноцитопит, агат-25 К, вермистим и ЭМ-1 на возбудителей фитофтороза (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) и альтернариоза (*Alternaria solani* Ell. et Mart) томата при разных инфекционных нагрузках.

Необходимо отметить, что искусственную инокуляцию в полевых условиях мы также проводили, но результаты исследований, проведенные в лабораторных условиях, были более достоверными по точности.

Семена томата сорта Лагидный высевали в горшочки [3]. Растения выращивали в вегетационном домике. Одним биологическим препаратом обрабатывали 20 растений. Обработку проводили в фазе 4-5 настоящих листьев. На следующий день 10 растений инокулировали суспензией приготовленной с чистой культурой гриба *Ph. infestans*, другие десять – суспензией с чистой культурой гриба *A. solani*. Из 10 растений пять заражали 50 конидиями в поле зрения микроскопа при увеличении 120x, другие пять – 100 конидиями патогенов.

Учеты проводили через 3, 5 и 7 сут. Инокуляцию проводили суспензией, приготовленной из чистой культуры гриба *Ph. infestans*, что была культивирована на кусочках картофеля сорта Незабудка, а также суспензией из чистой культуры гриба *A. solani*, культивированной на картофельно-глюкозном агаре.

При инокуляции 50 конидиями на вариантах с использованием иммуноцитопита и ЭМ-1 поражение по отношению к контролю составило 60-70%. Через 3 суток процент поражения в этих вариантах увеличился по отношению к предыдущим учетам, но остался ниже, чем в контроле. На 5-е сут после обработки процент поражения почти сравнялся с контрольным, а через 7 сут – даже превышал его, т.е. препараты сдерживали развитие фитофтороза только на протяжении 5 сут.

В сравнении с контролем ни один из исследуемых препаратов не снижал качество поражения *A. solani*.

Таким образом, проведенные нами исследования доказывают, что биологически активные вещества оказывают некоторое фунгипротекторное действие, но, применение препаратов данного класса возможно только при умеренном развитии болезней. В условиях отсутствия угрозы быстрого развития фитофтороза эти препараты могут быть применены в защите томата от болезней, что существенно снизит химический прессинг на агросистему.

Кроме этого, эти препараты за экспериментальными данными повышают урожай томатов, что имеет большое значение для овощеводства.

### Список литературы

1. Билай В.И., Эланская И.А. Основные микологические методы в фитопатологии. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Под ред. В.И.Билай. Киев: Наукова думка. 1982: 551 с.
2. Ганнибал Ф.Б. Видовой состав, таксономия и номенклатура возбудителей альтернариоза листьев картофеля. Лаборатория микологии и фитопатологии им. А.А. Ячевского ВИЗР. История и современность. Под ред. А.П. Дмитриева. СПб.: ВИЗР. 2007: 142-8.
3. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. Пер. с нем. К.В. Попковой, В.А. Шмыгли. М.: Агропромиздат. 1987: 224 с.
4. Simmons E.G. *Alternaria: an Identification Manual*. Utrecht: CBS. 2007. 775 p.

## ИЗУЧЕНИЕ ФИТОПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ ГРИБА *SEPTORIA NODORUM*

Райзер О.Б.<sup>1</sup>, Горбуля В.С.<sup>2</sup>, Хапилина О.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РГП «Национальный центр биотехнологии». Астана. Казахстан

<sup>2</sup>Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллин. Астана. Казахстан

В Республике Казахстан, как и во многих других странах мира, септориоз относится к особо опасным болезням зерновых культур. Вызывается заболевание грибами *Septoria tritici* и *Septoria nodorum*. Поражение верхних ярусов листьев растений пшеницы грибами рода *Septoria* вызывает значительную потерю урожая и его качества. Погодно-климатические условия Казахстана благоприятствуют развитию и распространению септориоза, снижая рентабельность зернового производства [1]. Септориоз проявляется в виде пятнистостей растений, наиболее вредоносен в фазу колошения и цветения [2].

Использование токсичных метаболитов фитопатогенных микромицетов в культуре тканей растений позволяет получить новые формы, обладающие устойчивостью к заболеванию. Одно из преимуществ использования очищенных токсинов либо культуральных фильтратов фитопатогенных грибов в качестве селективных агентов селекции *in vitro* заключается в отсутствии необходимости применения живых культур микроорганизмов. Это позволяет значительно расширить масштаб исследований вследствие использования большого количества растительных клеток, при этом их реакция на воздействие токсичных метаболитов в значительно меньшей степени зависит от условий окружающей среды, чем при реакции на введение патогена *in vivo*.

На патогенез существенное влияние оказывают свойства возбудителей, такие как патогенность, токсиногенность, агрессивность. От того, насколько в полной мере проявляются эти свойства, зависит успех дальнейших исследований в фитопатологии, клеточной селекции растений на устойчивость к возбудителям. Целью исследований являлась оценка фитопатогенных свойств 4 аборигенных штаммов грибов *Septoria nodorum* для дальнейшего использования их культурального фильтрата в селекции пшеницы *in vitro* на устойчивость к септориозу. Штаммы были

выделены в результате маршрутных обследований посевов пшеницы в различных областях Северного Казахстана с участием Койшибаева М.К.

Изучение проводили на отрезках листьев (стадия 1-2 листа) 3 образцов пшеницы: Акмола 2 и линий Л.609/94-3, Л.148/97-16. Оценку устойчивости растений-регенерантов к возбудителю септориоза проводили бензимидазольным методом. Суть его заключается в том, что водный 0,01%-ый раствор бензимидазола слабой концентрации позволяет длительное время сохранять жизнеспособность отделенных от растения листьев (или их отрезков), помещенных в раствор.

Для оценки устойчивости использовали поверхность стерилизованных 1%-ным раствором хлорамина отрезки листьев 10-дневных проростков пшеницы, которые помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу. Поверхность листьев смачивали 0,01%-ным раствором бензимидазола, после чего инокулировали кусочками спороносящего мицелия гриба.

Период инкубации составил 5–7 дней, по истечении которого проводили визуальную оценку по степени поражения патогеном. Учитывали такие признаки, как образование некротических пятен, интенсивность их образования, наличие пожелтения листьев, а также внедрение гиф в поверхностные ткани листьев [3].

Развитие болезни учитывали на 7-е сут после инокуляции. Для учета пораженности листьев грибом *S. nodorum* применяли международную шкалу Джеймса с показателями степени поражения листьев в процентах [4].

Проявление симптомов поражения диагностировали уже на второй день после заражения. Наблюдали активный рост мицелия у всех штаммов на отрезках листьев, однако активный рост мицелия еще не свидетельствует о патогенности штамма. На всех отрезках отмечали первичные симптомы инфицирования отрезков – мелкие желто-коричневые, темно-коричневые пятна, окруженные хлоротичной и некротичной зоной

вокруг. В дальнейшем наблюдали дифференциацию штаммов по проявлению патогенных свойств. У штамма Sn 1/05 хлоротичные пятна интенсивно сменялись некротизированной тканью желто-коричневого цвета. Интенсивность поражения варьировала от 10 до 25%, фитопатогенность составила 45%. У остальных штаммов интенсивность поражения не превышала 5–10%, фитопатогенная активность была на уровне 20%.

Дальнейшие исследования по оценке фитотоксичных свойств штаммов и их ферментативной активности показали перспективность использования штамма Sn 1/05 для использования в культуре тканей пшеницы для отбора устойчивых форм.

## МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КОРМОВЫХ КУЛЬТУР НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ

*Разгуляева Н.В., Костенко Н.Ю., Пуца Н.М.  
ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса, Лобня*

Известно, что действительную норму реакции генотипа испытуемого растения на воздействие патогена с учетом онтогенетических изменений иммунологических свойств в большинстве случаев можно выявить только на жестком инфекционном фоне в полевых условиях.

Вместе с тем, существенно облегчить и сократить объем и сроки работы в полевых условиях могут методы лабораторной оценки устойчивости к болезням. Косвенные методы оценки с использованием биохимических показателей перспективны с точки зрения ускорения сроков оценки, однако в этом случае важным моментом становится корреляция полученных результатов с устойчивостью образцов на полевом инфекционном фоне.

Методы ускоренной оценки устойчивости позволяют создавать строго контролируемые, оптимальные для развития патологического процесса условия. Большое значение имеет возможность проведения дифференцированной оценки устойчивости образцов к отдельным изолятам, штаммам патогена на всех этапах селекционного процесса. При этом сокращается время контакта возбудителей болезней и растений, что способствует разрыву в темпах их сопряженной эволюции.

В целом, эти методы можно классифицировать как лабораторные приемы оценки устойчивости, при которых обеспечивается непосредственный контакт растения-хозяина и патогена. В ряде случаев для оценки восприимчивости оказалось возможным использование токсинов и других метаболитов грибов, споровой или мицелиальной суспензии возбудителей грибных болезней и т.д.

К настоящему времени в лаборатории иммунитета ВНИИ кормов разработано и усовершенствовано более 10 методов ускоренной оценки болезнестойкости, позволивших создать более 50 сортообразцов с повышенной устойчивостью к болезням:

1. лабораторно-вегетационный метод оценки клевера лугового к раку;
2. лабораторно-полевой метод оценки клевера лугового к дитиленхозу;

### Список литературы

1. Койшибаев М. Листо-стеблевые инфекции яровой пшеницы в Северном Казахстане. *Защ. карант. раст.* 2003; 8: 17-20.
2. Михайлова Л.А., Пригоровская Т.Г. Желтая пятнистость листьев пшеницы – *Pyrrenophora tritici-repentis*. *Микол. фитопатол.* 2000; 34(1): 7-16.
3. Афанасенко О.С. Методы анализа популяций возбудителей пятнистости листьев ячменя. *Сб. мет. реком. по защ. раст.* СПб. 1998: 127-35.
4. Санин С.С., Санина А.А., Мотовилин А.А., Пахолкова Е.В. Защита пшеницы от септориоза. *Прилож. к журн. Защ. карант. раст.* 2012; 4: 62-82 с.

3. лабораторно-полевой метод оценки клевера лугового к фузариозу;
4. лабораторно-полевой метод оценки озимого рапса к склеротиниозу;
5. бензимидазольный метод оценки устойчивости костреца к гельминтоспориозу;
6. бензимидазольный метод оценки устойчивости клевера лугового к раку;
7. бензимидазольный метод оценки устойчивости клевера лугового к фузариозу;
8. бензимидазольный метод оценки устойчивости озимого рапса к склеротиниозу;
9. бензимидазольный метод оценки устойчивости озимого рапса к фузариозу;
10. метод отбора *in vitro* люцерны с использованием в качестве селективных факторов пектолитических и целлюлолитических ферментов;
11. лабораторный метод оценки устойчивости тимфеевки луговой к гетероспориозу.

По результатам многолетней разработки методов лабораторной оценки устойчивости кормовых культур к патогенам опубликованы Методические указания по лабораторной оценке устойчивости кормовых культур к болезням [1].

Методы ускоренной оценки устойчивости клевера лугового к раку и фузариозу, основанные на проращивании семян в культуральных жидкостях возбудителей с последующим выращиванием растений в сосудах с почвенной инфекцией патогенов дают возможность отбирать растения, которые в условиях полевых инфекционных фонов поражаются болезнями на 20-25% ниже, чем исходные формы.

Лабораторно-полевой метод создания исходного материала клевера лугового с повышенной устойчивостью к фузариозным корневым гнилям позволяет проводить оценку устойчивости и отбор здоровых растений на всех этапах онтогенеза (от семени до семени) на искусственных инфекционных фонах в строго контролируемых условиях лабораторных и вегетационных опытов на этапе семени-проростки-молодые растения. Заключительная оценка и отбор устойчивых растений проходит в полевых условиях. Селекционная

схема создания перспективного по устойчивости к фузариозу материала предусматривает оценку семенного потомства отобранного селекционного материала на искусственном полевом инфекционном фоне. Таким путем в лаборатории иммунитета был получен образец клевера лугового, превышающий сорт-стандарт ВИК 77 по устойчивости к корневым гнилям в условиях полевого инфекционного фона на 40%.

Значительно сокращает время проведения исследований и позволяет оценить сравнительную болезнеустойчивость большого количества образцов усовершенствованный нами бензимидазольный метод. Метод модифицирован для оценки устойчивости клевера лугового к раку и фузариозу, костреца безостого к гельминтоспориозу, озимого рапса к склеротиниозу и фузариозу.

Метод сравнительной оценки пораженности растений многолетних злаковых трав возбудителем спорыньи заключается в том, что в фазу начала цветения соцветия обрабатывают споровой суспензией патогена в определенной концентрации и по наличию "медвяной росы" судят о пораженности исследуемых растений.

Наши исследования показали хорошую результативность метода отбора *in vitro* устойчивых к фузариозу растений клевера лугового и люцерны с использованием в качестве селективных факторов пекто- и целлюлолитических ферментов. Метод основан на различиях в способности корней проростков выделять протопласты под действием мацерирующего раствора, содержащего пектиназу, целлюлазу, хлористый кальций и итаконовую кислоту. Устойчивые к болезни растения выделяют в раствор значительно меньшее количество протопластов, чем восприимчивые. Установлена тесная положительная корреляция между способностью растений выделять протопласты и интенсивностью развития болезни на искусственном инфекционном полевом фоне ( $r = 0,87-0,96$ ).

Полевые искусственные инфекционные фоны для оценки болезнеустойчивости основных кормовых культур во ВНИИ кормов существуют уже более 20 лет. Для создания фонов на базе объектного фитосанитарного мониторинга посевов были выявлены основные болезни, идентифицирован видовой состав возбудителей болезней, изучены морфолого-культуральные признаки и патогенные свойства популяций возбудителей, выявлены наиболее агрессивные изоляты, создана коллекция патогенов.

В зависимости от экологических особенностей возбудителей болезней отработаны приемы обеспечения надежных контактов (инокуляции) всех опытных растений-хозяев с тем или иным патогеном на протяжении всего цикла испытания. Определены дозы, сроки и способы внесения инфекции. Для каждого фона подобран оптимальный состав инокулята, включающий наиболее распространенные в условиях Центрального региона России виды или популяции возбудителей.

Работа по созданию болезнеустойчивого исходного материала дает хорошие результаты только в том случае, когда на инфекционном фоне проводится не только оценка пораженности образцов, но и ведется интенсивная селекционная работа.

На основании многолетних исследований, проведенных в лаборатории иммунитета ВНИИ кормов по созданию образцов с повышенной устойчивостью к патогенам, разработана селекционная схема, предусматривающая не только возможность оценки исходного материала, но и создания новых сортов с расшифровкой звеньев селекционного процесса, в которых необходима непосредственная работа иммунолога [2].

Традиционными селекционными методами, используемыми иммунологами, являются рекуррентные отборы и создание поликроссных популяций. Таким образом были созданы 5 образцов костреца безостого, превышающих в фазу цветения районированный сорт Моршанский 760 по устойчивости к гельминтоспориозу на 10–15%, образец тимopheевки луговой, превышающий стандарт ВИК 9 по устойчивости к гетероспориозу на 10%, 5 образцов клевера лугового, превышающих на 25–0% сорта-стандарты по устойчивости к раку и фузариозу.

Весьма перспективным в селекции на иммунитет у кормовых культур является метод инбридинга. На основании проведенных исследований была разработана схема создания исходного материала клевера лугового с повышенной устойчивостью к раку, включающая следующие этапы: лабораторная оценка ракоустойчивости, отбор здоровых, хорошо развитых растений; самоопыление и получение инбредных поколений I1–I3 на жестком фоне заражения возбудителем рака в лабораторных условиях; отбор на полевом искусственном инфекционном фоне генотипов, повышенная устойчивость которых обусловлена генетическими факторами; создание гетерозисных гибридов.

В результате этой работы было получено 5 линий I3 клевера лугового, превышающих исходные формы по устойчивости к болезни на 38–56%, а сорта-стандарты – на 13–37%. Причем, эти линии передавали по материнской линии признак повышенной устойчивости потомству при межлинейных скрещиваниях, то есть являлись донорами устойчивости. При гибридизации этих линий было получено 11 гибридов, превышающих по ракоустойчивости сорта-стандарты на 22–44%.

Всего на инфекционных фонах лаборатории иммунитета ВНИИ кормов прошли оценку свыше 2500 перспективных образцов кормовых культур, из которых 170 показали повышенную болезнеустойчивость. С использованием методов рекуррентных отборов, инбридинга, создания межлинейных гибридов и поликроссов получено 35 оригинальных образцов клевера, костреца безостого, тимopheевки, озимого рапса, перспективных по признаку устойчивости к болезням.

#### Список литературы

1. Разгуляева Н.В., Костенко Н.Ю., Пуца Н.М., Благовещенская Е.Ю., Мезенцева О.Ю. Методические указания по лабораторной оценке устойчивости кормовых культур к болезням. М.: Россельхозакадемия. 2010: 36 с.
2. Пуца Н.М., Разгуляева Н.В., Костенко Н.Ю. Методы формирования устойчивого к патогенам исходного материала для селекции кормовых трав. В сб. Адаптивная система селекции кормовых растений (биогенетический подход). Под ред. З.Ш. Шамсутдинова. М.: Изд-во МГОУ. 2007: 157–61.

## ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ *Puccinia triticipina* ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ И SSR-МАРКЕРАМ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ РФ

Шайдаюк Е.Л., Гультаева Е.И., Казарцев И.А.  
Всероссийский НИИ защиты растений. Санкт-Петербург-Пушкин

Бурая ржавчина (*Puccinia triticipina* Erikss.) распространённое заболевание пшеницы в Северо-Западном регионе РФ. Иммуногенетическая защита – наиболее экономичный и экологически безопасный метод снижения потерь урожая от данного заболевания. Для успешного ее осуществления необходима информация о расовом составе гриба и его многолетней динамике.

Популяционные исследования возбудителя бурой ржавчины на Северо-западе проводятся в ВИЗР ежегодно. В результате мониторинга вирулентности, проводимого в 2001–2007 гг., не выявлено существенных изменений в составе популяций гриба на данной территории. Преимущественно отмечалось высокое сходство между образцами псковских, ленинградских и новгородских популяций, но в отдельные годы, например, в 2007 г., наблюдались отличия псковских от двух других северо-западных [1–3]. Калининградские популяции значительно отличались от этих трех популяций. Они характеризовались меньшей вирулентностью, и в них отмечена высокая частота встречаемости изолятов, авирулентных на линиях TcLr3a, TcLr3bg и TcLr3ka.

В Российской Федерации большинство популяционных исследований *P. triticipina* проводились с использованием признака вирулентности. В 2007 г. эти исследования были дополнены RAPD и УП-ПЦР-анализом [2–3]. В 2014 г. J. Kolmer с соавт. [4] охарактеризовали SSR-полиморфизм российских изолятов, собранных в 2006–2010 гг. в 4 зернопроизводящих регионах (Центральном, Северокавказском, Западносибирском и Поволжье). Однако в данном анализе отсутствовал инфекционный материал гриба с Северо-запада и ряда других зернопроизводящих регионов России.

**Цель исследования** – оценка полиморфизма северо-западных популяций гриба *P. triticipina* по вирулентности и SSR-маркерам.

Инфекционный материал собрали на производственных посевах и ГСУ в Псковской, Ленинградской, Новгородской и Калининградской областях в 2008–2014 гг. Популяции с сухих листьев реанимировали на восприимчивом сорте и клонировали. Всего изучено 122 монопустульных изолята с Новгородской обл., 92 – с Ленинградской, 54 – с Калининградской и 41 – с Псковской. Все изоляты охарактеризованы по признаку вирулентности. Для обозначения фенотипов использована буквенная северо-американская номенклатура, основанная на определении вирулентности к группам из 5 Lr-линий [4–5]: 1 – Lr1, Lr2a, Lr2c, Lr3a; 2 – Lr9, Lr16, Lr24, Lr26; 3 – Lr3ka, Lr11, Lr17, Lr30; 4 – Lr19, Lr20, Lr14a, Lr18; 5 – Lr2b, Lr3bg, Lr14b, Lr15.

Работа выполнена по методикам лабораторного культивирования *P. triticipina*, основанных на применении бензимидазола [6]. Для определения буквенного кода фенотипов, вычисления индексов внутривидового разнообразия и различий между популяциями по вирулентности использовали пакет программ Virulence Analysis Tool (VAT).

Для молекулярных исследований отобрано 32 изолята, из них 7 новгородских, 6 псковских, 11 ленинградских и 8 калининградских. Ленинградские изоляты были представлены пятью фенотипами вирулентности, 3 из которых являлись оригинальными и встречались только в этой популяции; калининградские, новгородские и псковские – шестью, из них 6, 3 и 5, соответственно, оригинальные.

Для оценки полиморфизма использовали семь SSR-маркеров Pr3, Pt13, Pt50, Pt55, Pt61, Pt76 и Pt91. Выделение ДНК из спорового материала гриба проводили по ранее апробированному для RAPD-анализа методикам [2–3]. Для определения размера аллелей использовали генетический анализатор ABI Prism 3500 (ABI-Hitachi, Япония).

Все тестируемые изоляты были авирулентны на линиях TcLr9, TcLr19, TcLr24 и вирулентны на TcLr11, TcLr14a, TcLr14b, TcLr16, TcLr17, TcLr18. Вариабельность по типу инфекции отмечена на линиях с генами Lr1, Lr2a, Lr2b, Lr2c, Lr3a, Lr3bg, Lr3ka, Lr15, Lr20, Lr26 и Lr30. В период 2008–2014 гг. в северо-западных популяциях, как и в других российских, отмечается тенденция нарастания вирулентности к гену Lr1. Калининградская популяция характеризовалась большими частотами вирулентности к генам Lr2a, Lr2b, Lr2c по сравнению с псковской, ленинградской и новгородской. Вирулентность к генам Lr3a, Lr3bg, Lr3ka была высокой в псковской, ленинградской и новгородской популяциях (99–100%) и ниже в калининградской (67–69%).

Это согласуется с результатами предыдущих лет исследований (2000–2007 гг.) [1–3]. Частоты вирулентности к генам Lr20 были значительно ниже в псковской популяции (29%), чем в других северо-западных (72–83%), а к гену Lr15 в новгородской (33% и 76–96% соответственно). По вирулентности к гену Lr26 наблюдались высокие различия между популяциями. В псковской популяции она составляла 100%, ленинградской – 79%, калининградской – 31% и новгородской – 43%. Это могло быть обусловлено более высоким разнообразием инфекционного материала с Ленинградской и Псковской областей, преимущественно собранного на ГСУ. Единичный изолят авирулентный к линии TcLr30 выявлен в ленинградской популяции.

Среди 309 проанализированных изолятов выявлено 47 фенотипов вирулентности: в калининградской популяции – 14, ленинградской – 23, новгородской – 20, псковской – 10. Общим для трех популяций был фенотип ТНТКТ. Различия между популяциями оценивали по трем статистическим индексам – Нея (N), Роджерса (R) и Космана (KGst). Калининградские популяции характеризовались более высокими различиями с новгородскими, и незначительно меньшими с псковскими и ленинградскими. Псковские популяции имели более высокое сходство с ленинградскими, чем с новгородскими.

32 изолята были охарактеризованы по молекулярному полиморфизму SSR-локусов. При использовании

маркеров семи микоросателлитных локусов (SSR) один Pt13 не амплифицировался у изучаемых изолятов, несмотря на множественные попытки оптимизации условий ПЦР. Можно предположить, что у данной коллекции изолятов отсутствует данный SSR-локус, либо недостаточно подобраны условия для амплификации этого маркера. SSR-локусы Pt50 и Pt55 оказались мономорфными.

При использовании SSR-маркеров Pt13, Pt91, Pt61 наблюдали варибельность по 2 аллелям, а маркера Pt76 по четырем. В целом, при использовании шести SSR-маркеров выявлен полиморфизм по десяти аллелям. Среди калининградских изолятов выявлено 5 генотипов, ленинградской, псковской – 6, новгородской – 4. Внутрипопуляционное разнообразие по SSR-генотипам было выше среди псковских и ленинградских изолятов. Калининградские изоляты по SSR-имели большее сходство с псковскими, чем с новгородскими и ленинградскими. Полученные результаты являются обоснованием для дальнейшего применения данных SSR-маркеров для анализа российских популяций.

Согласно UPGMA-дендрограмме генетического сходства (NTSYSpc, Version 2.2.), выявлено два умеренно различающихся кластера. Первую близкородственную группу составляли все новгородские изоляты, 9 ленинградских, 5 псковских и 1 калининградский. Во 2-ю группу вошли 7 калининградских изолятов, 2 – ленинградских и 1 – псковский.

Не выявлено корреляции между молекулярными фенотипами и вирулентности. Например, общий для трех популяций фенотип ТНТТR был представлен тремя молекулярными генотипами, а фенотип РНТКН, доминирующий среди ленинградских изолятов, четырьмя молекулярными. Эти данные согласуются с ранее полученными с RAPD-маркерами [2].

Таким образом, проведенный комплексный анализ с использованием анализа вирулентности и

SSR-маркеров дополнил ранее полученные сведения о структуре популяций фитопатогенного гриба *P. triticina* в Северо-западном регионе. Высокое сходство изолятов по вирулентности и SSR-маркерам псковских, новгородских и ленинградских изолятов предполагает существование единой популяции гриба на этой территории. Определенные отличия калининградской популяции от них, вероятно, обусловлены ее географическим отдалением.

#### Список литературы

1. Гульятеева Е.И. Вирулентность популяций *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* в Северо-западном регионе РФ в 2001-2003 годах. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем»: Сб. докл. Межд. н.-практ. конф. Краснодар. 2004: 132-3.
2. Гульятеева Е.И., Косман Е., Дмитриев А.П., Баранова О.А. Структура популяций *Puccinia triticina* по вирулентности и ДНК-маркерам в Северо-Западном регионе РФ в 2007 году. Микол. фитопатол. 2011; 45(1): 70-81.
3. Gulyaeva EI, Dmitriev A.P., Kosman E. Regional diversity of Russian populations of *Puccinia triticina* in 2007. Canadian J. Plant Pathol. 2012; 34(2): 213-24.
4. Kolmer JA, Kabdulova M. G., Mustafina M.A., Zhemchuzhina N. S. Dubovoy V. Russian populations of *Puccinia triticina* in distant regions are not differentiated for virulence and molecular genotype. Plant Pathol. 2014. Online.
5. Long DL, Kolmer JA. North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*. Phytopathology. 1989; 79: 525-9.
6. Михайлова Л.А., Гульятеева Е.И., Мироненко Н.В. Методы исследования генетического разнообразия популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. СПб.: РАСХН, ВНИИЗР, Инновац. центр защ. раст. 2003: 24.

## ПРОБЛЕМЫ ФУЗАРИОЗОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В УЗБЕКИСТАНЕ И ИХ РОЛЬ В МИКОТОКСИКОЗАХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Шеримбетов А.Г.<sup>1</sup>, Захидов А.<sup>1</sup>, Шералиев А.Ш.<sup>1</sup>, Глухова Л.А.<sup>1</sup>, Хайтбаева Н.<sup>2</sup>, Рахмонов Ж.Х.<sup>3</sup>,  
Хакимов А.А.<sup>2</sup>, Сайитганиева З.Т.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт генетики и экспериментальной биологии растений АН РУз, Ташкент, Узбекистан

<sup>2</sup>Ташкентский государственный аграрный университет, Ташкент, Узбекистан

<sup>3</sup>Узбекский научно-исследовательский институт защиты растений, Ташкент, Узбекистан

В современных экологических условиях, при возрастающем влиянии антропогенных факторов на структуру биоценозов приспособляемость сапротрофных форм рода *Fusarium* к паразитическому образу жизни повышается. Эволюция их паразитизма наблюдается не только на растениях, но и в организмах животных и насекомых, где они выступают в качестве возбудителей различных заболеваний (Шералиев, 2014).

Заболевание человека и сельскохозяйственных животных, вызываемые грибами, разделены на две группы: микозы и микотоксикозы. Микозы – заболевания вызываемые грибами, паразитирующими на

живых тканях и органах, микотоксикозы – заболевания, вызываемые при употреблении в пищу или корм продуктов и кормов, пораженных токсинообразующими грибами.

Все виды растительного сырья, продукты питания, плоды, овощи и корма представляют весьма благоприятный субстрат для развития многочисленных видов грибов, в том числе рода *Fusarium*, вызывающих снижение их питательных качеств и образующих токсические вещества.

В изучение токсинообразующих грибов и их этиологической роли в заболеваниях человека и животных внесли значительный вклад Билай и Пидопличко

(1970), Саркисов (1972) и другие исследователи. Многими зарубежными авторами установлены токсические свойства более 50 видов грибов, поражающих пищевые продукты, овощи, плоды и бахчевые культуры.

В последние годы в различных хозяйствах республики Узбекистан на полях хлопково-пшеничного севооборота отмечалась сильная степень поражения хлопчатника, пшеницы, бахчевых, овощных и плодовых культур фузариозным вилтом. Так как в биоценозах почв сформировались сообщества грибов и культурных растений, приуроченных двум или нескольким культурным растениям и в результате гибридизации агрессивных форм поражающих посевы хлопчатника и пшеницы, образовались новые агрессивные формы патогена видов рода *Fusarium* отличающиеся не только патогенностью, но и физиологическими свойствами.

При микологическом анализе образцов из больных корней и зерен пшеницы выделяются представители грибов рода *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. graminearum*, а из стебля *F. verticiloidis*; из лука *F. solani*, из чеснока *F. javanicum*, из кукурузы *F. oxysporum*, из плодов дыни *F. oxysporum* var. *ortoceras*, из бобовых культур *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. javanicum*, *F. moniliforme*.

Токсины этих грибов, включаясь в трофический цикл биосферы через растительную пищу и корм и попадая в организм человека и животных, нередко являются причиной острых и особенно хронических заболеваний. Токсины этих видов фитопатогенных грибов относятся к различным классам химических соединений – пептидам, полисахаридам, производным аминокислот, органическим кислотам, терпеноидам и стероидам, липидоподобным веществам, производным пиридина и фураном, а также хинонам (Билай, 1977).

Как показали результаты многочисленных микологических анализов пораженных растений, патогенные представители *Fusarium* совместно встречаются с представителями *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, образуя микроценозы, синтезирующие токсины, антибиотики и биологически активные вещества.

Эти токсинообразующие грибы могут встречаться на поверхности растений или внутри или могут повреждать их во время уборки и хранения при благоприятных для их развития условиях или поражать растения во время вегетации. Как отмечено в докладе технической группы ВОЗ (2010), токсины грибов, находящиеся в пищевых продуктах, могут создавать при определенных условиях опасность для здоровья потребителя. В связи с этим изучение токсических свойств видов этого рода представляется весьма необходимым как для медико-санитарных, так и для фитопатологических целей.

#### Список литературы

1. Билай В.И., Пидопличко Н.М. Токсинообразующие микроскопические грибы. Киев: Наукова думка. 1970. 289 с.
2. Билай В.И. Фузариозы. Киев: Наукова думка. 1977: 439.
3. Саркисов А.Х. Роль микотоксинов в патологии человека и животных. Тез. докл. симпозиума по микотоксинам. Киев: Наукова думка. 1972: 8.
4. Шералиев А.Ш., Рахимов Ж.Х., Болезни нута в экстремальных условиях богары. Энерго- и ресурсо-эффективные технологии производства и хранения сельскохозяйственной продукции. Мат. Межд. н.-практ. конференции молодых ученых, аспирантов и студентов. 30-31 окт. 2014, Харьков. 144-8 с.

## ТЕСНАЯ СВЯЗЬ ОРХИДЕЙ С ГРИБАМИ-МИКОРИЗООБРАЗОВАТЕЛЯМИ

Шейко Е.А.<sup>1</sup>, Крупа Н.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины. Киев, Украина

<sup>2</sup>Белоцерковский национальный аграрный университет. Белая Церковь, Украина

Семейство Орхидные, многие представители которого редки и находятся под угрозой исчезновения, заслуживает серьезного внимания с точки зрения изучения и сохранения [1]. Для разработки реальных мер по охране этих видов необходимо иметь достаточно полные сведения по их биологии, распространению, экологии и фитоценологии, ритму сезонного развития, численности и динамике популяций, реакции на антропогенное воздействие. Одной из важнейших черт биологии орхидных является их тесная связь с грибами-микоризообразователями [2; 3].

За XIX–XX вв. было проведено большое количество исследований, посвященных изучению взаимодействия орхидей и гриба, но до сих пор остается ряд нерешенных вопросов. С одной стороны, степень микотрофности в онтогенезе орхидных – очень динамичная величина, т.к. растения обмениваются с грибами различными метаболитами, но до сих пор нет единого мнения о том, насколько они облигатные. С другой стороны, если рассматривать биологию

тропических орхидей в контексте их размножения в асептических условиях, то большинство из них являются облигатными микотрофами. По мнению работы [4], в микоризных симбиозах гриб паразитирует на высшем растении. Напротив, другие исследователи (Франк, Люк) считают, что высшее растение в этом случае паразитирует на своем микоризном грибе. Наконец, согласно данным [5], компоненты микоризного симбиоза находятся друг с другом в отношениях взаимного паразитизма.

Так как между орхидеей и грибом происходит обмен веществами различной природы, то можно предположить наличие аллелопатических взаимоотношений. Были выявлены различные фитогормоны, выделяемые грибом, которые усиливают рост орхидей. Исследования синтетической активности у 16 культур грибов у эпифитных и наземных орхидей показали способность к синтезу индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), а также веществ близких к гиббериллину, зеатину и кинетину. Опыты, проводимые по экзогенному



обеспечению фенолами, показали, что под их влиянием происходит установление симбиотического взаимодействия, наращивание вегетативной массы высшего растения, стимулируется расселение микоризы [6; 7].

Некоторые микромицеты (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Phoma*) и базидиомицеты (*Dendrobium moschatum*) ингибируют развития семян орхидей [8]. Способность грибов, ассоциированных с орхидными, выделять во внешнюю среду ауксины и другие необходимые вещества открывает возможность воздействия микроорганизмов на общий гормональный баланс растений, стимулируя дополнительное корнеобразование орхидей, а также влиять на прорастание их семян.

Цель исследований – изучение анатомо-морфологических, эмбриологических, симбиотических и аллелопатических особенностей орхидей.

Материалом исследования служили корневищные геофиты из подсемейства Orchidoideae: *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Epipactis palustris* (L.) Crantz. Анатомические препараты, качественные гистохимические реакции готовили по методике Барыкиной [9].

Потенциальную и реальную семенную продуктивность определяли по методике Назарова [10]. Качественная реакция на лигнин заключалась в обработке срезов флороглюцином (триоксибензол,  $C_6H_3(OH)_3 \times 2H_2O$ ) в сочетании с концентрированной соляной кислотой. В результате реакции одревесневшие элементы приобретают малиново-красный цвет. Интенсивность цветной реакции зависит от степени одревеснения. Для выявления пектиновых веществ срезы обрабатывали жавелевой водой, затем промывали дистиллированной водой, нейтрализовали уксусной кислотой и окрашивали метиленовым синим. В результате пектиновые вещества приобретали сине-голубой цвет. При проведении качественной реакции на фенольные соединения срезы помещали в раствор, включающий в себя 10 мл 5%-ного раствора нитрата натрия и две капли 50% серной кислоты. Затем добавляли каплю 5%-ного едкого калия.

Согласно данному методу, хлорогеновая кислота и другие фенольные соединения с орторасположенной гидроксильной группой, вступая в реакцию с азотистой кислотой, переходят в соединение, которое с едким калием дает красное или коричневое окрашивание. Эта реакция для хлорогеновой кислоты не строго специфична. Подобное окрашивание могут давать и другие фенольные соединения (пирокатехин, протокатеховая и кофейные кислоты), а также хиноны [9].

Для большинства исследованных видов автотрофных орхидей характерна эумицетная толипофаговая эндомикориза. Локализация эндофитных несовершенных грибов-микоризообразователей в клетках и тканях подземных вегетативных органов обусловлена их анатомо-морфологическими особенностями. В клетках эпibleмы корня гифы отсутствуют, но в корневых волосках выявлены коммуникационные гифы. В субэпидермальных слоях первичной коры корня расположены пелотоны. В мезодерме отмечено расщепление гиф. В эндодерме и центральном цилиндре гифы не обнаружены.

Степень микотрофности увеличивается в 2 раза от апекса корня к его основанию. В корневищах гифы гриба обнаружены преимущественно в эпидерме и в

первичной коре. В клетках первичной коры, содержащих большое количество крахмальных зерен, пелотонов нет. Наибольшее количество клеток с гифами гриба наблюдали в зоне перехода расширенной части клубня в шнуrowидное окончание.

Частота встречаемости микоризной инфекции изученных видов орхидей варьирует от  $1,9 \pm 0,5\%$  – *E. helleborine*, до  $8,4 \pm 0,3\%$  *E. palustris*. При этом четко прослеживается тенденция – у корневищных видов степень микотрофности ниже, чем у корнеклубневых орхидей. Корневищные геофиты, имея максимальную степень микотрофности, характеризуются минимальным количеством семязачатков в завязи и семян в коробочке. С увеличением степени микотрофности количество семязачатков в завязи возрастает в 6 раз. При увеличении частоты встречаемости микоризной инфекции количество семян в коробочке увеличивается примерно в 8 раз.

Динамика симбиотических отношений меняется по фазам онтогенеза. Частота встречаемости микоризной инфекции уменьшается от ювенильной к генеративной стадии у исследованных видов. Степень микотрофности зависит от климатических и эдафических факторов. С увеличением содержания гумуса на  $0,5\%$  степень микотрофности уменьшается в 2,6 раза. Действие pH среды на показатель частоты встречаемости микоризной инфекции видоспецифично. У *E. palustris*, с максимальной степенью микотрофности, наибольшая площадь фотосинтетической поверхности и минимальное значение высоты растения, количества цветков в соцветиях. Эти факторы, а также недоразвитие или повреждение соцветий, несинхронность и замедленность цветения, редкий специфический опылитель, высокий уровень гетерогенности семян и зародышей по линейным параметрам, асинхронность процесса формирования зародыша, по-видимому, являются причиной низкой численности популяций орхидей.

Таким образом, установлено, что репродуктивная стратегия исследуемых видов орхидей определяется степенью взаимодействия с грибом – микоризообразователем, особенностями условий произрастания и характером опыления изучаемых видов. При проведении качественных гистохимических реакций были установлены аллелопатические взаимоотношения гриба-микоризообразователя с корневищными орхидеями.

У растений, находившихся в генеративном периоде онтогенеза, отмечена начальная стадия лигнификации клеток паренхимы, прилегающей к центральному цилиндру, и более интенсивно лигнификация периферических участков ксилемы центрального цилиндра. Обнаружены многочисленные пелотоны в клетках первичной коры, которые дают слабую положительную реакцию на лигнин. При качественной реакции на пектин отмечалась яркая окраска сине-голубого цвета эпibleмы и некоторых проводящих элементов ксилемы у ювенильных растений. Ксилема генеративных растений отличалась более интенсивной окраской синего цвета, а также экзодермы и перицикла. При качественной реакции на фенольные соединения у ювенильных растений наблюдалось окрашивание эпibleмы и некоторых проводящих элементов ксилемы. У генеративных растений эпibleма практически

не окрашена. В первичной коре пелотоны приобрели светло желтую окраску, а некоторые элементы ксилемы коричневую. Пелотоны гриба, локализованные в первичной коре на всех срезах, дальше эндодермы не проникали.

Согласно качественным гистохимическим реакциям можно отметить изменения накопления веществ лигнина, пектина и фенольных соединений в связи с изменением степени взаимодействия между высшим растением и грибом. Установлено, что динамика аллелопатических взаимодействий обусловлена накоплением лигнина, пектина и фенольных соединений в тканях первичной коры корневища орхидей.

#### Список литературы

1. Delforge P. Orchids of Europe, North Africa and the Middle East. London: A&C Black. 2006: 640 p.
2. Rasmussen HN, Rasmussen FN. Orchid Mycorrhiza: Implications of a Mycophagous Life Style. *Oikos*. 2009; 118: 334-45.
3. McCormick MK, Whigham DF, O'Neil J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytol*. 2004; 163: 425-38.
4. Burgeff H. Mycorrhiza of orchids. *The Orchids: A scientific survey*. New York. Roland Press. 1959: 361-95.
5. Горбунова Н.П. О взаимоотношениях гриба и высшего растения в эндотрофных микорризах везикулярного типа. *Бюл. Глав. ботан. сада АН СССР*. 1957; 29: 243-68.
6. Euwe D, Nelly E. Effect of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species. *Can J. Bot*. 1995; 73(8): 1203-11p.
7. Матвеев Н.М. Аллелопатия как фактор экологической среды. Самара: Самар. гос. унив. 1994: 3-20.
8. Rasmussen HN. Recent development in the study of orchid mycorrhizas. *Plant and Soil*. 2002; 244: 149-63.
9. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д. Основы микротехнических исследований в ботанике. М: МГУ. 2000: 125 с.
10. Назаров В.В. Репродуктивная биология орхидных Крыма: автореф. дисс. ... к. б. н.: СПб. 1995: 26 с.

## МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ГНИЕНИЕ КОРНЕЙ ВИНОГРАДА, ПОРАЖЕННЫХ ФИЛЛОКСЕРОЙ В ТОВУЗСКОМ И ГАЗАХСКОМ РАЙОНАХ АЗЕРБАЙДЖАНА

Шихлинский Г.М., Мамедова Н.Х.

Институт генетических ресурсов НАНА, Баку, Азербайджан

В Азербайджане, в результате постепенного распространения филлоксеры, в настоящее время заражено более 50–60% от общей площади виноградников и этот ареал со временем расширяется. В Республике виноград выращивается в десяти природно-экономических зонах: Гянджа-Казахской, Ширванской, Карабахо-Мильской, Мугано-Сальянской, Нагорно-Карабахской, Куба-Хачмасской, Шеки-Закатальской, Ленкорано-Астаринской, Апшеронской и Нахчиванской АР. С учетом распространения филлоксеры, виноградарские районы Азербайджана делят на зоны:

- а) сплошного заражения (Гянджа-Казахская),
- б) частичного заражения (Ширванская, Нагорно-Карабахская, Шеки-Закатальская, Ленкорано-Астаринская, Карабахо-Мильская, Мугано-Сальянская),
- в) свободной от вредителя (Куба-Хачмасская, Апшеронская и Нахчиванская АР) [1].

Выведение устойчивых сортов винограда к филлоксеру, а также сортов с комплексной устойчивостью к болезням и морозу является одной из центральных задач иммунологов и селекционеров виноградарей, и ее решение ведет к радикальному разрешению исключительно сложной филлоксерной проблемы, которая в нашей стране обрела особую остроту [2].

Борьба с филлоксерой является актуальной проблемой, т. к. во многих республиках и областях страны, свободных от филлоксеры, европейские сорта культивируются корнесобственными, а вредитель с каждым годом распространяется, все шире охватывая новые виноградарские районы; карантинные мероприятия в современных условиях оказались малоэффективными.

До настоящего времени еще не внедрен в практику эффективный химический метод борьбы, который обеспечивал бы нормальное развитие и полные урожаи. Филлоксера наносит огромный ущерб виноградарским хозяйствам Крыма, Краснодарского Края, Ростовской области и др. [3].

Среди вредителей, филлоксера (*Viteus vitifolii* Shimer), вместе с патогенной микрофлорой (из грибов: *Fusarium oxysporum* Schl., *Cylindrocarpon radiclecola* Wr., *Gliocladium verticilloides* Pridpl., из бактерий: *Bacillus mesentericus vulgates* FL., *Pseudomonas liquefaciens* Migula), занимает в виноградарстве особое место [4].

Выведение сортов, устойчивых к филлоксеру, морозу и комплексу болезней, немыслимо без знания факторов, обуславливающих иммунитет, которые должны служить диагностическим признакам при создании методов и проведении оценки коллекционных сортов и селекционного фонда, а также при изучении закономерностей наследования устойчивости и качества в процессе иммуноселекции [5].

Проведенные исследования показали, что во всех виноградарских районах Молдавии, а также на территории Крыма, Краснодарского края, Ростовской области при гниении корней винограда, поврежденных филлоксерой, из пораженных гниlostным процессом тканей независимо от сорта всегда выделяются одни и те же несовершенные грибы: *Fusarium oxysporum* Schlecht., *F. solani* App. et Wr., *Cylindrocarpon radiclecola* Wr., *Gliocladium verticilloides* Pridpl. Из бактерий – *Pseudomonas Liquefaciens* Migula et *Bacillus mesentericus vulgates* Flugge [6].

Работа по определению видового состава микроорганизмов (грибы и бактерии), участвующих в процессе гниения корней винограда, поврежденных филлоксерой, проводилась и в других районах Азербайджана (Тергер, Агдам, Аскеран, Физули, Ходжавенд, Бейлаган). Выделение в чистые культуры фитопатогенных микроорганизмов – возбудителей гниения корней винограда – проводили по методике П.Н. Недова [7].

В виноградарском совхозе имени Низами Товузского района у сортов винограда Гырмызы кишмиши, Аг кишмиши, Гара кишмиши, Тавквери и Баяншира из корней, пораженных филлоксерой, были взяты образцы для проведения микробиологических исследований.

Количество микроорганизмов, выделенных из корней винограда сорта Гырмызы кишмиши, составило 100%, в состав которого входят фитопатогенные грибы и бактерии. Из них 35% грибов относятся к *Cliocladium*, 10% к – *Cylindrocarpon*, 25% – *Fusarium* и 30% *Pseudomonas*. Однако на корнях этого сорта не выявлены *Bacillus*, а также сапротрофные грибы.

Количество микроорганизмов, выделенных из корней винограда сорта Аг кишмиши, составило 92,5%. Из них 20% грибов, относились *Cylindrocarpon*, 7,5% к – *Fusarium*, а грибы *Cliocladium*, здесь не встречались. Из фитопатогенных бактерий 42,5% относились к *Pseudomonas*, 17,5% составили бактерии *Bacillus*. Из сапротрофных грибов 2,5% относились к *Penicillium* и 2,5% к – *Mucor*. На корнях этого сорта сапротрофные грибы встречались реже, чем фитопатогенные.

На поврежденных филлоксерой корнях винограда Гара кишмиши выделенные микроорганизмы составили 100%. Из них 60% были грибы *Cylindrocarpon*, и выявлено 40% *Pseudomonas*. У этого сорта сапротрофные грибы не выявлены.

У поврежденных филлоксерой сортов винограда Тавквери микроорганизмы, выделенные из корней, составили 100%. Из них 50% относились к *Cliocladium*, грибы, рода *Cylindrocarpon* и *Fusarium* не выявлены. А также установлено, что бактерии рода *Bacillus* составили 50%. У поврежденных сортов винограда Баяншира, микроорганизмы, выделенные из корней, составили 80%. Из них 23% грибы – *Cliocladium*, 21,5% – *Fusarium*, а грибы *Cylindrocarpon* не выявлены. Фитопатогенные бактерии *Penicillium* – 29,3%, грибы, *Absidia*, составили 6,2%.

Проводился также анализ образцов, взятых из корней сортов винограда Каберне, Тебризи и Баяншира Акстафинского совхоза Газахского района.

На корнях винограда Каберне выделенные микроорганизмы составили 100%. Было установлено, что из них грибы *Cylindrocarpon* составили 30%, но на корнях этого сорта не присутствовали грибы *Cliocladium* и *Fusarium*. Фитопатогенные бактерии *Pseudomonas* составили 28,5%, а *Bacillus* – 17,5%. Выявлено также наличие сапротрофных грибов *Mucor* – 10,5%, *Absidia* – 9% и *Rhacodiella* – 4,5%.

Микроорганизмы из поврежденных филлоксерой корней Тебризи составили 100%. Из них фитопатогенные грибы *Cliocladium* – 11,5%, *Fusarium* – 25%. На

корнях этого сорта не выявлены грибы *Cylindrocarpon*. Фитопатогенные бактерии *Pseudomonas* составили – 18%, бактерии *Bacillus* – 35%. На корнях этого сорта сапротрофные грибы не встречались.

На поврежденных филлоксерой корнях винограда сорта Баяншира выделенные микроорганизмы составили 100%. Из них 30,5% были фитопатогенные грибы рода *Cliocladium*, 31% грибы рода *Cylindrocarpon* и 13,5% грибы, относящиеся к роду *Fusarium*. На корнях этого сорта бактерии не выявлены. Из сапротрофных грибов 10% относились к *Penicillium*, 7,5% к – *Absidia* и 7,5% – к *Rhacodiella*.

Результаты исследования показали, что независимо от различий эколого-географических зон Азербайджана видовой состав микроорганизмов (грибы и бактерии), выделенных из корней, пораженных филлоксерой сортов винограда, приблизительно был одинаковым, то есть эти микроорганизмы являются причиной гниения корней и гибели сортов и форм винограда в условиях Азербайджана.

Выделенные нами микроорганизмы (грибы и бактерии) были использованы при создании комплексно-инфекционного фона в различных эколого-географических зонах Азербайджана для проведения иммунологической оценки устойчивости сортов и форм винограда к филлоксере и микроорганизмам.

#### Список литературы

1. Шихлинский Г.М. Виноградная филлоксера и микроорганизмы, вызывающие гниение корней. Баку: Чашыоглы. 2001: 172 с.
2. Недов П.Н. Роль иммуноселекции винограда в борьбе с филлоксерой. Теория и практика сохранения корнесобственной культуры винограда в зоне распространения филлоксеры. Новочеркасск. 1982: 25-33.
3. Недов П.Н., Гузун Н.И., Бербер П.Ф. Наследование признаков устойчивости винограда к филлоксере, гниению корней и морозу. Селекция и генетика плодовых и винограда в Молдавии. Кишинев: Штиинца. 1975: 91-102.
4. Голодрига П.Я. Теория, практика и очередные задачи по созданию комплексно-устойчивых высококачественных сортов винограда. Генетика и селекция винограда на иммунитет. Киев: Наукова Думка. 1978, 13-35.
5. Недов П.Н., Гулер А.П., Бербер П.Ф. и др. Устойчивость представителей рода *Vitis* к листовой и корневой формам филлоксеры и возбудителям гнилостного процесса. Защита винограда и плодовых культур от вредителей и болезней. Кишинев: Картя Молдовеняскэ. 1979: 55-70.
6. Недов П.Н. Патогенность микроорганизмов (грибов и бактерий) – возбудителей гниения корней винограда, поврежденных филлоксерой // Устойчивость винограда и плодовых культур к заболеваниям и вредителям. Кишинев: Штиинца, 1976, с.88-101.
7. Недов П.Н. Иммунитет винограда к филлоксере и возбудителям гниения корней. Кишинев: Штиинца, 1977: 171 с.

## ВЛИЯНИЕ ХРАНЕНИЯ НА ЗАРАЖЕННОСТЬ СЕМЯН ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ГРИБАМИ РОДА *FUSARIUM*

Шутилова Н. П.

ВНИИ защиты растений Санкт-Петербурга

Фитосанитарное состояние семян определяет уровень их всхожести и возникновение патологий в процессе роста и развития растений. Зараженность зерна грибами рода *Fusarium* представляет двойную опасность: как семенная инфекция, снижающая репродуктивный потенциал сорта и в связи с возможным накоплением опасных для человека, сельскохозяйственных животных и птицы микотоксинов [1, 2].

Микологический контроль семенного материала также необходим, чтобы не только повысить качество будущего урожая, отбирая партии семян без инфекции или мало инфицированные, но и избежать переноса с ними патогенных видов, нетипичных для того или иного региона. Известно, что некоторые виды рода *Fusarium*, однажды попав в почву с семенами, могут сохраняться в ней в течение длительного периода и в отсутствии растений – хозяев [3].

**Цель работы** – оценить влияние сроков проведения фитоэкспертизы зерна на результаты выявления зараженности и видового состава грибов рода *Fusarium*.

Проведен анализ зерна 10 образцов яровой пшеницы, озимой ржи, овса, ячменя урожая 2013 года, выращенных в Новгородской (Валдайский р-н) и Ленинградской (Гатчинский р-н) областях Северо-Западного региона и яровой пшеницы из Белоруссии (Гомельская обл., Калинковический р-н). Проанализированные образцы представлены районированными сортами: яровая пшеница – сорта Дарья и Ленинградская 97, озимая рожь – сорта Славия и Эра, овес – сорт Боррус, ячмень – сорт Ленинградский.

Зараженность зерна и видовой состав грибов рода *Fusarium* первоначально оценивали через 2 нед после обмолота зерна. В дальнейшем оставшееся зерно хранили в бумажных пакетах в лабораторных условиях и анализировали через 6 и через 15 месяцев.

Анализ зараженности зерна осуществлен в соответствии с общепринятыми в микологии и фитопатологии методами [4]. Из средней пробы образца (50 г) анализировали 100 поверхностно простерилизованных 0,1% раствором азотнокислого серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) зерен, которые выращивали на картофельно-сахарозном агаре с 1,5% сахарозы. На 5–10 сут учитывали общую зараженность семян грибами рода *Fusarium* (%). Виды грибов идентифицировали на 7–15 сут с использованием определителя В. Герлаха и Х. Ниренберг [5].

Зараженность зерна определенным видом *Fusarium* (%) выявляли по отношению числа зерен, зараженных данным видом, к общему числу анализируемых зерен. Долю конкретного вида в комплексе патогенов *Fusarium* (%) в каждом образце рассчитывали как отношение числа зерен, зараженных данным видом *Fusarium*, к числу зерен, зараженных грибами *Fusarium*. Частоту встречаемости (%) вида в образцах определяли по количеству образцов, в которых он зарегистрирован к общему количеству образцов.

Грибы рода *Fusarium* в свежееубранном зерне имели 100% встречаемость и зараженность варьировала от 7 до 21%. Через 6 мес хранения они зарегистрированы в 90% образцов, зараженность которых снизилась и варьировала от 1 до 15%. Через 15 мес фузариевые грибы выявлены только в 40% образцов и их зараженность колебалась от 1 до 3%.

Выявлено 8 видов грибов *Fusarium*: *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. oxysporum* Schltdl., *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. sporotrichioides* Sherb., *F. tricinctum* (Corda) Sacc.

В образцах свежееубранного зерна 100% встречаемость имели виды *F. avenaceum* и *F. sporotrichioides*. В 60% образцов зарегистрирован *F. poae* (не отмечен в образцах пшеницы из Новгородской и Ленинградской областей и озимой ржи из Ленинградской области). Частота встречаемости остальных видов составила: *F. tricinctum*, *F. graminearum* и *F. oxysporum* – 20%, *F. equiseti* и *F. culmorum* – 10%. Виды *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti* присутствовали в семенах зерновых из Новгородской области. *F. graminearum* – отмечен в образце овса (Новгородская область) и пшеницы (Белоруссия). Гриб *F. culmorum* выявлен только в семенах пшеницы из Белоруссии.

В свежееубранном зерне доминировал или входил в комплекс доминирующих видов *F. avenaceum*. Самый высокий показатель его присутствия отмечен в семенах всех культур в Ленинградской области (доля вида – 57,1–90,5%). В Новгородской области *F. avenaceum* превалировал в семенах ржи и пшеницы (70,6–81,8%), а на овсе и ячмене в этой области доля этого вида ниже – 27,8–35,3% соответственно. Грибы *F. sporotrichioides* и *F. poae* входили в комплекс доминирующих видов только в Новгородской области на овсе (доли составили 22,2 и 33,2% соответственно), а *F. tricinctum* (35,3%) – только на ячмене в этой области. В Белоруссии на пшенице доминировали – *F. culmorum* (38,5%) и *F. avenaceum* (30,8%). Зараженность семян *F. graminearum*, *F. equiseti* и *F. oxysporum* была незначительна и их доля в комплексе фузариевых грибов не превышала – 5–8%.

Через 6 мес хранения зараженность семян уменьшилась в среднем в 1,9 раза, причем, в основном за счет снижения зараженности зерна видом *F. avenaceum*. Гриб *F. avenaceum* в этот срок выделен из 90% образцов, зараженность зерна этим видом снизилась в 1,7–9 раз в зависимости от культуры. *F. sporotrichioides* выделен из 80% образцов. Зараженность семян этим видом в среднем не изменилась (2,5% на свежееубранном зерне и 2,4% после 6 мес хранения). В семенах пшеницы из Белоруссии гриб *F. sporotrichioides* вошел в комплекс доминирующих видов (доля вида 37,5%), за счет снижения доли *F. avenaceum* в патогенном комплексе. *F. poae* сохранился в семенах плёнчатых культур, при этом зараженность данным видом не уменьшилась по сравнению со свежееубранным зерном, а в некоторых

образцах даже возросла в 1,3–3 раза. В сравнении со свежееубранным зерном доля *F. roae* в комплексе видов *Fusarium* возросла в среднем с 35,3 до 46,7%. Зараженность семян ячменя видом *F. tricinctum*, который был одним из доминирующих видов на свежееубранном зерне, снизилась в 1,5 раза. В Белоруссии зараженность зерна *F. culmorum* снизилась в 1,2 раза, но он сохранил лидирующее положение в комплексе доминирующих видов (доля вида – 50%). Через 6 месяцев хранения исчезли, за исключением *F. oxysporum*, виды с незначительной представленностью в образце – *F. graminearum* и *F. equiseti*.

Через 15 мес в семенах сохранились только *F. roae* (на овсе из Новгородской и Ленинградской областей и в одном образце ячменя из Новгородской области) и *F. culmorum* в семенах пшеницы из Белоруссии. Зараженность видом *F. roae* составила 1–3%, а *F. culmorum* – 2%.

Выявлена динамика уменьшения жизнеспособности грибов рода *Fusarium* в процессе хранения зерна. Причем длительность сохранения грибов зависит от конкретного вида патогена. Наиболее длительный срок выживания выявлен для агрессивного вида *F. culmorum* и вида *F. roae*, характеризующегося как относительно слабый патоген [6]. Результаты совпадают с данными Б. Вивиоры [7], полученными при изучении сроков хранения на состав микобиоты семян ярового ячменя в Польше. *F. roae* обнаружен в семенах после 3-х лет хранения, *F. culmorum* – после 4-х лет.

Интересно, что жизнеспособность грибов в семенах не связана с образованием конкретным видом структур, приспособленных к длительному выживанию в неблагоприятных условиях. К длительно сохраняющимся в зерне грибам относятся виды способные к, например, образованию хламидоспор (*F. culmorum*), так и виды у которых они отсутствуют (*F. roae*).

Вид *F. graminearum* выявлен только в свежееубранном зерне. Ещё раз подтверждён факт присутствия на северо-западе гриба *F. graminearum*, который ранее не являлся типичным видом для этого региона. Выявление на северо-западе *F. graminearum* происходило начиная с 2003 г. [8]. Вполне вероятно, что этот вид был занесен в регион с семенным материалом из южных областей страны и адаптировался в связи с потеплением климата.

Из полученных результатов можно сделать вывод о естественном оздоровлении семян от фузариозной инфекции в процессе хранения. Можно видеть, что через 6 мес значительно снижается исходное заражение

свежееубранного зерна видом *F. avenaceum*, оказывающего негативное влияние на посевные качества семян.

Присутствие в зерне опасных токсигенных видов (*F. graminearum*, *F. culmorum*) позволяет прогнозировать возможность накопления микотоксинов в зерне. Экспертиза, проведенная в более поздние сроки, может не установить исходного заражения грибами, что особенно опасно, если зерно планируется использовать на кормовые и пищевые цели. Известно, что микотоксины, образуемые грибами, сохраняются значительно дольше, чем сами организмы [9].

Таким образом, фитоэкспертиза зерна должна проводиться в ранние сроки после уборки урожая, по результатам которой должно быть обосновано решение о целевом назначении партии зерна.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №14-26-00067).

### Литература

1. Иващенко В.Г., Шипилова Н.П., Горденко В.И. и др. Сезонная и зональная динамика фузариозной инфекции семян пшеницы. Вестн. защ. раст. 2000; 3; 42-5.
2. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур. Прилож. к журн. "Защита растений и карантин". 2011; 5: 52 с.
3. Иващенко В.Г., Шипилова Н.П., Назаровская Л.А. Фузариоз колоса хлебных злаков. СПб.-Пушкин, РАСХН, ВИЗР. 2004: 230 с.
4. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Киев: Наукова Думка. 1982: 552 с.
5. Gerlach W, Nirenberg HI. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Mitt Biol Bundesanst Land-Forstw. Berlin – Dahlem. 1982; 209: 406 p.
6. Шипилова Н.П. Видовой состав и биоэкологические особенности возбудителей фузариоза семян зерновых культур. Автореф. дисс... канд. биол. наук. 1994: 21 с.
7. Wiewiora B. Long-time storage effect on the seed health of spring barley grains. Plant Breed Seed Sci. 2009; 59: 3-12.
8. Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю., Буркин А.А., Кононенко Г.П. Фузариоз зерновых культур на Волосковском государственном сортоучастке в Ленинградской области. Вестн. защ. раст. 2009; 4: 37-43.
9. Martins ML, Martins HM, Bernardo F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. RPCV (Rev. Port. Ciências Veterinárias). 2003; 98(541): 179-83.

## ПОРАЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ БОЛЕЗНЯМИ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ

Шпанев А.М.<sup>1,2</sup>, Смур В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Агрофизический НИИ, Санкт-Петербург

Фитосанитарная обстановка на посадках картофеля в Северо-Западном регионе складывается таким образом, что из всех групп вредных организмов наибольшее экономическое значение здесь имеют фитопатогены. По некоторым оценкам, в структуре

потерь урожая от всего комплекса вредных организмов на болезни растений приходится 49–63% [1]. К числу наиболее вредоносных болезней картофеля в регионе относятся фитофтороз и ризоктониоз, в меньшей степени – обыкновенная парша, альтернариоз, мо-

края гниль. Для некоторых сортов значение имеют неинфекционные болезни – израстание, деткование, зеленение. На семеноводческих посадках картофеля большую опасность представляют вирусы.

Поражение болезнями картофеля определялось по данным 2012–2014 гг., полученным на агроэкологическом стационаре в Меньковском филиале АФИ, расположенном в Гатчинском районе Ленинградской области.

Степень проявления фитофтороза на посадках картофеля зависит от погодных условий в период вегетации культуры. Так сложилось, что три последних года оказались очень разными по метеоусловиям, как следствие, различалась и интенсивность поражения посадок картофеля этим заболеванием. В 2012 году обильное выпадение осадков и часто повторяющиеся продолжительные росы, наблюдаемые с самого начала августа, способствовали умеренному поражению растений картофеля фитофторозом. Развитие болезни на листьях составило 68%, доля пораженных клубней в убранный урожай – 10,1%.

В 2013 г. сложились очень благоприятные условия для сильного поражения картофеля фитофторозом. Этому способствовала теплая погода июня и июля в совокупности с достаточным количеством осадков. В августе практически ежедневно наблюдались обильные и длительные росы. Особенно сильно пострадали поздние посадки картофеля, на которых фитофтороз проявился раньше, чем началось смыкание растений в рядах.

В итоге, в цветение картофеля большинство листьев уже имели симптомы поражения. В период формирования клубней поражено было 75% листовой поверхности. На момент проведения десикации наблюдалось полное отмирание ботвы, вследствие длительной и очень активной деятельности фитопатогена. Такая степень поражения соответствовала самому высокому баллу, развитие болезни составило 85%. Пораженность клубней фитофторозом достигла 22%. Столь сильное поражение фитофторозом явилось основной причиной низкой урожайности картофеля, которая на поздних посадках, где отсутствовали защитные мероприятия против болезни, оказалась равной всего 50 ц/га.

Самая слабая интенсивность проявления фитофтороза в посадках картофеля отмечалась в 2014 г. Депрессия в развитии фитофтороза была вызвана длительным засушливым периодом и высоким температурным режимом, продолжавшимся на протяжении большей части июля. Симптомы болезни на листьях проявились позже обычного – в фазу бутонизации. Итоговое развитие болезни составило 47,2%, пораженность клубней – 2,6%.

Ризоктониоз – 2-е по значимости заболевание после фитофтороза. Высокие показатели развития болезни в последние годы во многом связаны с большой зараженностью семенного материала. Фитоэкспертиза клубней перед посадкой ежегодно выявляла не менее 50% с признаками поражения болезнью. Гибель растений от ризоктониоза на начальных этапах развития культуры находилась в пределах 3%. Доля пораженных клубней в урожае достигала 42,3%, интенсивность поражения – 12,6%.

Развитие альтернариоза на посадках картофеля в Северо-Западном регионе ограничивается не достаточно высокой, как требуется для фитопатогена, среднесуточной температурой воздуха. Поэтому заболевание проявляется в регионе не ежегодно. В 2012 г. развитие альтернариоза на листьях картофеля составило 68%, в 2013 г. оно отсутствовало, в 2014 г. – 10,6%.

Распространение обыкновенной парши на картофеле в регионе очень неравномерно. Оно определяется типом почв, агрофоном, насыщенностью севооборота картофелем, предшественником, технологией возделывания культуры. Изменчивость проявления болезни по годам связана с погодными условиями. В более жаркие и менее обильные по увлажнению годы поражение картофеля обыкновенной паршой усиливается. Так, в нашем опыте в 2014 г. доля пораженных клубней составила 9,8% при интенсивности поражения – 18,9%. При том, что в 2012 г. пораженные клубни составляли только 1,1%, а в 2013 г. – 1,3%.

Мокрая гниль, в отличие от обыкновенной парши, наоборот, чаще встречалась при уборке урожая в годы с избыточным увлажнением. В 2012 г. пораженных клубней насчитывалось 1,7%, в 2013 г. – 0,1%, в 2014 г. – 0,9%.

Проявление неинфекционных болезней, которые в значительной степени ухудшают товарный вид продукции и лежкость клубней при хранении, определяется сортовыми особенностями картофеля. Сильное поражение неинфекционными болезнями известно для сорта Сударыня. В условиях 2014 г., когда отмечалась повышенная уплотненность и пониженная аэрация почвы, оно проявилось особенно сильно. Зеленение было выявлено на 3% клубней и на 55% их поверхности. Доля клубней с израстанием составила 2,2% со средним количеством ростков на клубне – 1,7 шт. Деткование встречалось менее чем на 1% клубней.

#### Список литературы

1. Гончаров Н.Р. Нормативы сохраняемого урожая от применения химических средств защиты растений в РФ в зависимости от интенсивности земледелия. СПб. 2009: 8 с.

## ПОРАЖЕНИЕ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ ГРИБНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ НЕЧЕРНОЗЕМЬЯ

Шпанев А.М.<sup>1,2</sup>, Рогожников Е.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Агрофизический НИИ, Санкт-Петербург

Сложная фитосанитарная обстановка, складывающаяся в последние годы в посевах ярового ячменя на северо-западе Нечерноземья, в значительной мере обусловлена фитопатогенами. Использование некачественного семенного материала, несущего значительный запас инфекции, привело к увеличению распространения и развития болезней на этой культуре.

Ситуация с болезнями ярового ячменя отслеживалась в течение 2012–2014 гг. на полях агроэкологического стационара Меньковского филиала АФИ в Ленинградской области, где ведутся многолетние комплексные исследования сотрудниками ВИЗР и АФИ. В изучении находился районированный сорт ярового ячменя Ленинградский, обладающий средней устойчивостью к основным патогенам.

Видовой состав фитопатогенов на яровом ячмене был представлен возбудителями, поражающими корневую систему, листья, стебли, колосья и зерна (табл.).

Табл. Видовой состав возбудителей болезней ярового ячменя на северо-западе Нечерноземья (Ленинградская обл., 2012–2014 гг.)

Семейство	Вид
Dematiaceae	<i>Aureobasidium</i> sp.
	<i>Rhynchosporium secalis</i> (Oudem.) J. J. Davis
Erysiphaceae	<i>Blumeria graminis</i> (DC.) Speer f. sp. hordei Marchal.
Moniliaceae	<i>Acremonium</i> sp.
Mucoraceae	<i>Mucor</i> sp.
Мысо-sphaerellaceae	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link.
Nectriaceae	<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.
	<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.
	<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.
Pleosporaceae	<i>Alternaria</i> spp.
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoemaker.
	<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb.
	<i>Pyrenophora graminea</i> Ito & Kuribayashi
	<i>Pyrenophora teres</i> Drechsler
Pucciniaceae	<i>Puccinia graminis</i> Pers. f. sp. hordei Erikss. et P. Henn.
	<i>Puccinia hordei</i> G.H. Otth.
Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp.
Ustilaginaceae	<i>Ustilago nuda</i> (C.N. Jensen) Rostr.

Корневая система поражается корневыми гнилями гельминтоспориозно-фузариозного типа. В фазу кушения культуры проявление болезни ежегодно отмечалось на 60% растений, развитие варьировало в пределах 25–40%. Из листовых болезней на растениях ячменя регулярно проявляются гельминтоспориозные пятнистости и ринхоспориоз, периодически – мучнистая роса, карликовая и стеблевая ржавчина.

Одним из самых распространенных и опасных заболеваний ячменя в регионе является гельминтоспориоз, включающий несколько видов пятнистостей. Из литературы известно, что преобладает сетчатая пятнистость, а полосатая и темно-бурая пятнистости имеют второстепенное значение [1]. Сильное развитие гельминтоспориозных пятнистостей, которое соответствует уровню 15–20%, отмечалось в Ленинградской области в 2005, 2006 и 2007 гг. [2]. По нашим данным, степень развития данного заболевания в фазу налива зерна на 1-м подфлаговом листе составила 0,6% – в 2012 г., 19,1% – в 2013 г., 8,2% – 2014 г. В фазу молочной спелости на флаговом листе данный показатель достигал значения, равное 0,6, 54,4 и 20,6% соответственно.

Ринхоспориоз, хотя и проявляется ежегодно на растениях ячменя, но в слабой степени и очажно по площади посевов. В фазу налива зерна на 1-м подфлаговом листе развитие болезни изменялось в пределах от 0,05 до 0,5%, в фазу молочной спелости на флаговом листе увеличивалось до 1,6%. Из литературы известны случаи, когда развитие ринхоспориоза достигало 40–50% и более. Так было в 1999 и 2007 гг. [1, 2].

Устойчивыми низкими показателями развития в посевах ячменя характеризуются мучнистая роса, карликовая и стеблевая ржавчины. В самом благоприятном по погодным условиям 2014 г. развитие данных заболеваний составило 0,6, 0,02 и 0,03%. В 2013 г., который отличался более высоким температурным режимом и недостатком влаги в период вегетации культуры, мучнистая роса и оба вида ржавчины на растениях ярового ячменя не были обнаружены. К средним многолетним значениям по среднесуточным температурам и сумме осадков наиболее близок был 2012 г., в котором развитие болезни составило 0,1, 0,002 и 0,01%.

Из болезней колоса на ячмене фиксировались пыльная головня и фузариоз. В обследуемых нами посевах ежегодно встречались единичные растения, пораженные этими болезнями. Однако в отдельные годы на некоторых полях, их присутствие может быть заметным.

При анализе зерна чаще выявлялись виды грибов, вызывающие чернь колоса. Так, на грибы рода *Alternaria* (28%), *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link. (20%) и *Epicoccum purpurascens* Ehrenb. (9%) суммарно приходилось 57% зараженных зерен. Доля гриба

*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker., вызывающего корневые гнили и гельминтоспориозные пятнистости, составляла 26%. Фузариевые грибы встречались на 7% зерновок и, примерно в равной степени, они были представлены тремя видами – *F. sporotrichioides* Sherb., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. roae* (Peck) Wollenw. Плесневые грибы фиксировались на зернах в единичных случаях. Общая зараженность зерен грибами в 2012 г. составила 37%, в 2013 и 2014 гг. – 63%.

Высокие показатели развития болезней, фиксируемые в настоящее время в посевах ярового ячменя на северо-западе Нечерноземной зоны, указывают на необходимость уделять им большее внимание, в боль-

шем объеме проводить протравливание семенного материала и обработки фунгицидами по вегетирующим растениям.

#### Литература

1. Ишкова Т.И., Назаровская Л.А. Фитосанитарная обстановка на посевах серых хлебов в Северо-Западном регионе России. Агротехнический метод в защите растений от вредных организмов. Краснодар. 2002: 13-5.
2. Афанасенко О.С., Анисимова А.В., Мироненко Н.В. и др. Устойчивость ячменя к возбудителям пятнистостей листьев. СПб. 2013: 63 с.

## ДИВЕРГЕНЦИЯ ВИДА *Puccinia graminis* Pers, ВОЗБУДИТЕЛЯ СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЫ ЗЛАКОВ

Сколотнева Е.С.<sup>1</sup>, Коломиец Т.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

<sup>2</sup>ВНИИ фитопатологии. Большие Вяземы. Московская область

Биотрофные грибы – паразиты растений характеризуются специализацией в отношении определенного круга растений-хозяев. Облигатный биотроф *Puccinia graminis* Pers. (Uredinales, Basidiomycota) уже зарекомендовал себя как хорошая модель для изучения микроэволюционных процессов в системе патоген-хозяин [1]. Обладая высокой продуктивностью и примитивной морфологией, а также значительным потенциалом генетической изменчивости возбудитель стеблевой ржавчины злаков *P. graminis* оказывается активным участником системы "патоген-хозяин". Скорость реакции на изменения условий порой ставит селекционеров в тупик, и приводит к эпифитотиям.

Важным аспектом проблемы является вклад в поддержание инфекции дополнительных хозяев – дикорастущих видов злаков, на что указывал еще в 1937 г. Наумов в своей монографии «Ржавчина хлебных злаков в СССР». Вид *P. graminis* характеризуется сложной внутривидовой структурой, разбиваясь по растению-хозяину на специализированные формы, которые потеряли способность к скрещиванию в естественных условиях [2] и приобрели различия на молекулярном уровне [3].

Экономическую важность представляют специализированные формы патогенов, паразитирующие на культурных злаках: пшенице, ржи и овсе. Интересно, что, не скрещиваясь между собой и являясь угрозой только для профилирующей культуры, они способны поражать ряд дикорастущих злаков. При этом у пшеничной, ржаной и овсяной специализированной формы в списках дополнительных хозяев находится много общих видов. В качестве примеров таких универсальных хозяев могут выступать *Hordeum* (ячмень), *Agropyron* (пырей), *Phleum* (тимopheевка), *Dactylis* (ежа).

Группа Лекомцевой неоднократно обращала внимание на необходимость изучения всех возможных источников инфекции стеблевой ржавчины [4]. Обследование исключительно культурных злаков не позволяет составить исчерпывающую эпидемио-

логическую картину для региона. Так, ген Sr31 обеспечивал эффективную защиту пшеничных посевов повсеместно в течение 30–35 лет. Система ротации сортов поддерживала низкий уровень вирулентных генотипов гриба, которые не успевали накапливаться в патогенной популяции в достаточном для эпифитотии количестве.

Однако в 1999 г. в Уганде вспыхнула жесточайшая эпифитотия стеблевой ржавчины пшеницы с потерями урожая вплоть до 80%, вызванная появлением новой патогенной расы Ug99 (Uganda 1999), способной поражать неиммунное растение на любой стадии и приводить к его быстрой гибели [5]. Далее последовала череда эпифитотий стеблевой ржавчины по всей Восточной Африке, при этом инфекционный фон увеличил свои составляющие: к расе Ug99 прибавились две ее модификации Ug99+Sr24 и Ug99+Sr36. В 2006 году они были зафиксированы уже в Судане и Йемене, а в 2007 г. в Иране.

По официальным прогнозам, инфекция будет продолжать распространяться по странам Центральной Азии, и является вполне вероятным появление Ug99 в Казахстане, Узбекистане, Турции и на Украине [6]/ Эффект неожиданного и взрывного проявления расы Ug99 на производственных посевах пшеницы, подвергавшихся тщательному контролю, мы связываем, в частности, с накоплением инфекционного начала на дикорастущих злаках, не включавшихся в регулярное обследование. К сожалению, традиционный подход к анализу расового состава популяции стеблевой ржавчины не был пересмотрен даже после этой катастрофы. Ни за рубежом, ни на основных мониторинговых станциях у нас в стране дикорастущие злаки обычно не воспринимаются как реальный источник инфекции.

В этих условиях интересной представляется разработка системы быстрой идентификации отдельных специализированных форм возбудителя стеблевой ржавчины среди общего спорного образца, являющейся альтернативой фитопатологическому анализу,



который требует не менее пяти недель для выяснения принадлежности изолятов *P. graminis* к той или иной специализированной форме. Хорошо зарекомендовали себя PCR-маркеры, легко и достаточно точно устанавливающие представителей различных таксономических групп [7]. Обычно для цели идентификации видов грибов используются ITS-участки рибосомного оперона.

Однако речь идет о характеристике специализированных форм, эволюционно более молодом, нежели вид, подразделении. Полиморфизм ITS-участка рибосомного оперона позволяет отделить лишь овсяную форму от пшеничной и ржаной, которые по этому признаку кластеризуются вместе [8]. Нетранскрибируемые спейсеры (NTS), которые известны также как межгенные регионы (IGR), разделяют tandemно расположенные рибосомные опероны и характеризуются высокой степенью изменчивости внутри вида [9]. Нами были показаны отличия изолятов пшеничной и ржаной формы *P. graminis* по структуре IGR-региона [11].

Для генотипирования изолятов *P. graminis* f. sp. tritici была оптимизована техника RAPD-PCR с использованием CRL-праймеров из набора, предложенного для характеристики генетической изменчивости возбудителя стеблевой ржавчины в лаборатории, занимающейся проблемами изучения ржавчины злаков, в Миннесоте, США (именные CRL-праймеры из Cereal Rust Laboratory [10]). С помощью подобранных нами селективно-нейтральных молекулярных маркеров на основе техники RAPD-PCR при использовании праймеров, насыщенных GC-нуклеотидами, была обнаружена независимая от вирулентности дивергенция вида, связанная с предпочтением того или иного растения-хозяина. Сходным образом на UPGMA дендрограммах кластеризовались RAPD-паттерны, полученных на одной и той же выборке с помощью трех вариантов ПЦР: с праймерами CRL-7, CRL-9, CRL-11 [3].

Таким образом, можно заявлять об относительной генетической устойчивости выявленных групп изолятов *P. graminis* f. sp. tritici. Интересно было отметить филогенетическую близость RAPD-паттернов, полученных от спорных образцов с пшеницы и пырея (*Agropyron repens*), что может свидетельствовать об относительно простом переходе инфекции с данного вида дикорастущего злака на культуру при благоприятных условиях.

Исследование формирования инфекционных структур гриба на культурных и дикорастущих видах злаков позволили выявить различия в защитных механизмах растений-хозяев, обуславливающих дивергенцию сложного вида *P. graminis*. В ответ на поражение ржаной и овсяной форм стеблевой ржавчины у тестерных сортов пшеницы приоритетной защитной мерой оказывалась реакция гиперчувствительности, которая запускалась на 1–2 сут после инокуляции (искусственного заражения).

При инокуляции пшеничной, ржаной, овсяной формами стеблевой ржавчины у тимофееки луговой (*Phleum pratense*) и ежи сборной (*Dactylis glomerata*) механизмы устойчивости вне зависимости от специализации патогена работали без привлечения реакции сверхчувствительности, а проявлялись через снижен-

ное количество урединиев меньшего размера вместе с отсутствием хлороза и некроза на кроющем листе.

Что согласуется со сделанными во время полевых наблюдений 2012 г. выводами о том, что эти виды являются универсальными хозяевами для поддержания инфекционного фона в природных популяциях патогена. При сравнении инфекционных структур эндофитной стадии развития гриба было обнаружено явление коллапсирования подустыичной везикулы 85% овсяницы (*Festuca pratensis*) при заражении изолятами пшеничной формой ржавчины, что согласуется с данными фитопатологического анализа спорных образцов с этого вида дикорастущего злака.

Таким образом, комплексное исследование возбудителя стеблевой ржавчины злаков позволило установить его сложную внутривидовую структуру, сложившуюся в результате трофических предпочтений гриба, существующего в природе на различных растениях-хозяевах, что в результате коэволюции привело к дивергенции вида и формированию отдельных генетически-однородных групп со сходной биологической стратегией.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РНФ проект № 14-50-00029.

#### Литература

1. Сколотнева Е.С., Малеева Ю.В., Инсарова И.Д., Лекомцева С.Н. Генетическое разнообразие изолятов *Puccinia graminis* Pers. f. sp. tritici и *P. graminis* f. sp. secalis. Микол. фитопатол. 2008; 42(4): 374-85.
2. Leonard KJ, Szabo LJ. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. Mol Plant Pathol. 2005; 6(2): 99-111.
3. Skolotneva ES, Lekomtseva SN, Kosman E. The wheat stem rust pathogen in the central region of the Russian Federation. Plant Pathol. 2013; 62: 1003-10.
4. Лекомцева С.Н., Волкова В.Т., Зайцева Л.Г., Сколотнева Е.С., Чайка М.Н. Анализ вирулентности изолятов *Puccinia graminis* f.sp. tritici с разных растений-хозяев. Микол. фитопатол. 2007; 41(6): 554-63.
5. Wanyera R, Kinyua MG, Jin Y, Singh R. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminia* f. sp. tritici with virulence on Sr31 in wheat in Eastern Africa. Plant Disease. 2006; 90(1): 113.
6. Singh R, Hodson D, Jin Y. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. CAB Rev: Persp Agric, Vet Sci, Nutr Nat Res. 2006: 1, №054. doi: 10.1079/PAVSNNR20061054
7. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications (ed. MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky & TJ White). Acad Press: San Diego, USA. 1990: 315-22.
8. Zambino PJ, Szabo LJ. Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. Mycologia. 1993; 85: 401-14.
9. Kim WK, Zerucha T, Klassen GR. A region of heterogeneity adjacent to the 5s ribosomal RNA gene of cereal rusts. Curr Genet. 1992; 22: 101-5.
10. Kubelik AR, Szabo LJ. High-GC primers are useful in RAPD analysis of fungi. Curr Genet. 1995; 28: 384-9.

## ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКОБИОТЫ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЙ АРМЕНИИ

Согоян Е.Ю., Нанагюлян С.Г.

Ереванский государственный университет, кафедра ботаники и микологии, Ереван, Армения

Защита кормовых растений от вредителей и болезней является одной из важнейших задач сельского хозяйства. Современные жизненные условия населения Армении диктуют необходимость уделять особое внимание развитию животноводства, одним из важнейших условий развития которого является создание прочной кормовой базы. В настоящее время из дикорастущих и посевных кормовых бобовых и злаковых растений в Армении распространены виды клевера, люцерны, донника, эспарцета, вики, пырея, ковра, овсяницы, тимофеевки и другие.

Кормовая ценность этих растений, составляющих значительную часть травостоя на сенокосах и пастбищах, огромна. Для лучшего использования этого природного богатства и для повышения урожайности посевов необходимо всестороннее изучение условий их произрастания и устранение причин, препятствующих повышению урожайности этих растений. Одной из таких причин являются многочисленные грибные болезни, от которых сильно страдают луговые и посевные кормовые растения. Эти болезни иногда резко снижают урожай травостоя, вызывая преждевременное усыхание и отмирание растений, что сказывается на их питательных и вкусовых качествах.

Некоторые сведения о паразитной микобиоте культурных и дикорастущих растений Республики Армения нашли отражение в отдельных томах "Микофлоры Армянской ССР" [1]. В последние два десятилетия, в связи с глубоким энергетическим и экономическим кризисом в республике, эти работы были приостановлены и возобновились сравнительно недавно. Между тем, именно сейчас микологические и фитопатологические исследования в аграрном секторе приобретают особую злободневность в связи с такими факторами, как ввоз в республику вместе с семенами и посадочным материалом новых патогенов, сравнительная дороговизна химических средств защиты растений, ухудшение общей экологической обстановки и другие. Учитывая вышеизложенное, нами были проведены работы по исследованию грибных болезней важнейших посевных и дикорастущих кормовых растений Армении.

В результате изучения микобиоты кормовых растений Армении на основе собственных сборов грибов, а также пересмотра гербарных материалов и обработки литературных данных нами выявлено 160 видов, разновидностей и форм грибов и грибоподобных организмов из 51 рода, 18 порядков, 7 классов, относящихся к 3 отделам.

В связи с тем, что в настоящее время нет единой, всеми признанной системы грибов, а систематика постоянно корректируется, нами принята за основу система грибов, приведенная в 10-м издании словаря Эйнсворта и Бисби [2], с некоторыми изменениями по Ж. Эриксону с соав. [3] для аскомицетов и Р. Бауэру [4] для базидиомицетов [2, 3, 4].

Выявленные микромицеты обнаружены на 96 видах кормовых растениях из 12 родов, принадлежащих

семействам Poaceae (*Agropyron*, *Bromopsis*, *Bromus*, *Dactylis*, *Elytrigia*, *Festuca*, *Phleum*) и Fabaceae (*Lathyrus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Vicia*). Представители этих семейств поражаются видами грибов из различных систематических групп неодинаково.

Как видно из таблицы 1, наибольшее количество видов, вариаций и форм грибов обнаружено из отдела Ascomycota – 113 видов (70,6%). Значительно уступают им представители отделов Basidiomycota – 31 вид (19,4%) и Oomycota – 16 видов (10%).

Отдел Oomycota представлен порядком Peronosporales, отмеченный 2 родами и 16 видами. В отделе Ascomycota большим количеством видов представлены порядки Capnodiales – 42 вида (26,2%), Pleosporales – 25 видов (15,6%), Botryosphaerales – 12 видов (7,5%) и Erysiphales – 7 видов (4,4%). Из базидиальных грибов больше всего видов выявлено из порядка Uredinales – 25 видов. Остальные порядки представлены меньшим числом видов (от 1 до 3).

Отдел Oomycota – оомицеты. На исследованных нами кормовых растениях оомицеты представлены порядком Peronosporales с двумя семействами (Peronosporaceae и Pythiaceae) и родами Peronospora (15 видов) и Pythium (1 вид).

Из 5 родов растений-хозяев, пораженных пероноспорными грибами, наибольшее число принадлежит к роду *Vicia* (5 видов). На втором месте стоят роды *Lathyrus* и *Trifolium* (по 4 вида), на *Medicago* и *Onobrychis* обнаружено по одному виду пероноспорных грибов, а на злаковых растениях они вообще не найдены.

Среди видов рода *Pythium* обнаружен вид – *P. debaryanum*, который нами был впервые отмечен в Армении на следующих видах клевера: *Trifolium pratense*, *T. repens*, *T. hybridum* и *T. trichocephalum*.

Отдел Ascomycota – аскомицеты. На представителях изученных кормовых растений Армении выявленные нами аскомицеты включают 3 класса: Dothideomycetes, Leotiomyces и Sordariomycetes, которые представлены 12 порядками Botryosphaerales, Dothideales, Capnodiales, Pleosporales, Erysiphales, Rhytismatales, Helotiales, Hypocreales, Diaporthales, Glomerellales, Phyllachorales, Xylariales (табл. 1).

Больше половины исследованных сумчатых грибов относятся к классу Dothideomycetes (82 вида, 27 родов), причем порядок Capnodiales превосходит остальные порядки грибов как по числу родов, так и по числу видов (42 вида, 12 родов). Несколько беднее представлены порядки Pleosporales (25 видов, 8 родов) и Botryosphaerales (12 видов, 4 рода). Порядок Dothideales представлен 3 видами и 3 родами.

Согласно последним классификационным схемам к этому классу отнесены в основном анаморфные грибы, которые раньше выделялись как отдельный класс, – Deuteromycetes. Родовой и видовой состав представителей грибов этого класса, паразитирующих на посевных и дикорастущих кормовых растениях, представлен в табл. 2.

Таблица 1. Количественное распределение обнаруженных грибов и грибоподобных организмов по систематическим группам.

Систематические группы грибов			Количество родов	Количество видов, вариаций и форм	% от общего числа видов
Царство/Отдел	Класс	Порядок			
Chromista Оомycota	Оомycetes	Peronosporales	2	16	10
Mycota Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	4	12	7,5
		Capnodiales	12	42	26,2
		Dothideales	3	3	1,9
		Pleosporales	8	25	15,6
	Leotiomycetes	Erysiphales	4	7	4,4
		Helotiales	3	6	3,8
		Rhytismatales	1	1	0,6
	Sordariomycetes	Diaporthales	1	1	0,6
		Glomerellales	1	4	2,5
		Hypocreales	2	2	1,3
		Phyllachorales	3	5	3,1
		Xylariales	1	5	3,1
	3	12	43	113	70,6
Basidiomycota	Exobasidiomycetes	Entylomatales	1	1	0,6
		Tilletiales	1	1	0,6
	Urediniomycetes	Uredinales	2	25	15,6
	Ustilaginomycetes	Urocystidales	1	1	0,6
		Ustilaginales	1	3	1,9
	3	5	6	31	19,4
Итого:	7	18	51	160	100

Таблица 2. Количественное соотношение родов и видов класса Dothideomycetes

Порядки							
Capnodiales		Pleosporales		Botryosphaeriales		Dothideales	
Род	Вид	Род	Вид	Род	Вид	Род	Вид
Cercospora	3	Alternaria	2	Diplodia	1	Amastigosporium	1
Cercospora	1	Ascochyta	12	Macrophoma	1	Kabatiella	1
Cladosporium	4	Drechslera	1	Phyllosticta	9	Pseudoseptoria	1
Davidiella	2	Leptosphaeria	2	Pseudodiplodia	1		
Didymaria	1	Leptosphaerulina	1				
Heterosporium	2	Sphaerulina	1				
Heterosporium	3	Stagonospora	5				
Mycosphaerella	1	Stemphylium	1				
Phacellinum	1						
Polythrincium	8						
Ramularia	15						
Septoria	1						
Spermospora							
Итого:	12	42	8	25	4	12	3

В биоте изученных аскомицетов второе место принадлежит классу Sordariomycetes. Порядок Phyllachorales включает 3 рода – *Phyllachora* (3 вида), *Placosphaeria* (1 вид) и *Stigmatula* (1 вид), порядок Нурocreales 2 рода – *Claviceps* (1 вид) и *Epichloe* (1 вид), остальные порядки представлены по одному роду (Diaporthales – род *Diplodina*, Glomerellales – род *Colletotrichum*, Xylariales – род *Phoma*).

По числу родов и видов у сумчатых грибов на 3-м месте стоит класс Leotiomycetes (табл. 1), где наибольшее количество видов и родов относится к порядку Erysiphales (7 видов, 4 рода). Порядок Helotiales представлен родами *Cylindrosporium* (3 вида), *Pseudopeziza* (2 вида) и *Sclerotinia* (1 вид), а порядок Rhytismatales – всего одним родом *Lophodermium* (1 вид).

Отдел Basidiomycota – базидиомицеты. На исследованных растениях базидиомицеты представлены классами Exobasidiomycetes, Urediniomycetes и Ustilaginomycetes.

Головневых грибов выявлено всего 6 видов, которые относятся к четырем родам: *Ustilago* – 3 вида, *Entyloma*, *Tilletia* и *Urocystis* – по 1 виду. Все выявленные головневые грибы являются облигатными паразитами, поражающими листья, колосья, завязи и пыльники кормовых злаковых растений.

Ржавчинные грибы (порядок Uredinales) на кормовых растениях представлены 2 родами и 25 видами, являясь тем самым одним из распространенных порядков грибов, паразитирующих на кормовых растениях в условиях Армении. Интересно отметить, что представители рода *Puccinia* встречаются исключительно на кормовых злаках, а *Uromyces* – в основном на бобовых кормовых растениях.

Таким образом в результате изучения микобиоты кормовых растений Армении нами выявлено 160 видов, разновидностей и форм грибов и грибоподобных организмов на 96 видах кормовых растениях.

#### Список литературы

1. Микофлора Армянской ССР. Т. 1-8. Ереван, 1967-1913.
2. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (10th ed.) Wallingford, Kirk PM, Cannon PF et al. (eds.). UK: CABI Publish. 2008: 771 p.
3. Eriksson OE, Baral H-O, Currah RS et al. Notes on Ascomycete systematics. Myconet. 2003; 9: 91-103.
4. Bauer R, Begerow D, Sampaio JP et al. The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. Mycol. Progr. 2006; 5(1): 41-66.

## ЭНДОФИТНЫЙ ШТАММ *B. SUBTILIS* 26Д СТИМУЛИРУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ПАТОГЕНАМ И ВРЕДИТЕЛЯМ, АКТИВИРУЯ ТРАНСКРИПЦИЮ ЖАСМОНАТ-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ

Сорокань А.В., Абизильдина Р.Р., Юлдашев Р.А., Китаев К.А., Максимов И.В.  
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

**Введение.** Известно, что многие организмы, в том числе и сельскохозяйственные культуры, содержат в своих тканях эндофитные микроорганизмы. Их участие в регуляции роста растений, азотфиксации, синтезе биологически активных соединений и в биоконтроле развития патогенов открывает большие перспективы для их использования в защите растений от стрессовых факторов окружающей среды, в том числе и биотических [1].

Так, после идентификации и токсикологических исследований в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины под руководством академика НАН Украины В.В. Смирнова был выделен штамм бактерии *B. subtilis* ВНИИСХМ 128 (26Д) [2], на основе которого налажено производство биопрепарата «Фитоспорин-М». Хотя этот биопрепарат рекомендован для использования на посевах различных с.-х. культур и активно используется в хозяйствах в качестве защитного средства, фундаментальные основы физиолого-биохимических механизмов формирования устойчивости растений к патогенам под влиянием его биологической основы остаются еще практически не исследованными.

**Методика.** Объектами исследований для проверки эффективности Фитоспорина-М служили растения картофеля раннеспелого сорта Удача (*Solanum tuberosum* L.). Работа проводилась в полевых условиях

на опытном участке в Бирском р-не Башкортостана, д. Новобурново (почва серая лесная). Было проведено 2 обработки растений Фитоспорином в концентрации 15 г/л путем опрыскивания в фазах смыкания рядков – бутонизации, повторно через 10–15 сут. Пораженность растений оценивали по 4-балльной шкале, поврежденность колорадским жуком – в процентах листовой массы.

В лабораторных опытах были использованы стерильные пробирочные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.), восприимчивого к фитофторозу сорта Ранняя роза и штамм бактерии *B. subtilis* 26Д для экспериментов был выделен из коммерческого препарата Фитоспорин-М, любезно предоставленного нам ООО НВП «Башинком» (Россия). Растения картофеля через 14 сут культивирования инокулировали 5 мкл суспензии *B. subtilis* 26Д (10<sup>9</sup> кл./мл) путем нанесения микроорганизмов на прикорневую зону.

Через 14 сут часть растений инокулировали спорами *Phytophthora infestans* (10<sup>5</sup> спор/мл) по 5 мкл суспензии на каждый лист. В опытах по совместному влиянию *B. subtilis* 26Д с салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами растения высаживались на среду, содержащую 50 мкМ СК либо 0,1 мкМ ЖК, затем инокулировались как описано выше. Об устойчивости растений к фитофторозу судили по площади поражений на листьях.

Таблица. Эффективность Фитоспорина-М против вредителей картофеля в полевых условиях

Время после 1-й обработки	Процент пораженных пятнистостями растений			Средний бал поражённости			Процент повреждения колорадским жуком	Процент клубней, пораженных сухой гнилью	Процент клубней, пораженных паршой
	5	15	35	5	15	35			
Контроль	61	62	97	0,86	1,02	2,55	63,39	25	57
Фитоспорин	38	46	79	0,52	0,7	1,3	38,14	10	35

Тотальную РНК выделяли с помощью тризола согласно протоколу (Molecular Research Center, Inc). Синтез кДНК проводили с использованием праймеров и фермента М-MLV обратной транскриптазы по протоколу (Fermentas, США). Одноцепочечную кДНК использовали в реакции амплификации с праймерами к генам M21334 и U313509.

**Результаты.** При оценке эффективности применения препарата Фитоспорин-М в полевых условиях 2014 г. было выявлено большое распространение листовых пятнистостей в течение вегетационного сезона (таблица). Из пораженных тканей выделены возбудители альтернариоза (*Alternaria solani*), фитофтороза (*Phytophthora infestans*) и корневых гнилей (*Fusarium* spp.). Обработка растений Фитоспорином приводила к снижению количества инфицированных листовыми пятнистостями растений на 20% и степени их пораженности по сравнению с контрольными делянками на протяжении всего вегетационного периода (табл. 1). Обработка Фитоспорином-М сокращала количество клубней, поврежденных паршой обыкновенной более чем на 1/3, сухой гнилью – более чем на 1/3 по сравнению с контрольной выборкой. Следует отметить, что Фитоспорин так же снижал размер повреждения растений колорадским жуком на 20% по сравнению с контрольными показателями.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что *B. subtilis* 26Д подавляет развитие ряда патогенных грибов *in vitro* [3]. Согласно нашим данным, этот штамм стимулирует транскрипционную активность защитных генов ингибитора протеиназ SGN-U313509 и анионной пероксидазы M21334, экспрессирующихся при наличии жасмоновой кислоты в среде культивирования пробирочных растений. Из рис. 1 видно, что растения, обработанные *B. subtilis* 26Д, характеризуются высоким содержанием транскриптов этих двух генов. В инфицированных возбудителем фитофтороза растениях картофеля под воздействием *B. subtilis* 26Д содержание транскриптов гена M21334 превышало контрольные показатели почти втрое, U313509 – примерно на 50%.

Таким образом, одним из путей формирования защитного действия против патогенов и вредителей использованным штаммом бактерии является опосредованная им стимуляция экспрессии генов, кодирующих анионную пероксидазу M21334 и ингибиторы протеиназ U313509, которые находятся под контролем жасмонатной сигнальной системы растений.

Ранее мы показали, что совместное использование салициловой и жасмоновой кислот в низких кон-

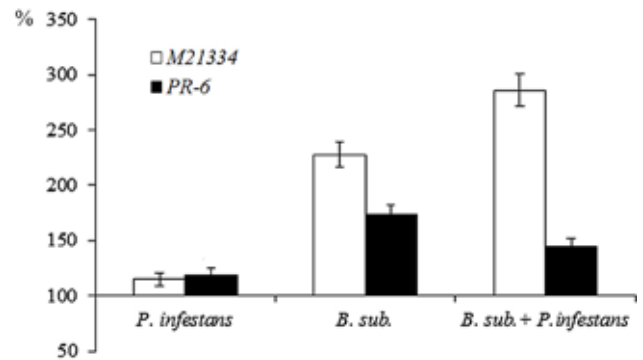


Рис. 1. Результаты нормализованной против гена актина оценки экспрессии генов M21334 и U313509 в пробирочных растениях картофеля, обработанных *B. subtilis* 26Д и инфицированных *P. infestans*.

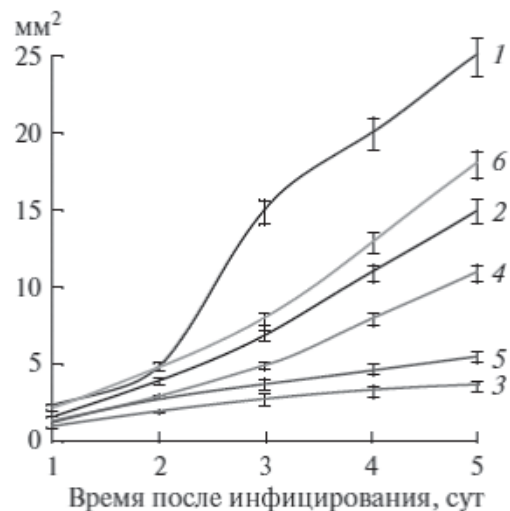


Рис. 2. Динамика развития симптомов фитофтороза (размер некротического пятна, мм<sup>2</sup>) на пробирочных растениях картофеля под влиянием индукторов устойчивости и бактериальной культуры *B. subtilis* 26Д:

1 – контроль (вода); 2 – СК; 3 – ЖК; 4 – *B. subtilis*; 5 – *B. subtilis* + СК; 6 – *B. subtilis* + ЖК.

центрациях способствует увеличению устойчивости растений к фитофторозу (Максимов и др., 2011). Интересно, что наибольшим снижающим рост патогена действием обладала суспензия бактерий *B. subtilis* 26Д, использованная совместно с СК (рис. 2), чему способствовала, вероятно, высокая транскрипционная активность гена M21334 (рис. 4). Обработка растений СК практически не способствовала увеличению

содержания мРНК изученного гена в растениях, но при инфицировании *P. infestans* в них происходило 3-кратное накопление транскриптов гена M21334 уже после 6 ч эксперимента. Полученные результаты предполагают, что СК, хотя сама и не запускает транскрипцию гена M21334 в растениях картофеля, может формировать чувствительность генома хозяина к появлению патогенного агента, что впоследствии проявляется в активации экспрессии отмеченного гена у инфицированных растений.

Обращает на себя внимание то, что на фоне значительного индивидуального защитного эффекта ЖК, а также суспензии клеток *B. subtilis* 26Д обнаруживалось заметное снижение иммунитета растений при последовательном применении этих препаратов.

Индивидуальная обработка растений эндофитной бактерией *B. subtilis* 26Д или ЖК способствовала высокому уровню активности транскрипции гена пероксидазы M21334 как в контрольных, так и в инфицированных растениях картофеля по сравнению с контролем (рис. 3). Интересно, что при последовательном использовании ЖК и затем бактериальной суспензии было выявлено снижение транскрипционной активности гена M21334 (рис. 2) и увеличение площади поражения патогеном на листьях (рис. 1).

Мы предположили, что это может быть связано с зависимостью от концентрационных составляющих

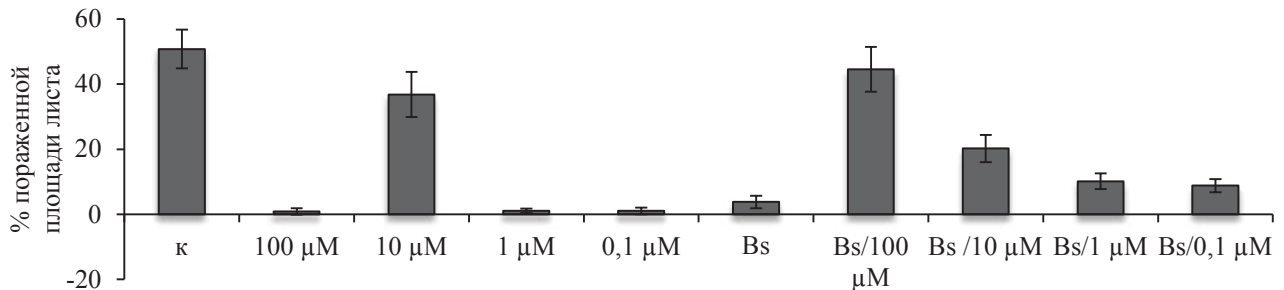


Рисунок 4. Влияние различных концентраций ЖК и ее комбинаций с *B. subtilis* 26Д на пораженность листьев картофеля фитофтороза (10 сут после инокуляции *P. infestans*).

Таким образом, можно предположить, что эффективность применения биопрепаратов на основе *B. subtilis* 26Д на картофеле может существенно быть понижена в конце вегетационного сезона, когда в тканях картофеля содержится жасмоновая кислота в высокой концентрации [4].

Кроме того, полученные нами в этой работе данные убедительно доказывают, что штамм *B. subtilis* 26Д, может быть эффективным агентом для защиты растений от патогенов и вредителей на посадках картофеля. Причем эти данные предполагают, что эффективность применения биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов выше в ранние сроки развития картофеля.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки РФ № 14.604.21.0016 по приоритетному направ-

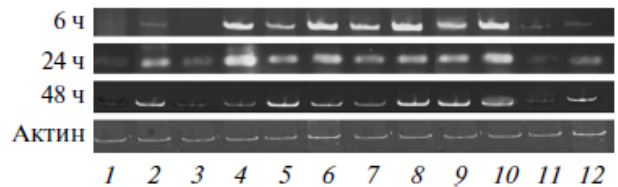


Рис. 3. Результаты нормализованной против гена актина оценки экспрессии гена пероксидазы M21334 в растениях картофеля, обработанных СК, ЖК и культурой клеток *B. subtilis* 26Д и инфицированных *P. infestans*:

- 1 – контроль; 2 – *P. infestans*; 3 – СК; 4 – СК + *P. infestans*; 5 – *B. subtilis*; 6 – *B. subtilis* + *P. infestans*;
- 7 – СК + *B. subtilis*; 8 – СК + *B. subtilis* + *P. infestans*;
- 9 – ЖК; 10 – ЖК + *P. infestans*; 11 – ЖК + *B. subtilis*;
- 12 – ЖК + *B. subtilis* + *P. infestans*.

сигнальных молекул, усиливающих защитный эффект микросимбионта. Исследование совместного влияния ЖК в различных концентрациях и суспензии *B. subtilis* 26Д (рис. 4) показало, что чем меньшая концентрация ЖК была добавлена к бактериальной суспензии, тем меньшая площадь распространения фитофтороза наблюдалась на инфицированных листьях, однако даже минимальная концентрация ЖК совместно с бактериальной суспензией была менее эффективна, чем *B. subtilis* 26Д и ряд концентраций ЖК в отдельности.

лению "Науки о жизни" в рамках мероприятия 1.2 Программы (уникальный идентификатор (RFMEFI57614X0039).

#### Список литературы

1. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Coh. в агроэкосистемах. М.: Наука. 2007: 147 с.
2. Смирнов В.В. Сорокулова И.В., Березнитская Т.Г. Патент РФ №2099947. 1997.
3. Абизгильдина Р.Р. Индукция защитной системы пшеницы и картофеля эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* 26Д Дисс. на соискание ученой степени к.б.н. по спец. 03.01.05. Уфа – 2012.
4. Matsuura H., Ohmori F., Kobayashi M. et al. Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonoids in potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64(11): 2380-7.

## ИЗУЧЕНИЕ РОССИЙСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА ЗЕРНА С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИЛОКУСНОГО ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Стахеев А.А., Завриев С.К.

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Род *Fusarium* представляет собой обширную группу аскомицетных грибов, многие из которых являются возбудителями болезней важных с.-х. культур, в первую очередь злаков. Впервые выделенный в качестве отдельной таксономической группы в 1809 г. немецким микологом Х.Ф. Линком, объединившим в него все грибы, имеющие веретеновидно-серповидную форму конидий, он пережил несколько таксономических «революций».

Долгое время в систематике рода *Fusarium* царил полный хаос – на определённом этапе сложилась ситуация, когда он включал в себя более 1000 видов. В настоящее время таксономическая система рода продолжает оставаться предметом спора многих исследователей. Эта противоречивость во многом обусловлена тем, что существующая классификация основана на анализе обладающих высокой изменчивостью морфологических структур. Виды, относимые к роду *Fusarium*, отличаются друг от друга по типу спороношения – для них характерны как микро-, так и макроконидии, по наличию или отсутствию половой стадии в цикле развития, а также по типу спаривания [1]. Проявление тех или иных морфологических характеристик может зависеть от состава среды, используемой для культивирования, условий окружающей среды, и других факторов.

На сегодняшний день важную роль в изучении разнообразия грибов *Fusarium*, а также в их видовой идентификации, играют молекулярные технологии. Особенно перспективными в этом отношении представляются подходы, основанные на сравнении спектров специфических метаболитов (например, токсинов), а также на анализе полиморфизма геномных или митохондриальных ДНК. Наиболее специфичными для обнаружения и идентификации возбудителей фузариоза являются методы с использованием генетических маркеров, в позволяющие определять вид, либо другой таксон, по характерной последовательности его ДНК.

Однако объём генетических данных для представителей рода *Fusarium* достаточно ограничен – полностью расшифрован геном только у четырёх видов: *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* и *F. solani*. В масштабе рода выявлено лишь небольшое число локусов, для которых разработаны специфические SCAR-маркеры [2]. Большинство исследований, посвящённых классификации и таксономической характеристике возбудителей фузариоза, проводилось с использованием последовательностей нуклеотидов 1–2 генов.

Этого явно недостаточно, чтобы сделать однозначные выводы по степени родства тех или иных видов или штаммов. Решить эти проблемы может применение метода MLST (мультилокусное секвенирование-типирование [3]), в основе которого лежит установление последовательностей нуклеотидов небольших

фрагментов (обычно 500–700 п.н.) нескольких генов и их последующим сравнением у разных организмов. Как правило, для мультилокусного анализа используют гены «домашнего хозяйства», которые характеризуются относительно низкой скоростью накопления мутаций, большинство из которых селективно нейтральны.

Для оценки достоверности метода MLST важен объём выборки исследуемых штаммов и видов. Как правило, анализируются группы, ограниченные как по количеству, так и по географическому происхождению. До сих пор не было проведено ни одного обширного исследования генетического разнообразия российской коллекции возбудителей фузариоза. Получение новой филогенетической информации и изучение таксономии *Fusarium*, равно как разработка эффективных систем идентификации возбудителей фузариоза требуют выявления новых ДНК-маркеров, специфичных на меж- и внутривидовом уровне.

**Цель исследования** – проведение мультилокусного филогенетического анализа широкой выборки возбудителей фузариоза из различных регионов России, поражающих злаковые культуры, анализ полиморфизма важных в таксономическом и функциональном отношении генов, а также выявление новых маркеров для филогенетических исследований, диагностики и идентификации продуцентов микотоксинов.

**Методика исследований.** Объектами исследования были 90 штаммов 12 широко распространённых токсигенных грибов рода *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. torulosum*, *F. equiseti* и *F. solani* из коллекций Всероссийского института защиты растений (ВИЗР) и Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (ВНИИФ) Россельхозакадемии. Необходимо отметить, что вид *F. torulosum* (2 штамма) был впервые выявлен на территории РФ в ходе настоящей работы. Для получения обильного мицелия грибы культивировали на картофельно-сахарозном агаре (КСА) в темноте в течение 7–10 сут при комнатной температуре.

Выделение ДНК проводили по модифицированному методу, основанному на использовании цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) в качестве детергента [4]. Мицелий (50–100 мг) гомогенизировали в 2–3 мл лизирующего буфера (25 мМ ЦТАБ; 0,7 М NaCl; 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 10 мМ ЭДТА; 1 % меркаптоэтанол) и инкубировали при 65°C в течение 2 ч, периодически перемешивая. Затем к гомогенату последовательно добавляли равные объёмы фенола и хлороформа для удаления белковых примесей. ДНК осаждали 96%-ным этанолом в присутствии 3М ацетата натрия, и растворяли в 100 мкл воды. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре «Nanovue» («GE Healthcare», США). Перед внесением в реакционную смесь все образцы ДНК разбавляли до концентрации 50 нг/мкл.

Для мультилокусного анализа были выбраны 7 генов «домашнего хозяйства»: фактора элонгации трансляции 1 альфа (TEF1 $\alpha$ ), ген бета-тубулина ( $\beta$ -tub), фосфатпермеазы (PHO), ген большой субъединицы АТФ-цитратлиазы (acl1), ген стерол-14 $\alpha$ -деметилазы (CYP51C), ген 2 субъединицы РНК-полимеразы II (RPB2), ген фратаксина (FXN), ген белка теплового шока 90 (HSP90). Также анализировались последовательности нуклеотидов внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомной ДНК (ITS), а для группы видов, продуцирующих энниатины (*F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. torulosum*) – ген энниатинсинтетазы (esn1).

Подбор универсальных праймеров для секвенирования проводился на основе выравнивания консервативных участков генов (как правило, это экзоны) с помощью программы AlignX (пакет программ Vector NTI 9). Физико-химические характеристики праймеров оценивали с помощью программы Oligo 6.

ПЦР-амплификация проводилась в реакционной смеси универсального состава (объём 35 мкл): 3,5 мкл 10X ПЦР-буфера (750 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 200 мМ сульфат аммония, 0,1% Твин-20), 1 мМ каждого dNTP, 1 мкМ праймеров, 2,5 ед. Таq-полимеразы и 5 мкл раствора выделенной ДНК. Температура отжига праймеров для каждой пары подбиралась индивидуально. Общий профиль амплификации был следующим: 94 °С – 90 с (1 цикл); 94 °С – 10 с, отжиг праймеров – 15 с, 72 °С – 10 с (45 циклов); 72 °С – 3 мин.

Анализ продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза при силе тока 400 мА в 2,5%-

ном агарозном геле в буфере ТАЕ (40 мМ трисгидроксиметиламинметан, 20 мМ ледяная уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА), с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркер молекулярного веса ДНК 1 т.п.н. GeneRuler. Клонирование продуктов ПЦР проводили с использованием набора InstA Clone PCR Cloning Kit («Fermentas», Литва) по протоколу производителя.

Филогенетический анализ проводили с использованием пакета программ MEGA 5.1. Филогенетические деревья конструировали с помощью метода присоединения соседей. Достоверность построенных деревьев подтверждали бутстрэп-анализом (500 случайных выборок).

**Результаты и обсуждение.** Филогенетический анализ исследуемых штаммов проводился индивидуально по каждому из локусов, а также на основе сравнения «суммарной» последовательности. Общая топология деревьев в целом не зависела от выбранного гена, основные отличия касались уровней внутривидового полиморфизма. Наиболее филогенетически информативным был признан ген TEF1 $\alpha$ , однако для группы энниатин-продуцирующих видов (*F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. torulosum*) им был ген PHO. На рис. 1 приведено филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа частичных последовательностей гена TEF1 $\alpha$  12 видов возбудителей фузариоза из всероссийских коллекций (по одному штамму от каждого вида, последовательность вида *F. oxysporum* получена из базы данных GenBank NCBI).

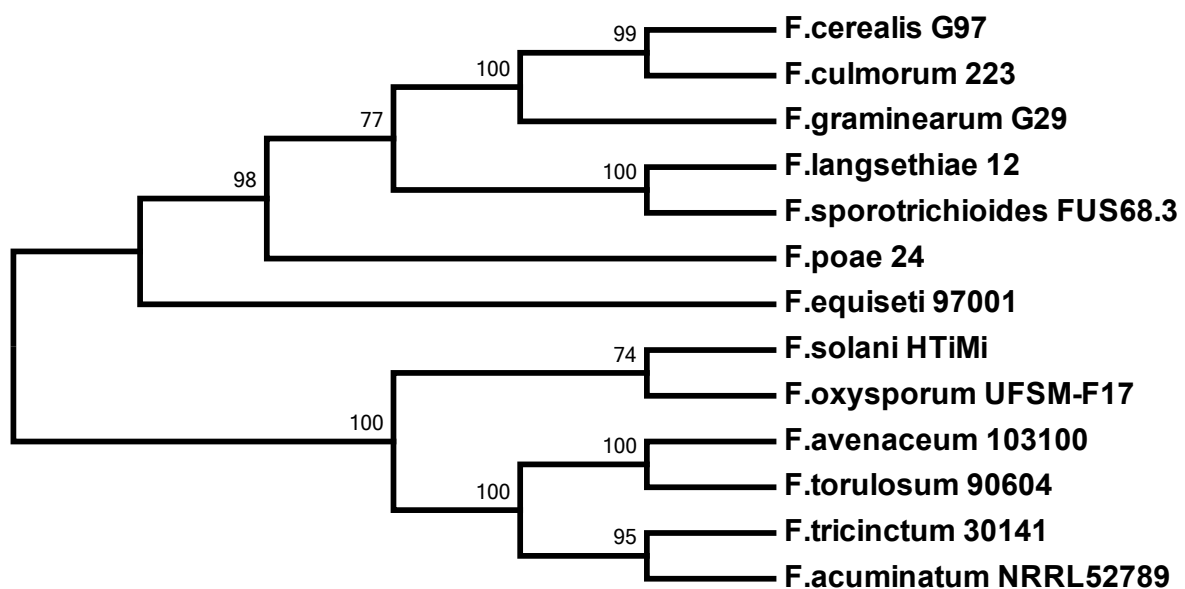


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа частичных последовательностей гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (TEF1 $\alpha$ ) с использованием метода присоединения соседей. Масштаб соответствует 5 заменам на 100 пар оснований. Показаны значения бутстрэпа более 70%.

Принципиально важной топологической характеристикой представленного дерева является наличие двух чётко различимых кластеров, в один из которых входят виды (*F. cerealis* – *F. equiseti*, верхний кластер), способные продуцировать микотоксины трихотеценовой группы. В этом кластере, в свою очередь, присут-

ствуют группы видов, характеризующиеся определёнными хемотипами: продуценты трихотеценов типа А (*F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*); продуценты трихотеценов типа В (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*); виды, характеризующиеся смешанным хемотипом (*F. equiseti*, *F. poae*). Другой кластер («нижний», *F. solani*



– *F. acuminatum*) включает в себя виды, не обладающие способностью к образованию трихотеценовых токсинов, причём общей чертой видов *F. avenaceum* – *F. acuminatum* является продуцирование соединений группы энниатинов и боверицина.

Энниатинпродуцирующие виды рода *Fusarium* представляют собой относительно слабо изученную в филогенетическом отношении группу возбудителей фузариоза. По существующей систематике, каждый из четырёх видов относится к разным секциям, причём вид *F. tricinctum* относят к секции *Sporotrichiella*, вместе с такими видами, как *F. sporotrichioides* и *F. langsethiae*.

Полученные результаты явно свидетельствуют об ошибочности такой классификации, поскольку как филогенетически, так и по профилю продуцируемых токсинов, он близок к видам *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. torulosum*. Такой результат был подтверждён в филогенетических исследованиях с использованием всех анализируемых в работе локусов.

**Заключение.** Таким образом, впервые проведён мультилокусный филогенетический анализ моноспо-

ровых штаммов возбудителей фузариоза всероссийских коллекций. Полученные данные однозначно демонстрируют наличие корреляции между степенью родства исследованных видов и профилем продуцируемых ими токсинов. Эти результаты могут лечь в основу создания модернизированных таксономических систем рода *Fusarium*, а также быть использованы при создании систем высокоспецифической идентификации его представителей. Ряд отсеквенированных в настоящей работе последовательностей нуклеотидов депонирован в базу данных GenBank NCBI (accession numbers KJ200246-KJ200272; KJ508100-KJ508180).

#### Список литературы

1. Leslie JF, Summerell BA. Blackwell Publish. 2006: 388 p.
2. Paran I, Michelmore RW. Theor Appl Genet. 1993; 85, 985-93.
3. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E et al. Proc Nat Acad Sci USA. 1998; 95: 3140-5.
4. Murray MG, Thompson WF. Nucl Acid Res. 1980; 8, 4321-5.

## ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ *FUSARIUM CULMORUM* В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР

Стахеев А.А.<sup>1</sup>, Щербакова Л.А.<sup>2</sup>, Завриев С.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup>ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы. Московская обл.

Фитопатогенный комплекс корневой гнили пшеницы формирует в частности. При подходящих погодных условиях этот вид способен поражать также и колос. Экономический ущерб от прямых потерь урожая, вызванных данным патогеном, усугубляется тем, что он продуцирует ниваленол, дезоксиниваленол, зеараленон и другие микотоксины, что делает опасным или невозможным использование заражённого им зерна.

Токсигенность возбудителя, а также связанное с изменениями климата расширение его ареала и возрастающая вредоносность для пшеницы диктуют необходимость обеспечения надежного контроля патогена для защиты этой важной сельскохозяйственной культуры. Одним из подходов к решению поставленной задачи является расширение спектра химических соединений или биоагентов, которые в дальнейшем могли бы стать основой для высокоэффективных фунгицидов и индукторов устойчивости к болезням.

В свою очередь, результативность их поиска зависит от того, насколько быстро и масштабно проводится скрининг защитной активности тестируемых кандидатов на 1-м этапе лабораторных испытаний. Независимо от того, какой метод используют для проверки действия веществ, их защитный эффект оценивают визуально, а само тестирование требует длительного времени. Наиболее быстрое получение результата обеспечивает тестирование с помощью так называемого «рулонного» теста, но и в этом случае данные о зараженности корневой гнилью на проростках пшеницы с достоверным количественным результатом получают на 12–14 сут после закладки опыта. Если же

при скрининге требуется дифференцировать эффект тестируемого агента на фузариозную корневую гниль от его влияния на дающие сходные симптомы корневые гнили другой этиологии, приходится проводить микроскопическое исследование и идентификацию возбудителей по морфологии спор.

В то же время, для быстрой и специфической диагностики возбудителей фузариоза широко используются молекулярные методы, основанные на ПЦР, а одна из ее модификаций – количественная ПЦР – открывает возможность количественного анализа содержания в пробе ДНК конкретного патогенного гриба. Можно предполагать, что при проведении «рулонного теста» уровень защитного действия химических веществ или природных соединений, использованных для обработки семенного материала, может быть оценен по уровню содержания ДНК патогена в проростках с помощью метода количественной ПЦР на значительно более ранних сроках, чем при визуальной оценке.

Однако для этого необходимо быть уверенным, что количественное определение грибной ДНК в вегетирующих растениях и ее накопление по мере развития болезни отражает реальное распространение патогена. Это, в свою очередь, требует проведения серии предварительных экспериментов по количественному анализу содержания грибной ДНК в проростках, выращенных из инокулированных семян с известным уровнем инфицирования. В данной работе представлены первые результаты таких экспериментов с использованием в качестве контролируемого патогена

пшеницы гриба *F. culmorum*.

**Методика исследований.** Семена пшеницы (сорт Энита) с низким уровнем естественного инфицирования возбудителями корневой гнили (распространенность 4,1%) были продезинфицированы в 0,5% раствором  $KMnO_4$ , тщательно промыты стерильной дистиллированной водой и подсушены под ламинатом между стерильными бумажными фильтрами. Семена заражали *F. culmorum* путем погружения их в суспензию спор гриба (100 мл суспензии с концентрацией  $1 \times 10^6$  конидий/мл на 1000 зерен) и последующей инкубацией в ней при постоянном медленном перемешивании на качалке в течение 30 мин. Контрольные семена инкубировали в тех же условиях в стерильной дистиллированной воде. Семена отбрасывали на стерильные фильтры Miracloth (Calbiochem®), а затем переносили на стерильную фильтровальную бумагу, чтобы удалить излишки жидкости.

Из контрольных и обработанных суспензией спор семян пшеницы готовили образцы (по 250 семян в каждом), в которых количество инокулированных зерен составляло 0 (контроль), 10, 50 и 100%. Влажные семена размещали в рулонах, которые помещали в стаканы со стерильной дистиллированной водой и выращивали проростки во влажной камере при температуре 20 °С днем (16 часов) и 18 °С ночью в течение 12 сут, после чего проводили визуальную оценку симптомов заболевания на корнях и корневой шейке, которые в первую очередь поражаются патогеном. Пробы растительной ткани для анализа отбирали через 3 и 7 сут после заражения, замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С. Каждая проба представляла собой объединенный образец из 10 проростков – корней и корневых шеек, отделенных от каждого 5-го проростка из 50 в рулоне (5 рулонов на вариант).

Выделение ДНК проводили по модифицированному методу, основанному на использовании цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) в качестве детергента [1]. Образцы растительной ткани (200 мг) гомогенизировали в 5 мл лизирующего буфера (25 мМ ЦТАБ; 0,7 М NaCl; 50 мМ Трис-HCl pH 8,0; 10 мМ ЭДТА; 1%-ный меркаптоэтанол) и инкубировали при 65 °С в течение 2 ч, периодически перемешивая. Затем к гомогенату последовательно добавляли равные объемы фенола и хлороформа для удаления белковых примесей. ДНК осаждали 96%-ным этанолом в присутствии 3М ацетата натрия, и растворяли в 100 мкл воды. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре «Nanovue» («GE Healthcare», США). Перед внесением в реакционную смесь все образцы ДНК разбавляли до концентрации 20 нг/мкл.

Количественную ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия) в соответствии со следующим профилем амплификации: 94 °С – 1 мин 30 с; 94 °С – 10 с, 64 °С – 15 с, 67 °С – 10 с (35 циклов). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 2 мкл 10-кратного буфера (750 мМ Трис-HCl pH 8,8; 200 мМ сульфат аммония, 0,1% Твин-20; 0,5 мМ каждого dNTP, по 6,25 пмоль праймеров, 7 пмоль флуоресцентно-меченных зондов, 1,25 ед. Taq-полимеразы и 5 мкл раствора ДНК.

Для специфической детекции гриба *F. culmorum* использовалась пара праймеров FctefF-R и гидро-

лизующийся зонд (TaqMan) FgctefT [2]. Кроме того, для стандартизации реакции и выявления возможного ингибирования ПЦР была разработана система внутреннего контроля с использованием праймеров WhEFGF (5'-TGCGAGATAAGCCAGGTGGAC-3'), WhEFGR (5'-TGCTGACATACTGGAACATCTCG-3') и зонда WhEFGT (5'-(BHQ1) TAACATCCA(HEXdT) TGTCAGCTATAGCCGAG-3'), комплементарных последовательности гена фактора элонгации трансляции G пшеницы.

В проведенном исследовании использовался так наз. пороговый метод анализа результатов ПЦР, основанный на нахождении момента  $C_q$ , выраженного в циклах ПЦР, когда количество продуктов амплификации в реакционной пробирке достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины.

**Результаты и обсуждение.** Чтобы выяснить, возможен ли количественный анализ содержания специфической ДНК в исследуемых образцах, требовалось определить уровень сигнала ПЦР при амплификации образцов известной концентрации. Для этого проводили ПЦР с последовательными 1-кратными разведениями ДНК, выделенной из моноспорового изолята *F. culmorum* (K3-17001) и строили калибровочный график, демонстрирующий зависимость сигнала ПЦР ( $C_q$ ) от концентрации ДНК (log) в диапазоне концентраций от 100 до 0,001 нг на реакцию (рис. 1).

Минимальная концентрация, при которой детектировался сигнал ПЦР, составила 0,001 нг/реакцию. Поскольку геном *F. culmorum* полностью не расшифрован, для расчета числа копий был принят известный размер генома близкородственного вида *F. graminearum*, равный 36 млн п.н. При таком размере генома количество 0,001 нг соответствует ~ 20 копиям геномной ДНК на реакцию, что соответствует высокой чувствительности. Аналогичный опыт проводился с последовательными разведениями чистой ДНК пшеницы известной концентрации с использованием пары праймеров WhEFGF-R и зонда WhEFGT (данные не приводятся).

В табл. 1 приведены результаты мультиплексных количественных ПЦР (усредненное  $C_q$ ) исследуемых образцов ткани проростков на 3-и и 7-е сут после заражения семян.

Табл. 1. Результаты ПЦР-анализа ДНК *F. culmorum* в проростках пшеницы из семян, искусственно зараженных патогеном. FAM – специфический образец, HEX – внутренний контроль, «К+» и «К-» – положительный и отрицательные контроли.

Варианты	$C_q$ FAM		$C_q$ HEX	
	Возраст проростков, сут			
	3	7	3	7
Контроль	-	-	+27,5	+27,3
Заражение 10%	+32,5	+34,0	+27,1	+28,0
Заражение 50%	+34,7	+26,6	+27,4	+27,6
Заражение 100%	+35,2	+23,9	+27,8	+27,5
К+	+22,0	+21,5	+26,9	+27,0
К-	-	-	+26,7	+26,9

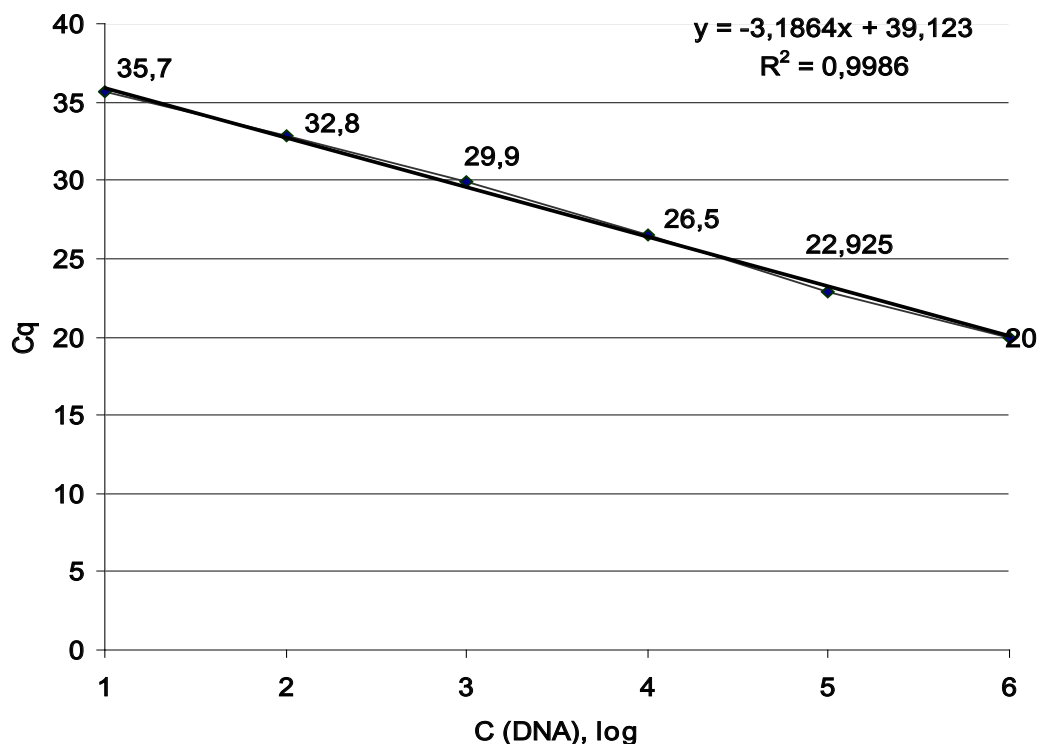


Рис. 1. График зависимости сигнала ПЦР (Cq) от концентрации ДНК гриба *F. culmorum* при амплификации с парой праймеров FctefF-R и зондом FgctefT.

Амплификация внутреннего контроля (ДНК пшеницы) происходила во всех исследованных образцах, что свидетельствовало об отсутствии ингибирования реакции, и исключало ложно отрицательные результаты. В неинокулированных патогеном контрольных образцах ДНК *F. culmorum* обнаружено не было. Концентрация ДНК пшеницы во всех пробирках составила около 50 нг, что соответствовало приблизительно  $3 \times 10^3$  копий на реакцию.

Определение абсолютного соотношения ДНК *F. culmorum* и пшеницы, рассчитанного двумя спо-

собами (табл. 2), показало, что уже на 3-и сут после инокуляции семян ДНК гриба достоверно детектировалась в проростках пшеницы даже в тех образцах, которые содержали всего 10% зараженных зерен.

Для 7-сут проростков была выявлена корреляция между уровнем исходной семенной инфекции и интенсивностью сигнала ПЦР.

Количество ДНК в серии «50%» выше, чем в серии «10%», почти на 3 порядка, а в серии «100%» в 10 раз выше, чем в серии «50%».

Таблица 2. Количество ДНК *F. culmorum* в проростках пшеницы, выращенных из семян, зараженных патогеном, относительно внутреннего контроля (растительная ДНК).

Распространенность корневой гнили, %	(пг ДНК <i>F.culmorum</i> )/ (1 нг ДНК пшеницы)	(копий ДНК <i>F. culmorum</i> )/ (1 копия ДНК пшеницы)
3 сутки после заражения		
0*	0	0
10	0,1	0,04
50	0,1	0,04
100	0,09	0,039
7 сутки после заражения		
0*	0	0
10	1	0,43
50	20	8,4
100	150	64

\* Неинокулированный контроль

**Заключение.** Наши исследования показали принципиальную возможность использования ПЦР в реальном времени для количественной оценки развития фузариоза на проростках пшеницы, в том числе в период, когда симптомы заболевания отсутствуют или слабо выражены.

Представляется вполне вероятным, что применение ПЦР при проведении «рулонного теста» позволит ускорить скрининг веществ с антифузариозной активностью. Кроме того, количественная ПЦР, по-видимому, является перспективным подходом для

выявления эффекта, оказываемого фунгицидом или биопрепаратом на конкретный вид возбудителя, а ее специфичность позволит оценить индивидуальной вклад того или иного вида в патогенез и вредоносность фузариоза.

#### Список литературы

1. Murray MG, Thompson WF. Nucl Acid Res. 1980; 8: 4321-5.
2. Рязанцев Д.Ю., Абрамова С.Л., Евстратова С.В., Гагкаяева Т.Ю., Завриев С.К. Биоорг. хим. 2008; 34: 716-24.

## ВЛИЯНИЕ ФОРМ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА И НЕКОТОРЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА *FUSARIUM CULMORUM*

Струнникова О.К., Вишневская Н.А., Бородина Е.В., Шондина О.В.  
ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

*Fusarium culmorum* W.G. Smith – почвообитающий факультативный фитопатоген, широко распространен в почвах разных регионов мира [1,2]. Известно, что *F. culmorum* способен к сапротрофному типу развития в почве, однако в некоторых условиях гриб переходит к паразитизму на растениях, вызывая корневые и стеблевые гнили, а также фузариоз колоса зерновых культур, что приводит не только к снижению урожая, но и загрязнению зерна микотоксинами [3, 4]. Одним из условий, приводящих к разной заболеваемости ячменя, вызываемой *F. culmorum*, является форма внесенного минерального азота.

В вегетационном эксперименте, проведенном в нестерильной почве на инфекционном фоне, созданным внесением макроконидий *F. culmorum*, ячмень сильнее поражался корневой гнилью при внесении в почву азота в аммонийной форме, по сравнению с нитратной. Развитие *F. culmorum* на мембранах, внесенных в почву, колонизацию патогеном корней, заболеваемость и длину корней ячменя учитывали на 3-, 5-, 7-, 10- и 15-е сут.

Количество грибных структур на мембранах и плотность колонизации *F. culmorum* корней ячменя оценивали под микроскопом Imager A1 (Carl Zeiss, Germany) после иммунофлуоресцентного окрашивания. Оценка развития *F. culmorum*, внесенного на мембранах в почву обоих вариантов, показала более активное формирование мицелия и макроконидий гриба в течение первых семи дней эксперимента в почве с окисленной формой минерального азота, по сравнению с восстановленной.

К концу эксперимента количество хламидоспор увеличивалось в почве с восстановленной формой азота. *F. culmorum* колонизировал уже 3-сут корни ячменя. Причем плотность заселения грибом корней была одинаковой в течение всего эксперимента в почве с обеими формами минерального азота. Несмотря на одинаковую плотность гриба на корнях, количество больных растений ячменя в почве с восстановленной формой минерального азота к 10-м сут достигло 35%, тогда как в почве с окисленной формой сохранялось на уровне 10%.

Длина корней ячменя была достоверно выше у растений в почве с нитратной формой азота, по сравнению с аммонийной, в том числе и у контрольных растений без инокуляции микроорганизмами. Результаты проведенного эксперимента показали отсутствие прямой зависимости между интенсивностью развития *F. culmorum* в почве под ячменем и плотностью заселения грибом корней. Не было также прямой связи и между количеством *F. culmorum* на корнях, и интенсивностью развития гнили корней, вызываемой грибом. Подобное несоответствие между количеством гриба в почве под растением, на корнях, и уровнем болезни мы наблюдали и в других экспериментах в разных почвенных условиях.

Восстановленная форма азота является энергетически более выгодной для использования микроорганизмами, тем не менее на мембранах мы видели более интенсивный рост *F. culmorum* в почве с окисленной формой минерального азота. Формы азота, безусловно, меняют состав почвенной микрофлоры, активизируя ту ее часть, которая отвечает за процессы трансформации азота. Влияют ли формы минерального азота непосредственно на *F. culmorum*?

Чтобы вычленить влияние форм азота на *F. culmorum* нами была проведена серия модельных экспериментов, где использовали те же источники минерального азота –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{NaNO}_3$ , как и в почве. Источниками углерода являлись сахароза, глюкоза и цитрат натрия. Выбор источников углерода определялся необходимостью выяснить насколько гриб может быть конкурентно способен в ризосфере растений. Известно, что корневые экссудаты растений, значительную долю которых составляют органические кислоты, аминокислоты и сахара, являются основными источниками питания в ризосфере [5].

У ячменя основную долю всех выделяемых сахаров составляет глюкоза, а из органических кислот – лимонная. *F. culmorum* способен конкурировать за глюкозу, даже в естественных почвенных условиях [6]. Однако мы не знаем, насколько исследуемый штамм *F. culmorum* способен утилизировать цитрат, а стало быть и конкурировать за него в условиях ризосферы.

В серии модельных экспериментов влияние форм минерального азота и некоторых источников углерода на репродуктивную способность *F. culmorum* оценили посевом в жидкие питательные среды. Биоморфологическую структуру популяции оценивали под микроскопом. Скорость распространения гриба в субстратах, содержащих те же источники углерода и азота, была оценена на твердых питательных средах по диаметру формируемой грибом колонии.

В этом эксперименте использовали также агаризованную среду с разными источниками азота, но без внесения дополнительного углерода, тем самым имитируя условия углеродного голодания. Влияние разных источников азота и углерода на способность *F. culmorum* колонизировать корни растений была определена при одновременном выращивании гриба и ячменя в течение пяти дней на средах соответствующего состава. Количество *F. culmorum* на корнях ячменя определяли посевом. Интенсивность гнили оценивали по пятибалльной шкале.

Результаты экспериментов показали, что самая высокая репродуктивная способность гриба была на глюкозе и восстановленном азоте. На цитрате количество КОЕ гриба было самым низким, независимо от формы минерального азота; сахароза активнее использовалась грибом на нитратном азоте. Биоморфологическая структура популяции *F. culmorum* больше зависела от форм минерального азота, чем от источников углерода: на средах с аммонийным азотом обильно формировались хламидоспоры, напротив, на средах с нитратным азотом – макроконидии.

Скорость роста гриба на агаризованных питательных средах была выше на средах с нитратной формой азота и ниже – с аммонийной. Причем на среде без дополнительного источника углерода и на среде с цитратом и окисленной формой азота *F. culmorum* распространялся быстрее, формируя колонии большего диаметра, чем, например, на среде с глюкозой и  $\text{NH}_4$  (среде, на которой гриб продуцировал самое большое количество КОЕ).

При развитии в жидких и твердых питательных средах *F. culmorum* выделял малиновый пигмент. Продукция пигмента отмечена в условиях повышенной скорости роста (среды с нитратным азотом) и низкой репродуктивной способности (среды с цитратом), причем самое большое количество пигмента гриб продуцировал на цитрате и нитратном азоте.

По данным наших экспериментов, высокая скорость распространения *F. culmorum* в субстрате не является отображением условий, благоприятных для развития гриба. Напротив, высокая скорость роста – это поиск грибом питания, которого не достаточно в месте инокуляции. Совершенно не случайна в этом случае и продукция пигмента. Биосинтез нафтохиноновых пигментов исследователи связывают с ответом грибов рода *Fusarium* на стрессовые воздействия,

например, дефицит питания [7–9]. Самая компактная колония была сформирована грибом на среде с глюкозой и восстановленным азотом.

Оценка колонизации *F. culmorum* корней ячменя показала, что гриб активнее заселял корни в условиях высокой скорости роста (дефицита питания в субстрате). Уже на 2-е сутки гриб колонизировал корни ячменя при росте на безуглеродной среде и среде с цитратом, независимо от формы азота. Это может свидетельствовать о том, что в условиях проведенного эксперимента гриб испытывал большую нужду в углероде, чем в азоте. На средах с сахарозой и глюкозой в этот период гриба на корнях еще не было. Рост на среде с источником углерода, слабо утилизируемым *F. culmorum* (цитрат), либо на бедной среде приводил к более активной колонизации корней растений, по сравнению с развитием на средах с источником углерода, доступным для гриба. Самая высокая заболеваемость ячменя отмечена на цитрате и безуглеродной среде.

Таким образом, *F. culmorum* колонизировал корни в поисках источника питания для своего развития и осуществлял это питание за счет растения, о чем свидетельствует увеличение интенсивности гнили.

#### Список литературы

1. Cook RJ. Fusarium diseases of wheat and other small grains in North America. In: Fusarium: diseases, biology and taxonomy (PE. Nelson, TA Toussoun & R Cook, eds), Pennsylvania State Univ. Press, Univ. Park, PA. 1981: 39-52.
2. McMullen M, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact. Plant Dis. 1997; 81: 1340-8.
3. Parry DW, Jenkinson P, McLeod L. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. Plant Pathol. 1995; 44: 207-8.
4. Pomeranz Y, Bechter DB, Sauer DB et al. Fusarium head blight (scab) in cereal grains. In: Pomeranz Y, ed. Advances in Cereal Science and Technology. Am Assoc Cer Chemists. 1990: 373-433.
5. Walker T, Bais H, Grotewold E et al. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiol. 2003; 132: 44-51.
6. Струнникова О. К., Шахназарова В. Ю., Вишневецкая Н. А. и др. Развитие и взаимоотношения *Fusarium culmorum* и *Pseudomonas fluorescens* в почве. Микробиология. 2007; 76(5): 675-81.
7. Феофилова Е.П. Пигменты микроорганизмов. М.: «Наука». 1974: 218.
8. Феофилова Е.П. Биохимическая адаптация мицелиальных грибов к стрессовым воздействиям. Тр. инст. микробиол. им. С.Н. Виноградского. Юбилейн. сб. к 70-летию института. М.: «Наука». 2004: 397-410.
8. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. Биосинтез нафтохиноновых пигментов грибами рода *Fusarium*. Прикл. биохим. микробиол. 2005; 41(5): 573-7.

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В РИЗОСФЕРЕ ТРАНСГЕННОГО ТАБАКА

Широких А.А., Назарова Я.И., Рябова О.В., Широких И.Г.  
НИИ сельского хозяйства Северо-Востока, Киров

Выявлено достоверное варьирование плотности мицелия и спор грибов в зависимости от характера почвы, фазы развития и генотипа растения [1]. Различия в заселенности грибами корней растений разных сортов обусловлены генотипическими особенностями состава их корневых эксудатов. Генно-инженерное вмешательство в геном культурных растений с целью их совершенствования сопряжено с реальной опасностью, что неспецифическая экспрессия генов, отвечающих за синтез целевых метаболитов, может вызвать плейотропные эффекты, что повлечет количественные и качественные изменения в корневой экскреции трансгенных растений и, как следствие, перестройки в структуре микробного ризосферного комплекса, включая микроскопические грибы.

**Цель работы** – сравнительная характеристика структуры комплексов микромицетов в ризосфере исходных и подвергнутых генетической трансформации растений табака.

Численность и родовой состав микромицетов в прикорневой зоне табака *Nicotiana tabacum* L. изучали в модельном опыте, выращивая пробирочные растения в вегетационных сосудах на фоне эдафического стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислых почвах. Использовали природную дерново-подзолистую почву с рН<sub>сол.</sub> 3,6 и содержанием подвижного алюминия 12,8 мг/100 г. Контролем служили растения, выращенные в сосудах, заполненных торфяно-перегнойной смесью с рН 6,0 без алюминия.

В работе использовали сорта Самсун и полученные во ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Москва) путем агробактериальной трансформации независимые трансгенные линии Trtf 3 и Trtf 13 с геном, кодирующим цитоплазматическую Fe-содержащую супероксиддисмутазу (Fe-СОД-1) из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [2].

Для анализа использовали свежие образцы корней, отобранные в фазу цветения растений. В стерильных

условиях с помощью скальпеля и пинцета осторожно счищали излишки почвы с корней, оставляя лишь слой, не превышающий по толщине 3 мм. Затем стерильно вырезали сегменты корней (на 2–3 см ниже шейки корня). Из каждого образца брали навеску (2 г.) корней с прилипшей к ним почвой, помещали в 100 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывали 3–5 мин со стерильными металлическими отбойниками. Из полученной суспензии (ризосфера) извлекали корни. Для получения образца ризопланы отмытые корни стерильно растирали в ступке и доводили объём гомогената до 100 мл стерильной водой. Сухую массу корней и почвы определяли гравиметрически после фильтрования через бумажный фильтр и высушивания при 105 °С.

Учёт длины мицелия грибов определяли прямым методом с использованием люминесцентного микроскопа «Leica 2500 MD». Препараты для микроскопии готовили по общепринятой методике [3]. Просматривали по 100 полей зрения для каждого образца.

Качественный состав типичных микромицетов ризосферной почвы и ризопланы табака определяли при посеве разведений суспензий на твёрдую среду Чапека со стрептомицином (100 мг/л), который добавляли для ингибирования роста бактерий. Доминирующие на каждой чашке типы колоний выделяли в чистую культуру и изучали морфологические и культуральные признаки грибов в соответствии с определителями [4, 5]. Данные обрабатывали стандартными методами статистического анализа [6].

Сравнение комплексов микроскопических грибов в ризосфере исходного сорта Самсун и трансгенных линий табака Trtf 3 и Trtf 13 не выявило существенных различий в их количественных показателях, за исключением того, что в обычных условиях количество пропагул в 1 г. прикорневой почвы растений линии Trtf 3 было на порядок выше, чем у исходного сорта и линии Trtf 13 (табл. 1).

Таблица 1. Количественные показатели комплексов почвенных микромицетов в прикорневой зоне табака исходного сорта и независимых линий трансформантов.

Показатель	Нейтральный почвенный фон (контроль)			Кислый почвенный фон с алюминием (стресс)		
	Самсун	Trtf 3	Trtf 13	Самсун	Trtf 3	Trtf 13
Численность, тыс. КОЕ/г	18,14±1,57	118,2±13,1	22,3±0,49	73±1,9	63±3,4	93±3,2
Длина мицелия в ризосфере, м/г	100,5±0	89,3±24,23	111,8±79,4	77,4±6,45	74,4±18,4	51,5±16,1
Длина мицелия в ризоплане, м/г	740±40,3	815±87,0	786±12,4	694±16,9	990±17,3	1666±104
Общее число родов	4	4	4	5	5	5

По длине грибного мицелия выделяемые с помощью методическим приемом микролокусы ризосферы (десятки м/г почвы) и ризопланы (сотни м/г корней)

различались между собой на порядок, т.е. более значительно, чем сравниваемые генотипы. Однако линия Trtf 13 на фоне стресса, в отличие от исходного сорта

Таблица 2. Изменение структуры комплекса микромицетов в прикорневой зоне табака (обилие представителей рода, %)

Род	Нейтральный почвенный фон (контроль)			Кислый почвенный фон с алюминием (стресс)		
	Самсун	Trtf 3	Trtf 13	Самсун	Trtf3	Trtf 13
<i>Penicillium</i>	33	4,9	25	70	41,6	37
<i>Aspergillus</i>	17	7,4	50	6,7	25	43
<i>Acremonium</i>	33	82,8	12,5	0	8,4	8,6
<i>Cladosporium</i>	0	4,9	12,5	0	8,4	0
<i>Trichoderma</i>	17	0	0	6,7	0	0
<i>Nigraspora</i>	0	0	0	3,4	16,6	2,8
Другие	0	0	0	13,20	0	8,6

Самсун и другой трансформантной линии Trtf 3, характеризовалась увеличением длины грибного мицелия в 2,3 раза по сравнению с обычными условиями выращивания.

Вместе с тем, установлены различия между ризосферными комплексами микромицетов сравниваемых генотипов табака в их качественном составе. Исходный сорт характеризовался равной представленностью на корнях грибов из родов *Penicillium* (33%) и *Acremonium* (33%) в обычных условиях и доминированием *Penicillium* (70%) – в стрессовых, в том и другом случае участием в комплексах представителей рода *Trichoderma* (табл. 2).

В ризосферном комплексе табака линии Trtf 3 в обычных условиях доминировали виды рода *Acremonium* (83%), а на кислом почвенном фоне – *Penicillium* (42%) с высокой долей участия представителей родов *Aspergillus* (25%) и *Nigraspora* (17%).

В ризосфере Trtf 13 как в обычных, так и в стрессовых условиях доминировали аспергиллы (50 и 43% соответственно). *Trichoderma* в ризосферных комплексах трансформантов обеих линий не обнаружена.

Таким образом, ризосферные комплексы грибов исходного сорта Самсун и трансгенных линий Trtf 3 и Trtf 13 значительно различались по относительному обилию видов родов *Trichoderma* ( $p = 0,03$ ) и *Aspergillus* ( $p = 0,003$ ). На кислом фоне у тех и других увеличивалась доля участия в комплексе представителей родов *Penicillium* ( $p = 0,005$ ) и *Nigraspora* ( $p = 0,03$ ).

Результаты позволяют заключить, что сравнительная характеристика комплексов почвенных микромицетов в ризосфере исходного и подвергнутых генетической трансформации линий табака выявила отклонения в родовой структуре микромицетного комплекса трансгенных по гену Fe-COD1 растений, а тем самым – потенциальные риски для экологии почв.

Таблица 2. Изменение структуры комплекса микромицетов в прикорневой зоне табака (обилие представителей рода, %)

Род	Нейтральный почвенный фон (контроль)			Кислый почвенный фон с алюминием (стресс)		
	Самсун	Trtf 3	Trtf 13	Самсун	Trtf3	Trtf 13
<i>Penicillium</i>	33	4,9	25	70	41,6	37
<i>Aspergillus</i>	17	7,4	50	6,7	25	43
<i>Acremonium</i>	33	82,8	12,5	0	8,4	8,6
<i>Cladosporium</i>	0	4,9	12,5	0	8,4	0
<i>Trichoderma</i>	17	0	0	6,7	0	0
<i>Nigraspora</i>	0	0	0	3,4	16,6	2,8
Другие	0	0	0	13,20	0	8,6

### Список литературы

1. Широких А.А., Широких И.Г. Микробные сообщества кислых почв Кировской области. Киров: НИИСХ Северо-Востока. 2004: 320 с.
2. Нодельман Е.К. Применение гена Fe-зависимой супероксиддисмутазы для защиты хлоропластов томатов и табака от окислительного стресса. Автореф. дис... к. б. н. М.: ВНИИ СХБ. 2014: 29 с.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Учебное пособие. Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ. 1991: 304 с.
4. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М.: Мир, 2001: 486 с.
5. Domsh K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi. Eching: IHW-Verlag. 2007: 672 p.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высш. школа. 1990: 352 с.

## ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ *Puccinia triticina* ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ И SSR-МАРКЕРАМ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ РФ

Шайдаюк Е.Л., Е.И. Гулытьева, Казарцев И.А.  
Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин

Буряя ржавчина (*Puccinia triticina* Erikss.) – распространенное заболевание пшеницы в Северо-западном регионе РФ. Иммуногенетическая защита – наиболее экономичный и экологически безопасный метод снижения потерь урожая от данного заболевания. Для успешного ее осуществления необходима информация о расовом составе гриба и его многолетней динамике.

Популяционные исследования возбудителя бурой ржавчины на Северо-западе проводятся в ВИЗР ежегодно. В результате мониторинга вирулентности, проводимого в 2001–2007 гг., не выявлено существенных изменений в составе популяций гриба на данной территории. Преимущественно отмечалось высокое сходство между образцами псковских, ленинградских и новгородских популяций, но в отдельные годы, например, в 2007 г., наблюдались отличия псковских от двух других северо-западных [1-3]. Калининградские популяции значимо отличались от этих трех популяций. Они характеризовались меньшей вирулентностью, и в них отмечена высокая частота встречаемости изолятов, авирулентных на линиях TcLr3a, TcLr3bg и TcLr3ka.

В Российской Федерации большинство популяционных исследований *P. triticina* проводились с использованием признака вирулентности. В 2007 г. эти исследования были дополнены RAPD и УП-ПЦР-анализом [2–3]. В 2014 г. J. Kolmer с соавт. [4] охарактеризовали SSR-полиморфизм российских изолятов, собранных в 2006–2010 гг. в 4 зернопроизводящих регионах (Центральном, Северокавказском, Западносибирском и Поволжье). Однако в данном анализе отсутствовал инфекционный материал гриба с Северо-запада и ряда других зернопроизводящих регионов России.

Цель настоящих исследований – оценка полиморфизма северо-западных популяций гриба *P. triticina* по вирулентности и SSR-маркерам.

Инфекционный материал был собран на производственных посевах и ГСУ в Псковской, Ленинградской, Новгородской и Калининградской областях в 2008–2014 гг. Популяции с сухих листьев реанимировали на восприимчивом сорте и клонировали. Всего изучено 122 монопустульных изолята с Новгородской обл., 92 – с Ленинградской, 54 – с Калининградской и 41 – с Псковской. Все изоляты охарактеризованы по признаку вирулентности. Для обозначения фенотипов использована буквенная северо-американская номенклатура, основанная на определении вирулентности к группам из 5 Lr-линий [4-5]: 1 – Lr1, Lr2a, Lr2c, Lr3a; 2 – Lr9, Lr16, Lr24, Lr26; 3 – Lr3ka, Lr11, Lr17, Lr30; 4 – Lr19, Lr20, Lr14a, Lr18; 5 – Lr2b, Lr3bg, Lr14b, Lr15. Работа выполнена по методикам лабораторного культивирования *P. triticina*, основанных на применении бензимидазола [6]. Для определения буквенного кода фенотипов, вычисления индексов внутривидового разнообразия и различий между популяциями по вирулентности использовали пакет программ Virulence Analysis Tool (VAT).

Для молекулярных исследований отобрано 32 изолята, из них 7 новгородских, 6 псковских, 11 ленинградских и 8 калининградских. Ленинградские изоляты были представлены пятью фенотипами вирулентности, 3 из которых являлись оригинальными и встречались только в этой популяции; калининградские, новгородские и псковские – шестью, из них 6, 3 и 5, соответственно, оригинальные.

Для оценки полиморфизма использовали семь SSR-маркеров Pr3, Pt13, Pt50, Pt55, Pt61, Pt76 и Pt91. Выделение ДНК из спорового материала гриба проводили по ранее апробированным для RAPD-анализа методикам [2–3]. Для определения размера аллелей использовали генетический анализатор ABI Prism 3500 (ABI-Hitachi, Япония).

Все тестируемые изоляты были авирулентны на линиях TcLr9, TcLr19, TcLr24 и вирулентны на TcLr11, TcLr14a, TcLr14b, TcLr16, TcLr17, TcLr18. Варибельность по типу инфекции отмечена на линиях с генами Lr1, Lr2a, Lr2b, Lr2c, Lr3a, Lr3bg, Lr3ka, Lr15, Lr20, Lr26 и Lr30. В период 2008–2014 гг. в северо-западных популяциях, как и в других российских, отмечается тенденция нарастания вирулентности к гену Lr1. Калининградская популяция характеризовалась большими частотами вирулентности к генам Lr2a, Lr2b, Lr2c по сравнению с псковской, ленинградской и новгородской.

Вирулентность к генам Lr3a, Lr3bg, Lr3ka была высокой в псковской, ленинградской и новгородской популяциях (99–100%) и ниже в калининградской (67–69%). Это согласуется с результатами предыдущих лет исследований (2000–2007 гг.) [1-3]. Частоты вирулентности к генам Lr20 были значимо ниже в псковской популяции (29%), чем в других северо-западных (72–83%), а к гену Lr15 в новгородской (33 и 76–96%, соответственно). По вирулентности к гену Lr26 наблюдались высокие различия между популяциями.

В псковской популяции она составляла 100%, ленинградской – 79%, калининградской – 31% и новгородской – 43%. Это могло быть обусловлено более высоким разнообразием инфекционного материала с Ленинградской и Псковской областей, преимущественно собранного на ГСУ. Единичный изолят, авирулентный к линии TcLr30, выявлен в ленинградской популяции.

Среди 309 проанализированных изолятов выявлено 47 фенотипов вирулентности: в калининградской популяции – 14, ленинградской – 23, новгородской – 20, псковской – 10. Общим для трех популяций был фенотип ТНТКТ. Различия между популяциями оценивали по трем статистическим индексам – Нея (N), Роджерса (R) и Космана (KGst). Калининградские популяции характеризовались более высокими различиями с новгородскими, и незначительно меньшими с псковскими и ленинградскими. Псковские популяции имели более высокое сходство с ленинградскими, чем с новгородскими.



32 изолята были охарактеризованы по молекулярному полиморфизму SSR-локусов. При использовании маркеров семи микоросателлитных локусов (SSR) один Pt13 не амплифицировался у изучаемых изолятов, несмотря на множественные попытки оптимизации условий ПЦР. Можно предположить, что у данной коллекции изолятов отсутствует данный SSR-локус, либо недостаточно подобраны условия для амплификации этого маркера. SSR-локусы Pt50 и Pt55 оказались мономорфными. При использовании SSR-маркеров Pt13, Pt91, Pt61 наблюдали вариабельность по 2 аллелям, а маркера Pt76 – по четырем.

В целом, при использовании шести SSR-маркеров выявлен полиморфизм по десяти аллелям. Среди калининградских изолятов выявлено 5 генотипов, ленинградской, псковской – 6, новгородской – 4. Внутрипопуляционное разнообразие по SSR-генотипам было выше среди псковских и ленинградских изолятов. Калининградские изоляты по SSR-имели большее сходство с псковскими, чем с новгородскими и ленинградскими. Полученные результаты являются обоснованием для дальнейшего применения данных SSR-маркеров для анализа российских популяций.

На основе UPGMA-дендрограммы генетического сходства (NTSYSpc, Version 2.2.) выявлено 2 умеренно различающихся кластера. Первую близкородственную группу составляли все новгородские изоляты, 9 – ленинградских, 5 – псковских и 1 – калининградский. Во вторую группу вошли 7 калининградских изолятов, 2 ленинградских и 1 псковский.

Не выявлено корреляции между молекулярными фенотипами и вирулентности. Например, общий для трех популяций фенотип ТНТТТР был представлен тремя молекулярными генотипами, а фенотип РНТКН, доминирующий среди ленинградских изолятов, четырьмя молекулярными. Эти данные согласуются с ранее полученными с RAPD-маркерами [2].

Таким образом, проведенный комплексный анализ с использованием анализа вирулентности и SSR-маркеров дополнил ранее полученные сведения о структуре популяций фитопатогенного гриба *P. tritici* в Северо-западном регионе. Высокое сходство изолятов по вирулентности и SSR-маркерам псковских, новгородских и ленинградских изолятов предполагает существование единой популяции гриба на этой территории. Определенные отличия калининградской популяции от них, вероятно, обусловлены ее географическим отдалением с ними.

#### Список литературы

1. Гульятеева Е.И. Вирулентность популяций *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* в Северо-западном регионе РФ в 2001–2003 годах. Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Сб. докл. Межд. н.-практ. конф. Краснодар. 2004: 132-3.
2. Гульятеева Е.И., Косман Е., Дмитриев А.П., Баранова О.А. Структура популяций *Puccinia tritici* по вирулентности и ДНК-маркерам в Северо-Западном регионе РФ в 2007 году. Микол. фитопатол. 2011; 45(1): 70-81.
3. Gulyaeva EI, Dmitriev AP, Kosman E. Regional diversity of Russian populations of *Puccinia tritici* in 2007. *Canad. J Plant Pathol.* 2012; 34(2): 213-24.
4. Kolmer JA, Kabdulova MG, Mustafina MA et al. Russian populations of *Puccinia tritici* in distant regions are not differentiated for virulence and molecular genotype. *Plant Pathol.* 2015; 64(2): 328-36 doi: 10.1111/ppa.12248.
5. Long DL, Kolmer JA. North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology.* 1989; 79: 525-9.
6. Михайлова Л.А., Гульятеева Е.И., Мироненко Н.В. Методы исследования генетического разнообразия популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. СПб.: ВНИИЗР, Инновац. центр защ. раст. 2003: 24 с.

## ВОЗМОЖНОСТЬ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОКОНТРОЛЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ИНФИЦИРУЮЩИХ РАСТЕНИЯ ПРИ ПОНИЖЕННЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ, С ПОМОЩЬЮ ПСИХРОФИЛЬНЫХ АНТАГОНИСТОВ

Щербакова Л.А.<sup>1</sup>, Шумилина Д.В.<sup>1</sup>, Сметанина Т.И.<sup>1</sup>, Супрунова Т.П.<sup>2</sup>, Кузнецова М.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ фитопатологии. Большие Вяземы. Московская область

<sup>2</sup>ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур. пос. ВНИИССОК, Московская область

Биологический контроль фитопатогенов с помощью грибов-антагонистов представляет собой привлекательную альтернативу химическому методу защиты сельскохозяйственных культур от болезней. Среди микромицетов в качестве биоагентов против почвообитающих фитопатогенных грибов наиболее часто используются виды *Trichoderma*. Однако, если при мелкоделяночных испытаниях или в закрытом грунте биоконтроль дает хороший результат, при более масштабном применении этот метод часто оказывается недостаточно эффективным. Большинство штаммов-антагонистов, использующихся в настоя-

щее время для разработки биопрепаратов, являются мезофилами и обеспечивают полноценную защиту растений в относительно узком интервале температур окружающей среды, а температурные колебания во многих случаях являются критическим фактором, оказывающим негативное влияние на эффективность биоагентов.

Ожидается, что преодоление нестабильности защитного действия антагонистов, вызываемое изменениями температуры, будет способствовать более широкому использованию в сельском хозяйстве биологического контроля и расширит спектр

фитопатогенов, которые могут стать его объектами. В частности, в число таких объектов могли бы быть включены возбудители фузариозной корневой гнили злаковых и черной парши (ризоктониоза) картофеля, вредоносность которых во многих регионах России возрастает, когда весной устанавливается холодная и влажная погода, или когда весь вегетационный сезон проходит на фоне периодических похолоданий. Приспособленные к низким температурам и проявляющие антагонизм в отношении указанных выше патогенов виды *Trichoderma* могли бы стать дополнительными или альтернативными агентами биоконтроля, работающими в неблагоприятных для мезофилов температурных условиях.

Для выявления потенциальных биоагентов со свойствами психрофилов нами были проанализированы изоляты шести видов *Trichoderma*, полученных из Государственного природного заповедника «Ненецкий» или приобретенных во Всероссийской коллекции микроорганизмов. Коллекционные образцы были представлены двумя изолятами *T. longibrachiatum*, собранными в районе Колымы, а также видами *T. harzianum* (1 изолят) и *T. atroviride* (1 изолят), обнаруженными на территории антарктической станции «Беллингаузен». Из тундровых почв заповедника «Ненецкий» были выделены *T. cf. pseudonigrovirens* (5 изолятов), *T. harzianum* (2 изолята), *T. virens* (1 изолят) и *T. koningii* (1 изолят).

Для всех этих изолятов был определен диапазон температур, при которых в течение первых 7 сут культивирования на агаре Чапека наблюдался быстрый вегетативный рост. После этого у изолятов, проявивших себя как психрофилы, активно растущие при 9–10 °С, методом двойных (встречных) культур была исследована способность к антагонизму с *Fusarium culmorum*, *F. avenaceum*, *F. nivale* и *R. solani* при температурах от 10 до 15 °С.

В этих условиях антагонизм с *R. solani* и *F. nivale* был выявлен у четырех ненецких изолятов pen3 (*T. cf. pseudonigrovirens*), pen4, pen10 (*T. harzianum*) и pen9 (*T. koningii*). Один из колымских штаммов *T. longibrachiatum* был эффективен против *R. solani* и *F. culmorum*. В наших экспериментах наиболее ак-

тивными антагонистами, подавлявшими *in vitro* развитие всех четырех видов фитопатогенов, оказались психрофилы *T. harzianum* и *T. atroviride* антарктического происхождения. Следует отметить, что эти психрофильные изоляты были толерантны к средним температурам и продолжали проявлять антагонизм с возбудителями при 20–22 °С, причем в этом случае их рост-ингибирующий эффект лишь незначительно уступал эффекту коммерческого мезофильного штамма T18 (*T. harzianum*), использованного как эталон.

Анализ кластера генов, ответственных за биосинтез глиотоксина, с помощью ПЦР с вырожденными праймерами позволил предположить, что у ненецких изолятов *T. koningii* и *T. atroviride* антагонизм мог быть связан со способностью продуцировать это антифунгальное соединение. При совместном культивировании *T. harzianum* и *T. atroviride* на фоне ингибирования роста фитопатогенных грибов наблюдался также лизис мицелия. Это могло свидетельствовать о вкладе в антагонизм антарктических изолятов их экзоферментов, в частности, хитиназа.

Поскольку биоагенты, отобранные при скрининге на питательных средах, далеко не всегда оказываются столь же эффективны, когда их используют для обработки растений, защитное действие наиболее активных антагонистов было проверено в вегетационных экспериментах. В результате было установлено, что антарктические изоляты *T. harzianum* и *T. atroviride* способны защищать проростки пшеницы от *F. culmorum* или *F. avenaceum*, а растения картофеля – от возбудителя ризоктониоза как при 20–22 °С, благоприятных для штамма T-18, так и при пониженных температурах. Защитный эффект психрофильных изолятов при 13–15 °С заметно превосходил эффект мезофила T-18, который в этих условиях был неактивен или слабо сдерживал развитие фузариозной корневой гнили и ризоктониоза.

Таким образом, в наших исследованиях продемонстрирована принципиальная возможность использования антагонистов из экстремальных мест обитания для повышения эффективности биологического метода защиты растений от болезней.

## ВИДОВОЙ (ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ) СОСТАВ ГРИБОВ-ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ДЕКОРАТИВНЫХ ДРЕВЕСНО-КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЙ В ПИТОМНИКАХ БЕЛАРУСИ

Тимофеева В.А., Головченко Л.А., Войнило Н.В., Линник Л.И.  
Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск. Республика Беларусь

В питомниках Республики Беларусь ежегодно увеличиваются объемы выращивания посадочного материала декоративных древесно-кустарниковых растений для городских насаждений. Из питомников в городские насаждения ежегодно высаживают до 171,7 тыс. саженцев древесных растений, 660,3 тыс. саженцев кустарников.

Всходы, сеянцы, саженцы относятся к возрастным группам растений наиболее восприимчивым к болезням. Наиболее распространенными на листовых

древесных растениях и кустарниках являются болезни, вызывающие поражение листовой пластинки. Болезни листьев сопровождаются нарушением фотосинтеза, дыхания, транспирации и других физиологических и биохимических процессов. При массовом развитии они приводят к преждевременному опадению листьев, значительной потере декоративности и снижению защитных функций деревьев и кустарников. На листьях древесно-кустарниковых растений отмечены следующие типы болезней: мучнистая роса, пятнистости,

ржавчина. Мучнисто-росяные и ржавчинные грибы весьма вредоносны для растений. Развитие многих из них начинается уже в мае и продолжается до конца вегетации. Пятнистости появляются в основном во второй половине вегетации растений, заметно ухудшают декоративные качества растений, значительно ослабляя растения. Поражение растений болезнями приводит к снижению выхода стандартного посадочного материала, ослаблению молодых растений, потере декоративности. Наибольший вред в питомниках причиняют болезни, вызываемые патогенными грибами. Патогены отличаются филогенетической, онтогенетической и органотропной специализацией, встречаемостью и степенью вредоносности.

По результатам проведенного в 2011–2013 гг. мониторинга фитосанитарного состояния декоративных древесно-кустарниковых растений в производственных питомниках республики выявлен видовой состав наиболее распространенных и вредоносных патогенов растений. Большинство идентифицированных видов патогенных грибов относится к отделу Ascomycota – 44 вида; к отделу Basidiomycota – 6 видов.

Патогенные грибы представители отдела Ascomycota класса Leotiomycetes подкласса Leotiomycetidae порядка Erysiphales семейства Erysiphaceae являются возбудителями мучнистой росы – *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lévl. (дерен белый), *Erysiphe berberidis* DC. (барбарис), *Microsphaera syringae* Jacz. (сирень обыкновенная), *Microsphaera betulae* Magn. (береза), *Microsphaera alphitoides* Griffon & Maubl. (дуб черешчатый), *Microsphaera lonicerae* (DC.) With. (жимолость), *Podosphaera oxycanthae* (DC.) de Bary (боярышник), *Erysiphe lonicerae* DC. (жимолость), *Sawadaea bicornis* (Wallr.) Homma (клен ясенелистный, клен татарский), *Podosphaera clandestina* (Wallr.) Lévl. (рябина). Все они – узкоспециализированные облигатные паразиты, образующие на пораженных органах (листьях, побегах) поверхностный мицелий. Мицелий мучнисторосяных грибов является характерным диагностическим признаком болезней этого типа.

Пятнистости появляются на листьях в середине лета, и пик нарастания этого типа болезни приходится на август, сентябрь. Пятнистости характеризуются образованием на листьях плоских (некротических) или выпуклых (строматических) пятен различных размеров, формы и окраски. Первые представляют собой отмершие участки тканей листа, на которых образуются споронии гриба. Возбудителями пятнистостей листьев являются патогенные грибы представители отдела Ascomycota класса Dothideomycetes подкласса Dothideomycetidae порядка Capnodiales семейства Mycosphaerellaceae: *Mycocentrospora acerina* (R. Hartig) Deighton (клен остролистный), *Mycosphaerella millegrana* (Cooke) J. Schröt. (сумах оленерогий), *Cercospora ligustri* Roum. (бирючина обыкновенная), *Cercospora microsora* Sacc. (липа), *Pseudocercospora fraxini* (Ellis & Kellerm.) U. Braun (ясень обыкновенный), *Mycosphaerella ligustri* (Roberge ex Desm.) Lindau (бирючина обыкновенная), *Septoria syringae* Sacc. & Speg. (сирень обыкновенная), *Septoria tilia* Westend. (липа), *Septoria hydrangeae* Bizz. (гортензия), *Septoria corni-maris* Sacc. (дерен белый), *Septoria betulina* Pass. (береза), *Septoria salicis* West. (ива), *Septoria philadelphi*

Ellis & Everh. (чубушник), *Ramularia spiraeae* Peck (спирея), *Passalora viburni* (Ellis & Everh.) U. Braun & Crou (калина).

Возбудителями пятнистостей являются также представители подкласса Pleosporomycetidae порядка Pleosporales семейства Incertaesedis – *Ascochyta tenerrima* Sacc. & Roum. (жимолость), *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley (калина), *Ascochyta symphoricarphophila* Fairm. (снежноягодник белый), *Ascochyta spiraeae* Kabát & Bubák (спирея), *Ascochyta crataegi* Fuck. (боярышник).

Патогенные грибы порядка Botryosphaerales семейства Phyllostictaceae представлены следующими видами – *Phyllosticta spiraeae-salicifoliae* Kabát & Bubák (спирея), *Phyllosticta fraxini* Ellis & G. Martin (ясень обыкновенный), *Phyllosticta sphaeropsoidea* (Ellis & Everh.) Petrak (каштан конский обыкновенный), *Phyllosticta cotoneastri* Allesch. (кизильник), *Phyllosticta tilia* Sacc. E Speg. (липа), *Phyllosticta ulmi* Westend. (вяз шершавый), *Phyllosticta berberidicola* Speg. (барбарис), *Phyllosticta sorbi* Westend. (рябина), *Phyllosticta betulae* Oud. (береза), *Phyllosticta quercus* Sacc. Et Speg. (дуб), *Phyllosticta lonicera* Westend. (жимолость).

Отмечены представители отдела Ascomycota класса Dothideomycetes подкласса Dothideomycetidae порядка Rhytismatales семейства Rhytismataceae – *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fr. (клен остролистный, клен татарский), *Rhytisma salicinum* (Pers.) Rhem. (ива).

Патогенные грибы отдела Basidiomycota класса Pucciniomycetes порядка Pucciniales являются возбудителями ржавчины. Все они – узкоспециализированные патогены с полным или неполным циклом развития. Развитию ржавчинных грибов, благоприятствует высокая влажность воздуха, особенно в 1-й половине вегетационного периода. Повышенная температура и недостаточное количество осадков сдерживают их развитие, что приводит к депрессивному уровню развития болезни на растениях. Отмечены представители семейства Pucciniastraceae – *Melampsorium betulinum* (Pers.) Kleb. (береза повислая); семейства Pucciniaceae – *Puccinia graminis* Pers. (барбарис), *Cumminsia mirabilissima* (Peck) Nannf. (магония падуболистная), *Gymnosporangium cornutum* Arthur ex F. Kern (рябина), *Gymnosporangium confusum* Plowr. (боярышник); семейства Melampsoraceae – *Melampsora salicina* (Lev.) Kleb. (ива белая).

В последние годы резко возросла поражаемость саженцев лиственных древесных растений болезнями, вызываемыми усыханием и отмиранием ветвей. При некрозных поражениях происходит отмирание коры, луба, камбия и наружных слоев древесины. Наиболее вредоносными являются цитоспороз и тиростромоз, возбудителями которых являются патогенные грибы представители отдела Ascomycota класса Leotiomycetes порядка Botryosphaerales семейства Botryosphaeriaceae – *Thyrostroma compactum* (Sacc.) Höhn. (липа, каштан); порядка Diaporthales семейства Valsaceae – *Cytospora carphosperma* Fr. (липа, каштан).

Видовой состав патогенных грибов зависит от разнообразия выращиваемых растений. Питомники, расположенные в разных зонах республики существенно отличаются по видовому составу как растений, так и патогенов, а также по интенсивности развития отдель-

ных возбудителей болезней. Это зависит от времени появления болезни, агрессивности ее возбудителя и приспособленности гриба к данным экологическим условиям. С продвижением на юг видовой состав возбудителей болезней становится разнообразнее.

К числу отсутствующих в средней зоне республики, но весьма вредоносных заболеваний на юге республики, можно отнести мучнистую росу бересклета и магонии, филлостиктоз барбариса, аскохитоз акации. Наиболее тесно связаны с окружающей средой мучнисто-росяные грибы, из-за эктофитного характера развития. В целом, этой группе грибов присуща относительная засухоустойчивость. Сухость воздуха, особенно во 2-ю половину вегетации, способствует поражению растений мучнисто-росяными грибами. Климатические условия наряду с наличием растений-хозяев являются основными факторами, определяющими границы распространения патогенных грибов.

Для развития гриба необходимо благоприятное сочетание факторов внешней среды в критические периоды его развития. Неодинаковые микроклимати-

ческие условия создаются в разных типах насаждений, и это является одной из основных причин, обуславливающих различный уровень развития болезней.

При ежегодно возрастающих масштабах озеленения увеличивается объем ввоза из-за рубежа в питомники посадочного материала декоративных древесных растений. Интродукция растений влечет за собой интродукцию соответствующих патогенов. Многие виды патогенов хорошо адаптируются в новых условиях, перезимовывают и сохраняются на протяжении нескольких вегетационных периодов, приводя к полной гибели растения.

Все это предъявляет большие требования к защите растений, так как затраты на озеленение городов нередко обесцениваются в результате поступления в городские насаждения пораженных болезнями растений. Необходимым условием получения стандартных качественных растений для зеленых насаждений является регулярный мониторинг фитосанитарного состояния растений при выращивании посадочного материала и своевременное проведение защитных мероприятий от болезней.

## ВОЗБУДИТЕЛИ СНЕЖНЫХ ПЛЕСЕНЕЙ И КОНТРОЛЬ ИХ ЧИСЛЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Ткаченко О.Б., Щуковская А.Г.

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва

Возбудители снежных плесеней, грибы или грибоподобные организмы, развиваются под снеговым покровом при близких к нулю температурах, почти не встречая конкуренции с другими организмами [1] и относятся к ксерофильным грибам [2, 3]. Наиболее полный список возбудителей снежных плесеней представлен в работе Т. Хошино с соавт. [4].

Заражение снежными плесенями происходит, как правило, в осенний период, болезнь развивается в течение зимы и весны при пониженных температурах. В это время растения-хозяева этих патогенов при длительном снеговом покрове и непромерзшей почве теряют устойчивость к снежным плесеням и могут поражаться этими возбудителями. Возбудители снежных плесеней активны при температурах, близких к нулю, почти не встречая конкуренции с другими организмами. Они активно развиваются под снегом, предохраняющим их от заморозков, поддерживающим темноту, влажность и низкую температуру.

Для сельского хозяйства России наибольшую значимость имеют базидиомицеты *Typhula ishikariensis*, вызывающие крапчатую снежную плесень, *T. incarnata* (возбудитель серой снежной плесени) и аскомицеты *Sclerotinia borealis* (возбудитель склероциальной снежной плесени), *S. nivalis* и *Microdochium nivale* var. *nivale* (возбудитель розовой снежной плесени).

В мировом сельском хозяйстве наибольший ущерб наносит гриб *T. ishikariensis*. Ущерб от остальных грибов менее значимый, как у *M. nivale* var. *nivale*, незначительно снижающий урожайность и его качественные показатели. Некротроф *S. borealis* поражает

только поврежденные морозом ткани растений, поэтому сильный ущерб наносит зимующим растениям в Поволжье и Сибири. Т.е. для предотвращения поражения этим грибом достаточно избежать повреждения растений морозами.

Попытки использования биометода для регуляции численности снежных плесеней использовались рядом авторов [5–12] и только последние работы в Северной Америке с *Typhula phacorrhiza* и *Trichoderma atroviride* в Канаде и на Аляске [10, 12] против *T. ishikariensis*, *M. nivale* и американского низкотемпературного базидиомицета *Coprinus psychromorbidus* получили практическое применение. Использование остальных биоагентов не вошло в практику.

В России отечественный изолят гриба *T. phacorrhiza* успешно применялся на озимых зерновых против *Typhula ishikariensis* и *Microdochium (Fusarium) nivale* только один раз [14], однако дальнейшее продвижение по применению этого гриба в практику не произошло. Биологическая эффективность применения *T. phacorrhiza* у С.В. Тазиной была на 30,3% больше, чем после обработки фундазолом и на 17,6% больше, чем после обработки байлетоном. Однако известно, что препараты бензимидазольной группы, к которым относится фундазол, не только слабо подавляют *T. ishikariensis*, но в ряде случаев даже стимулируют развитие патогена. Серьезного скрининга биоагента, как это было проведено в Канаде Томом Хсиангом, не проводилось.

Нами была предпринята попытка использования против розовой снежной плесени (возбудитель

*Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & Hallett нематод. Нематоды входят в биоту озимых зерновых, а ряд видов, относящихся к экологической группе микогельминтов, по мнению В.П. Балахниной [15], имеют тесную трофическую связь с возбудителем розовой снежной плесени в весенний период.

Выделенные из поражённых розовой снежной плесенью растений озимой пшеницы микогельминты *Aphelenchoides saprophilus*, *Aphelenchus avenae* и *Paraphelenchus tritici*. Эти виды были испытаны в лабораторных условиях в пробирках на косяках агара PDA (картофельно-декстрозный агар, фирма Himedia, Mumbai, India) с грибом *M. nivale* при 5 °C, близкой к температуре под снеговым покровом. *A. saprophilus* поглощал *M. nivale* быстрее других видов. Поэтому этот вид микогельминта был испытан нами в открытом грунте.

Для определения эффективности подавления возбудителя розовой снежной плесени *M. nivale* микогельминтом *A. saprophilus* был поставлен ряд опытов на посевах озимой пшеницы сорта Лютесценс-147 в открытом грунте. Показано, что применение водной суспензии на посевах озимой пшеницы снижало развитие РСП на 51%, в период весенней вегетации и улучшать продуктивные качества пшеницы: увеличение числа продуктивных стеблей на 13%, количества зерна в колосе на 11%, массы зерна в колосе на 11,4% и как следствие повышение урожайности на 67%.

Таким образом, была показана возможность регуляции популяции *M. nivale* var. *nivale* в агроценозе озимой пшеницы при помощи микогельминта *A. saprophilus*.

#### Список литературы

- Hoshino T, Xiao N, Tkachenko O.B. Cold adaptation in phytopathogenic fungi causing snow molds. *Mycoscience*. 2009; 50(1): 26-38.
- Hoshino T, Matsumoto N. Cryophilic fungi to denote in the cryosphere. *Fungal Biol. Rev.* 2012; 26(2-3): 102-5.
- Ткаченко О.Б., Хошино Т. Кривофильные грибы и оомицеты, их особенности. *Микол. фитопатол.* 2014. 48(4): 213-7.
- Hoshino T, Yajima Yu, Tkachenko OB et all. Diversity and evolution of fungal phytopathogens associated with snow. *Adv Med Biol.* 2013; 69: 69-82.
- Smith JD, Davidson GN. *Acremonium boreale* n.sp., a sclerotial, low-temperature-tolerant, snow mold antagonist. *Can J Bot.* 1979; 57(20): 2122-39.
- Schneider EF, Seaman WL. *Typhula phacorrhiza* on winter wheat. *Can J Plant Pathol.* 1986; 8: 269-76.
- Matsumoto N, Tajimi A. Bacterial flora associated with the snow mold fungi, *Typhula incarnata* and *T. ishikariensis*. *Annu Phytopathol Soc Japan.* 1987; 53(2): 250-53.
- Matsumoto N, Tajimi A. Biological control of *Typhula ishikariensis* on perennial ryegrass. *Annu Phytopathol Soc Japan.* 1992; 58(5): 741-51.
- Lawton MB, Burpee LL, Effect of rate and frequency of application of *Typhula phacorrhiza* on biological control of *Typhula blight* of creeping bentgrass. *Phytopathology* 1990 80: 70-73.
- Hsiang T, Cook S. Effect of *Typhula phacorrhiza* on winter injury in field trials across Canada. *Intern Turfgrass Soc Res J.* 2001; 9: 669-73.
- Boulter JJ, Boland GJ, Trevors JT. Assessment of compost for suppression of Fusarium Patch (*Microdochium nivale*) and Typhula Blight (*Typhula ishikariensis*) snow molds of turfgrass. *Biol. Contr.* 2002; 25: 162-72.
- McBeath JH. Snow mold-plant-antagonist interactions: Survival of the fittest under the snow. *The Plant Health Instructor.* 2002. doi: 10.1094/PHI-I-2002-1010-01.
- Hsiang T. Biological control of turfgrass snow molds. *GreenMaster.* October/November. 2000: 12-15.
- Тазина С.В. Обоснование защиты озимых зерновых культур от инфекционного выпадения растений. Дисс. ... канд. биол. наук. М. 2005: 165 с.
- Балахнина В.П. Нематоды и снежная плесень на посевах озимой пшеницы. *Бюлл. всес. ин-та гельминтол.* 1973; 11: 8-10.

## НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *VERTICILLIUM DAHLIAE*, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ, И ИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С РАСТЕНИЯМИ ХЛОПЧАТНИКА

Власова Т.А., Агеева И.В., Братковская Л.Б.

Московский государственный университет, биологический факультет, Москва

Возбудитель вертициллезного вилта *Verticillium dahliae* Kleb., поражает многие виды растений. В частности, этот патоген вызывает одно из самых вредоносных заболеваний хлопчатника, приводящее к большим потерям урожая хлопка [1, 2 и др.] В работе использовали вирулентные и авирулентные штаммы *V. dahliae*, которыми заражали молодые растения или изолированные корни хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.), исследуя устойчивые и восприимчивые к вилту сорта хлопчатника.

При изучении патогенеза вилта большое значение имеет рассмотрение начальной фазы взаимодействия гриба с растением из-за ее влияния на дальнейший ход

инфекционного процесса. Для этого ставили опыты по заражению изолированных корней хлопчатника.

Опыты показали, что мицелий авирулентного штамма *V. dahliae* интенсивно разрастался по среде и по самим корням, но не внедрялся в корни. В то же время мицелий вирулентного штамма менее интенсивно разрастался на среде и не всегда покрывал всю поверхность корней, но в участках контакта внедрялся в ткани корней растений обоих сортов. Однако в корни восприимчивого сорта гриб внедрялся более интенсивно и на большую глубину [3].

Интенсивный рост паразита позволяет ему не только в кратчайший срок развивать имеющиеся у

него факторы патогенеза, но и успешнее выдерживать конкуренцию с другими патогенами. Конидии и микросклероции в культуре вирулентных штаммов развивались быстрее, чем у авирулентных, и микросклероциев у них было значительно больше. Некоторые авирулентные штаммы были представлены только мицелиальными формами. Массивное формирование покоящихся структур может указывать на большую способность к выживанию в неблагоприятных условиях. Широкая фенотипическая и генотипическая изменчивость вида и полиморфность паразита в онтогенезе очень важны для успешного сохранения гриба в природной популяции.

В настоящее время большое внимание уделяется возможностям биоконтроля *V. dahliae*, так как этот патоген очень чувствителен к присутствию в почве конкурирующих микроорганизмов. В моноконидиальных культурах *V. dahliae*, выделенных из пораженных вилтом растений хлопчатника, выявили *Mycobacterium* sp, ассоциированную с грибом. Охарактеризованы изменения свойств *V. dahliae* в совместных с *Mycobacterium* культурах, ультраструктурные аспекты взаимодействия этих микроорганизмов, а также изменения инфекционного процесса в результате заражения хлопчатника совместными культурами [4, 5].

Рост и развитие ивирулентных, и авирулентных изолятов *V. dahliae* в смешанных культурах в определенных условиях стимулировались, в то время как в других условиях рост гриба мог существенно подавляться. Под влиянием *Mycobacterium* ускорялось прорастание конидий, причем сильнее у вирулентного штамма. Полученные результаты позволяют трактовать данную ассоциацию как симбиотическую. Интересно исследовать возможность применения *Mycobacterium* для биоконтроля вертициллезного вилта.

Важнейшую роль в процессе инфицирования растений такими фитопаразитами, как грибы, играют интенсивность прорастания спор и массовость проникновения паразита в ткани растения-хозяина, непосредственно связанные с образованием липидов и скоростью их обмена. Возникновение устойчивых форм фитопатогенов является следствием понижения проницаемости клеточных мембран и выработки компенсаторных механизмов.

В процессе адаптации гриба непосредственную роль играет перестройка липидных компонентов клеточных мембран, а именно фосфолипидов, стерина и жирных кислот. В живых организмах ряд биосинтетических процессов, в том числе поддержание липидного состава и проницаемости мембран в большой степени регулируются уровнем свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов [6, 7].

Выявлен высокий уровень содержания липидов у всех штаммов гриба на протяжении всего периода инкубации, включая моноглицериды, свободные жирные кислоты, триглицериды, фосфолипиды, стерин и эфиры стерина. Вирулентные штаммы характеризовались более высоким содержанием стерина и свободных жирных кислот, а авирулентные – более высоким содержанием триглицеридов. У вирулентных штаммов отмечался более высокий уровень ненасыщенных жирных кислот, а у авирулентных – низкомолекулярных.

Электронно-микроскопическое изучение также выявило различия ультраструктуры липидных включений в гифах различных штаммов *V. dahliae*. Липидные тела в клетках мицелия вирулентного штамма отличались несколько большими количествами и размерами. Различались также форма и плотность липидных включений [3, 8].

Следует отметить также и другие ультраструктурные различия штаммов. Так, в гифах авирулентного штамма митохондрии были более многочисленны и имели конденсированную форму, в гифах вирулентного штамма их количество было меньше, и они имели ортодоксальную форму. Это согласуется с данными о более высокой митохондриальной активности вирулентного гриба [9]; возможно, большее количество митохондрий в клетках авирулента должно компенсировать их низкую активность.

В клетках мицелия авирулентного штамма при контакте с растением наблюдалось меньшее количество вакуолей, чем у вирулентного, в них часто присутствовали миелоноподобные структуры и фрагменты цитоплазмы, что предполагает деструктивные процессы в клетках. В гифах же вирулентного штамма вакуолей было меньше, и в некоторых из них обнаруживались включения, сходные с полифосфатными гранулами. В сочетании с крупными липидными включениями и различиями в составе липидов эти особенности вирулентного штамма могут указывать на более высокую устойчивость к фунгитоксическим соединениям растения.

#### Список литературы

1. Губанов Г.Я. Вилт хлопчатника. М.: Колос. 1972. 395 с.
2. Каримов М.А. Болезни хлопчатника. Ташкент: Укитувчи. 1976: 120 с.
3. Власова Т.А. Морфологические аспекты взаимодействия *Verticillium dahliae* Kleb. с изолированным корнем хлопчатника. Дисс. ... канд. биол. наук. М. 1990: 132 с.
4. Ageeva I.V. Symbiotic action of *Mycobacterium* sp. and the fungus *Verticillium dahliae*. In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds. V. Proc. 15th Reinhardtsbrunn Symp. May 06–10, 2007. Friedrichroda, Germany, 2008: 105.
5. Vlasova T, Kuznetsov L. Some characteristics and pathogenicity of *Verticillium dahliae* in association with *Mycobacterium* sp. In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds. V. Proc. 15th Reinhardtsbrunn Symp. May 06–10. 2007 Friedrichroda, Germany. 2008: 319-20.
6. Бурлакова Е.Б. Роль липидов мембран в процессе передачи информации. В сб. Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука. 1981: 23-5.
7. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты. Усп. хим. 1985; 54(9):1540-58.
8. Ageeva I, Vlasova T. Some characteristics of pathogenic and non-pathogenic strains of fungus *Verticillium dahliae* Kleb. Microsc Conf. 2013. Univ. of Regensburg, Germany, Aug. 25–30. Proc. Pt II. 2013: 209-10.
9. Воронков Л.А., Живописцева И.В., Рубин Б.А. О функциональной активности митохондрий *Verticillium dahliae* Kleb. различной патогенности. Микол. фитопатол. 1973: 7(6): 532-34.

## ВИДОВОЕ И ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФИТОПАТОГЕНОВ ОЗИМЫХ КОЛОСОВЫХ КУЛЬТУР НА ЮГЕ РОССИИ

Волкова Г.В., Кремнева О.Ю., Шумилов Ю.В., Синяк Е.В., Ваганова О.Ф.,  
Данилова А.В., Трофимова И.А.

Всероссийский НИИ биологической защиты растений, Краснодар, Россия

В результате проведенных в 2014 г. фитосанитарных обследований посевов зерновых колосовых культур повсеместно отмечены листовые болезни. Они были интенсивнее в северных, центральных и южно-предгорных районах юга России, особенно, – на полях с нарушением севооборота.

На озимой пшенице преобладала желтая пятнистость (*Pyrenophora tritici-repentis*) с максимальным поражением (50–60 %) на сортах Васса, ГРОМ, Иришка, Лебедь, Таня, Краснодарская 99, Сила, Москвич. Бурая ржавчина (*Puccinia triticina*) зафиксирована в пределах от 5% (восточная степная зона) до 12% (центральная зона), карликовая ржавчина ячменя (*P. hordei*) – от 1% (северная зона) до 7,5% (центральная зона). Желтая (*P. striiformis*) и стеблевая (*P. graminis*) виды ржавчины пшеницы, как и в 2013 г., отмечены в южной предгорной, северной и центральной зонах очагами с развитием до 1–2%. За последние 10 лет развитие пятнистостей в среднем по региону выросло с 0,5 до 8,8%, ржавчин с 0,15 до 1,2%.

Наблюдалось интенсивное распространение фузариозной (*Fusarium* spp.), церкоспореллезной гнили (*Pseudocercospora herpotrichoides*) и гиббереллины (*Gibellina cerealis*), которое охватило около 40% площади посевов зерновых культур. На озимой пшенице развитие этих болезней составило в среднем 2,6%, на озимом ячмене – 4,4%. Особенно сильное развитие

(40–65%) отмечали по полупаровому предшественнику. Учитывая, что источниками инфекции являются растительные остатки (стерня, солома), почва и семена, следует ожидать еще большего поражения посевов корневыми гнилями.

В 2014 г. в регионе отмечен фузариоз колоса (*Fusarium graminearum* и др.). Им было заражено от 30 до 60% посевов с распространением на пшенице 5,4%, на ячмене – 10,7%, что выше уровня прошлых лет. Максимальное поражение фузариозом (30–42%) по полупаровому предшественнику отмечено особенно интенсивно в южно-предгорной зоне Краснодарского края.

Возросло распространение на посевах озимой пшеницы твердой (*Tilletia caries*) и карликовой (*T. controversa*) головни. Так, в 2014 г. головневыми было поражено до 30% посевов. Эпифитотийное распространение наблюдалось в хозяйствах южно-предгорной зоны края. Спорышей (*Claviceps purpurea*) поражалось до 3% посевов.

Изучен внутривидовой состав по признаку вирулентности возбудителей особо опасных болезней пшеницы: бурой, желтой, стеблевой ржавчины, желтой пятнистости листьев и карликовой ржавчины ячменя. Описана вирулентность 100 клонов *P. triticina*, 40 – *P. striiformis*, 40 – *P. graminis*, 110 – *P. hordei* и определена частота каждого комплементарного гена вирулентности (таблица).

Таблица. Частота изолятов с генами вирулентности в популяциях возбудителей ржавчины зерновых культур (2014 г.)

Возбудитель	Частота изолятов с генами вирулентности pp, (%)			
	Не выявлены	До 5 %	От 6 до 25 %	Свыше 25 %
<i>P. triticina</i>	9, 19, 41, 42, 43+24, 45, 47	24, 29, 32, W	15, 21, 25, 36, 44	1, 2a, 2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 11, 14a, 14b, 16, 17, 18, 20, 23, 26, 28, 30, 33, 38, 40, Exh, B
<i>P. striiformis</i>	2+9, 3a, 3b+4a+H46, 3c+Min, 5, 17, 24, 25+32, 26, 32, SD, Sp	3, 4+12, 7, 18, 27, 10+Mor, 3a+4a+V23, 7+22+23, 7+25	2, 4b, 6, 8, 9, 10, 15, 25, 29, 2+6, 1 (Chinese 166), 2+HVII, 8+19, 3a+4a+ND, 2+6+25, A, Da1+Da2, SU	1, 21, 39+Alp
<i>P. graminis</i>	1, 5, 6, 9b, 9d, 9e, 9f, 10, 11, 24, 25, 31, 32, 35	7a, 8a, 9a, 30, 33	8b, 9g, 12, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 27, 29, 37, Dp2	14, 16, 20, 23, 26, 36, WLD
<i>P. hordei</i>	-	Pa2+Pa19	Pa2+Pa5, Pa2+Pa6	Pa, Pa2, Pa3, Pa3+Pa7, Pa4, Pa7, Pa8

Северокавказские популяции ржавчинных грибов на юге России характеризуется высокой вирулентностью и широким разнообразием фенотипов. В популяции возбудителя бурой ржавчины часто встречаются фенотипы с 6–21 генами вирулентности

из 39 изученных и составляют 60,0 % всей популяции; желтой ржавчины – с 1–5 генами вирулентности из 42 изученных (60,0%); стеблевой ржавчины – с 3–4 генами вирулентности из 39 изученных (25,0 %); карликовой ржавчины ячменя – с 2–5 генами вирулентности

из 10 изученных (25,0%). Не обнаружены изоляты, вирулентные к тестерам генов Lr: 9, 19, 41, 42, 43+24, 45, 47; Yr: 2+9, 3a, 3b+4a+H46, 3c+Min, 5, 17, 24, 25+32, 26, 32, SD, Sp; Sr: 1, 5, 6, 9b, 9d, 9e, 9f, 10, 11, 24, 25, 31, 32, 35, которые рекомендованы для использования в селекции как обеспечивающие надежную защиту от возбудителей ржавчины на начальной стадии развития растения-хозяина.

В результате изучения популяции *P. tritici-repentis* выявлено 6 рас из восьми известных в мире. Доминирующими на юге России являются раса 1 (образующая два токсина: Ptr tox A и Ptr tox B), раса 2 (образующая Ptr tox A) и раса 8 (образующая 3 токсина: Ptr tox A, Ptr tox B и Ptr tox C) с частотой встречаемости до 59%. Анализ вирулентности возбудителя желтой пятнистости листьев пшеницы показал, что изоляты из южной предгорной и центральной агроклиматических зон юга

России являются более вирулентными, что связано как с благоприятными климатическими условиями зон, так и с сортовым составом. Обработка данных, полученных в процессе изучения патогенных характеристик возбудителей ржавчинных заболеваний, позволила обозначить тенденции внутривидовых изменений в их структурах за последние 3 года.

В популяции *P. graminis* отмечено снижение pp: 6, 8b, 9a, 9f, 10, 12, 15, 19, 23, 29, Dp2; в популяции *P. striiformis* – увеличение pp: 1, 2+HVII, 3a+4a+ND, 3a+4a+V23, снижение pp: 7, 10, 26; в популяции *P. triticina* – увеличение pp: 2a, Eхh, снижение pp: 21, 29.

Полученные результаты свидетельствуют о значительном видовом и внутривидовом разнообразии возбудителей болезней на юге России, что является крайне важным при разработке стратегии защиты зерновых колосовых культур.

## МИКОБИОТА ЗЕРНА ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ

Волкова Т.Н.<sup>1</sup>, Селина И.В.<sup>1</sup>, Созинова М.С.<sup>1</sup>, Осипов В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности, Москва,

<sup>2</sup>Московский НИИСХ «Немчиновка», Московская область

Производители пива и кваса в последние годы стали проявлять интерес к тритикале как возможному новому виду зернового сырья. (Тритикале, *Triticosecale* spp. Wittmack – искусственно полученный зерновой гибрид в результате скрещивания пшеницы *Triticum* spp. и ржи *Secale* spp.). Этот интерес определяется рядом ценных свойств озимой тритикале – большей пластичностью, большей устойчивостью ко многим болезням и вредителям по сравнению с её родительскими видами, большей урожайностью и продуктивностью по биомассе. По своим физико-химическим свойствам зерно тритикале удовлетворяет потребностям процесса соложения, а также может быть применено в пивоварении в качестве несоложенного материала [1–5].

Важно исследовать грибную микробиоту зерна этого нового вида сырья, чтобы можно было предвидеть связанные с этим фактором возможные осложнения в ходе соложения. В литературе есть сведения относительно тритикале кормовых сортов [6], а также зараженности зерна тритикале в послепосевном состоянии, касающейся в основном грибов хранения [7]. Для нас же было важнее получить представление о полевой микробиоте зернового сырья. Было интересно также сравнить состав микробиоты зерна тритикале с хорошо изученной микробиотой зерна пивоваренного ячменя [8], чтобы понять, есть ли какие-либо преимущества по этому показателю у тритикале.

Обследовали 17 образцов озимой тритикале 14 сортов из разных районов произрастания (Ростовская, Московская, Кировская обл.), заготовленных в 2011–2014 гг. Видовой и количественный состав микробиоты зерна определяли ранее описанным методом [9]. Результаты представлены на след. стр. (табл.)

Анализ показал, что микробиота зерна озимой тритикале обладает определенными особенностями в

сравнении с микробиотой зерна пивоваренного ячменя. Заметна очень низкая инфекционная нагрузка, в условных единицах, выражаемая десятками или даже сотыми долями по сравнению с ячменем (здоровый свежесобраный ячмень, в зависимости от погодных условий, обычно имеет инфекционную нагрузку в 2–3 усл. ед., что соответствует приблизительно  $1 \times 10^2$  –  $1 \times 10^4$  КОЕ/зерно).

Возможно, это отчасти объясняется тем, что тритикале – культура голозерная, в отличие от ячменя, являющегося пленчатой культурой. Большая часть поверхностной микробиоты удаляется при обмолоте зерна. Известно также, что тритикале обладает значительно большей устойчивостью, чем, например, пшеница, к грибковым и вирусным болезням, практически не поражается твердой и пыльной головней, мучнистой росой.

Видовой состав микробиоты зерна тритикале отличается близким к 100% наличием *Alternaria* sp., практически полным отсутствием *Bipolaris sorokiniana*, неожиданно высоким, до 50%, содержанием кладоспориума в некоторых образцах из Московской и Кировской областей (у ячменя средний показатель по кладоспориуму составляет 5–6%). Отмечено высокое содержание *Aureobasidium pullulans* в образцах Валентин 90 (20%), Тимирязевская 150 (40%), Бард (44%). Список минорных компонентов микробиоты: *Nigrospora sphaerica*, *Arthrotrichum* sp., *Acremonium atra*, *Chaetocladium elegans* – сходен с таковым у ячменя. Фузариум встречался во всех образцах со сроками хранения менее 18 мес, и отсутствовал в образцах с большими сроками хранения.

В Московской и Кировской областях преобладали *F. sporotrichioides* и *F. roae*, в Ростовской области – *F. verticillioides*. Фузариозных зёрен не было обнаружено ни в одном из образцов.



Сорт, область заготовки*, срок хранения, мес.	Состав грибной микробиоты зерна, в % зараженных зёрен					Инфекционная нагрузка, усл. ед., 0–5
	Alt**	Bipo	Clad	Epic	Fusar	
Каприз (Р) 30	78	0	6	4	0	0,01
Капрал (Р) 30	96	2	8	14	0	0,01
Ацтек (Р) 18	98	0	8	6	0	0,1
Зимогор (Р) 18	82	0	10	4	0	0,01
Легион (Р) 18	86	0	2	0	0	0,1
Бард (Р) 18	58	0	0	0	40	0,1
Немчиновский 56 (М) 18	96	2	52	8	22	1-2
Гермес (М) 18	54	0	6	0	0	0,5
Консул (К) 18	96	0	18	2	0	1
Зимогор (К) 18	90	0	6	4	4	0,1
Корнет (К) 13	98	0	6	0	0	0,5
Зимогор (К) 13	100	0	2	0	0	0,5-1,0
Валентин 90 (М) 6	90	0	54	12	14	0,5-1,0
Тимирязевская 150 (М) 6	82	0	44	6	26	0,5-1,0
Немчиновский 56 (М) 2	100	0	70	8	8	1
Нина (М) 2	86	0	68	8	20	1
121-1-9 (М) 2	86	0	84	6	26	1

\*Р, М, К – соответственно Ростовская, Московская и Кировская области

\*\* *Alternaria sp.*, *Bipolaris sorokiniana*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sp.*

Обследованное зерно находилось в здоровом состоянии, имело высокие показатели прорастаемости в пределах 90,0 – 98,0%, содержание грибов хранения было незначительным.

Таким образом, с точки зрения микробиологического статуса культура тритикале представляет собой хорошую замену или дополнение как зерновое сырьё в пивоваренной промышленности. В составе микробиоты тритикале отсутствует *Bipolaris sorokiniana*, который часто вызывает почернение зерна ячменя, тем самым приводя к потемнению пивоваренного сусла. Невысокое содержание токсинообразующих видов *Fusarium* позволяет надеяться на получение более чистого в отношении микотоксинов продукта. Низкая инфекционная нагрузка также должна рассматриваться как положительное качество.

#### Список литературы

- Pomeranz Y, Burkhart B, Moon L. Triticale in malting and brewing. Am Soc of Brew Chem. Annu Meeting, Detroit, 10–14 May 1970, Proceedings, pp. 40-46.
- Gupta N, Singh T, Bains G. Malting of Triticale: Effect of variety, steeping moisture, germination and gibberellic acid. Brew. Dig. 1985; 60: 24-30.
- Glatthar J, Heinisch J, Senn T. A study on the suitability of unmalted Triticale as a brewing adjunct. J Am Soc Brew Chem. 2002; 60(4): 181-7.
- Glatthar J, Heinisch J, Senn T. The use of unmalted Triticale in brewing and its effect on wort and beer quality. J Am Soc Brew Chem. 2003; 61(4): 182-90.
- Grujić OS, Pejin JD. The application of Triticale malt as the substitute for barley malt in wort production. Acta Periodica Technol. 2007; 38: 117-26. doi:10.2298/APT0738117G.
- Alijošius Saulius. The quality of grains damaged by Micromycetes. (2011). // Lietuvos akademine elektronine biblioteka (eLAB) [http://vddb.library.lt/obj/LT-eLABa-0001:E.02~2011~D\\_20110609\\_124309-82627](http://vddb.library.lt/obj/LT-eLABa-0001:E.02~2011~D_20110609_124309-82627)
- Lugauskas A. Potential toxin producing Micromycetes on food raw material products of plant origin. Botanica Lithuanica. 2005, Suppl. 7: 3-16.
- Волкова Т.Н. Оценка зараженности зерна ячменя и солода плесневыми грибами. Пиво и напитки. 2010; 2: 26-32; 4: 46-50.
- Оганесянц Л.А., Беневоленская Л.Н., Волкова Т.Н., Воронина Е.В. Инструкция контроля микологического состояния зерна пивоваренного ячменя и солода ИК 9184-074-00334600-08. М.: РАСХН, ГУ ВНИИ ПБ и ВП, 2008.

## АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ УСТОЙЧИВОСТИ ИВ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ

Воробьева И.Г., Томошевич М.А.

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск

Известно, что устойчивость растений обусловлена комплексным действием пред- и постинфекционных факторов. Среди факторов, роль которых проявляется на 1-й фазе инфекционного процесса, а именно при внедрении паразита внутрь растительной ткани, особое место занимают анатомо-морфологические [1, 2].

Проведенные нами в течение ряда лет наблюдения за развитием мучнистой росы ив *Salix* (возбудитель – *Erysiphe adunca* (Wallr.) Fr.) в дендрарии ЦСБС СО РАН, позволили выявить различия в устойчивости растений к заболеванию. Среди 60 видов ивы, объединенных в 148 эколого-географические группы, мучнистой росой поражается до 25% групп растений. Ежегодно заболевание регистрируется на *S. pyrolifolia* Ledeb., *S. lanata* L., *S. saxatilis* Turcz. ex Ledeb., *S. taraiensis* Kimura, *S. caprea* L., *S. myrtilloides* L., *S. rorida* Laksch., *S. brachypoda* (Trautv. et C. A. Mey) Kom., *S. kochiana* Trautv., *S. jensisensis* B. Floder., *S. acutifolia* Willd., *S. saposchnikovi* A. Skvorts., *S. coesia* Vill., *S. rosmarinifolia* L. и видах рода *Salix*, произрастающих в естественных ценозах [3].

Проведен сравнительный анализ анатомо-морфологических признаков двух вида ив (*S. alba* L. и *S. lanata* L.), произрастающих рядом, но значительно различающихся по устойчивости к болезни. На растениях *S. alba* в период исследования симптомов заболевания не обнаружено, а *S. lanata* в сильной степени поражалась мучнистой росой. Габитус вида *S. lanata* способствует созданию благоприятных условий для заражения. Листья растений расположены горизонтально, округлые, крупные (40 см<sup>2</sup>), густоопушенные, толщина черешка составляет 787 мкм. У ивы *S. alba* листья повислые, узкие ланцетовидные с единичными волосками по краю, толщина черешка – 245 мкм.

Считается, что опушенность листьев снижает риск заражения растений, однако в данном случае, этот признак, а также горизонтальное расположение листа, способствовали задержанию капельной влаги

на листьях, и как следствие, создают благоприятные условия для прорастания спор возбудителя заболевания. Напротив, морфологические особенности листьев *S. alba* обеспечивают легкое скатывание инфекционных капель, чем значительно снижается вероятность контакта патогена с поверхностью листа.

Как правило, мучнисто-росяные грибы заражают растения, проникая через кутикулу или устьица [4, 5]. Установлены различия показателей длины волосков, толщины кутикулы, клеточной стенки эпидермиса, количества устьиц на единицу площади листа у изученных видов. Так, устойчивый вид *S. alba* по сравнению с восприимчивым видом *S. lanata* имеет почти в 4 раза более толстую кутикулу, толщина клеточной стенки превосходит восприимчивый вид почти в 13 раз (90 и 7 мкм соответственно), а количества устьиц на единицу площади листа различается в 4,7 раза (184 и 860 шт./см<sup>2</sup> соответственно).

Таким образом, проведенное нами исследование подтверждает мнение о том, что анатомо-морфологические признаки растений как фактор пассивного иммунитета могут служить критерием отбора устойчивых видов и форм растений при их интродукции и в озеленении.

### Список литературы

1. Горленко, М.В. Краткий курс иммунитета растений к инфекционным болезням. М.: Высшая школа. 1973.
2. Шкаликов В.А., Дьяков Ю.Т., Смирнов А.Н. и др. Иммунитет растений. Под ред. проф. В.А. Шкаликова. М.: Колос. 2005.
3. Томошевич М.А., Воробьева И.Г. Мучнистая роса сибирских видов рода *Salix* L. Сиб. экол. журн. 2005; 12(4): 771-5.
4. Гойман, Э. Инфекционные болезни растений. М.: Мир. 1954.
5. Головин П.М. Мучнисто-росяные грибы, паразитирующие на культурных и полезных растениях. М.-Л.: Изд-во АН СССР. 1960.

## ВИРУЛЕНТНОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ *PUCCINIA TRITICINA* ERIKSS. НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО И СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО РЕГИОНОВ РОССИИ В 2013 ГОДУ

Жемчужина А.И., Афонина С.В.

ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы. Московская область

Наиболее перспективным и биологически чистым методом защиты урожая продовольственных культур от фитопатогенных микроорганизмов является создание высоко устойчивых сортов. Трудности селекции новых ржавчиноустойчивых сортов пшеницы вызваны прежде всего тем, что патоген эволюционирует быстрее, чем хозяин и часто опережает процесс вы-

ведения нового сорта. Отсюда и возникает необходимость вести постоянный контроль за изменчивостью как хозяина, так и патогена. Исследования возбудителя бурой ржавчины пшеницы проведены в Центральном и Северо-Кавказском регионах России в 2013 г. Из двух регионов изучено 69 монопустульных изолятов: 48 из Северо-Кавказского и 21-из Центрального.

Таблица. Частота встречаемости генов вирулентности  
в Центральной и Северо-Кавказской популяциях *Puccinia triticina*/

Lr-гены	Центральная		Северо-Кавказская	
	Количество изолятов	%	Количество изолятов	%
1	21	100	46	96
2a	21	100	44	92
2b	21	100	47	98
2c	21	100	48	100
3a	21	100	48	100
3bg	21	100	48	100
3ka	21	100	48	100
9	16	76	21	44
10	18	86	36	75
11	8	38	34	71
14a	17	81	46	96
14b	17	81	43	90
15	21	100	44	92
16	0	0	8	17
17	21	100	48	100
18	21	100	47	98
19	3	14	7	15
20	21	100	46	96
21	20	95	44	92
23	19	90	35	73
24	0	0	0	0
25	18	86	32	67
26	10	48	21	44
27+31	17	81	44	92
28	1	5	1	2
29	0	0	0	0
30	21	100	48	100
32	16	76	32	67
33	21	100	48	100
36	0	0	1	2
38	17	81	14	29
39	20	95	42	87
40	16	76	40	83
41	0	0	0	0
42	0	0	0	0
44	0	0	0	0
45	0	0	0	0
46	7	33	10	21
47	0	0	0	0
51	0	0	0	0
53	0	0	0	0
B	21	100	48	100
Всего изолятов	21		48	

Исследования проводили в камерах искусственного климата в строго контролируемых условиях: среднесуточная температура воздуха +20 °С, относительная влажность 60% днём и 70% ночью, освещённость 10–15 тыс. Лк, фотопериод 16 ч. (Методы оценки и отбора, 2012).

В результате анализа вирулентности изолятов патогена на 42 моногенных линиях *Thatcher* и сортах пшеницы к единичным генам устойчивости отнесены

гены: Lr 1, Lr 2a, Lr 2b, Lr 2c, Lr 3a, Lr 3bg, Lr 3ka, Lr 9, Lr 10, Lr 11, Lr 14a, Lr 14b, Lr 15, Lr 16, Lr 17, Lr 18, Lr 19, Lr20, Lr 21, Lr 23, Lr 24, Lr 25, Lr 26, Lr 27+31, Lr 29, Lr 30, Lr 32, Lr 33, Lr 36, Lr 38, Lr 39, Lr 40, Lr 41, Lr 42, Lr 44, Lr 45, Lr 46, Lr 47, Lr 51, Lr 53, Lr B (McIntosh et al., 2003), выявлено 63 фенотипа *P. triticina*.

В двух популяциях выявлено 33 гена вирулентности. Высокой частотой встречаемости (67–100%) в обеих популяциях характеризовались гены вирулент-

ности: pp 1, 2a, 2b, 2c, 3a, 3bg, 3ka, 10, 14a, 14b, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 25, 27+31, 30, 32, 33, 39, 40, B.

В Центральном регионе часто встречались гены p 9 (76%) и p 38 (81%), на Северном Кавказе p 11 (71%). На территории регионов не обнаружены pp 24, 29, 41, 42, 44, 45, 47, 51, 53; гены p 16 и p 36. Со средней

частотой встречаемости в обоих регионах идентифицированы гены p 26 (48 и 44%) и p 46 (33 и 21%), на Северном Кавказе – p 38 (29%). С низкой частотой на изученных территориях встречались гены p 19 (14 и 15%) и p 28 (5 и 2%).

## КРОСС-АДАПТАЦИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ СВЕРХ СИЛЬНЫХ СТРЕССОРОВ

Юшкевич Т.И.

*Сельскохозяйственный университет Внутренней Монголии, г. Хух-Хото, Китай*

Индукция неспецифической устойчивости у растений является одним из перспективных способов защиты сельскохозяйственных культур от действия стрессов различной природы (абиотических и биотических). Известны методы индукции врожденных защитных механизмов растений с помощью предварительной обработки семян природными или синтетическими препаратами. Одним из таких индукторов, обуславливающих экологическую безопасность его применения для агроценозов, является хитозан. Под действием хитозана происходит фенотипическая иммунокоррекция растений, в результате чего изменяется функционирование растительной ткани, связанное с уровнем экспрессии защитных генов [1].

Изучали проявление кросс-адаптации при воздействии на семена и проростки сахарной свеклы растворов NaCl (в концентрации 900 мМ и 1 М), низкой плюсовой температуры (+4 °С), и грибной инфекции (вызывающей заболевания и гибель проростков свеклы) в вариантах с обработкой и без обработки их препаратом CFKJ (действующее вещество – хитозан). Тестировали семена сахарной свеклы 33 сортов китайской селекции в соответствии с ранее разработанной схемой опытов [2]. Оценивали всхожесть семян, весовые и линейные показатели роста, развития проростков после действия стрессоров и их сочетания.

Семена, не обработанные препаратом, после солевого и температурного стресса не прорастали. Стрессоры полностью подавляли всхожесть семян. Обработанные хитозаном семена прорастали, но их всхожесть составляла не более 30% у сортов свеклы селекционных линий, использующих стратегию равномерного поглощения воды при набухании семян (вес поглощенной воды на 4- и 8-е сут прорастания одинаковый).

Стрессоры подавляли ростовые процессы у проростков. Отличия этих проростков во всех вариантах воздействия стрессорами от контрольных связаны

со снижением весовых и линейных показателей (суммарный вес и длина проростка и его частей, площадь листьев, диаметр и длина coleoptила), а также активности фотосинтеза и концентрации сахара. Однако проростки, полученные после воздействия высоких концентраций NaCl на семена свеклы, были устойчивые к действию всех стрессоров и их совместному воздействию.

В вариантах с грибной инфекцией и хитозаном процент выживаемости проростков был такой же, как и в контроле: усиливалось поглощение проростками воды и активность фотосинтеза даже при низкой температуре. Хитозан не подавлял развитие грибного мицелия. Наблюдалось развитие грибного мицелия на тканях живых проростков, но грибы не убивали проростки, проростки не заболели. Весовые и линейные показатели, содержание сахара и активность фотосинтеза в проростках были такими же, как и у проростков, не подвергавшихся стрессовому воздействию.

Обнаружено проявление кросс-адаптации и устойчивости проростков к действию сверхсильных доз стрессоров после солевого воздействия на семена.

### Список литературы

1. Куликов С.Н. Индукторы болезнеустойчивости на основе хитозана для защиты от грибных и вирусных болезней: автореф. дис. ... к.б.н. Всерос. научно-исследовательский и технологический инст. биол. промышл. РАСХН. Щелково., 2006: 36 с.
2. Юшкевич Т.И. Устойчивость сортов сахарной свеклы китайской селекции при моделировании весенне-летней засухи. Совр. тенденции в сельском хозяйстве. III Межд. научн. Интернет-конф: материалы конф. (Казань, 9–10 окт. 2014 г.). Сервис виртуальных конференций Pax Grid сост. Д.Н. Синяев. Казань: ИП Синяев Д.Н., 2014: 140–44.

## ЛОЖНАЯ МУЧНИСТАЯ РОСА – РАСПРОСТРАНЁННАЯ И ВРЕДНОСНАЯ БОЛЕЗНЬ ПОДСОЛНЕЧНИКА В РОССИИ

Якуткин В.И.

ВНИИ защиты растений (ФГБУ ВИЗР), Санкт-Петербург

Возбудитель ложной мучнистой росы подсолнечника – биотроф *Plasmopara halstedii* (Farl.) et de Toni впервые идентифицирован в 1876 г. в Северной Америке, где в дальнейшем он распространился повсеместно [5]. После этого, как возбудитель ложной мучнистой росы подсолнечника, он отмечался в разных странах мира. В России патоген зарегистрирован на Кавказе в 1897 г. [2]. Повсеместное его эпифитотийное проявление на посевах подсолнечника в России отмечено в 1952 г. в Краснодарском крае [3]. Разрушительные нарастающие потери урожая культуры, вызываемые паразитом *Pl. halstedii* в других местах страны, стимулировали развитие научных исследований.

Всестороннее его изучение в нашей стране связано с именем Н.С. Новотельновой. В ее монографической сводке представлены обширные материалы о таксономическом положении патогена, его биологических особенностях, влиянии экологических факторов на распространение и обоснование мероприятий по ограничению заболевания и многое другое (Новотельнова, 1966). К настоящему времени ложная мучнистая роса поражает подсолнечник во всех регионах страны, где он возделывается.

Изучение в последние годы биологических особенностей *Pl. halstedii* показало, что дополнительным трансмиссивным источником инфекции, кроме семенной, является аэрогенный инокулюм. Если почвенная и семенная инфекция заражает подсолнечник на начальных этапах его развития, то аэрогенный инокулюм в виде зооспор, вызывает заболевание в начале цветения и несколько позже, что также усиливает вредоносность болезни. Нарастание этого типа инфекции, как показали наши наблюдения, происходит в Центральной чернозёмной зоне (ЦЧЗ) России.

Можно полагать, что указанное явление связано с сокращением ротации подсолнечника в полевых севооборотах до трёх или четырёх лет. Повсеместное внедрение импортного заражённого семенного материала способствует также нарастанию инфекционного потенциала возбудителя болезни в нашей стране. Непрерывные микроэволюционные процессы, происходящие в популяциях гриба *Pl. halstedii*, усиливают вирулентные свойства, повышают резистентность к металаксилу (Апрону), что приводит к нарастанию его вредоносности на подсолнечнике.

К настоящему времени у возбудителя болезни идентифицировано около 20 физиологических рас. В России первоначально отдельные из них были выявлены в 1999 г. в ЦЧЗ [4]. В дальнейшем они были обнаружены в других регионах страны. Что касается резистентности возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника к Апрону, то в зарубежной практике это широко распространенное явление. Этот феномен нами неоднократно наблюдался на посевах культуры в ЦЧЗ.

В агроценозах с подсолнечником в настоящее время инфекция гриба *Pl. halstedii* не является лимитирующим фактором для проявления и развития

болезни. Распространенное и интенсивное поражение культуры зависит от экологических условий. Так, эпифитотия раболевания происходит при увлажнении территории от всходов до цветения подсолнечника. при ГТК 1,0 и более. Если этот показатель за данный период бывает менее 1,0, ложная мучнистая роса проявляется ограниченно или же полностью отсутствует. Почвенный инокулюм (ооспоры) возбудителя болезни заражает подсолнечник при достижении влажности почвы до 95% и её температуры в пределах 12–14 °С. Появившиеся зооспорангии на поражённых растениях утрачивают свою жизнеспособность при повышении температуры до 26 °С. Выход зооспор из появившихся зооспорангиев и массовое заражение ими подсолнечника происходит во влажных условиях в узком интервале температур от 15 до 18 °С.

В ареале подсолнечника в России распространённость и интенсивность его поражения ложной мучнистой росой проявляются различно, что соответствует степени ее вредоносности. По результатам многолетних исследований, в повсеместном проявлении болезни, с помощью ГИС-технологии идентифицированы три зоны с различной её вредоносностью, которые указаны на представленной карте (рис.)

Зона слабой (ограниченной) вредоносности болезни на подсолнечнике приурочена к Крыму, Сибири и Дальнему Востоку. Среднегодовые потери урожая здесь находятся в пределах 10%. В отдельные влажные вегетационные сезоны снижение урожая в этих местах может превышать указанный показатель. Зона сильной вредоносности болезни, с потерями урожая более 31%, сформировалась в предгорных районах Кавказа. В этом очаге, в условиях с постоянным увлажнением территории с ГТК 1,0 и более, происходят постоянные массовые вспышки заболевания, приводящие к ощутимым потерям количества и качества урожая. В европейской части ареала подсолнечника – в ЦЧЗ, на Северном Кавказе, Поволжье и на Урале, как правило, вредоносное влияние ложной мучнистой росы находится в пределах 30% снижения урожая. Поскольку в этих местах наблюдаются засушливые и влажные сезоны, вредоносность болезни здесь может колебаться от минимальной до указанной максимальной 30%.

Вредоносность ложной мучнистой росы на подсолнечнике проявляется в потерях его урожая и снижении количества и товарного качества семян. Установлена прямая статистическая зависимость между количеством поражённых растений, снижением урожая и его качеством (масличностью). Коэффициент детерминации ( $D$ ) между потерями урожая и его поражаемостью заболеванием достигал показателя 0,99. Снижение масличности в зависимости от проявления болезни детерминировалось этим коэффициентом до показателя 0,70. С учётом этого разработаны уравнения экспертной оценки вредоносности гриба *Pl. halstedii* на подсолнечнике, которые имеют следующий вид:

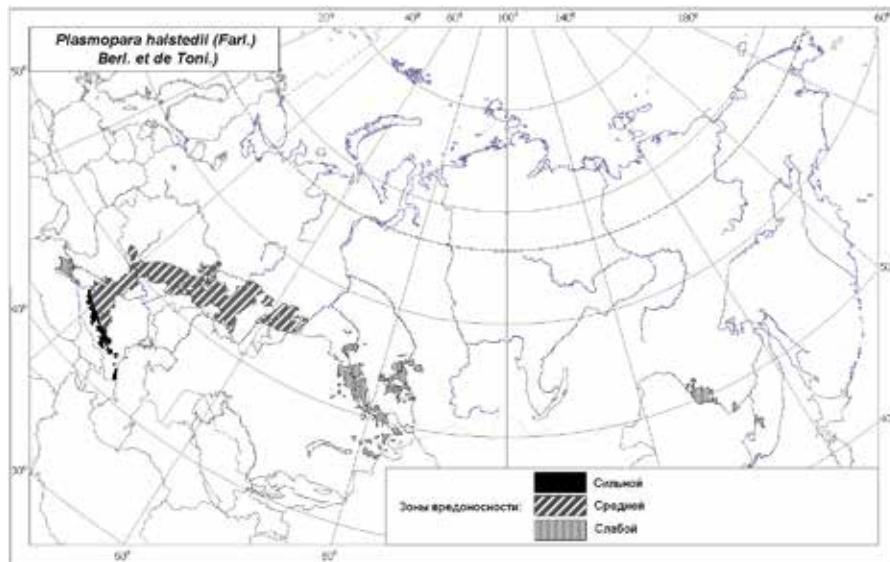


Рис. Зоны вредоносности гриба *Plasmopara halstedii* в ареале подсолнечника России

$$Y = 1,281 - 0,130 \times X \pm 0,052,$$

где:

$X$  – количество поражённых растений, в %;  
 $\pm 0,052$  – статистическая ошибка уравнения, в %.

Данное уравнение разработано для каждых 10 корзинок, случайно отобранных в четырёхкратной повторности (100 корзинок), в посеве подсолнечника. Одновременно из этой же выборки урожая по следующему уравнению регрессии определяется его масличность.

$$Y = 52,3 - 0,24 \times X \pm 5,4,$$

где:

$X$  – масличность семян в отобранном урожае, в %;  
 $\pm 5,4$  – статистическая ошибка уравнения, в %.

Это уравнение рассчитано для каждой выборки из 100 семян, случайно отобранных в 4-кратной повторности (400 семян), в исследуемом урожае подсолнечника сортов-популяций.

Для гибридов оно имеет несколько другой вид:

$$Y = 48,1 - 0,28 \times X \pm 4,3.$$

Указанные уравнения можно использовать для оценки эффективности проведённых мероприятий против вредоносного влияния ложной мучнистой росы на подсолнечнике.

#### Список литературы

1. Новотельнова Н.С. Ложная мучнистая роса подсолнечника. Наука, М.-Л. 1966: 150.
2. Спешнев Н.Н. Материалы для изучения микологической флоры Кавказа. Тр. Тифлисского бот. сада. 1897; 11: 7.
3. Ягодкина В.П. 1955. Ложная мучнистая роса подсолнечника в Краснодарском крае. Земледелие, 7: 95-7.
4. Якуткин В.И. Болезни подсолнечника в России и борьба с ними. Защ. карант. раст. 2001. 10: 26-9.
5. Farlow WG. Enumeration of the Peronosporae of the United States. Hedwigia. 1884; 9: 143 и 10: 159.

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПО АГРЕССИВНОСТИ ШТАММОВ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* (MONT) DE BARY НА ФОРМИРОВАНИЕ ЗАЩИТНОГО ОТВЕТА В РАСТЕНИЯХ *SOLANUM TUBEROSUM*

Яруллина Л.М., Новоселова Е.И., Умаров И.А., Ибрагимов Р.И.  
 Башкирский государственный университет. Уфа

Одним из распространенных заболеваний картофеля (*Solanum tuberosum*) на территории России является фитофтороз, вызываемый гембиотрофным грибом *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, борьба с которым в настоящее время остается важной задачей. Вредоносность болезни зависит от целого ряда факторов, прежде всего от болезнеустойчивости возделываемых сортов, агрессивных свойств возбудителя болезни и погодных условий [1].

Возбудитель болезни *Ph. infestans* при продолжительной влажной погоде развивается весьма интенсив-

но, снижая урожайность до 40% из-за преждевременного отмирания ботвы, а также гниения пораженных клубней в период их хранения. Основная причина резкого усиления вредоносности фитофтороза – значительное изменение структуры популяции возбудителя болезни. Поэтому весьма важным представляется сбор образцов из популяции *Ph. infestans* и изучение их агрессивных свойств.

Возбудитель фитофтороза был выделен из растений картофеля с полей Бирского (северная лесостепь) и (южная лесостепь) районов с различных сортов

Табл. 1. Развитие изолятов *Ph. infestans* из различных агробиоценозов на листьях картофеля сорта Удача (5 сут после инокуляции)

Показатель	Северная лесостепь	Южная лесостепь	
	Высоко агрессивный	Средне агрессивный	Низко агрессивный
Тип изолята			
Площадь некротизированных участков на листе, %	31,2±2,9	23,4±1,7	11,3±0,9
Продуктивность спороношения, конидий/мл	2×10 <sup>4</sup>	2×10 <sup>3</sup>	3×10 <sup>2</sup>

картофеля (Невский, Луговской, Удача, Башкирский). Почва под картофельным полем – светло серая лесная, средне- и тяжело суглинистого механического состава, с общим составом гумуса 6,72– 6,93%.

В табл. 1 показаны различия роста и развития штаммов возбудителя фитофтороза картофеля, выделенных из популяции *Ph. infestans* северной и южной лесостепей.

Так, штаммы *Ph. infestans* из популяции северной лесостепи вызывали поражение листовой пластинки в среднем на 31%. Как видно из табл. 1, площадь некротизированных участков на листьях восприимчивого сорта картофеля при инокуляции высокоагрессивными штаммами гриба составляла 31,2±2,9%, а продуктивность спороношения – 2×10<sup>4</sup> конидий/мл. С картофельных полей южной лесостепи были выделены менее агрессивные изоляты гриба *Ph. infestans*, которые отличались низкой продуктивностью спороношения (2×10<sup>3</sup> и 2×10<sup>2</sup> конидий/мл соответственно) и меньшей площадью некротизированных участков в листьях (23,4±1,7 и 11,3±0,9% соответственно).

Биохимические исследования показали, что в ответ на инокуляцию высоко агрессивными штаммами в листьях картофеля сорта Удача усиливалась продукция H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> спустя 24 ч после инокуляции (табл. 2).

Обращает на себя внимание факт, что через 24 ч после инфицирования концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в инфицированных высоко агрессивным штаммом №1 листьях картофеля превышает показатели в неинфицирован-

Табл. 2. Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листьях картофеля сорта Удача при инфицировании различными по агрессивности штаммами *Ph. infestans*

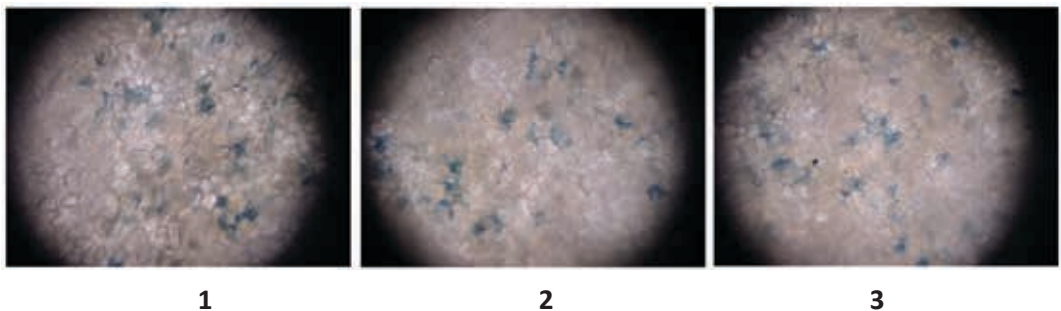
Штаммы <i>Ph. infestans</i>	Время после инокуляции, ч/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкМ/г сырого веса		
	24	48	72
Контроль	5,1±0,03	9,3 ±0,05	6,2 ±0,02
Высоко агрессивный	15,8±0,97	7,9±0,02	5,0±0,04
Средне агрессивный	18,4±0,93	15,1±0,95	12,4±0,82
Низко агрессивный	20,1±0,98	17,4±0,96	15,8±0,92

ного варианта в 3 раза. Однако через 48 ч после инокуляции высоко агрессивным штаммом происходило резкое снижение продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Напротив, листья картофеля, инфицированные средне- и низко агрессивными штаммами, отличались интенсивной генерацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на протяжении 72 ч.

Образование АФК является одним из наиболее ранних ответов растительных клеток на контакт с патогеном, в результате чего индуцируются защитные реакции растения [2]. Наиболее стабильной формой АФК является перекись водорода, которая может перемещаться по растению и индуцировать устойчивость в местах, удаленных от патогена.

Поражение клубней картофеля фитофторой наносит значительный урон качеству и товарным характеристикам этой ценной пищевой культуры, а также способствует заражению другими патогенными микроорганизмами [3]. Для оценки агрессивных свойств изолятов *Ph. infestans* на клубнях картофеля использовали модельную систему [4]. Для выявления некротических клеток через 2 сут после инокуляции делали срезы клубней, отступая 0,3 см от поверхности клубня с нанесенными спорами. Срезы окрашивали 0,1 % метиленовым синим [5].

Микроскопические наблюдения показали, что инфицирование клубней картофеля возбудителем фитофтороза приводило к появлению в клубнях некротических клеток (рис. 1). Так, через 48 ч после инокуляции высоко агрессивным изолятом их было значительно больше (рис. 1 – **1**), чем при заражении низко агрессивными штаммами (рис. 1 – **2, 3**).

Рис. 1. Некротическая реакция в клубнях картофеля сорта Удача при инфицировании различными по агрессивности изолятами возбудителя фитофтороза *Ph. infestans*. 48 ч после инокуляции.

1 – высокоагрессивный, 2 – среднеагрессивный, 3 – низкоагрессивный изолят. Ув.: ок. 10х, об. 10х.

Таким образом, агрессивные штаммы *Ph. infestans* отличались более высокой продуктивностью спороношения, интенсивной некротической реакцией на клубнях картофеля, способностью подавлять развитие защитных реакций у картофеля посредством снижения продукции  $H_2O_2$  в инфицированных тканях. Выявленные различия в степени агрессивности изолятов *Ph. infestans* из различных агробиоценозов свидетельствуют о необходимости учета структуры популяций патогена при проведении защитных мероприятий.

*Исследования проведены при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания, № 01201456414).*

#### Список литературы

1. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии. М.: КМК. 2005: 220 с.
2. Galvez-Valdivieso G, Mullineaux PM. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the Nucleus. *Physiol Plant*. 2010; 138: 430-9.
3. Тютюрев С.Л. Научные основы индуцирования болезнеустойчивости растений. СПб.: ООО «Инновационный центр защиты растений» ВИЗР. 2000: 328 с.
4. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Ревина Т.А., Валуева Т.А. Процесс раневой репарации и индуцированная устойчивость клубней картофеля. *Прикл. биохим. микробиол.* 2009; 45(2): 220-4.
5. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. Р.П. Барыкина и др. М.: МГУ. 2004: 312 с.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ СЕМЯН ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ СОРТА УЧИТЕЛЬ В БОРЬБЕ С КОРНЕВЫМИ ГНИЛЯМИ В ОРЕНБУРГСКОМ РАЙОНЕ

Яфаров С.Ф.

Оренбургский государственный аграрный университет. Оренбург

Ежегодно от вредителей, болезней и сорняков не добывается 30 % потенциально возможного урожая. На долю болезней приходится примерно одна третья часть, а в годы массового развития болезней – половина и более [4].

Степень вредоносности болезней зависит от экологических условий возделывания и особенностей культуры. В одних эколого-географических зонах страны большую вредоносность проявляют одни болезни, в других – другие [5].

Проявлению болезни предшествует заражение растения и это, в основном, происходит несколькими путями:

- инфицирование растения от больных семян;
- инфицирование от почвы через подземное междоузлие или корневую систему;
- инфицирование воздушно-капельным путем или переносчиками [1].

Нарушение какого-либо из этих факторов или их комплекса ведет к накоплению в почве факультативных сапротрофов и снижению антифитопатогенной части. Это усиливает вредоносность возбудителей прикорневых и корневых гнилей, поэтому защита от них на первых этапах онтогенеза растений важна для получения высоких и стабильных урожаев.

Протравливание семян позволяет свести к минимуму применение фунгицидов при сохранении достаточно высоких уровней химической и экологической эффективности. Протравливание семян обеспечивает 15–70-кратную окупаемость затрат [2].

Характерные признаки болезни – поражение первичных и вторичных корней, подземного междоузлия, эпикотилия и основания стебля. Болезнь вызывает гибель всходов, отмирание продуктивных стеблей и белоколосость. Развитию болезни способствует комплекс биотических и абиотических факторов, ослабляющих растения [6].

**Обыкновенная корневая гниль.** Самое распространенное заболевание во многих районах возделывания зерновых культур. Возбудитель – гриб *Bipolaris sorokiniana* Shoem. (*Drechslera sorokiniana* Subram. Et Jain. *Helminthosporium sativum* Pam.). У всходов происходит побурение основания стебля и влагалище 1-го листа, и далее всходы часто погибают.

У взрослых растений происходит поражение основания стебля; они начинают отставать в росте, колос не выходит. На листьях образуются темные, а позже – бурые или светло-бурые, слегка удлиненные пятна с темной каймой. Со временем пятна покрываются оливково-бурым или черно-серым налетом [5].

**Фузариозная корневая гниль,** как и обыкновенная, может быть причиной отмирания проростков до достижения ими поверхности почвы. Она вызывает побурение первичных и вторичных корней, подземного междоузлия и основания стебля. На этих органах растений сначала появляются бурые или коричневые штрихи либо полосы, которые затем разрастаются и часто сливаются и окольцовывают их. Побурение основания стебля обычно обнаруживается в начале цветения и значительно увеличивается к уборке урожая. Во влажную погоду в местах поражений появляется розовый налет. В период вегетации болезнь вызывает изреживание посевов и отмирание продуктивных стеблей. Часть пораженных стеблей образует недоразвитый колос с щуплым зерном, а иногда остается пустоколосым.

Возбудителями фузариозной корневой гнили являются *Fusarium* Link. Наиболее часто встречаются *F. avenaceum* Saccardo, *F. culmorum* Saccardo, *F. graminearum* Shwabe, *F. gibbosum* Appel et Wollenweber, *F. oxysporum* Schlechtberg, *F. solani* Appel et Wollenweber и некоторые другие [5].

**Церкоспореллезная корневая гниль.** Вызывает почернение и отмирание корней, колеоптиля, но



наиболее характерно проявляется на нижнем основании стеблей, иногда на подземном междоузлии и влагищах листьев в виде эллипсовидных пятен. На наружной поверхности листовых влагищ, на уровне почвы или несколько выше того места, где возбудитель проникает в соломину, появляются эллиптические участки бурой пораженной ткани длиной 0,5–2,5 см.

Места внедрения патогена имеют вид эллиптических изъявлений на соломине. Центр изъявления занимает темная строма гриба, в связи с чем заболевание получило название «глазковая пятнистость стеблей». Если строма гриба широко распространяется, основные соломины кажутся обугленными, а не блестящими и гладким, как при офиоболозе. При сильном развитии болезни изъявления опоясывают стебель. Возбудитель церкоспореллезной гнили – *Pseudocercospora herpotrichoides*, порядок Nuyphomycetales [5].

**Офиоболезная корневая гниль.** Возбудитель – сумчатый гриб *Orhiobolus graminis* Sacc. В фазе полных всходов гриб вызывает гибель растений, а в период колошения – отмирание продуктивных стеблей, карликовость и белостебельность. На полях можно обнаружить светлые плешины или очаги. На побуревшем стебле и листовых влагищах появляются черные точки – псевдотеции гриба, в которых формируются сумки с сумкоспорами. Образуется щуплое зерно. Продуктивность пораженных растений снижается на 40% и более [6].

**Методика исследований.** Исследования проводили в 2012–2014 гг. в лаборатории химической защиты растений Оренбургского ГАУ, полевые опыты – в Оренбургском НИИСХ Оренбургской района. Для проведения полевых и лабораторных опытов использовался сорт яровой мягкой пшеницы «Учитель». Опыты закладывались согласно методике полевого опыта Б.А. Доспехова [3].

В производственных условиях опыт закладывался на опытных делянках, размер опытной делянки со-

ставлял для протравителей 4,2 × 100 м. Перед посевом семена протравливали с помощью машины ПК-20.

Из большого числа протравителей, разрешенных к применению (Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2012), на опытном поле Оренбургском НИИСХ и в лаборатории химической защиты растений изучались следующие варианты:

1. Контроль
2. ТМТД Плюс, КС (400 г/л тирама) 2 л/т
3. Бункер, ВСК (60 г/л Тебуконазол) 0,5 л/т
4. ТМТД плюс+Бункер 1,2 л/т

Лабораторные опыты проводились в 3-х повторностях, семена проращивали в песке (глубина заделки 1 см). Промеры длины зародышевых корней, колеоптиля, стеблей проводили у 25 типичных растений в каждом повторении, после предварительной отмывки их от песка, в каждом повторении определяли массу проросших растений. Корневую гниль определяли визуально, просматривая все взошедшие растения в опыте.

Распространенность и развитие корневой гнили учитывается трижды за вегетационный период: в фазу кущения, колошения и восковой спелости. Интенсивность поражения определяют по условной шкале и выражают в баллах: 0 – отсутствие болезни; 1 балл (25% поражения) – слабое побурение колеоптиля, гипокотилиа и корней; 2 балла (50% поражения) – сильное побурение гипокотилиа с точечными некрозами, переходящими на узел кущения и основание стебля, угнетения развития продуктивных стеблей; 3 балла (75% поражения) – сильное побурение гипокотилиа с обширными некрозами, побурения узла кущения и основания стебля, резкое снижение продуктивности; 4 балла (100% поражения) – гибель или пустоколосость растений [4]. Результаты анализа представлены в табл. 1.

Динамика изменений развития и распространенности возбудителя корневой гнили *Bipolaris sorokiana* отображена на рис. 1.

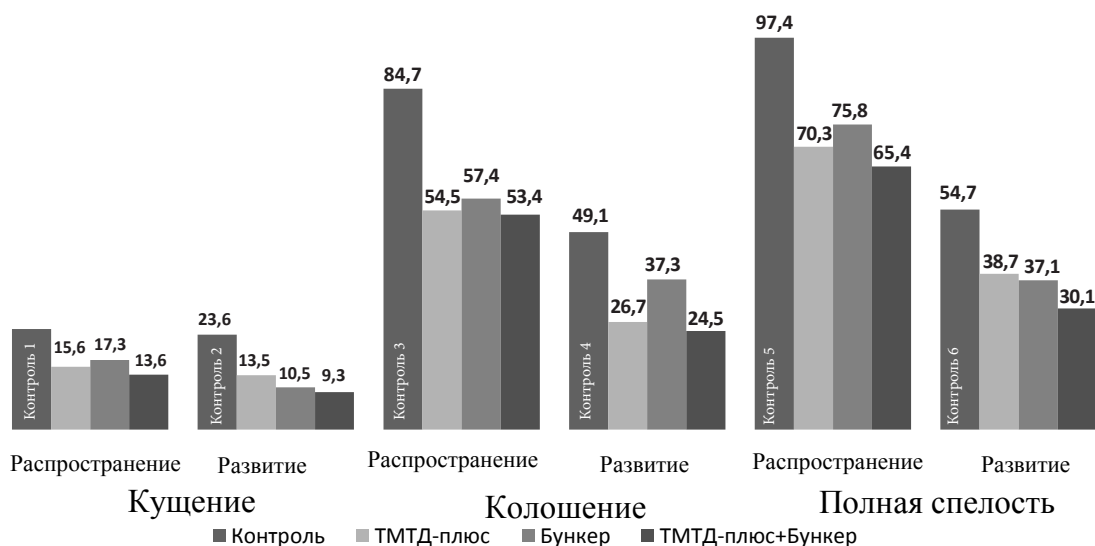


Рис. 1. Влияние препаратов на распространенность и развитие корневой гнили яровой мягкой пшеницы (Оренбургский НИИСХ, среднее 2011–2013 г.)

Табл. 1. Влияние препаратов на распространенность и развитие корневой гнили яровой мягкой пшеницы (Оренбургский НИИСХ, среднее 2011–2013 г.)

Вариант опыта	Распространение (Р) и развитие (R) корневой гнили, %					
	кущение		цветение		полная спелость	
	Р	R	Р	R	Р	R
Контроль	25,0	23,6	84,7	49,1	97,4	54,7
ТМТД Плюс	15,6	13,5	54,5	26,7	70,3	38,7
Бункер	17,3	10,5	57,4	37,3	75,8	37,1
ТМТД Плюс + Бункер	13,6	9,3	53,4	24,5	65,4	30,1

Результаты исследования показывают, что вариант ТМТД-плюс+Бункер наиболее эффективно снижают фитопатогенную активность возбудителя корневой гнили. Распространенность корневой гнили в фазу кущения –13,6%, в фазу колошения – 53,4%, фазу восковой спелости – 65,4%. Развитие в фазу кущения

составляет – 9,3%, фазу колошения – 24,5%, фазу восковой спелости – 30,1%.

#### Список литературы

1. Глинушкин А.П. Фитопатогенный комплекс пшеницы и меры борьбы с ним. Дис. ...д. с.-х. н. М. 2013: 336 с.
2. Глинушкин Алексей Павлович. Эффективность применения биологических и химических препаратов в комплексной защите яровой пшеницы от болезней в Оренбургском Предуралье. Дис. ... канд. биол. наук: Оренбург. 2004: 219 с.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд. доп. и перераб. М.: Агропромиздат, 1985: 351 с.
4. Лухменев В.П. Фитопатология: Учебное пособие. Оренбург: Изд. центр ОГАУ, 2012: 342 с.
5. Пересыпкин В. Ф. Болезни сельскохозяйственных культур: в 3-х тт. Т. 1. Болезни зерновых и зернобобовых культур. К.:Урожай. 1989: 216 с.
6. Шкаликов В.А., Белошапкина О.О., Букреев Д.Д. и др. Защита растений от болезней. Под ред. В. А. Шкаликова – 2-е изд., испр., и доп. М.: КолосС, 2003: 255 с.

## АРОМАТНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ГРИБОВ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИХ БИОСИНТЕЗА

Власенко Е. Н.

Украинский государственный химико-технологический университет, Днепрпетровск

В настоящее время душистые и ароматные вещества широко используются в производстве парфюмерных изделий, косметической продукции как ароматизаторы синтетических моющих средств и пищевой продукции. В последние годы все большее внимание исследователей привлекают высшие грибы как продуценты ароматных веществ.

По последним данным, уже выделено и идентифицировано более 250 органических веществ, ответственных за формирование различных оттенков аромата грибов [1]. По химической природе душистые вещества принадлежат к различным классам органических соединений, среди которых преобладают терпеновые углеводороды и их кислородсодержащие производные – эфиры, спирты, альдегиды и кетоны. К веществам, имеющим характерный «грибной» аромат, относятся алифатические спирты и кетоны с числом атомов углерода 8: 1-октен-3-ол, 2-октен-1-ол, 3-октанол, 1-октанол, 1-октен-3-он и 3-октанон. Эти соединения обладают оттенками запаха сырых грибов, относятся к «ключевым» соединениям и в различных количественных соотношениях встречаются во многих видах грибов [2].

Существуют также особые ароматные вещества, характерные только для одного из видов грибов или близкородственных видов, которые и формируют неповторимый аромат именно этого вида. К таким веществам относится, например, лентионин, формирующий своеобразный аромат *Lentinus edodes*. Но чаще всего на образование характерного запаха каждого

вида грибов влияет целая группа летучих веществ, причем предельная концентрация некоторых из них бывает настолько низкой, что их не удастся идентифицировать с помощью современных методов анализа.

Биологическая роль летучих душистых веществ грибов еще окончательно не установлена. Считают, что их функция состоит как в отпугивании вредителей, так и в привлечении насекомых для размножения посредством распространения спор. Летучие вещества способны проникать в воздушные поры почвы и распространяться на значительные расстояния, тем самым обеспечивая защиту субстратного мицелия от патогенных организмов. Установлено, что обработанное 1-октен-3-олом («грибным спиртом») растение *Arabidopsis thaliana* становится устойчивым к возбудителю серой гнили растений *Botrytis cinerea* [1].

Выделение летучих веществ грибами может быть эффективным способом защиты от поедания. Например, 1-октен-3-ол, выделяемый грибом *Clitopilus prunulus*, предотвращает поедание грибов банановым слизнем *Ariolimax columbianus* [3]. Некоторые грибные душистые вещества аналогичны выделяемым цветковыми растениями и выполняют функцию привлечения насекомых.

Пути биосинтеза летучих душистых веществ в грибах мало изучены. Считается, что они могут быть как продуктами первичного, так и вторичного метаболизма. Различные пути образования душистых летучих веществ достаточно подробно изучены и описаны на примере растений. Ввиду некоторого сходства в струк-

турных и функциональных особенностей строения растительных и грибных клеток, вполне вероятным является и сходство путей образования вторичных метаболитов в растительных и грибных организмах. Большинство летучих веществ растений происходит от насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Это ненасыщенные спирты, альдегиды, кетоны, кислоты, эфиры и лактоны, встречающиеся повсеместно у растений в достаточно высоких концентрациях.

Они образуются тремя путями: липоксигеназным (рис. 1), α-окислением и β-окислением. Душистые вещества изопреноидной природы образуются мевалонатным путем (рис. 2). Возможен также путь синтеза душистых веществ из аминокислот [4].

Жирные кислоты запасаются в клетках в виде триацилглицеридов, поэтому сначала происходит ферментативное окислительное расщепление липидов. Затем следует ферментативное преобразование

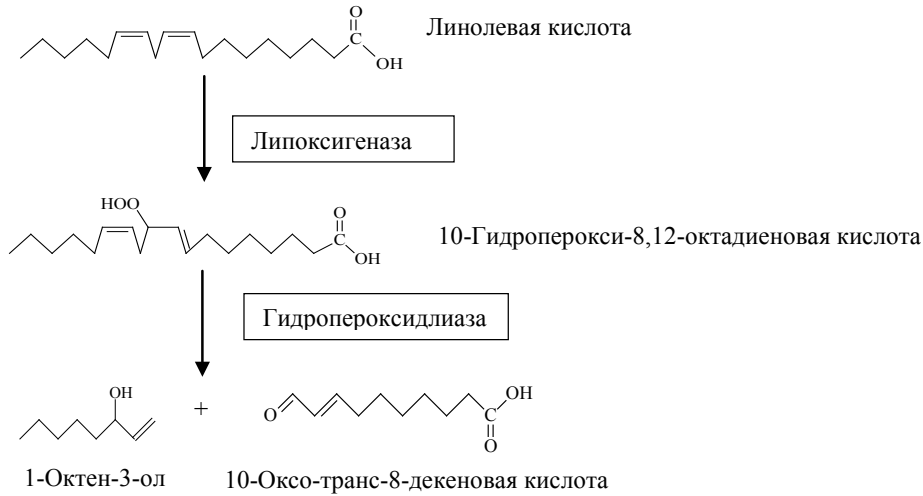


Рис. 1. Липоксигеназный путь окисления жирных кислот.

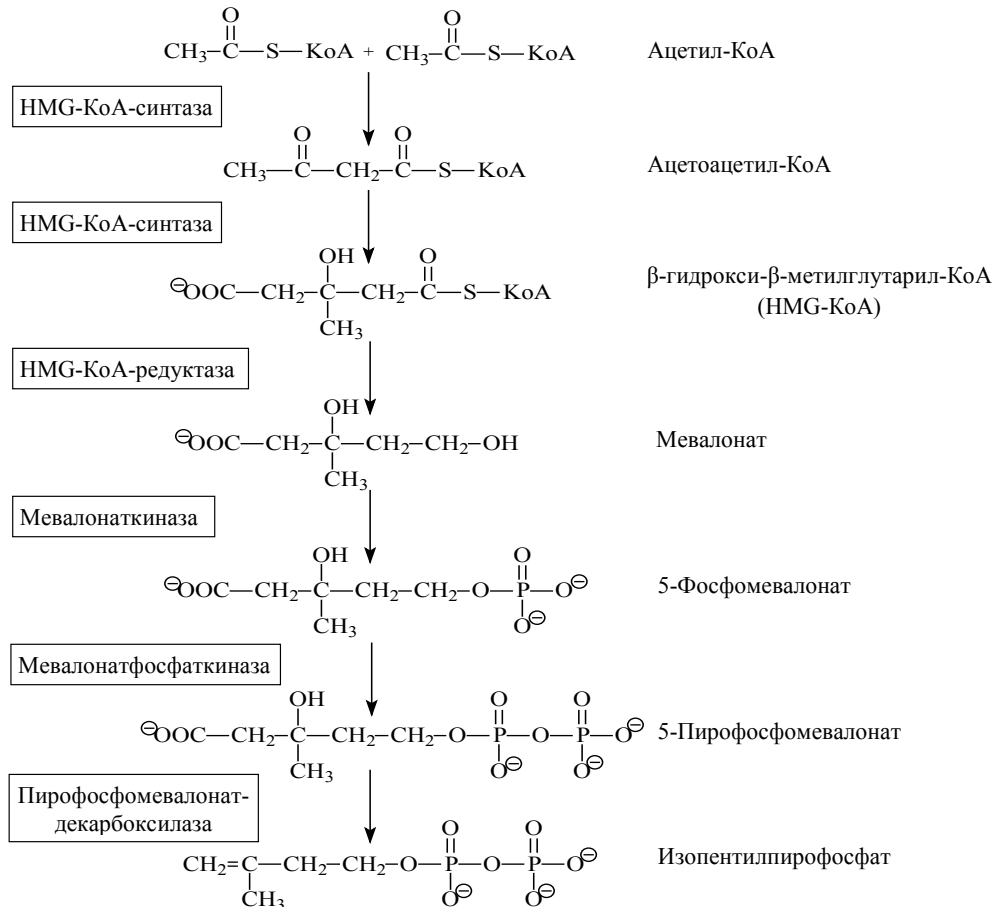


Рис. 2. Мевалонатный путь синтеза изопентилпирофосфата.

жирных кислот в насыщенные и ненасыщенные альдегиды и спирты. Известно, по крайней мере, 3 фермента, участвующих в липоксигеназном пути: липоксигеназа (LOX), гидропероксидлиаза (HPL) и алкогольдегидрогеназа (ADH) [4].

Липоксигеназы – семейство негемовых железо-содержащих диоксигеназ, которые катализируют окисление ненасыщенных жирных кислот, содержащих один или несколько (Z,Z)-1,4-пентадиеновых фрагментов [5].

Гидропероксидлиазы относятся к семейству цитохромов P450 и являются гемопротеидами. Они обладают различными типами ферментативной активности, зачастую малой субстратной специфичностью, участвуют в окислении многочисленных соединений.

Алкогольдегидрогеназы – ферменты класса дегидрогеназ, катализирующие окисление спиртов и ацеталей до альдегидов и кетонов в присутствии НАД, являются димерами и содержат ион цинка  $Zn^{2+}$ .

$\alpha$ -Окисление жирных кислот происходит в цитоплазме растительных клеток, в нем участвуют пероксидаза жирной кислоты, которая с участием пероксида водорода катализирует окислительное декарбоксилирование жирной кислоты с образованием альдегида, и дегидрогеназа альдегидов жирных кислот, имеющая в качестве кофермента нуклеотидную группировку НАД и участвующая в присоединении кислорода к  $\alpha$ -углеродному атому альдегида жирной кислоты. В результате  $\alpha$ -окисления углеродная часть жирной кислоты становится короче на один углеродный атом.

$\beta$ -Окисление жирных кислот осуществляется в митохондриях с помощью ферментов ацил-КоА-синтетазы, ацил-КоА-дегидрогеназы, 3-оксоацил-КоА-дегидрогеназы, ацил-КоА-тиолазы и приводит к образованию фрагмента жирной кислоты, укороченного на два углеродных атома, и молекулы ацетил-КоА.

Алифатические кислоты с числом атомов углерода до 10-ти играют важную роль в формировании запаха как растений, так и грибов, придавая острые, сливочные или сырные оттенки. Они также могут выступать субстратами для биосинтеза других летучих веществ, таких как алифатические альдегиды и спирты [4].

Вторичные метаболиты изопреноидной природы образуются в цитоплазме растительных клеток из ацетил-КоА по мевалонатному пути, в результате чего образуется изопентилпирофосфат, который является структурным мономером всех душистых веществ терпеновой природы. Промежуточными продуктами мевалонатного пути являются ацетоацетил-КоА,  $\beta$ -гидрокси- $\beta$ -метилглутарил-КоА (HMG-КоА), мевалонат, 5-фосфомевалонат и 5-пирофосфомевалонат. Ключевые реакции мевалонатного пути катализируют мевалонаткиназа и мевалонатдифосфатдекарбоксилаза, которые по структурному подобию относятся к семейству GNMP-киназ.

Существует также альтернативный (немевалонатный) путь образования изопентилпирофосфата, протекающий в пластидах растительных клеток. Предшественниками этого пути являются пируват и D-глицеральдегид-3-фосфат, а точные подробности прохождения цепи реакций их превращения в изопентилпирофосфат до сих пор не ясны [6].

Наличие терпеноидов обуславливает характерные фруктовые, цитрусовые и цветочные ноты запаха [4].

Изучение и определение основных метаболических путей грибов, обеспечивающих образование летучих душистых веществ, установление структуры предшественников, ключевых ферментов и промежуточных метаболитов позволит решить важную проблему, возникающую при промышленном культивировании съедобных грибов, а именно – отсутствие или значительное изменение характерного грибного аромата. Особенно остро эта проблема ощущается при глубинном культивировании макромицетов. При осуществлении этого процесса, вероятно, блокируются определенные стадии биосинтетических процессов в грибных клетках из-за отсутствия или недостаточного содержания в жидкой питательной среде веществ, необходимых для синтеза или активации ферментов этих метаболических путей. Некоторые экспериментальные исследования в этой области показали возможность усиления характерного грибного запаха при добавлении в питательную среду для глубинного культивирования биогенных добавок, таких как лецитиновая эмульсия, дрожжевой экстракт, экстракт из проростков ячменя, молочная сыворотка [7].

Решение проблемы образования грибного аромата позволит в процессе крупномасштабного глубинного культивирования получать биомассу высших грибов, которую можно будет использовать не только как качественную пищевую добавку с характерным грибным ароматом, но и в качестве сырья для получения летучих душистых веществ, которые обладают фунгицидными, инсектицидными и бактерицидными свойствами.

#### Список литературы

1. Morath SU, Hung R, Bennet JW. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal biol rev.* 2012; 26: 73-83.
2. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. и др. Изменения в составе летучих компонентов при хранении сухих белых грибов (*Boletus edulis*). *Химия растительного сырья.* 2008. №4. - С.113-118.
3. Wood WF, Archer CL, Largent DL. 1-Octen-3-ol, a banana slug antifeedant from mushrooms. *Biochem Syst Ecol.* 2001; 29(5): 531-3.
4. Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* 2008; 54(4): 712-32. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03446
5. Голованов А.Б., Мягкова Г.И., Гроза Н.В. Липоксигеназное окисление жирных кислот в растениях. *Химия и технология лекарственных препаратов и биологически активных веществ.* 2008; 3(6): 26-33.
6. Хелдт Г.-В. *Биохимия растений.* М.: Бином. Лаборатория знаний. 2011: 471 с.
7. Власенко К.М., Кузнецова О.В., Малиновська Н.В. Застосування біогенних домішок для поліпшення грибного аромату *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. при глибинному культивуванні. «Біотехнологія: звершення та надії». *Мат. III Всеукр. науково-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених.* Київ, 2014: 67.

**Национальная академия микологии**  
ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

## **СОВРЕМЕННАЯ МИКОЛОГИЯ В РОССИИ**

Current Mycology in Russia

Том 5

Выпуск 5.

**Сельскохозяйственная  
микология—II**

Глава 11.

**Фунгициды и биопестициды**

Глава 12.

**Микотоксины и безопасность кормов**

Volume 5

Issue 5.

**Fungal problems in agriculture  
Part II**

Chapter 11.

**Fungicides and biopesticides**

DOI:10.14427/cmr.2015.v.11

Chapter 12.

**Mycotoxins in grain and livestock feed**

DOI: 10.14427/cmr.2015.v.12

## Содержание Выпуска 5

### Глава 11. Фунгициды и биопестициды

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНГИЦИДОВ ПРОТИВ РЖАВЧИНЫ ГОРОХА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В УСЛОВИЯХ ПОЛЕВОГО ЭКСПЕРИМЕНТА Аршава Н.В., Божко К.Н., Щедрин В.А., Желтова Е.В., Каракотов С.Д. ....	171
МЕХАНИЗМ И СПЕКТР АНТИФУНГАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ БИОФУНГИЦИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ РОДОВ <i>FUSARIUM</i> И <i>PYRENOPHORA</i> Асатурова А.М., Павлова М.Д., Сидорова Т.М., Дубяга В.М. ....	173
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ ФИЛЛОСФЕРЫ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ Берестецкий А.О., Инюшева В.В., Полуэктова Е.В., Сокорнова С.В., Степаныхева Е.А. ....	175
ПОЧВЕННЫЙ СТРЕПТОМИЦЕТ <i>STREPTOMYCES NETROPSIS</i> – ПРОДУЦЕНТ ВЕЩЕСТВ ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ Белявская Л.А., Ефременкова Е.В., Зенкова В.А., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. ....	175
СРАВНИТЕЛЬНАЯ АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА 2-БЕНЗИМИДАЗОЛИЛКАРБАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ЕГО ГИДРОХЛОРИДА И ТЕБУКОНАЗОЛА В ОТНОШЕНИИ АНТРОПОЗОО- И ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ Чикишева Г.Е., Медведев Ю.А. ....	177
ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МЕТАБОЛИТНЫЕ ПРОФИЛИ И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ГРИБА <i>ALTERNARIA SONCHI</i> – ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МИКОГЕРБИЦИДА ДЛЯ БОРЬБЫ С ОСОТОМ ПОЛЕВЫМ Далинова А.А., Волосатова Н.С., Иванова А.Н., Сазоненкова Я.А., Салимова Д.Р., Берестецкий А.О. ....	178
НОВЫЙ КОМБИНИРОВАННЫЙ ФУНГИЦИД ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР ОТ НИЗШИХ ГРИБОВ Долженко В.И., Ишкова Т.И., Кунгурцева О.В., Силаев А.И. ....	179
ПОИСК НОВЫХ АНТИМИКОТИКОВ Дробин Ю.Д., Фетисов Л.Н., Морковник А.С., Диваева Л.Н., Зубенко А.А., Русанов В.А., Солдатенко Н.А., Коваленко А.В., Бодряков А.Н. ....	181
ОЦЕНКА АНТИФУНГАЛЬНОГО ЭФФЕКТА ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ МИКРОМИЦЕТОВ И НАНОЧАСТИЦ АНАЛЬЦИМА ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИТОПАТОГЕНАМ РОДА <i>FUSARIUM</i> Элланская Н.Э., Заименко Н.В., Дидык Н.П., Юношева Е.П. ....	182
СКРИНИНГ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА <i>BACILLUS</i> -АКТИВНЫХ АНТАГОНИСТОВ ФИТОПАТОГЕНОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ И ГРИБНОЙ ПРИРОДЫ Грабова А.Ю., Драговоз И.В., Крючкова Л.А., Авдеева Л.В. ....	184
ДЕЙСТВИЕ ФУНГИЦИДОВ НА <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> SCHW Гришечкина Л.Д. ....	186
РАЗРАБОТКА НОВОГО БИОФУНГИЦИДА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ РОДА <i>FUSARIUM</i> Хомяк А.И., Жевнова Н.А., Асатурова А.М. ....	187
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИЧЕСКИХ ФУНГИЦИДОВ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГРИБНЫХ ИНФЕКЦИЙ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ Кутузова И.А., Григорович И.А., Побединская М.А., Фарукшина К.Т., Еланский С.Н. ....	190
СОВРЕМЕННЫЕ ФУНГИЦИДЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ КАРТОФЕЛЯ ОТ БОЛЕЗНЕЙ Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Сметанина Т.И. ....	192
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ Маслиенко Л.В., Холод Н.А., Ковчигина М.А. ....	194
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ПАРШИ И МУЧНИСТОЙ РОСЫ ЯБЛОНИ Маслиенко Л.В., Якуба Г.В., Ковчигина М.А. ....	195
АНТИФУНГАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОМИЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ СЕРЕБРА И СЕРЫ НА ПАТОГЕННЫЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ Массалимов И.А., Медведев Ю.А., Зайнитдинова Р.М., Янахметов М.Р. ....	197
ОПЕРАТИВНОЕ РЕШЕНИЕ ЗАЩИТЫ КАРТОФЕЛЯ ОТ КОМПЛЕКСА РАСПРОСТРАНЕННЫХ И ВРЕДНОСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ Мельникова Е.С., Мелькумова Е.А. ....	198
ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕРБИЦИДНОГО МЕТАБОЛИТА, ОБРАЗУЕМОГО ГРИБОМ <i>RHOMA</i> SP. N19 Полуэктова Е.В., Большакова К.П., Берестецкий А.О. ....	199

СКРИНИНГ ФУНГИЦИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ОТ ФОМОЗА В ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКАХ БЕЛАРУСИ Середич М.О., Ярмолевич В.А., Дишук Н.Г. ....	200
АНТАГОНИЗМ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ МОЛДОВЫ ГРИБОВ РОДА <i>PENICILLIUM</i> К ФИТОПАТОГЕНАМ Сырбу Т.Ф. ....	202
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНГИЦИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕМЛЯНИКИ К БОТРИТИОЗУ Скрипникова Е.В., Скрипникова М.К., Чиркин А.М. ....	204
ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ Сокорнова С.В., Матвеева Т.В., Гасич Е.Л., Полуэктова Е.В. ....	206
ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИЙ ФУНГИЦИДНЫХ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ И СПОСОБОВ ОСНОВНОЙ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ НА КОМПЛЕКС ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОРНЕЕДА И ПРОДУКТИВНОСТЬ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ Стогниенко О.И., Шамин А.А. ....	207
АНТИФУНГАЛЬНЫЕ НАНОБИОКОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЕНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ И НАНОМАТЕРИАЛОВ ТИПА МУНТ ТАУНИТ И ПОЛИПИРРОЛ Тимофеева А.В., Ильина М.В., Баратова Л.А, Катруха Г.С. ....	210
ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ГРИБОВ РОДА <i>ALTERNARIA</i> Торопова Е.Ю., Кириченко А.А. ....	212
ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ГРИБА – АНТАГОНИСТА <i>TRICHODERMA SP. IZR D-11</i> Войтка Д.В., Юзефович Е.К. ....	214
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ Зачиняев Я.В., Зачиняева А.В. ....	217
ВЛИЯНИЕ РЕАЛЬДИРОНА И ОКСИМЕТИЛУРАЦИЛА НА ФУНГИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ Муфазалова Н.А., Муфазалова Л.Ф., Мухаметзянова А.Я., Батракова К.В. ....	218

## Глава 12. Микотоксины и безопасность кормов

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ МИКОТОКСИКОЗАХ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ВНЕСЕНИЕМ В РАЦИОН КОМПЛЕКСА ИЗ ЭНТЕРОСОРБЕНТА ПОЛИСОРБА ВП, ПОЛИМИНЕРАЛЬНЫХ ПОДКОРМОК ПМП-2 И РУМЕНОСАНА Агольцов В.А., Попова О.М. ....	219
ИЗУЧЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОХРАТОКСИНОМ А И ФУМОНИЗИНАМИ ПРОДУКТОВ ПРИКОРМА В 2010–2014 гг. Аксенов И.В., Седова И.Б. ....	221
МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ЗЕРНА ОВСА И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ Буркин А.А., Кононенко Г.П., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю. ....	221
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АЛЬТЕРНАРИОЛА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ Буркин А.А., Кононенко Г.П. ....	223
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА ТРАМЕТИН НА ОСНОВЕ <i>TRAMETES PUBESCENS</i> (SHUMACH.:FR.) <i>PILAT.</i> В БИОТЕХСИСТЕМАХ В БОРЬБЕ С САЛЬМОНЕЛЛЁЗОМ ТЕЛЯТ И ПОРОСЯТ Чхенкели В.А., Анисимова А.В. ....	225
ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ КОНЪЮГАТОВ ОХРАТОКСИНА А. Дюсенова Г.Т. ....	227
ОБОСНОВАНИЕ ПДК ТОКСИКАНТОВ ТЕХНОГЕННОГО И ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ СОЧЕТАННОМ ОТРАВЛЕНИИ ЖИВОТНЫХ Егоров В.И., Папуниди Э.К. ....	228
МИКРОМИЦЕТЫ И МИКОТОКСИНЫ В КОРМОВЫХ СЕЯНЫХ ТРАВАХ Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Кононенко Г.П., Буркин А.А. ....	230
УТОЧНЕНИЕ МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ГРИБОВ <i>FUSARIUM EQUISETI</i> , <i>F. HETEROSPORUM</i> И <i>F. INCARNATUM</i> Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П. ....	232
АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВА ГРИБОВ-ХИТРИДИОМИЦЕТОВ В РУБЦЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Филиппова В.А., Никонов И.Н. ....	234
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ МИКОТОКСИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР Иванов А.А., Папуниди К.Х., Самсонов А.И., Плотникова А.М., Семёнов Э.И., Трмасов М.Я., Матросова Л.Е. ....	235

ПОКАЗАТЕЛИ ГОМЕОСТАЗА ОВЕЦ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ Т-2 ТОКСИНА В МАЛЫХ ДОЗАХ Кадиков И.Р. ....	237
О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ГИСТОМОРФОЛОГИИ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ С КОРМОМ ЗЕАРАЛЕНОНА Карапегян А.Ф. ....	238
СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА СВИНЕЙ ПРИ ИНВАЗИИ <i>BALANTIDIUM COLI</i> Карпеева Е.А., Ильина Н.А. ....	240
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГУМАТА ЖЕЛЕЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИКОТОКСИКОЗА Хусаинов И.Т., Гаврилов С.Г., Валиев А.Р., Канарская З.А., Семёнов Э.И., Папуниди К.Х. ....	241
КОРМОВАЯ ДОБАВКА МИКОСОРБ В РАЦИОНАХ САМОК И МОЛОДНЯКА НОРОК Лоенко Н.Н., Чернова И.Е. ....	242
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ АФЛАТОКСИКОЗА ПОРОСЯТ РЕТИНОЛА АЦЕТАТОМ Мухарлямова А.З., Тремасов М.Я. ....	243
ВЗАИМОВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА А И АФЛАТОКСИНА В1 Мухарлямова А.З. ....	244
ДИНАМИКА ГРИБОВ РОДА <i>CANDIDA</i> В ЭНТЕРОБИОЦЕНОЗЕ ТЕЛЯТ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИНБИОТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ Николаева О.Н., Андреева А.В. ....	246
ВИДЫ СЕМЕЙСТВА MUCORACEAE В КОРМАХ Пирызева Е.А. ....	247
ВЛИЯНИЕ КОРМОВЫХ МИКОТОКСИКОЗОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА МЯСА И ИХ КОРРЕКЦИЯ ВНЕСЕНИЕМ В РАЦИОН КОРОВ КОМПЛЕКСА ИЗ ЭНТЕРОСОРБЕНТА ПОЛИСОРБА ВП, ПОЛИМИНЕРАЛЬНЫХ ПОДКОРМОК ПМП-2 И РУМЕНОСАНА Попова О.М., Агольцов В.А. ....	247
ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК ОРГАНОВ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ПОРОСЯТ ДИОКСИНОМ, Т-2 ТОКСИНОМ И ЛЕЧЕНИИ Сайтов В.Р., Идиятов И.И., Папуниди К.Х., Кадиков И.Р. ....	249
ДОСТИЖЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ МИКОЛОГИИ И ПРОБЛЕМЫ УСТОЙЧИВОГО РАЗВИТИЯ ЖИВОТНОВОДСТВА В ЕВРОСОЮЗЕ Саркисов К.А., Коваленко К.Н. ....	250
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ МИКОТОКСИНОВ В КОРМАХ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА Комаров А.А., Метальников П.С., Панин А.Н., Селимов Р.Н. ....	251
КОНТАМИНАЦИЯ ЗЕРНА, СОЛОМЫ И ПОЖНИВНЫХ ОСТАТКОВ МИКОТОКСИНАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕХНОЛОГИИ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ Солдатенко Н.А., Дробин Ю.Д., Русанов В.А., Фетисов Л.Н., Бокун Е.А., Сухих Е.А. ....	252
МИКОТОКСИКОЗЫ И СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ БОРЬБЫ С НИМИ Тремасова А.М. ....	253
Т-2 ТОКСИКОЗ ТЕЛЯТ: РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ Тремасов М.Я., Тремасова А.М., Папуниди К.Х. ....	255
МОНИТОРИНГ МИКОТОКСИНОВ В ПИЩЕВОЙ ЦЕПИ Тремасов М.Я., Папуниди К.Х., Семенов Э.И., Иванов А.В. ....	256
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОЙ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТРИХОФИТИИ И МИКРОСПОРИИ ЛОШАДЕЙ Умитжанов М., Боранбаева Р.С. ....	257
РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФОРМАТОВ ЭКСПРЕССНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. ....	259
СКРИНИНГ СРЕДСТВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ПРИ Т-2 МИКОТОКСИКОЗЕ Валиев А.Р., Семенов Э.И., Хусаинов И.Т., Спиридонов Г.Н., Тремасов М.Я. ....	259
МИКОТОКСИНЫ В СИЛОСЕ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ОПАСНОСТЬ ВОЗНИКНОВЕНИЯ МИКОТОКСИКОЗОВ У КОРОВ Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Филиппова В.А., Никонов И.Н. ....	263
РАЗРАБОТКА МЕТОДА БИОКОНТРОЛЯ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РОСТА ОХРАТОКСИГЕННЫХ ГРИБОВ ИЗ СЕКЦИИ <i>ASPERGILLUS NIGRI</i> В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ ИЗЮМА Григорян К.М., Акопян Л.Л., Саргсян М.П. ....	264



# Глава 11.

## Фунгициды и биопестициды

doi: 10.14427/cmr.2015.v.11

### АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНГИЦИДОВ ПРОТИВ РЖАВЧИНЫ ГОРОХА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В УСЛОВИЯХ ПОЛЕВОГО ЭКСПЕРИМЕНТА.

Аршава Н.В., Божко К.Н., Щедрин В.А., Желтова Е.В., Каракотов С.Д.  
АО «Щелково Агрохим», Щелково. Московская область.

Цель работы – изучение влияния фунгицидов на основе различных действующих веществ химического происхождения на развитие ржавчины гороха, вызванной фитопатогенным грибом *Uromyces pisi-sativi*. Эффективность фунгицидов оценивалась по количеству накопившегося в растениях ДНК патогена с использованием ПЦР в реальном времени.

Эксперимент проводился в Орловской области, на посевах гороха (*Pisum*), ежегодно поражающихся ржавчинными грибами. Заболевание проявляется в середине лета на листьях и стеблях в виде оранжево-коричневых пустул – урединий с урединиоспорами. Споры распространяются при помощи ветра. К концу лета появляются темно-коричневые телии с телиоспорами. Листья засыхают и опадают, бобы недоразвиваются. Недобор урожая гороха может достигать 25–30%. Также поражаются растения родов чина (*Lathyrus*) и вика (*Vicia*) семейства бобовых (*Fabaceae*). Развитию ржавчины способствуют частые осадки, обильные росы и температура воздуха 20–25 °С.

Выбор хозяйства связан с наличием в нем стабильно высокого ржавчинного инфекционного фона. В его производственных посевах на протяжении последних лет доминирует восприимчивый к ржавчине безлисточковый сорт гороха Фараон селекции ВНИИ ЗБК (г. Орел). Инфицирование анализируемых посевов может быть вызвано несколькими факторами. Во-первых, весной 2014 г. высевались семена, полученные в крайне неблагоприятной по эпифитотийной обстановке 2013 г., когда наблюдалось 100%-ное поражение гороха ржавчиной. Во-вторых, источником инфицирования могли послужить растительные остатки с прошлогодних полей гороха, на которых перезимовало колоссальное количество телиоспор, базидиоспоры с которых способны переноситься ветром на большие расстояния. И наконец, не исключена передача патогена с сельхозорудиями при обработке почвы, на колесах транспортных средств и пр.

По симптоматике патоген отнесен к ржавчинным грибам рода *Uromyces* (систематическое положение – Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Pucciniomycotina; Pucciniomycetes; Pucciniales; Pucciniaceae). Заболевание на горохе вызывают три базидиальных гриба этого рода – *Uromyces pisi*, *Uromyces pisi-sativi* и *Uromyces fabae* (*U. viciae-fabae*). Для более точной видовой идентификации фитопатогена использовали тест-системы, разработанные в лаборатории молекулярной диагностики ИБХ РАН. Три пары праймеров и три зонда, меченные флуоресцентными красителями, дают

возможность получения количественных результатов реакции в реальном времени. Было показано, что ржавчину гороха в хозяйстве вызывает гриб *U. pisi-sativi*. Поэтому в ходе эксперимента уровень заболеваемости растений гороха оценивался с использованием тест-системы для диагностики *U. pisi-sativi*. Несмотря на то, что остальные представители *Uromyces* в формировании патологического процесса не участвуют, их наличие проверялось на протяжении всего эксперимента. Результат был неизменно отрицательный.

Для изучения влияния фунгицидов на развитие ржавчины гороха были выбраны препараты системного действия, в состав которых входят ингибиторы биосинтеза эргостерина:

1. Титул 390, ККР – концентрат коллоидного раствора, содержащий 390 г/л пропиконазола, предназначен для борьбы с широким спектром болезней на посевах зерновых культур, сахарной свеклы, рапса, райграса пастбищного, костреца безостого, овсяницы луговой, на черной смородине, винограде, а также на клевере луговом.

2. Титул Дуо, ККР – концентрат коллоидного раствора, содержащий 200 г/л пропиконазола и 200 г/л тебуконазола, предназначен для борьбы с широким спектром болезней на посевах зерновых культур.

3. Медея, МЭ – микроэмульсия, содержащая 60 г/л дифеноконазол и 30 г/л флутриафол, предназначена для защиты садов и виноградников.

4. Триада, ККР – концентрат коллоидного раствора, содержащий 140 г/л пропиконазола, 140 г/л тебуконазола и 72 г/л эпоксиконазола, предназначен для защиты зерновых культур.

В эксперименте использовали две схемы применения фунгицидов: превентивно до появления первых признаков и по первым признакам заболевания. Обработка посевов производилась механизировано прицепным полевым опрыскивателем Амазоне при расходе рабочего раствора 200 л/га. Доза препаратов (в скобках действующих веществ) в опытах составляла:

1) Титул 390, ККР – 0,4 л/га (пропиконазол 156 г/га),  
2) Титул Дуо, ККР – 0,4 л/га (пропиконазол 80 г/га и тебуконазол 80 г/га),

3) Медея, МЭ – 1,2 л/га (дифеноконазол 50 г/га и флутриафол 36 г/га),

4) Триада, ККР – 0,6 л/га (пропиконазол 84 г/га, тебуконазол 84 г/га и эпоксиконазол 43,2 г/га).

Опытное поле было разделено на 8 равных делянок площадью 0,9 га. В середине каждой из них выделили небольшие необработываемые контрольные участки

(во время опрыскивания их накрывали пленкой). Сев проводили в апреле семенами гороха сорта Фараон, полученными в том же хозяйстве в эпифитотийный по ржавчине год и содержащие на своей поверхности телиоспоры *U. pisi-sativi*. Таким образом, естественный инфекционный фон почвы «обогатился» патогеном, паразитирующим на бобовых. Через месяц после сева в момент превентивной обработки он уже детектировался методом ПЦР-РВ в очень незначительных количествах в средних пробах с опытных участков. Симптомы отсутствовали повсеместно.

Первые визуальные признаки заболевания были обнаружены в начале июня (2 мес после сева) в период дождей, которые спровоцировали развитие ржавчины. Осмотр показал наличие на листьях некоторых растений единичных урениоспор (уредиоспор, уредоспор) ржаво-коричневого цвета. Тогда же была произведена фунгицидная обработка второй половины поля.

Для того, чтобы оценить инфекционную нагрузку на поле в целом сравнивали результаты ПЦР со всех контрольных участков. Показано, что все необработанные фунгицидами растения в 2-мес возрасте одинаково поражены *U. pisi sativa*. Их зараженность составляет  $10^7$  геном-эквивалента патогена в 1 мкл тотальной ДНК, выделенной из 250 мг растительной ткани. Концентрация патогенов определялась относительно положительного контроля известной концентрации (плазмида с проклонированным в ней в период создания теста ампликоном) –  $1 \times 10^5$  геном-эквивалента/мкл. Эталонном высокой инфекционной нагрузке поля служил образец, полученный из Новосибирска. При 100%-ном поражении гороха детектируется почти  $10^9$  геном-эквивалента *U. pisi sativa* в 1 мкл тотальной ДНК, выделенной из растений. Одновременно на пробах с контрольных участков изучалась кинетика развития инфекционного процесса. Показано, что за 5 сут уровень инфицированности необработанных участков вырос с  $8 \times 10^4$  до  $10^7$ , т.е. в 125 раз. Этому в значительной степени благоприятствовали погодные условия (дожди, невысокая температура и пр.).

Фунгицидная активность препаратов оценивалась по степени накопления генома *U. pisi sativa* в растениях. Периодичность отбора проб – один раз в 2 нед.

Проанализировав эффективность превентивной обработки через 2 нед после ее проведения, мы оценили фунгистатическую активность препаратов Титул Дуо и Медея, как наивысшую. Количество *U. pisi-sativa* на участках, обработанных этими препаратами, в сотни раз меньше, чем на контрольных. Эффект от применения Титул 390 не отмечен. Такая картина сохранялась на протяжении 2–3 нед с момента опрыскивания. Однако спустя еще месяц весь горох, обработанный превентивно, оказался поражен *U. pisi sativae* в той же степени, что и контрольная группа растений ( $9-1,4 \times 10^9$  геном-эквивалентов/мкл), т.е. средняя концентрация патогена увеличилась прибли-

зительно в 100 раз. Причем погодные условия на этот раз не способствовали развитию грибной инфекции (высокая температура, солнечная инсоляция, отсутствие дождей).

Согласно второй схеме, опрыскивание фунгицидами производилось в середине июня при появлении первых симптомов заболевания на уже создавшемся инфекционном фоне. В это время количество накопленного в необработанных растениях патогена достигло  $10^7$  геном-эквивалентов/мкл. В середине июля провели отбор проб с восьми экспериментальных полей и их контрольных участков.

В контрольной группе размножение гриба продолжалось, и за 3 мес вегетации его количество достигло  $10^9$  геном-эквивалентов/мкл. Обработка препаратом Титул 390 также не дала видимых результатов ( $0,4 \times 10^9$ ). Остальные фунгициды, примененные в период появления первых урениоспор, сдержали развитие инфекции практически на 100%. А использование препарата Медея даже снизило концентрацию *U. pisi sativae* в средней пробе с  $1,2 \times 10^7$  до  $0,8 \times 10^7$ .

Таким образом, проанализировав состояние посевов гороха на восьми экспериментальных полях и их контрольных участках, используя Относительный Количественный метод ПЦР, мы сделали следующие выводы:

1. Превентивная обработка посадок гороха с целью предупреждения эпифитотии ржавчины сдерживает развитие заболевания в течение 2–3 нед после обработки. Второй месяц вегетации растений ознаменован бурным развитием гриба *U. pisi sativae*, концентрация которого повышается до количеств, равных таковым в необработанных растениях.

2. Обработка посевов после появления первых признаков заболевания предпочтительнее. Явный фунгистатический эффект Титул Дуо, Медея и Триада сохраняется не менее месяца (вплоть до сбора урожая).

3. Титул 390 в концентрации 0,4л/га не имеет выраженного фунгистатического эффекта для *U. pisi sativae*.

4. Количество патогена на контрольных участках увеличилось в течение трех месяцев вегетации с момента его первой идентификации в 15 000 раз и составило ~1 млрд геном-эквивалента/мкл. На превентивно обработанном поле детектируется такое же количество патогена. Более поздняя обработка в период появления первых урениоспор позволила замедлить развитие инфекционного процесса практически на 100%, т.е. на момент проведения обработки и в конце третьего месяца вегетации детектируется одинаковое количество геном-эквивалентов *U. pisi sativae* – 100 тыс.

В заключение можно отметить, что эффективность химического препарата, предназначенного для уменьшения (или увеличения) численности какого либо биологического объекта, может подтверждаться современными высокоточными методами.

## МЕХАНИЗМ И СПЕКТР АНТИФУНГАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ БИОФУНГИЦИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ РОДОВ *FUSARIUM* И *PYRENOPHORA*

Асатурова А.М., Павлова М.Д., Сидорова Т.М., Дубяга В.М.  
ВНИИ биологической защиты растений, Краснодар

Антагонистическое действие биоконтрольных штаммов *Bacillus subtilis* отмечено по отношению к широкому спектру фитопатогенных грибов: *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia clerotiorum*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria solani*, *Fusarium solani*, *F. culmorum*, *F. sporotrichiella*, *F. oxysporum*, *Alternaria tenuis*, *Phytophthora infestans*, *Bipolaris sorokiniana* и др. [1-4].

В лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов ВНИИ БЗР разработаны оригинальные опытные образцы экологически безопасных биофунгицидов полифункционального типа действия на основе аборигенных штаммов бактерий-антагонистов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 для защиты озимой пшеницы от фитопатогенных грибов родов *Fusarium*, *Microdochium* и *Pyrenophora* [5-7].

Исследован спектр антифунгальной активности штаммов-продуцентов биофунгицидов в отношении фитопатогенных грибов *in vitro*: степень ингибирования роста мицелия *Fusarium graminearum* Schwabe составила 48,5-52,9 %, *Microdochium nivale* (*F. nivale*) (Fr.) Samuels & I.C. Hallett – 42,7–52,7 %, *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. – 42,2–48,1 %, *F. oxysporum* var. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilal – 57,6–62,9 %, *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler – 76,0–94,4% (табл. 1).

Исследован спектр антифунгальной активности штаммов-продуцентов биофунгицидов в отношении фитопатогенных грибов *in vitro*: степень ингибирования роста мицелия *Fusarium graminearum* Schwabe составила 48,5-52,9 %, *Microdochium nivale* (*F. nivale*) (Fr.) Samuels & I.C. Hallett – 42,7–52,7 %, *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. – 42,2–48,1 %, *F. oxysporum* var. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilal – 57,6–62,9 %, *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler – 76,0–94,4% (табл. 1).

Таблица 1. Антифунгальная активность штаммов-продуцентов биофунгицидов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

Патоген	Ингибирование роста мицелия, %, сутки							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	5	10	15	20	5	10	15	20
<i>F. graminearum</i>	20,7	48,5	49,2	48,5	29,5	51,0	52,2	52,9
<i>M. nivale</i> ( <i>F. nivale</i> )	21,2	47,6	44,4	42,7	0	57,6	52,7	52,7
<i>F. culmorum</i>	43,9	48,1	48,1	48,1	39,0	44,4	42,2	42,2
<i>F. oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i>	32,3	55,6	62,9	57,6	35,4	59,2	64,3	62,9
<i>P. tritici-repentis</i>	78,5	92,8	93,9	94,4	60,5	68,8	73,9	76,0

Таким образом, установлено, что оба исследуемых штамма-продуцента способны *in vitro* подавлять рост наиболее широко распространенных и вредоносных патогенов озимой пшеницы. При этом наиболее чувствительным к антагонистическому действию штаммов оказался гриб *P. tritici-repentis*, наименее чувствительными – *F. graminearum* и *M. nivale* (табл. 1).

В тестах на активность основных групп миколитических ферментов исследуемые штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 проявили высокую казеинолитическую активность, а штамм BZR 336g *B. subtilis* – также и липолитическую. Хитинолитической активности ни у одного из штаммов выявлено не было.

Изучен характер и динамика разрушения мицелия патогенов при совместном культивировании на твердых питательных средах со штаммами-продуцентами биофунгицидов. Так, например, установлено, что штамм *B. subtilis* BZR 336g может проявлять гиперпаразитизм по отношению к грибам рода *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. oxysporum* var. *orthoceras*). Наблюдалась миграция бактериальных клеток *B. subtilis* BZR 336g по направлению к гифам и их локализация вдоль гиф патогенов. При совместной инкубации штамма *B. subtilis* BZR 336g с *F. graminearum* и *F. oxysporum* var. *orthoceras* отмечалось замедление формирования мицелия по сравнению с контролем, а формирующий-

ся мицелий отличался явными морфологическими изменениями: задержка удлинения апекса гиф, их набухание и частое ветвление, а также массовое образование раздвоенных уродливых вздутых апекса.

На последующих этапах культивирования отмечалась агрегация мицелия в тяжи – сплетения, состоящие из более тонких, видоизмененных гиф. А в непосредственной близости к колонии бактерии происходил интенсивный лизис и деградация мицелия патогенного гриба. К концу совместной инкубации наблюдалось формирование многочисленных клеток хламидоспорового типа с утолщенной оболочкой, а также неправильной формы гигантских клеток. В отличие от грибов рода *Fusarium*, ингибирование роста мицелия *P. tritici-repentis* происходило, по-видимому, в основном, за счет дистантного действия метаболитов штамма-антагониста *B. subtilis* BZR 336g задолго до непосредственного контакта с бактериальными клетками. К концу совместной инкубации на 10-е сут наблюдался распад гиф патогена на отдельные сегменты и выход пигментированного содержимого гиф.

Вышеописанные изменения гиф субстратного и воздушного мицелия исследователи отмечают при старении, длительном культивировании или воздействии других неблагоприятных стресс-факторов [8], например, УФ-облучения, что проявляется в двух

аспектах: с одной стороны, это деградация мицелия, с другой – стимуляция образования макроконидий [9]. Деградация мицелия может происходить либо путем укорочения и утолщения гиф с последующим их распадом, либо путем их удлинения и истончения. Морфологически это проявляется в израстании, разряжении, потемнении мицелия, вплоть до его гибели.

Исследователи отмечают, что образование макроконидий можно рассматривать как реакцию на действие стресса, подобного действию УФ-облучения или недостатка питательных веществ, направленную на выживание и распространение мицелия. Также отмечается и то, что под действием антифунгальных метаболитов *B. subtilis*, образование макроконидий хоть и активизируется, но прорастание их угнетается [9].

Таким образом, механизмы взаимодействия штаммов-продуцентов *B. subtilis* новых биофунгицидов в отношении фитопатогенных грибов родов *Fusarium* и *Pyrenophora* включают продукцию антифунгальных веществ и миколитических ферментов, а также исчерпание экзогенных источников питания при конкуренции за питательные вещества вследствие быстрой динамики роста бактерий.

Методом биоавтографии (ориг.) с тест-культурой *F. oxysporum* var. *orthoceras* выявлено наличие в культуральной жидкости обоих исследуемых штаммов соединений с фунгистатическими свойствами. Они выделены в виде отдельных смесей с определенным поведением в УФ-свете, подвижностью в трех системах растворителей и на разных носителях.

Предварительный анализ обнаруженных активных метаболитов предположительно указывает, что большинство из них имеет пептидную природу – свечение в УФ с  $\lambda=254$  светом и окрашиваются нингидрином. Причем, характер пептидных соединений отличается: вещества, окрашенные нингидрином в карминовый цвет, вероятно, имеют в строении свободные аминокислоты, первичные амины. А ярко-оранжевая окраска нингидрином может говорить о наличии циклического строения полипептидов, о чем свидетельствует также темно-желтое свечение в УФ-свете [10].

В структуре исследуемых соединений обнаруживаются также фенолы, причем с наличием свободных гидроксильных групп (темно-синее окрашивание реактивом Фолина). Голубой цвет пятен при опрыскивании раствором хлорного железа и феррицианида калия также может свидетельствовать о наличии фенольных групп, а также ароматических аминов в строении обнаруженных метаболитов.

Кроме того, установлено, что оба исследуемых штамма-продуцента приживаются и сохраняют жизнеспособность в ризосфере и на семенах озимой пшеницы в течение, как минимум 12 мес, успешно конкурируя при этом с бактериальной семенной инфекцией и эффективно подавляя развитие плесневых грибов родов *Miscor*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* и т.д., что впоследствии позволит использовать биофунгициды на их основе для заблаговременной обработки семян перед посевом и при закладке на хранение.

Таким образом, проведенные исследования открывают перспективы использования в сельскохо-

зяйственной практике новых бактериальных агентов биоконтроля фитопатогенных грибов родов *Fusarium*, *Pyrenophora* и др. на озимой пшенице.

Введение в систему интегрированной защиты сельскохозяйственных растений новых биофунгицидов на основе бактерий *B. subtilis* будет способствовать увеличению урожая и повышению качества семян, возможности отказа от использования ряда дорогостоящих пестицидов; повышению плодородия почв, оздоровлению почвенной микробиоты; возможности переориентации хозяйств на производство экологически безопасной продукции. При этом разрабатываемые биофунгициды могут быть использованы для формирования самостоятельной системы защиты озимой пшеницы и других культур или включены в систему интегрированной защиты, снижая пестицидную нагрузку на агроценозы.

### Список литературы

1. Kloepper JW, Ryu CM, Zhang SA. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 2004; 1259-66.
2. Кудряшова Е.Б., Винокурова Н.Г., Арискина Е.В. *Bacillus subtilis* и фенотипически близкие штаммы – продуценты гексаэновых антибиотиков. Прикл. биохим. микробиол. 2005; 5: 553-7.
3. Захарченко Н.С., Георгиевская Е.Б., Школьная Л.А. и др. Выделение и характеристика полипептида *Bacillus subtilis* K-1-1 – ингибитора роста фитопатогенных грибов и бактерий. Биотехнология. 2007; 3: 21-6.
4. Новикова И.Н., Шенин Ю.Д. Выделение, идентификация и антигрибная активность метаболитов комплекса гамаир, образуемого штаммом *Bacillus subtilis* – М-22 – продуцентом биопрепарата для защиты растений от микозов и бактериозов. Биотехнология. – 2011. - №2 – С.45-57.
5. Асатурова А.М., Дубяга В.М., Томашевич Н.С., Жарникова М.Д. Отбор перспективных агентов биологического контроля для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза. Электр. политематический научный журнал КубГАУ, 2012. – №75(01). Режим доступа [http://ej.kubagro.ru/2012/01/pdf/37.pdf].
6. Асатурова А.М., Надыкта В.Д., Исмаилов В.Я. и соавт. Изучение влияния бактериализации семян на рост и развитие растений озимой пшеницы. Электронный политематический научный журнал КубГАУ, 2013. №85(01). Режим доступа [http://ej.kubagro.ru/2013/01/pdf/66.pdf].
7. Кремнева О.Ю., Асатурова А.М., Волкова Г.В. Отбор штаммов бактерий, проявляющих антагонизм в отношении возбудителя желтой пятнистости листьев пшеницы. Биотехнология. 2013; 5: 54-9.
8. Билай В.И. Грибы рода *Fusarium*. Киев: Наук. Думка, 1977: 441 с.
9. Кутлубердина Д.Р. Антагонистические штаммы *Bacillus subtilis* как агенты биоконтроля грибов рода *Fusarium*. Автореф. дис. ... к. б. н. Уфа. 2000: 147.
10. Максимова Н.П., Феклистова И.Н., Маслак Д.В. и др. Бактерии *B. subtilis* КМБУ 30043 – основа биопрепарата Бактоген. IV Межд. конф. «Биологические препараты в растениеводстве». Киев, 2008: 15-7.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ ФИЛЛОСФЕРЫ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ

Берестецкий А.О.<sup>1</sup>, Инюшева В.В.<sup>2</sup>, Полуэктова Е.В.<sup>1</sup>, Сокорнова С.В.<sup>1</sup>, Степанычева Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт

Основной задачей работы являлось сравнение различных экологических и таксономических групп грибов по спектру действия образуемых ими метаболитов и установление их экологической роли в формировании биоценозов филлосферы травянистых растений.

Было протестировано более 100 изолятов различных видов фитопатогенных и эндофитных микромицетов. В четырех различных таксономически гетерогенных и гомогенных выборках антимикробная активность грибов филлосферы варьировала от 20 до 70%, инсектицидная – от 0 до 50%, фитотоксическая – от 40 до 100%.

Фитопатогенные грибы обладали более высокой инсектицидной активностью, чем эндофиты; эндофитные грибы продемонстрировали высокий потенциал к образованию фитотоксинов. Показано, что для изучения биологически активных соединений различ-

ного спектра действия особый интерес представляют альтернариоидные гифомицеты.

Таким образом, грибы филлосферы являются продуцентами не только фитотоксинов, но и антибиотиков и инсектицидных метаболитов. Это может объяснять их частое доминирование на листьях растений: их наличие, очевидно, играет ключевую роль в формировании сообществ филлосферы.

В связи с этим, регламенты применения фунгицидов в агроэкосистемах должны принимать во внимание этот факт: при элиминировании фитопатогенов из фитоценоза следует прогнозировать нарастание заболеваний культурных растений, вызванных другими группами микроорганизмов, а также рост численности насекомых-фитофагов.

*Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 12-04-00853).*

## ПОЧВЕННЫЙ СТРЕПТОМИЦЕТ *STREPTOMYCES NETROPSIS* – ПРОДУЦЕНТ ВЕЩЕСТВ ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ

Белявская Л.А.<sup>1</sup>, Ефременкова Е.В.<sup>2</sup>, Зенкова В.А.<sup>2</sup>, Козырицкая В.Е.<sup>1</sup>, Иутинская Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАНУ, Киев

<sup>2</sup>НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва

В последние годы значительно расширился спектр болезней основных сельскохозяйственных культур. Несмотря на применение новых химических средств защиты растений, общая ситуация принципиально не изменяется: болезни часто носят эпидемический характер, кроме того наблюдается не только увеличение вредоносности известных патогенов, но и появления новых опасных видов, часто из перечня карантинных объектов. Регистрируется развитие как микозов, бактериозов, нематодозов, так и смешанных инфекций, вызванных несколькими возбудителями одновременно. Фитопатогены снижают количество и качество урожая, а также приводят к накоплению в растительной продукции токсинов, опасных для здоровья человека и животных [1].

Химически синтезированные препараты, которые в основном используют для контроля численности фитопатогенов, вредителей и сорняков, в подавляющем большинстве, являются токсичными, мутагенными и загрязняющими окружающую среду. Одним из основных элементов современных технологий для оптимизации фитосанитарного состояния агроценозов является использование биологических средств защиты растений. В связи с этим разработка новых эффективных и экологически безопасных биопрепаратов на основе микробных метаболитов с широким спектром действия является весьма актуальной [2].

Богатейшим источником разнообразных по химическому строению и спектру действия биологически активных веществ являются почвенные стрептомицеты, продуцирующие вторичные метаболиты с фунгицидными, бактерицидными, инсектицидными, акарицидными, нематодицидными и другими специфическими свойствами [3].

В результате скрининга коллекционных и свежесобранных из почв изолятов стрептомицетов сотрудниками Отдела общей и почвенной микробиологии ИМВ НАНУ был выделен штамм *Streptomyces* sp., проявляющий высокую антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам и бактериям [4]. На основе морфолого-культуральных и физиолого-биохимических характеристик, а также с помощью анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК, была установлена принадлежность данного штамма к виду *Streptomyces netropsis*, который был депонирован в Украинской коллекции микроорганизмов под номером УКМ Ас-2186.

Цель работы – выделение и изучение активного метаболитного комплекса, продуцируемого *Streptomyces netropsis* УКМ Ас-2186, изучение спектра его антагонистической активности.

Для хранения штамма использовали агаризованные питательные среды: картофельно-глюкозную и ISP-3 [5]. Подготовку посевного материала и культи-

вирование проводили в жидкой питательной среде с соевой мукой и глюкозой [6]. Глубинное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейра емкостью 750 мл при 28 °С в течение 7 сут при постоянном перемешивании (260 об./мин). Полученный этанольный экстракт биомассы продуцента и супернатант культуральной жидкости в соотношении 1:4 использовали для создания биопрепарата Фитовит. Для выделения, изучения и первичной идентификации активных компонентов супернатанта культуральной жидкости проводили первичную сорбцию антибиотиков с помощью сорбента Amberlyte XAD-2 с последующей элюцией смесью н-бутанол-ацетон-вода (1:1:1) при нейтральном значении рН.

Полученные элюаты упаривали в вакууме досуха при 37 °С и сухой остаток растворяли в 60 %-ном водном этаноле. UV-VIS-спектры антибиотиков регистрировали на спектрофотометре UV-1601 PC (Shimadzu, Япония). Дальнейшую очистку антибиотиков из полученного концентрата и этанольного экстракта биомассы проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках DC-Fertigfolien Alugram SIL G/UV254 Kieselgel 60 (Macherey-nagel) (20×20 см) в различных системах растворителей. Хроматограммы анализировали в УФ-свете на денситометре "Sorbfil".

Каждую фракцию, полученную после ТСХ, снимали отдельно в эпендорфы, элюировали 60 %-ным этанолом и упаривали досуха при температуре 37 °С до сухого остатка. Очищенные таким образом фракции и разведенные 60%-ным этанолом до концентрации 4 мг/мл наносили по 5 мкл на стерильные диски диаме-

тром 5 мм, высушивали и использовали для определения их антагонистических свойств по отношению к фитопатогенным грибам и бактериям из Украинской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Штамм *S. netropsis* в процессе роста в условиях глубинного культивирования продуцировал вторичные метаболиты, обладающие антифунгальной и антибактериальной активностями. УФ-спектр поглощения этанольного концентрата супернатанта культуральной жидкости *S. netropsis* УКМ Ас-2186 выявил наличие 4 веществ, два из которых имели близкую химическую природу, с явно выраженными максимумами поглощения при 290, 304, 318 нм и 318, 322, 351 нм характерных для полиеновых антибиотиков, а именно тетраена и пентаена соответственно [7].

ТСХ с использованием различных кислых, нейтральных и щелочных систем растворителей показала, что метаболитный комплекс, выделенный из этанольного экстракта биомассы *S. netropsis* УКМ Ас-2186, состоит из шести основных компонентов различающихся по хроматографической подвижности, 2 из которых являются минорными, а 4 – мажорными.

Изучение биологической активности полученных компонентов показало (табл.), что фракции 4 и 5 были наиболее активны против фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* УКМ F-54201 и *Alternaria alternata* УКМ F-13814 (зоны ингибирования составляли 14-18 мм), тогда как остальные фракции угнетали, как грамположительные, так и грамотрицательные фитопатогенные бактерии.

Таблица. Спектр антимикробной активности отдельных фракций антибиотического комплекса *Streptomyces netropsis* УКМ Ас-2186

Тест-культура фитопатогенного микроорганизма	Зоны угнетения роста тест-культур исследуемыми фракциями, мм*					
	1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas syringiae</i> УКМ В-1022	13	11	11	11	12	13
<i>Xanthomonas translucens</i> УКМ В-1069	11	13	11	-	-	20
<i>Clavibacter mechiganensis</i> УКМ В-02	10	10	12	-	-	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> УКМ Y-2474	10	10	-	-	-	10
<i>Fusarium oxysporum</i> УКМ F-54201	-	7	12	15	14	13
<i>Alternaria alternata</i> УКМ F-13814	-	7	13	14	18	12

Примечание: \* – концентрация фракций 20 мкг/диск (для бактерий) и 48 мкг/диск для грибов

Две фракции (4 и 5), проявляющие антифунгальную активность, по хроматографической подвижности в системе н-бутанол-уксусная кислота-вода (3:1:1) были близки к полиеновым антибиотикам. В кристаллическом виде эти фракции представляют собой желто-белый порошок, хорошо растворимый в 60%-ном этаноле, плохо растворимый в воде, метаноле абсолютном этаноле.

На основании максимумов поглощения UV-VIS-спектров и антагонистических свойств указанных

фракций предположительно можно говорить о наличии тетраена и пентаена, которые характеризуются антифунгальной активностью. Уровень специфичности и физиологической активности штаммов-продуцентов определяется химической природой синтезируемых ими биологически активных веществ, поэтому знание химической природы основных активных компонентов метаболитного комплекса позволит в дальнейшем подойти к пониманию механизмов их действия на целевые объекты.

Биопрепарат Фитовит, созданный на основе метаболитов *S. netropsis* УКМ Ас-2186 был испытан в полевых условиях для предпосевной обработки семян и вегетирующих растений пшеницы ярой сорта Ранняя 93. Применение Фитовита способствовало уменьшению поражения растений корневыми гнилями по сравнению с контрольным вариантом.

Биологическая эффективность биопрепарата колебалась от 53,5 до 60,8% в зависимости от фазы развития растений, тогда как химического препарата Витавакс – от 25,3 до 33,8%. Тем самым использование биопрепарата Фитовит способствовало повышению урожая на 25,5 %, а химического препарата – только на 2,5 %.

Таким образом, выделенные компоненты метаболитного комплекса Ш УКМ Ас-2186, обладающие высокой антифунгальной активностью относятся к полиеновым антибиотикам. На основании метаболитов *S. netropsis* УКМ Ас-2186 разработан новый эффективный биопрепарат Фитовит, обладающий антагонистическими свойствами по отношению к ряду фитопатогенных грибов.

Создание и использование таких биопрепаратов является перспективным с экологической стороны и экономически выгодно.

### Список литературы

1. Биорегуляция микробно-растительных систем. Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андреюк К.И. и др. Под ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко. Киев: Ничлава. 2010: 464 с.
2. Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. J Antibiot. 2005; 58(1): 1-26.
3. Srividya S, Adarshana T, Deepika VB et all. Streptomyces sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. Eur J Expl Biol. 2012; 2(1): 163-73.
4. Циганкова В.А., Андрусевич Я.В., Белявская Л.А. и др. Ростстимулирующие, фунгицидные и нематодические свойства новых субстанций микробного происхождения и их влияние на синтез si/mi РНК в клетках растений. Микробиол. журн. 2012; 74(6): 36-45.
5. Валагурова Е. В., Козырицкая В. Е., Иутинская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces*, описание видов и компьютерная программа их идентификации. К.: Наукова думка. 2003: 618 с.
6. Белявская Л.А., Козырицкая В.Е., Валагурова Е.В., Иутинская Г.А. Биологически активные вещества препарата аверком. Микробиол. журн. 2012; 74(3): 10-5.
7. Ветлугина Л.А., Никитина Е.Т. Противогрибковые полиеновые антибиотики. Алма-Ата: «Наука» КазС-СР. 1980: 248 с.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА 2-БЕНЗИМИДАЗОЛИЛКАРБАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ЕГО ГИДРОХЛОРИДА И ТЕБУКОНАЗОЛА В ОТНОШЕНИИ АНТРОПОЗОО- И ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Чикишева Г.Е., Медведев Ю.А.

НИТИ гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством, Уфа

Проблема разработки антифунгальных препаратов с разным спектром фунгицидного действия продолжает сохранять свою актуальность как для многих сторон промышленной, сельскохозяйственной, бытовой и многих других видов деятельности человека, так и для биологических, медицинских, ветеринарных разделов науки. При этом широкие перспективы решения проблемы представляет синтез и изучение новых препаратов на основе производных азотсодержащих гетероциклические соединений.

В основном, данные препараты разрабатываются для борьбы с фитопатогенными микроскопическими грибами, поражающими растительные организмы, и предназначаются для защиты растений, применяемых в сельском хозяйстве и промышленности. Среди них наиболее известны метиловый эфир 2-бензимидазолилкарбаминовой кислоты (БМК, карбендазим) и тебуконазол (ТБ) – препарат из группы триазолов, применяемые в качестве гербицидов в сельскохозяйственной практике и обладающие свойствами системных фунгицидов в отношении значительного числа обитающих в почве сапрофитических и фитопатогенных грибов [1, 2].

В то же время данные препараты могут применяться и для борьбы с микроскопическими грибами, поражающими не только растения, но и животные организмы. Антифунгальные препараты и средства могут быть предназначены или для защиты растений в сельском хозяйстве и промышленности, или для лечения и профилактики микотических заболеваний людей и животных в медицине и ветеринарии.

Так, показано, что метиловый эфир 2-бензимидазолилкарбаминовой кислоты (БМК, карбендазим) и его производные способны оказывать антифунгальное действие как на фитопатогенные, так и антропо- и зоопатогенные грибы – плесневых и дрожжеподобных возбудителей «оппортунистических» микозов и возбудителей дерматофитий.

Показано также, что фунгицидное действие многих применяемых сельскохозяйственных фунгицидов, в частности, метилового эфира 2-бензимидазолилкарбаминовой кислоты (БМК) и его производных, распространяется и на микроскопические грибы, представляющие непосредственную угрозу здоровью и жизни людей и животных [3, 4]. Вопрос о возможностях воздействия ТБ на грибы, патогенные для людей

и животных, до настоящего времени не изучен. С учетом вышеуказанного нами проведена сравнительная оценка антифунгальной активности ТБ, БМК, и синтезированного на основе БМК более растворимого в воде дигидрата гидрохлорида метилового эфира 2-бензимидазолкарбаминовой кислоты (ГХБМК, БМК·НСl·2H<sub>2</sub>O) в отношении некоторых фито- и зооантропогенных микроскопических грибов. В исследовании использованы коммерческие препараты БМК и ТБ, (БМК·НСl·2H<sub>2</sub>O) синтезирован [5].

Фунгицидная активность препаратов проверялась путем учета полной задержки роста тест-культур грибов на плотной среде Сабуро. В расплавленную среду Сабуро (селективная) вносили водные растворы препаратов в возрастающих концентрациях (0,1–10 мл/100 мл среды), разливали по 20 мл в чашки Петри и равномерно перемешивали вплоть до полимеризации среды. После полимеризации («застывания») на среды с препаратами и контрольные среды высевали тест-культуры и инкубировали при 28 °С в течение 30 дней.

Результаты регистрировали ежедневно визуально по наличию роста типичных колоний грибов. Препараты были испытаны на чистых культурах грибов фитопатогенных – *Alternaria alternata* и *Fusarium graminearum*, вызывающих заболевания сельскохозяйственных и дикорастущих растений, способных вызывать у животных и людей пищевые отравления (микотоксикозы) и инфекционные заболевания (оппортунистические микозы), плесневых грибах – *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*, и дрожжеподобных, которые могут вызывать у людей и животных инфекционные заболевания, возникающие в определенных условиях (оппортунистические микозы), дерматофиты – *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum* – вызывающие контактные инфекционные заболевания (дерматофитии) у людей и/или

животных, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* (антропо-, зоо-, зооантропо-патогенные грибы).

Из числа использованных в исследовании фунгицидов ТБ проявил наиболее высокую подавляющую активность в отношении фитопатогенных грибов, превосходя в 10 и более раз таковую БМК. При этом его фунгицидность в отношении изученных зооантропогенных грибов была сходна с активностью БМК, в то время как водорастворимая форма БМК – БМК·НСl·2H<sub>2</sub>O проявляла фунгицидную активность в концентрациях в 10–15 раз более низких, чем БМК, т. е., сопоставимых с таковыми ТБ.

Таким образом, проведенные исследования показали, что фунгицидность модифицированной формы БМК – БМК·НСl·2H<sub>2</sub>O в отношении изученных зооантропогенных грибов сходна с активностью ТБ.

#### Список литературы

1. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение. М.: Химия. 1987: 559, 565.
2. Пилюгин В.С. Азотсодержащие гетероциклические соединения. Синтез и биологическая активность производных 2-аминобензимидазола и 1,3,5-сим-триазина. Уфа: «Гилем», 2008: 372 с.
3. Чикишева Г.Е., Медведев Ю.А., Колбин А.М., Мухаммадеева О.Р. Сравнительная антифунгальная активность некоторых производных метилового эфира 2-бензимидазолкарбаминовой кислоты в отношении антропо-зооантропогенных грибов. Усп. мед. микол. 2014; 12: 380-3.
4. Степанова Ж.В. Грибковые заболевания. М.: Миклош. 2005: 124 с.
5. Чикишева Г.Е., Земченкова Г.К., Давлетов Р.Д., Колбин А.М., Давлетшина А.М. Фунгицидное средство. Пат. РФ. №2497361. Заявл. 15.06.2012. Опубл. 10.11.2013 Бюл. №31.

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МЕТАБОЛИТНЫЕ ПРОФИЛИ И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ГРИБА *ALTERNARIA SONCHI* – ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МИКОГЕРБИЦИДА ДЛЯ БОРЬБЫ С ОСОТОМ ПОЛЕВЫМ

Далинова А.А.<sup>1</sup>, Волосатова Н.С.<sup>2</sup>, Иванова А.Н.<sup>2</sup>, Сазоненкова Я.А.<sup>2</sup>, Салимова Д.Р.<sup>3</sup>, Берестецкий А.О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический университет растительных полимеров

Вторичные метаболиты микроорганизмов являются важным источником новых биологически активных соединений с различными свойствами.

Объект исследований – гриб *Alternaria sonchi* – патоген осота полевого и продуцент фитотоксических и антимикробных соединений.

Цель работы – сравнение метаболитного профиля и биологической активности экстрактов из культуры *A. sonchi*, полученной различными жидкими и твердыми

питательными средами. Для жидкофазного культивирования использовали среду YES на основе дрожжевого экстракта, среду Чапека с добавлением тиамина и биотина и среду ДМГ на основе дрожжевого и мальтозного экстрактов.

В качестве субстратов для твердофазного культивирования использовали перловую, пшеничную и рисовую крупы. Экстракт из культурального фильтра получали методом жидкость-жидкостной



экстракции, в качестве экстрагента использовали гексан и этилацетат; экстракцию метаболитов гриба из мицелия проводили ацетоном. Извлечение комплекса веществ из колонизированных грибом зерновых субстратов проводили гексаном, а затем 50%-ным водным ацетоном с последующей их переэкстракцией этилацетатом после упаривания из вытяжки ацетона. Фитотоксическую активность экстрактов оценивали в концентрации 5 мг/мл в отношении осота полевого, пырея ползучего и арабидопсиса. Антимикробную активность оценивали методом бумажных дисков в отношении *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* и *Candida tropicalis* в концентрации 500 мкг/диск.

Сравнительное изучение метаболитных профилей экстрактов проводили методом ТСХ. Состав метаболитных комплексов колонизированных грибом жидких и зерновых субстратов значительно различался. Однако все экстракты содержали альтернатаноксин В, предложенный ранее в качестве хемотаксономического маркера для данного вида.

Отмечены существенные различия в биологической активности экстрактов. В целом, экстракты из культурального фильтрата показали более высокую

фитотоксическую и антимикробную активность, чем экстракты из мицелия *A. sonchi*. Наиболее высокую фитотоксическую и антимикробную активность проявил этилацетатный экстракт культурального фильтрата из среды Чапека с витаминами. Однако выход экстрактивных веществ при культивировании гриба на этой среде был сравнительно низким. Высокую антимикробную активность продемонстрировал гексановый экстракт из культурального фильтрата, полученного в результате ферментации гриба на среде ДМГ. Высокую фитотоксическую и среднюю антимикробную активность проявил этилацетатный экстракт из культуры *A. sonchi*, полученной на пшеничной крупе.

Таким образом, перспективными средами для получения новых биологически активных веществ из гриба *A. sonchi* являются жидкие среды ЧАВ и ДМГ, а среди зерновых субстратов – пшеничная крупа. В дальнейшем планируется работа по выделению и идентификации индивидуальных соединений, обуславливающих проявление активности экстрактов.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 14-26-00067).

## НОВЫЙ КОМБИНИРОВАННЫЙ ФУНГИЦИД ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР ОТ НИЗШИХ ГРИБОВ

Долженко В.И., Ишкова Т.И., Кунгурцева О.В., Силаев А.И.  
ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Значительный ущерб урожаю овощных культур причиняют болезни, возбудителями которых являются *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (возбудитель фитофтороза томата), *Pseudoperonospora cubensis* Rostovz (возбудитель пероноспороза огурца), *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. (возбудитель пероноспороза лука). Ведущее место в системе защиты данных культур от вышеотмеченных болезней занимает обработка посевов фунгицидами [1].

По данным регистрационных испытаний, достаточно высокую эффективность против фитофтороза и пероноспороза имеют двухкомпонентные зарубежные и отечественные фунгициды, включающие в свой состав действующее вещество манкоцеб в сочетании с другими (диметоморф, цимоксанил, фенамидон, металаксил, мефеноксам).

К сожалению, манкоцеб, относящийся к классу дитиокарбаматов, образует при разложении токсичнозначимый метаболит этилентиомочевину (ЭТМ), который устойчивее исходного соединения в объектах окружающей среды [2]. Этилентиомочевина ответственна за эмбрио- и гонадотропный, тератогенный, мутагенный и канцерогенный эффекты, что определяет опасность этих соединений для человека и теплокровных животных в условиях длительного контакта с ними. Этот фактор предъявляет ряд ограничений к применению фунгицидов на основе манкоцеба [3].

В течение трёх лет (2011–2013 гг.) в системе регистрационных испытаний оценивался новый фунгицид для защиты огурца, томата и лука от ложномучни-

сторосяных грибов Орвего, КС, содержащий в своем составе диметоморф и аметоктрадин.

Диметоморф относится к химическому классу морфолины, механизм действия которых связан с ингибированием фосфолипидного биосинтеза и синтеза клеточной стенки гриба.

Аметоктрадин – новое действующее вещество для России, относящееся к классу пиримедиламинов. Механизм его действия сопряжен с ингибированием развития зооспор путем влияния на комплекс ферментов в клетках оомицетов, входящих в митохондриальную дыхательную цепь переноса электронов. В отличие от манкоцеба аметоктрадин не обладает негативными свойствами в отношении человека и теплокровных животных.

Изучение препарата Орвего, КС проводилось нами в системе регистрационных испытаний ГНУ ВИЗР на томате, огурце и луке в Саратовской и Волгоградской областях, Краснодарском крае в течение 2011–2013 годов согласно «Методическим указаниям по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве» [4]. В настоящее время препарат находится на последней стадии регистрации.

Обработка посадок овощных культур фунгицидом Орвего, КС в трёх дозировках 0,6, 0,8 и 1,0 л/га осуществлялась 3-хкратно за сезон. Первое опрыскивание было проведено профилактически, последующие два опрыскивания – с интервалом 10 дней. В качестве стандарта на томате в Саратовской и Волгоградской областях были взяты фунгициды Сектин Феномен,

ВДГ (500 г/кг манкоцеба и 100 г/кг фенамидона) и Танос, ВДГ (250 г/кг фамоксадона и 250 г/кг цимоксанила) в Краснодарском крае в дозировках 1,25 кг/га и 0,6 кг/га соответственно. На огурце стандартом служил фунгицид Курзат Р, СП (689,5 г/кг хлорокиси меди и 42 г/кг цимоксанила) в дозировке 3,0 кг/га. В контрольном варианте растения фунгицидами не обрабатывались.

Обобщающие результаты трёхлетних исследований на томате открытого грунта свидетельствуют, что эффективность препарата Орвего, КС против фитофтороза на листьях в Краснодарском крае на сорте Титан через 20 сут после 3-х кратной обработки при нормах применения 0,8 и 1,0 л/га (66,7-80,1%) превышала эффективность стандарта Танос, ВДГ (61,1-66,7%), а при норме применения 0,6 л/га (64,4-66,7%) была равноценна последнему при развитии болезни в контроле 1,5-9,0%.

Достаточно высокая эффективность сохранялась на протяжении 35 суток после обработок (65,7-73,1%), у стандарта она составила всего 58,0% при сильном развитии болезни в контроле (35,0%).

В Саратовской и Волгоградской областях эффективность препарата Орвего, КС на сортах Бобкат и Рио гранде была ниже; однако, при норме применения 1,0 л/га (56,4-68,8%) не уступала стандарту Сектин Феномен, ВДГ (55,4-69,0%) и мало отличалась от него при норме применения 0,8 л/га (50,0-64,0%) при развитии болезни в контроле 12,5-22,0%. При более низкой дозировке 0,6 л/га эффективность препарата Орвего, КС (41,8-57,6%) была ниже, чем в стандартном варианте.

Применение препарата Орвего, КС в дозировках 0,8-1,0 л/га позволило защитить не только листья, но и плоды томата от фитофтороза в течение месяца после обработок на 57,1-70,6% в Саратовской области и на 64,3-71,4% в Волгоградской области, в стандартном варианте эффективность составила соответственно 57,1-64,7 и 51,7-63,6% на фоне развития болезни в контрольном варианте более 5,0%. Помимо фитофтороза, Орвего, КС при тех же нормах применения контролировал и такое заболевание как альтернариоз.

Обработки препаратом Орвего, КС положительно сказались на величине сохраненного урожая как в Саратовской, так и Волгоградской областях: 4,2-4,7% и 4,2-5,5% соответственно, в варианте со стандартом - 4,2-6,0%.

В Краснодарском крае величина сохраненного урожая была выше во всех вариантах (16,7-42,6%).

Результаты изучения препарата Орвего, КС против пероноспороза на огурце в Саратовской и Волгоградской областях показали, что он был более эффективен также при более высоких дозировках 0,8 и 1,0 л/га.

Так, в Саратовской области на сорте Феникс уже через 8 сут после 2-й обработки и через 8 сут после 3-й обработки эффективность фунгицида на листьях при нормах применения 0,8 л/га (64,5-68,7%) и 1,0 л/га (69,5-72,9%) мало отличалась от эффективности стандарта (68,1-70,5%) при развитии болезни в контроле 11,9-21,4%. Через две недели после 3-х опрыскиваний произошло снижение эффективности всех препаратов: до 51,5-54,2% (0,8 л/га) и до 55,3-60,0% (1,0 л/га), в стандарте - до 55,8-60,7% на фоне сильного развития болезни в контроле (39,7%).

При норме применения 0,6 л/га эффективность препарата Орвего, КС (46,1-60,3-60,5%) при всех сроках учета уступала стандарту Курзат Р, СП. Аналогичные результаты по эффективности против пероноспороза получены и в Волгоградской области на сорте Маша. Эффективность на листьях через 8-10 дней после 2-кратной обработки при нормах применения 0,8 и 1,0 л/га составила 65,5-69,3%, через 10 дней после 3-х кратной обработки - 69,0-72,3%; в варианте со стандартом Курзат Р, СП - 68,2-73,4% при развитии болезни в контроле 25,6%. Во всех вариантах величина сохраненного урожая (3,8-5,3%) была близка стандартному варианту (3,8-4,8%). На луке изучение биологической эффективности препарата Орвего, КС против пероноспороза проводилось в Саратовской и Астраханской областях на сортах Денсити и Халцедон в 3-х нормах применения 0,6; 0,8 и 1,0 л/га. В качестве стандартного препарата использовали фунгицид Акробат МЦ, ВДГ (600 г/кг манкоцеба и 90 г/кг диметоморфа) в дозировке 2,0 кг/га.

В Саратовской области на 10-й день после 2-го опрыскивания получены положительные результаты по снижению пероноспороза при двух больших нормах применения: 64,9-67,7% (0,8 л/га) и 69,1-71,7% (1,0 л/га), близкие показателям стандартного препарата (68,0-70,7%) на фоне развития болезни 9,7-9,9%. Изучаемый препарат в более низкой норме применения 0,6 л/га показал более скромные результаты: 62,6-62,9%. На 10- и 20-й дни после трёх обработок отмечалось некоторое снижение эффективности изучаемых препаратов, при этом Орвего, КС при нормах применения 0,8 л/га (62,7-47,4%) и 1,0 л/га (66,3-52,3%) был на уровне стандарта Акробат МЦ, ВДГ (65,3-50,2%) при развитии болезни в варианте без обработок 18,6-43,2%. При норме применения 0,6 л/га (57,9-41,4%) эффективность оставалась ниже стандартного варианта.

В Астраханской области через 10 дней после 2-го опрыскивания изучаемый препарат был более эффективен против пероноспороза. Так, при более высоких нормах применения: 82,7% (0,8 л/га) и 88,5% (1,0 л/га) превосходил стандартный препарат (73,1%) и несколько уступал ему при норме применения 0,6 л/га (68,4%) при развитии болезни в контрольном варианте 5,2%. К 20 дню после трёх обработок произошло постепенное снижение эффективности препаратов. Изучаемый препарат в большей дозировке 1,0 л/га сохранил преимущество по эффективности (75,5-69,2%) перед стандартом Акробат МЦ, ВДГ (50,0-48,0%); при норме применения 0,8 л/га (56,4-40,3%) он оставался на уровне стандарта при нарастании развития болезни до 27,2%. При меньшей норме применения к этому времени он был неэффективен.

В Саратовской области применение препаратов позволило получить прибавку урожая в размере 6,0% по отношению к контролю. В Астраханской области величина сохраненного урожая была выше, при большей норме применения 1,0 л/га (24,1%) этот показатель был на уровне стандартного варианта (22,0%), при нормах применения 0,6 л/га (7,3%) и 0,8 л/га (14,9%) он несколько уступал им.

Таким образом, положительные результаты, полученные при изучении эффективности фунгицида Ор-

вего, КС на томате против фитофтороза, огурце и луке против пероноспороза, позволяют рекомендовать его для включения в системы защиты этих культур от вышеприведенных болезней при дозировках 0,8 и 1,0 л/га и 3-кратном применении.

#### Список литературы

1. Долженко В.И. Повысить фитосанитарную безопасность Российской Федерации. *Защ. карант. раст.* 2011; 2: 4-7
2. Справочник по пестицидам. Гигиена применения и токсикология. Под. ред. А.В. Павлова. Киев: Урожай. 1986: 432 с.
3. Долженко В.И., Новожилов К.В. Химический метод защиты растений: состояние и перспективы повышения экологической безопасности. *Защ. карант. раст.* 2005; 3: 80-3
4. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве. Под. ред. В.И. Долженко. СПб.: ВИЗР. 2009: 379 с.

### ПОИСК НОВЫХ АНТИМИКОТИКОВ

Дробин Ю.Д.<sup>1</sup>, Фетисов Л.Н.<sup>1</sup>, Морковник А.С.<sup>2</sup>, Диваева Л.Н.<sup>2</sup>, Зубенко А.А.<sup>1</sup>,

Русанов В.А.<sup>2</sup>, Солдатенко Н.А.<sup>1</sup>, Коваленко А.В.<sup>1</sup>, Бодряков А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН, Новочеркасск

<sup>2</sup>Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

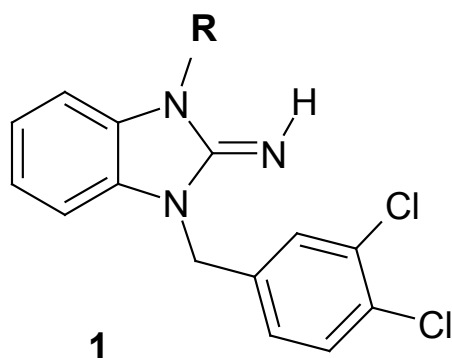
Спектр изучаемых в качестве антимикотиков веществ чрезвычайно широк: препараты бактериального происхождения, комплексные соединения меди, кобальта и серебра, фотодинамические системы, производные различных классов органических соединений и другие. Увеличение резистентности грибов к антимикотикам, снижение эффективности лечения требует от исследователей разработки новых лекарственных средств, в том числе и среди новых классов химических веществ.

В ФГБНУ СКЗНИВИ совместно с ФГБОУ ЮФУ проводятся активные исследования по синтезу и биотестированию новых соединений в ряду амидов жирных кислот, пиридина, имидазола, хиναзолина, а

также природных соединений (пиридоксаль, анабазин, никотин, вазицинон, дизоксивазицинон, пеганин, котарнин и др. ).

В ряду производных 2-аминобензимидазола выявлены высокоактивные антибактериальные и противопаразитарные соединения [4–6]. Представлялось интересным изучить фунгицидные свойства синтезированных нами соединений, так как по литературным данным на основе бензимидазола созданы эффективные фунгициды, в том числе известный в агрономии препарат фундазол.

Производные 2-аминобензимидазола общей формулы 1 были синтезированы по разработанным нами методикам [1-3].



1a R= CH<sub>3</sub>

1b R= CH<sub>2</sub>-phenyl

1c R= CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH

1d R= CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

**Материалы и методы.** Материалом для исследования послужили вещества из ряда бензимидазола общей формулы 1. Тест-культурой служил полевой изолят *Penicillium italicum*. Исследования выполняли следующим образом: на чашку со средой сусло-агар засевали газоном культуру *P. italicum*, на поверхность газона помещали диски из фильтр-картона («чистые»), на диски с помощью микропипетки со сменными наконечниками наносили растворы изучаемых веществ в количестве 15мкл различных концентраций. Чашки с посевами помещали в термостат при 26 °С на 72 ч. Учёт результатов выполняли путем измерения зоны

ингибирования роста тест-культуры в мм. Результаты исследований зон задержки (в мм) представлены в таблице.

Соединение	1a	1b	1c	1d	Фундазол
Зона задержки	10	12	10	10	22

Изученные соединения обладают выраженной фунгиостатической активностью, хотя и уступают по активности фундазолу. Представляется перспективным продолжить синтезы и изучение антимикотической активности. Производные бензимидазола 1a – 1d

могут стать основой для модификации с целью поиска активных соединений.

#### Список литературы

1. Морковник А.С. 1,3-Дизамещенные 2-иминобензимидазолина, обладающие антибактериальным действием. Пат. РФ №2423355, опублик. 10.07.2011, Бюл. №19: 9 с.
2. Зубенко А.А. 1-Омега-Арилоксиалкил-и 1-бензилзамещенные 2-иминобензимидазолина и их фармакологически приемлемые соли, обладающие протистотоксической и антимикробной активностью. Пат. РФ №2514196, рег. 27.04.2014, бюл. №12: 11 с.
3. Зубенко А.А. Производные 1-(2-арилоксиэтил)-и 1-бензилзамещенных-(2-гидроксиэтил)-2-иминобензимидазолина, обладающие антибактериальной и протистотоксической активностью». Пат. РФ №2513993, рег. 27.04.2014, бюл. №12: 9 с.
4. Zhang HZ, Damu GL, Cai GX, Zhou CH. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of novel benzimidazole type of Fluconazole analogues and their synergistic effects with chloromycin, norfloxacin and fluconazole Eur J Med Chem. 2013; 64: 329-44.
5. Garudachari B, Satyanarayana MN, Thippeswamy B et al. Synthesis, characterization and antimicrobial studies of some new quinoline incorporated benzimidazole derivatives. Eur J Medicin Chem. 2012; 54: 900-6.
6. Li S, Chen JX, Xiang QX et al. The synthesis and activities of novel mononuclear or dinuclear cyclen complexes bearing azole pendants as antibacterial and antifungal agents. Eur J Med Chem. 2014; 84: 677-86.

## ОЦЕНКА АНТИФУНГАЛЬНОГО ЭФФЕКТА ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ МИКРОМИЦЕТОВ И НАНОЧАСТИЦ АНАЛЬЦИМА ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИТОПАТОГЕНАМ РОДА *FUSARIUM*

Элланская Н.Э., Заменко Н.В., Дидык Н.П., Юношева Е.П.  
Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАНУ, Киев

Чтобы получать стабильные высокие урожаи сельскохозяйственных культур необходимо постоянно применять минеральные удобрения и средства химической защиты растений. Использование средств химизации связано с рядом проблем, которые носят как экологический так и экономический характер. Альтернативой применения химических пестицидов является создание высокоэффективных биологических препаратов на базе наночастиц природных минералов и продуктов жизнедеятельности микроорганизмов (бактерий и мицелиальных грибов).

Такие препараты не загрязняют окружающую среду токсическими веществами и не разрушают взаимосвязи между компонентами агроэкосистем. Одним из перспективных является создание фунгицидной композиции, состоящей из экзометаболитов штамма гриба *Penicillium roseopurpureum* (продуцента курвуларина – мощного микотоксина с высокой антифунгальной активностью) и кремнесодержащего природного минерала анальцима ( $\text{Na}[\text{AlSi}_2\text{O}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Применение курвуларина подавляет развитие фитопатогенных микроорганизмов на ранних этапах заражения растений, поскольку он относится к классу фенольных соединений.

Анальцим, который проявляет синергизм к курвуларину в составе фунгицидной композиции, поступая в растения, укрепляет их скелетную структуру, предотвращает проникновение патогенных микроорганизмов в растительные клетки и повышает устойчивость растений к стресс-факторам, тем самым усиливая действие курвуларина. Такая композиция характеризуется положительным влиянием на функциональное состояние живых организмов [1–3].

В модельном опыте нами проведены исследования по изучению фунгицидного потенциала культивируемого экстракта гриба *P. roseopurpureum*, наноматериала

анальцима, их совместного влияния на фитопатогенные грибы *Fusarium* на однолетних культурах: капусты, томатов (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. culmorum*) и пшеницы (*F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. gibbosum*).

Семена растений выдерживали в растворе культуральной жидкости (КЖ) *P. roseopurpureum* (1:50) в течение 24 ч, контрольные – в стерильной водопроводной воде. Затем семена (по 20 шт.) высаживали в стаканчики со стерилизованной почвой (серая оподзоленная). На стадии появления двух первых настоящих листьев тест-растения поливали по 15 мл смесью культуральных экстрактов грибов *Fusarium*. Повторный инфекционный фон создавали через 5 сут.

**Схема опыта:** (1) контроль; (2) обработка семян культуральной жидкостью (КЖ) *P. roseopurpureum*; (3) внесение наночастиц анальцима в почву (200 мг/200 г), (4) обработка семян КЖ + анальцим. Через две недели после повторного заражения тет-растения выкапывали, фиксировали количество проростков с видимыми фузариозными повреждениями (корневой перетяжкой), высушивали в сушильном шкафу и определяли их фитомассу. При снятии опыта был проведен микробиологический посев, определена численность и видовой состав микромицетов в почве. Повторность опыта 4-х кратная.

Обнаружено, что обработка семян исследованных растений КЖ гриба *P. roseopurpureum* ингибирует развитие грибов рода *Fusarium* в почве под капустой в 1,5 раза, под томатами – в 10 раз, под пшеницей – в 2,2 раза (табл.1). Наблюдалась специфичность действия анальцима под разными культурами. В частности, его внесение привело к возрастанию количества микромицетов в 2 раза в почве под капустой, тогда как под томатами и пшеницей численность почвенных грибов уменьшалась в 1,3 и 2,3 раза соответственно. Синергическое действие *P. roseopurpureum* и анальци-

Табл. 1. Численность микромицетов в почве модельного опыта (тыс. КОЕ в 1 г абс. сух. почвы)

Варианты опыта	капуста	томаты	пшеница
Контроль	38,7±3,5	46,1±1,6	62,3±15,9
Обработка семян КЖ <i>P. roseopurpureum</i>	25,2±4,7	4,8±2,7	29,0±1,7
Внесение наночастиц анальцима	79,3±13,9	35,2±0,5	27,0±4,5
Обработка семян КЖ <i>P. roseopurpureum</i> + внесение наночастиц анальцима	30,9±1,1	16,6±1,1	51,5±6,7

ма усиливает ингибирующий эффект по отношению к *Fusarium*: под капустой – в 1,3 раза; под томатами – в 2,7 раза; под пшеницей – в 1,2 раза.

Оценка физиологических параметров жизненного состояния тест-растений показала, что наиболее чувствительной к фитопатогенам рода *Fusarium* оказалась капуста. Поражение её проростков фитопатогенном

снижало массу надземных органов и корней более чем в два раза. Проростки помидора и пшеницы проявили большую устойчивость к фузариозу (рис. 1).

Обработка семян тест-растений КЖ *P. roseopurpureum* и внесение наночастиц анальцима в почву снижало степень поражения проростков тест-растений фузариозом. Это выразилось в увеличении фитомассы их надземных органов и корневых систем. Защитное действие КЖ *P. roseopurpureum* было существенно выше, чем у анальцима. Установлено синергическое действие КЖ *P. roseopurpureum* и внесения наночастиц анальцима в почву на накопление фитомассы тест-растениями (рис. 1). Так, совместное применение культуральной жидкости и анальцима полностью компенсировало негативный эффект, которое оказывало на фитомассу заражение проростков томатов и пшеницы фитопатогенами рода *Fusarium*.

Т. обр., полученные результаты подтвердили высокую антифунгальную активность экзометаболитов штамма гриба *P. roseopurpureum* и наночастиц анальцима по отношению к фитопатогенным грибам на примере представителей рода *Fusarium*, поражающим растения капусты, помидоров и пшеницы. Установлено, что совместное использование экзометаболитов штамма *P. roseopurpureum* и наночастиц анальцима значительно повышает их защитный эффект.

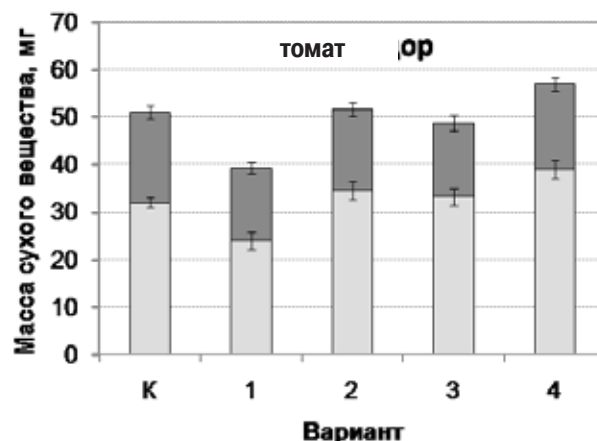
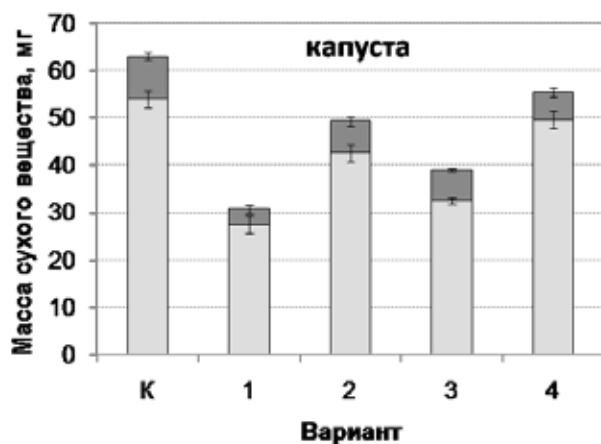
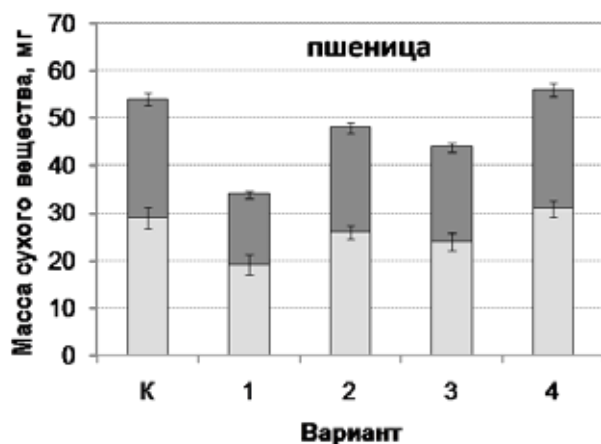


Рис. 1. Влияние обработки семян тест-растений КЖ *P. roseopurpureum* (2), внесения в почву наночастиц анальцима (3) и совместного действия этих двух факторов (4) на накопление фитомассы проростками через 2 нед после заражения фитопатогенами *Fusarium*.



#### Список литературы

1. Заименко Н.В., Иваницкая Б.А., Росицкая Н.В., Миськив Н.Г. Кремний-содержащие природные минералы для биологического земледелия. Актуальные проблемы экологии: мат. VI межд. н.-практ. конф. (Гродно, 27 – 29 окт. 2010 г.). Гродно: ГрГУ, 2010: 175-6.
2. Росицкая Н.В. Использование соединений кремния в биологической земледелии. Биол. системы. 2012; 4(2): 202-6.
3. Zaimenko NV, Didyk NP, Dzyuba OI et al. Enhancement of drought resistance in wheat and corn by nanoparticles of natural mineral analcite. Ecol Balkan. 2014; 6(1): 1-10.

## СКРИНИНГ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*-АКТИВНЫХ АНТАГОНИСТОВ ФИТОПАТОГЕНОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ И ГРИБНОЙ ПРИРОДЫ

Грабова А.Ю., Драгавоз И.В., Крючкова Л.А., Авдеева Л.В.  
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ, Киев

Современная концепция биометода в растениеводстве предполагает не только подавление различных фитопатогенов, но и поддержание видового и количественного состава микробиоты агроэкосистем. Биопрепараты, в частности, на основе бактерий-антагонистов, являются важным элементом комплексной системы защиты в современном растениеводстве, который позволяет существенно снизить нормы применения химических препаратов.

Устойчивость растений к болезням, вызываемым фитопатогенами различной природы, во многом определяется процессами взаимодействия между корневой системой растений и почвенными микроорганизмами. Известно, что в ризосфере и филлоплане растений между микроорганизмами складываются разнообразные, в том числе и конкурентные взаимоотношения.

В частности, высокой антагонистической активностью обладают аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus*: *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. mesentericus*, *B. subtilis* и др. Биологические препараты на их основе имеют ряд существенных преимуществ, таких, как безвредность для человека и животных, устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды, что делает возможным их эффективное применение в борьбе с болезнями растений различной этиологии.

Природа антагонистической активности бацилл изучена недостаточно, однако известно, что ризосферные штаммы бацилл способны синтезировать антибиотические вещества различной химической структуры, в том числе и широкий спектр липопептидных антибиотиков, таких, как фенгицины и сурфактины, являющиеся биосурфактантами. Поиск новых штаммов – антагонистов фитопатогенных микроорганизмов является актуальной задачей современной микробиологии, связанной с созданием эффективных микробных препаратов для биоконтроля заболеваний растений, а также поиском перспективных продуцентов антибиотических соединений.

**Цель работы** – отобрать новые штаммы *Bacillus* с высоким уровнем и широким спектром антагонизма по отношению как к фитопатогенным грибам, так и бактериям на основании результатов скрининга антагонистической активности.

В структуре заболеваний растений грибы являются преобладающими возбудителями. Фитопатогенные грибы чаще всего поражают корни и высаживаемые в почву семена, причем потери урожая от таких инфекций могут достигать 70%. Скрининг антагонистов фитопатогенных микроорганизмов-возбудителей заболеваний культурных растений проводили в несколько этапов. На 1-м этапе изучали уровень антагонизма штаммов *Bacillus* sp. к *Fusarium graminearum*, который является наиболее распространенным и опасным возбудителем заболеваний зерновых культур.

В частности, в различных областях Украины им часто поражаются озимая пшеница, ячмень, овес. Другие

представители рода *Fusarium* являются возбудителями болезней практически всех культурных растений. Кроме того, известно, что грибы *Fusarium* высоко устойчивы к неблагоприятным условиям внешней среды и в течение длительного времени сохраняют жизнеспособность в почве и на семенах.

В результате проведенных исследований показано, что ни один из исследуемых штаммов бацилл не проявлял высокий уровень антагонизма по отношению к *F. graminearum* (рис. 1).

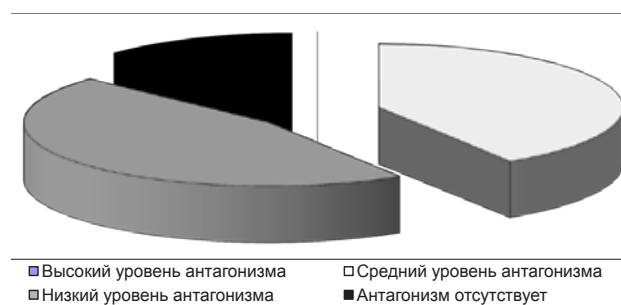


Рис. 1. Распределение штаммов по уровню антагонистической активности к *F. graminearum*.

Более 50% штаммов проявили низкий уровень антагонизма, а в 13% случаев антагонизм полностью отсутствовал. Только 23% штаммов бацилл проявили средний уровень антагонизма к данному фитопатогену, однако зоны задержки роста (ЗЗР) достоверно не отличались между собой. В дальнейшем была исследована антагонистическая активность последних по отношению к *F. oxysporum* и *Bipolaris sorokiniana*, выделенных с поверхности растений зерновых культур (табл. 1).

Табл. 1. Распределение штаммов бацилл по уровню антагонистической активности в отношении к фитопатогенным грибам

Грибы	Количество штаммов, %		
	с низким уровнем антагонизма	со средним уровнем антагонизма	с высоким уровнем антагонизма
<i>Fusarium oxysporum</i>	94,4	5,6	0
<i>Bipolaris sorokiniana</i> 7G	33,3	44,4	22,2

Показано, что *F. oxysporum* является значительно более устойчивым к антагонистическому действию бацилл – не более 6% из отобранных ранее антагонистов *F. graminearum* проявили средний уровень антагонизма к этому грибу. В тоже время, более 20% штаммов

активно подавляли рост *B. sorokiniana*, выделенного с поверхности растений ячменя.

Таким образом, из всех исследованных было отобрано 5 штаммов с наиболее высоким уровнем фунгицидной активности. Последние были использованы для проверки антагонистической активности

в отношении более широкого спектра фитопатогенных микромицетов. Это было необходимо оценить с целью определения спектра сельскохозяйственных культур, для защиты которых можно будет использовать отобранные штаммы. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Антагонизм бацилл по отношению к фитопатогенным грибам.

Штамм <i>Bacillus</i> sp.	Зоны задержки роста, мм					
	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i> 7G	<i>Bipolaris sorokiniana</i> 9G
C1	13±0,1	7±0,2	16±0,2	22±0,2	21±0,7	19±0,4
C6	13±0,4	8±0,1	12±0,2	19±0,3	18±0,3	18±0,1
C10	12±0,2	10±0,2	14±0,5	21±0,3	22±0,3	21±0,2
Lg 24s	12±0,3	8±0,3	14±0,3	20±0,1	20±0,1	29±0,6
Lg 37s	12±0,1	15±0,6	16±0,1	20±0,2	20±0,2	13±0,5
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7100	11±0,2	8±0,2	16±0,6	19±0,3	17±0,4	15±0,4

Установлено, что только штамм *Bacillus* sp. Lg 37s проявлял средний уровень антагонизма по отношению к *F. oxysporum* (ЗЗР=15 мм), остальные штаммы проявляли слабую антагонистическую активность по отношению к данному микромицету (ЗЗР не превышали 10 мм). Большинство штаммов бацилл проявили средний уровень антагонизма к грибу *B. sorokiniana*, а штамм *Bacillus* Lg 24s оказался активным антагонистом этого микромицета, его ингибирующее действие значительно превышало аналогичный показатель у эталонного штамма (ЗЗР = 28,5 и 14,5 мм соответ-

ственно). Отобранные штаммы также имели высокий и достоверно одинаковый уровень антагонизма по отношению к *R. solani* и *B. sorokiniana*, выделенному из ячменя и средний по отношению к *F. solani*.

Для всех штаммов *Bacillus* sp. был также исследован антагонизм по отношению к коллекционным культурам фитопатогенных бактерий. На рис. 2 показано распределение штаммов бацилл по уровню антагонистической активности к фитопатогенным бактериям, принадлежащим к различным родам. Показано, что высокий уровень антагонизма к *X. campestris* и *P.*

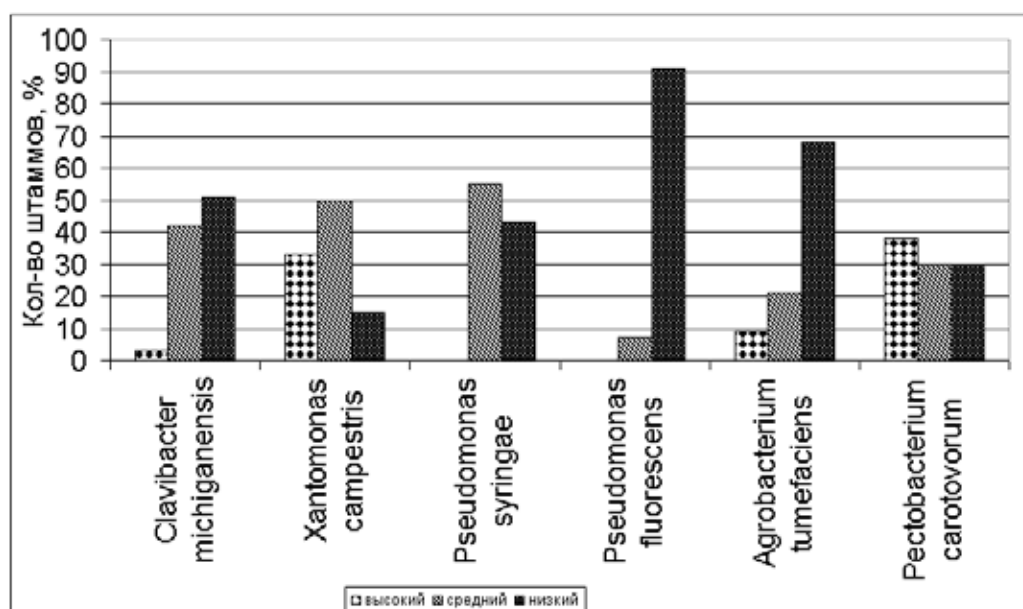


Рисунок 2. Распределение исследованных штаммов бацилл по уровню антагонистической активности к коллекционным фитопатогенным бактериям.

Таблица 3. Спектр антагонистической активности отобранных штаммов по отношению к коллекционным культурам фитопатогенных бактерий

Штамм <i>Bacillus</i> sp.	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
С 1	16	14	8	7	18	24
С 6	11	13	10	6	13	23
С 10	12	20	12	8	21	27
LG 24s	21	16	17	11	37	24
LG 37s	18	14	14	7	25	17

*carotovorum* проявляли 33 и 38% штаммов бацилл соответственно. Более половины штаммов бацилл проявляли низкий антагонизм по отношению к *C. michiganensis*. Эта же половина бацилл, включая активные штаммы-антагонисты фитопатогенных микромицетов, проявили среднюю антагонистическую активность к *P. syringae* – фитопатогенной бактерии, которая является одним из наиболее широко распространенных в мире возбудителей заболеваний большинства культурных (в том числе и злаковых), а также дикорастущих растений.

По отношению к *P. fluorescens* только 4% штаммов проявляли средний уровень антагонизма. Очевидно, что результаты являются свидетельством в пользу применения данных штаммов бацилл в качестве агентов биоконтроля, поскольку *P. fluorescens* – условный фитопатоген. Так, некоторые штаммы псевдомонад могут ослаблять развитие фузариозов, повышать

урожайность определенных культур и индуцировать у них системную устойчивость.

В целом, около 25% исследуемых штаммов проявили низкий уровень либо полное отсутствие антагонизма к коллекционным штаммам фитопатогенных бактерий, 11% штаммов – средний и высокий уровень антагонизма к большинству тест-культур. При этом эталонный штамм *B. amyloliquefaciens* (УКМ В-7100) проявлял низкий уровень антагонизма по отношению к *P. syringae* и *P. fluorescens* и высокий уровень антагонизма ко всем другим фитопатогенным бактериям.

Следует отметить, что штаммы, которые проявляли наиболее высокий уровень антагонизма к фитопатогенным микромицетам, оказались наиболее активными антагонистами к коллекционным тест-культурам фитопатогенных бактерий (табл. 3.), и, в тоже время, не подавляли роста *P. fluorescens*.

## ДЕЙСТВИЕ ФУНГИЦИДОВ НА *FUSARIUM GRAMINEARUM* SCHW

Гришечкина Л.Д.

ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин

Серьезную проблему для производства зерна представляют грибы рода *Fusarium*, особенно при поражении колоса. Наиболее опасное проявление этого заболевания отмечается в фазе колошения–цветения культуры. В этот период грибок поражает зародыш и колос формирует белые зерна (~70%), пронизанные его мицелием. Такие зерна часто несут скрытую фузариозную инфекцию. В пораженном фузариозом семени уменьшается содержание белка и снижается его биологическая ценность, а также ухудшаются хлебопекарные качества. Накопление микотоксинов ведет к тому, что зерно становится непригодным для пищевых и кормовых целей, а также резко снижается всхожесть семян и урожайность [1].

Не все фунгициды применяемые в сельском хозяйстве в борьбе с фузариозом колоса имеют достаточную эффективность. Бензимидазолы (д.в. беномил, карбендазим), триазолы (д.в. флутриафол, триади-

мефон, триадименола) и имидазолы (д.в. прохлораз) и др. подавляют развитие патогена на уровне 40–60% и только у тебуконазола она достигает 70–80%. Высокая фунгицидная активность против возбудителей фузариозов характерна для метконазола и протиоконазола. В отношении стробилуринов, применяемых на зерновых культурах, нет единого мнения по поводу их эффективности против фузариоза колоса. Одни исследователи [2, 3] доказывают, что препараты на их основе не только не действуют на грибок, но даже повышают содержание микотоксинов в зерне. В связи с чем особое внимание нами было уделено определению эффективности изучаемых препаратов против латентной инфекции.

Исследования проводились в Краснодарском крае при искусственной инокуляции растений пшеницы озимой сорта Батко путем заражения пшеницы водной суспензией спор гриба *Fusarium graminearum*



Schw. в концентрации  $1 \cdot 10^5$  мл<sup>-1</sup>. Суспензию наносили на колос в фазе начала цветения из расчета 50 мл на 1 м<sup>2</sup> и покрывали полиэтиленовыми изоляторами, создавая влажную камеру в течение суток. После чего растения обрабатывали фунгицидами с помощью опрыскивателя марки «Теснопа», расход рабочей жидкости составил 300 л/га. В контрольном варианте фунгициды не применяли. Размер опытных делянок составил 10 м<sup>2</sup>, повторность 4-кратная.

Агротехника опытных делянок – общепринятая для данного региона. Почва – выщелоченный сверхмощный чернозем с содержанием гумуса 3,8%; рН 6,7. В опытах были использованы следующие действующие вещества: тебуконазол (Фоликур, КЭ в дозировке 1,0 л/га), тебуконазол с триадимефоном (Форус, КЭ – 1,0 л/га), протиоконазол с тебуконазолом (Прозаро, КЭ – 1,0 л/га), тебуконазол с прохлоразом (Замир, ЭМВ – 1,2 л/га), тебуконазол с пропиконазолом (Титул Дуо, ККР – 0,32 л/га), спирокарсамин с тебуконазолом и триадимефоном (Фалькон, КЭ – 0,6 л/га), флутриафол (Импакт, СК – 0,5 л/га), пикоксистробин с ципроконазолом (Аканто Плюс, КЭ – 0,6 л/га), пропиконазол с ципроконазолом (Альто супер, КЭ – 0,5 л/га; пропиконазол с азоксистробиним и ципроконазолом (Амистар трио, КЭ – 1,0 л/га).

В полевых условиях пораженность колосьев фузариозом оценивали визуально по 5-балльной шкале. В лабораторных условиях зараженность зерна определяли путем подсчета семян с типичными признаками болезни. В целях выявления скрытой фузариозной инфекции зерновок раскладывали на питательную среду Чапека. Просмотр колоний гриба и подсчет осуществляли на 3, 5 и 7 сут. Статистическая обработка данных проводилась методом дисперсионного анализа по Доспехову Б.А. [4].

В наших исследованиях фунгицидные обработки пшеницы гарантированно снижали пораженность колоса фузариозом на 49,0–77,0% в зависимости от агроэкологических условий, складывающихся в годы проведения опытов. При этом фон поражения колоса в контроле был достаточно высоким (69,7–78,6%). Наибольшую эффективность в борьбе с болезнью на уровне 63–65% обеспечивали смеси тебуконазола и прохлоразы (Замир, ЭМВ), пироклостробина с ципроконазолом (Аканто Плюс, КС), пропиконазола с азоксистробиним и ципроконазолом (Амистар Трио, КЭ) [5, 6].

Во всех вариантах применения фунгицидов зараженность зерновок фузариозом снижалась. Препара-

ты действовали и на латентную форму фузариоза, ограничивая развитие патогена на 16–70% в сравнении с контролем. Наилучший результат был получен при использовании препаратов следующих комбинаций действующих веществ: тебуконазол с прохлоразом, тебуконазол один и с триадимефоном, пироклостробин с ципроконазолом. Во все годы исследований, даже в экстремальных погодных условиях 2010 г. с преобладанием повышенных температур воздуха и отсутствие осадков, обработанные препаратами растения обеспечивали прибавку урожая на 31–84 % по сравнению с контрольными растениями. Показатели массы 1000 зерен в вариантах применения препаратов были выше контроля на 5,2–19,0 г.

Следует отметить, что на результативность применения средств защиты сказывается ряд причин, связанных с особенностями патогенеза: полициклический характер его протекания; растянутый период заражения растений; скорость проникновения инфекции во внутренние ткани растения и ее распространение в пределах колоса; степень колонизации зерновок; латентный период болезни; плотность прилегания чешуек к зерновке; темпы налива и созревания зерна и т.д.

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что современные фунгициды существенно ограничивают развитие фузариоза колоса, включая зараженность зерновок в латентной форме.

#### Список литературы

1. Долженко В.И. Повысить фитосанитарную безопасность Российской Федерации. Защ. карант. раст. 2011; 2: 4-7.
2. Greenfield JE, Rosall S. The effect of fungicides on productivity and toxin content of wheat inoculated with *Fusarium*. 6-th European *Fusarium* Seminar. Book of Abstr. 2000: 104-5.
3. Grossman K, Retzlaff G. Bioregulatory effect of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat. Pest Sci. 1997; 50: 11-20.
4. Доспехов Б.А. Методика опытного дела. М.: Колос. 1973: 336 с.
5. Гришечкина Л.Д. Фунгициды на основе тебуконазола в борьбе с фузариозом колоса хлебных злаков. Зерн. хоз. 2012; 4: 59-64.
6. Гришечкина Л.Д., Волкова Г.В., Долженко В.И. Исследование эффективности фунгицидов для защиты зерновых культур от фузариоза колоса. Докл. РАСХН. 2012; 4: 13-6.

## РАЗРАБОТКА НОВОГО БИОФУНГИЦИДА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*

Хомяк А.И., Жевнова Н.А., Асатурова А.М.  
ВНИИ биологической защиты растений, Краснодар

Повсеместное распространение на территории России токсиногенных возбудителей фузариоза зерновых культур, устойчивых к действию большинства современных фунгицидов, является одним из негативных последствий интенсивных агротехнологий.

Заболевания, вызываемые различными видами грибов рода *Fusarium*, вызывают корневые и прикорневые гнили всходов, трахеомикозные увядания растений, загнивания семян, поражение репродуктивных частей растений [1]. Что приводит к значительным потерям

урожая: до 30–40% и снижению качества зерна до 100% [2].

Среди факторов, снижающих качество зерна, серьезное значение имеет контаминация его фузариотоксинами, которые накапливаются в зерне, что ухудшает потребительские качества сельскохозяйственного пищевого сырья, его биологическую полноценность и делает его небезопасным для теплокровных организмов [3, 4]. Наличие в партиях семян, предназначенных для производства продуктов питания и кормов, значительной примеси семян, пораженных грибами рода *Fusarium*, в конечном итоге может вызывать фузариотоксикозы у людей и животных. Эта болезнь сопровождается изменением состава крови, ослаблением иммунной и повреждением нервной системы, а также образованием опухолей в различных органах [5, 6].

Многолетнее применение химических фунгицидов в огромных масштабах выявило ряд отрицательных последствий, таких, как загрязнение окружающей среды, пищевых продуктов, вредное влияние на здоровье человека, глубокие изменения в экосистемах [7]. В связи с этим особое значение приобретает использование экологически безопасных методов защиты растений от возбудителей болезней, в том числе и микробиологических препаратов [8].

Несмотря на многочисленные исследования готовых биопрепаратов на российском рынке средств защиты растений крайне недостаточно. Это связано, в том числе, и с отсутствием современных стандартов получения и применения биопрепаратов.

Сотрудниками лаборатории микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВНИИБЗР созданы опытные образцы биофунгицидов на основе аборигенных штаммов бактерий-антагонистов *Vacillus* для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза. Были проведены исследования, позволяющие разработать элементы технологии производства и применения новых биофунгицидов.

Были подобраны первые образцы оригинальных оптимизированных сред (ОС), и проведена их сравнительная оценка со стандартными средами: Кинга В (КВ) и картофельно-глюкозной средой (КГС) по таким критериям, как количество колониеобразующих единиц (КОЕ) и антифунгальная активность.

Установлено, что количество КОЕ в жидкой культуре (ЖК) на основе штамма *B. subtilis* 336g на ОС оказалось на 3 порядка выше, чем на КВ, и на 2 порядка выше, чем на КГС и составило  $(8,7 \pm 0,66) \times 10^{10}$  КОЕ/мл. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 ОС также оказалась более предпочтительной по данному критерию: титр ЖК составил  $(7,2 \pm 0,42) \times 10^{10}$  КОЕ/мл.

Для штамма *B. subtilis* BZR 336g максимальная антифунгальная активность в отношении *F. graminearum* отмечена на ОС и составила 90,0% на 5-е сут, 83,6% на 10-е сут и 78,2% – на 15-е сут. На КГА и КВ степень ингибирования патогена увеличивалась до 10 сут инкубации, но была значительно ниже, чем в варианте с ОС. На 15-е сут антифунгальная активность на указанных средах начала заметно снижаться (рис. 1).

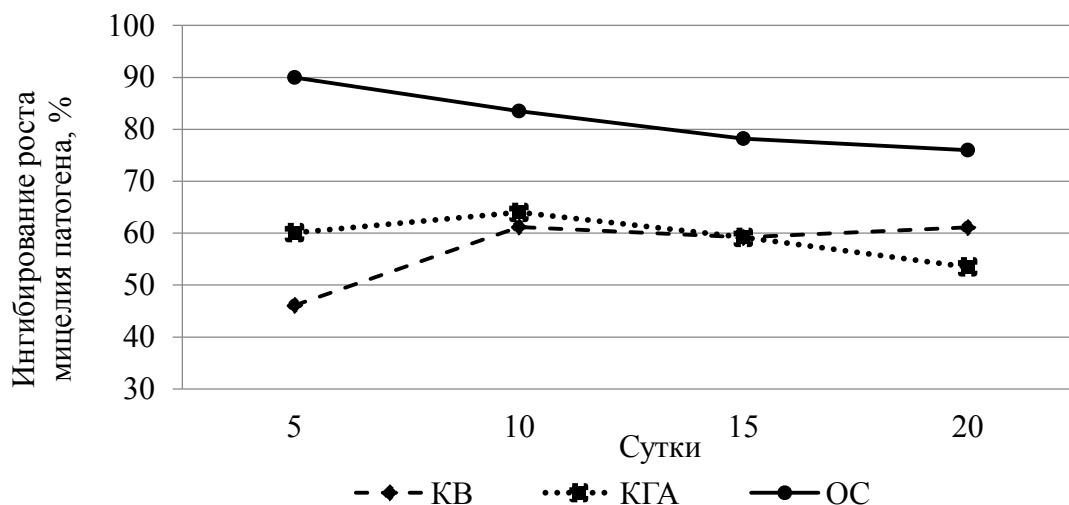


Рисунок 1. Антифунгальная активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. graminearum*.

Важно отметить, что только на ОС данный штамм обладал высокой подвижностью – уже на 5-е сут совместной инкубации биоагент занял всю площадь питательной среды, блокируя рост патогена.

Степень ингибирования *F. graminearum* в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 517 к 10-м сут увеличивалась на всех питательных средах, однако существенных различий в антифунгальной активности, как в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 336g, выявлено

не было (рис. 2). Но все же *B. subtilis* BZR 517, как и *B. subtilis* BZR 336g, на ОС обладал более высокой подвижностью.

Кроме того, среди особенностей действия метаболитов активных штаммов бактерий на *F. graminearum* необходимо отметить, что в зоне антагонистического действия бактерий в некоторых вариантах наблюдался лизис уже сформировавшегося мицелия, ингибирование роста и изменение окраски мицелия патогена.

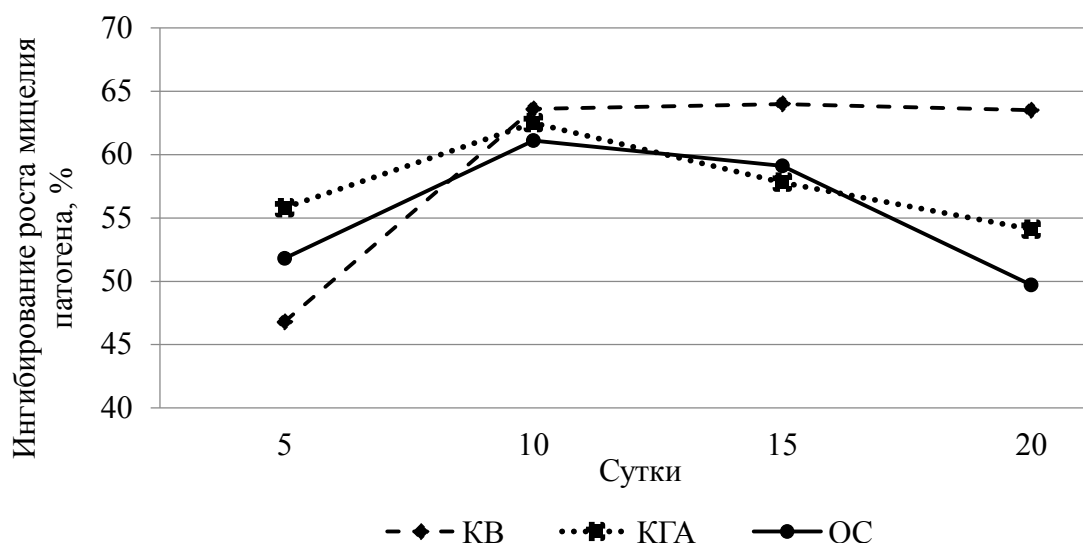


Рисунок 2. Антифунгальная активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum*.

Специально подобранная ОС позволяет штаммам наиболее максимально реализовать свои биоконтрольные признаки (продукция антифунгальных веществ, ферментов и др.). Так, биологическая эффективность применения опытных образцов биофунгицидов, полученных с использованием ОС, на фоне искусственного заражения *F. graminearum* составила от 35,4% до 60,8% (развитие в контроле – 64,8 % и распространение – 100 %). При этом эффективность химического эталона Кинто Дуо, КС составила 38,9%, а биологического эталона Фитоспорин-М – 28,9 %.

Важно отметить, что в вариантах с тремя различными питательными средами опытные образцы на основе штамма Ш BZR 517 обеспечивали одинаково эффективную защиту семян и проростков озимой пшеницы: 35,0% в варианте с КГС и 37,0% в вариантах с КВ и ОС. Максимальную биологическую эффективность среди образцов на основе смеси двух штаммов показал вариант с наименьшей нормой расхода при культивировании на КГС – 36,4%, на КВ – 60,8%, на ОС – 35,1%.

В большинстве опытных вариантов отмечено также положительное влияние на всхожесть семян. В основном, опытные образцы биофунгицидов, обеспечивающие высокую биологическую эффективность, демонстрировали аналогичный результат в отношении всхожести семян. Однако на КВ при обработке смесью штаммов в соотношении 1:1 с максимальным защитным эффектом 60,0%, всхожесть была небольшой – всего 55,0%. В то время, как в варианте с обработкой смесью штаммов в соотношении 1:0,5 с меньшей биологической эффективностью (21,5 %) всхожесть составила 90,0%. Важно отметить, что всхожесть семян в варианте с обработкой биофунгицидом на основе ОС была в среднем на 20 – 30% выше, чем в вариантах со стандартными средами, что также свидетельствует об эффективной защите семян от фузариозной почвенной инфекции.

В 2012–2014 гг. на экспериментальной базе ВНИИБЗР в условиях стационарного севооборота на естественном фоне поражения фузариозными корневыми

гнилями были проведены испытания опытных образцов новых биофунгицидов на озимой пшенице сорта Калым. Обнаружена зависимость биологической эффективности от количества инфекционного начала и погодных условий в период вегетации. Биологическая эффективность против фузариозных корневых гнилей в 2012–2013 гг. составила 10,0 – 44,2% (на фоне развития болезни 57,1%). При этом было получено 25,0–48,0% дополнительного урожая.

Биологическая эффективность против корневых гнилей в 2013–2014 гг. составила 17,2 – 25,5%, при развитии болезни 36,1%, величина сохраненного урожая – 4,9 – 11,9%.

Таким образом, нами установлено, что опытные образцы новых биофунгицидов обеспечивают эффективную защиту семян и проростков озимой пшеницы в лабораторно-полевых условиях против фитопатогенных грибов рода *Fusarium*. Это делает их перспективными для использования в сельскохозяйственной практике в качестве агентов биоконтроля возбудителей фузариоза. Новые биофунгициды могут быть использованы для защиты озимой пшеницы в технологиях органического земледелия и в системах интегрированной защиты, существенно снижая пестицидный пресс на агроценозы юга России.

*Работа выполнена при финансовой поддержке МЦП ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» на 2011-2015 гг. Министерства образования и науки РФ (ГК №14.М04.12.0012) и гранта № 13-08-96533 p\_юг\_a Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Краснодарского края.*

#### Список литературы

1. Монастырский О.А Опасные грибы. Сельскохозяйственные аспекты исследований фитопатогенных токсинобразующих грибов. Агро XXI. 1998; 10:18-9.
2. Выприцкий, А.С., Плахотник В.В., Выприцкая А.А. Возбудители особо опасных болезней подсолнечника в ЦЧЗ. Биологическая защита растений – основа

- стабилизации агроэкосистем: материалы межд. н.-практ. конф. (20–22 сент. 2006 г.). Краснодар. 2006; 4: 134-6.
3. Новикова И.И. Полифункциональные биопрепараты для защиты растений от болезней. Защ. карант. раст. 2005; 2: 22-4.
  4. Пирязева Е.А., Малиновская Л.С. Распространенность грибов рода *Fusarium* Link, поражающих зерно хлебных злаков в различных регионах Восточной Сибири. Пробл. вет. санитарии, гигиены и экол. 2009; 2: 14-9.
  5. Иващенко В.Г., Шипилова Н.П., Назаровская Л.А. Фузариоз колоса хлебных злаков. СПб. 2004:164 с.
  6. Азизбекян Р.Р. Использование спорообразующих бактерий в качестве биологических средств защиты растений. Биотехнология. 2013;1: 69-77.
  7. Pitan B. Decline in leaf growth under salt stress is due to an inhibition of H<sup>+</sup> pumping activity and increase in apoplastic pH of maize leaves. J Plant Nutr Soil Sci. 2009; 172: 535-43.
  8. Билай В.И. Грибы рода *Fusarium*. Киев: Наук. думка. 1977: 441 с.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИЧЕСКИХ ФУНГИЦИДОВ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГРИБНЫХ ИНФЕКЦИЙ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

Кутузова И.А., Григорович И.А., Побединская М.А., Фарушкина К.Т., Еланский С.Н.  
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Возбудители клубневых гнилей картофеля вызывают высокие потери урожая при вегетации и во время хранения. Возбудитель серебристой парши *Helminthosporium solani* развивается на клубнях, во время хранения это заболевание приводит к иссушиванию клубней и поражению ростков, что препятствует успешному прорастанию семенных клубней. *H. solani* спорулирует на поверхности перидермы пораженного клубня. Возбудитель может перезимовывать на зараженных клубнях при хранении, и поэтому контроль посадочного материала является одной из важных стратегий контроля болезни. Конидии *H. solani* могут длительное время сохраняться в почве.

Антракноз, или черная пятнистость, вызывается несовершенным грибом *Colletotrichum coccodes*. Заболевание характеризуется серебристыми поражениями на поверхности клубней, которые приводят к ухудшению качества кожуры и изменению структуры клубней. В этом случае симптомы заболевания очень похожи на серебристую паршу. *C. coccodes* также может вызывать появление язв, часто мокрых, на клубнях и других частях растений.

Отличительным признаком всех поражений антракнозом является наличие мелких точечных черных склероциев на пораженных частях. *C. coccodes* является одним из элементов комплекса заболеваний, вызывающих раннюю гибель картофеля. До недавнего времени частота встречаемости и урон от черной пятнистости, возможно, были занижены, так как симптомы на клубнях часто ошибочно принимали за серебристую паршу, вызываемую *H. solani*. Инокулом *C. coccodes* может содержаться как в семенных клубнях, так и в почве.

Заболевания, вызываемые *H. solani* и *C. coccodes* сложно поддаются контролю, поскольку коммерческие сорта картофеля обладают низким уровнем устойчивости. Эффективность химических средств защиты растений довольно слабо исследована, о наличии устойчивых изолятов в российских популяциях нам не известно. В то же время эти заболевания стали достаточно распространенным и наносят, при мас-

совом развитии, значительный урон выращиваемому картофелю. Для разработки эффективных мер борьбы необходимо изучение эффективности препаратов фунгицидного действия, прежде всего используемых для предпосадочной обработки клубней.

Для определения устойчивости к фунгицидам использовали агаризованную среду на основе пивного суслу с добавлением фунгицида в концентрациях 0,1, 1,0, 10,0, 100,0 и 1000,0 ppm. В оценке концентраций действующих веществ использован показатель *pprt* (частей на миллион):  $1pprt = 1 \text{ мкг/мл} = 1 \text{ мг/л}$ .

В качестве контроля использовали среду без добавления фунгицида. Посев проводили агаровыми блоками с мицелием гриба, в трех повторностях. Чашки инкубировали при комнатной температуре (22 – 24 °С). Когда диаметр бесфунгицидного контроля достигал 75% диаметра чашки Петри (50% для *H. solani*), проводили учет диаметров колоний. Показатель  $EC_{50}$  определяли для каждого изолята в отдельности.  $EC_{50}$  – (50% эффективной концентрации) это та концентрация фунгицида, которая замедляет скорость радиального роста колонии в 2 раза по сравнению с контролем. В работе были использованы следующие фунгициды: дифеноконазол (в работе использовали препарат Скор), азоксистробин (Квадрис), флудиоксанил (Максим), пенцикурон (Престиж), тиабендазол (Текто). Также в нашей работе было исследовано влияние нового фунгицида Зерокс, действующим веществом которого является коллоидное серебро. Ниже приводятся описания использованных в работе пестицидов.

*Дифеноконазол* – системный фунгицид и протравитель семян. Обладает длительным защитным и лечебным действием против широкого круга растительных патогенов, относящихся к аскомицетам, базидиомицетам, дейтеромицетам, включая возбудителей альтернариоза, септориоза, церкоспороза, парши, антракноза, ржавчины, мучнистой росы.

*Азоксистробин* – системный фунгицид для защиты картофеля и овощных культур открытого и защищенного грунта (томаты, огурцы), а также виноградной

лозы от основных болезней, таких как настоящая и ложная мучнистая роса, фиальтернариоз, фитофтороз, милдью и оидиум. Препарат обладает системным (передвигается в растении акропетально) и трансламинарным действием, ингибирует прорастание спор и апрессориев, воздействует на прорастающие гифы грибов, обладает выраженным антиспорулирующим действием.

Флудиоксонил – контактным фунгицид с длительным защитным и слабым системным действием, подавляющим фосфорилирование глюкозы в процессе клеточного дыхания. Влияние его на рост мицелия, размножение патогена и формирование клеточных мембран связывают с нарушением функции клеточных мембран. Он эффективно подавляет развитие патогенов из рода *Fusarium* и *Tilletia*, вызывающих болезни проростков зерновых культур, а также из рода *Alternaria*, *Ascochyta*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia* и *Penicillium* ssp. Применяется в России в качестве фунгицида для предпосевного протравливания семян зерновых культур, гороха, подсолнечника и сахарной свеклы, а также для обработки клубней картофеля перед посадкой и перед закладкой на хранение.

Пенцикурон является контактным фунгицидом с длительным защитным действием, применяется для предпосадочного протравливания семенных клубней картофеля.

Тиабендазол входит в состав сжигаемых шашек Вист и применяется для фумигации помещения под картофель, а также обработки клубней после их загрузки на хранение

Зерокс – новый фунгицидный препарат широкого спектра действия против фитопатогенных бактерий, грибов и оомицетов, действующим веществом которого являются наноразмерные частицы коллоидного серебра, поверхностно модифицированные экологически безопасным биоразлагаемым амфотерным поверхностно-активным веществом.

Препарат Зерокс является новым фунгицидом, разработанным совместно специалистами МГУ им. М.В. Ломоносова, компании «Grand Harvest Research» и группы компаний «Агрохимпром». Препарат эффективен против широкого круга грибных и бактериальных патогенов, находится в стадии регистрации. Используется для предпосадочной обработки семян и опрыскивания вегетирующих растений [1, 2].

Исследования эффективности фунгицидов в отношении возбудителя серебристой парши (таблица 1) показали следующее: тиабендазол был достаточно эффективен в отношении большей части исследуемых изолятов, однако были обнаружены устойчивые изоляты, успешно растущие на концентрации 100 и даже 1000 ppm. Зерокс был эффективен в отношении всех изучаемых изолятов: максимальные показатели

Таблица 1. Влияние концентрации исследуемых фунгицидов в агаризованной среде на радиальный прирост мицелия *H. solani*.

Фунгицид	Кол-во протестированных изолятов	Вариабельность $EC_{50}$ , ppm	Среднее $EC_{50}$ , ppm	Число штаммов с различными $EC_{50}$				
				<1	1–10	10–100	100 – 1000	>1000
Тиабендазол (Текто)	13	0,5 – >1000	*	1	9	0	1	2
Коллоидное серебро (Зерокс)	5	7,63 – 10,55	9,34	0	3	2	0	-

Примечание: \* – Невозможно вычислить среднее значение  $EC_{50}$ , так как данные по  $EC_{50}$  некоторых штаммов превышают максимально исследованную концентрацию в 1000 ppm.

Таблица 2. Влияние концентрации исследуемых фунгицидов в агаризованной среде на радиальный прирост мицелия *S. coccoodes*.

Фунгицид (препарат)	Кол-во протестированных изолятов	Вариабельность $EC_{50}$ , ppm	Среднее $EC_{50}$ , ppm	Число штаммов с различными $EC_{50}$ :			
				<1	1–10	10–100	>100
Тиабендазол (Текто)	40	0,85 – 50,30	8,87	8	24	8	0
Коллоидное серебро (Зерокс)	31	3,07 – 6,97	5,14	0	31	0	0
Флудиоксонил (Максим)	21	0,58 – 0,86	0,69	21	0	0	0
Пенцикурон (Престиж)	40	>100	>100	0	0	0	40
Азоксистробин (Квадрис)	38	0,05 – 11,55	1,91	28	8	2	0
Дифеноконазол (Скор)	36	0,05 – 0,67	0,11	36	0	0	0

ЕС<sub>50</sub> не превышали 11 ppm. Оценка эффективности препаратов в отношении *S. coccoodes* (табл. 2) показала, что наиболее эффективны были фунгициды флудиоксонил и дифеноконазол (максимальный показатель ЕС<sub>50</sub> для обоих фунгицидов не превышал 1 ppm). Хорошую эффективность показали также азоксистробин и Зерокс (ЕС<sub>50</sub> < 11 ppm). Однако следует отметить, что азоксистробин имел фунгистатический эффект – очень медленный рост наблюдался и при концентрациях 100 и даже 1000 ppm. Пенцикурон был не эффективен в отношении *S. coccoodes* – рост изолятов при концентрации 100 ppm практически не отличался от контроля.

**Вывод.** Используемые в защите картофеля фунгициды сильно отличаются по эффективности воздействия на исследованные штаммы возбудителей

болезней картофеля. Поэтому при планировании защитных мероприятий обязательно следует учитывать эффективность фунгицидных препаратов.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00029).*

#### Список литературы

1. Еланский С.Н., Побединская М.А., Кокаева Л.Ю. и др. Новый препарат Зерокс на основе коллоидного серебра: результаты лабораторных испытаний. *Защ. картоф.* 2014; 1: 41-3.
2. Мыца Е.Д., Еланский С.Н., Кокаева Л.Ю. и др. Новый препарат Зерокс – оценка фунгицидного и бактерицидного эффекта in vitro. *Достиж. науки и техн. АПК.* 2014; 28(12): 16-9.

## СОВРЕМЕННЫЕ ФУНГИЦИДЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ КАРТОФЕЛЯ ОТ БОЛЕЗНЕЙ

*Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Сметанина Т.И.  
ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы. Московская область,*

Картофель является ценной продовольственной и технической культурой для России, однако потери урожая, как в период выращивания растений, так и во время уборки и хранения клубней в нашей стране достигают высоких значений (более 70% [1]). Одной из причин этого являются потери урожая, вызванные поражением растений многочисленными болезнями; в России наиболее вредоносными являются фитофтороз (возб. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary; альтернариоз (возб. *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) J. et G. и возб. *Alternaria alternata* (Keissler); ризоктониоз (возб. *Rhizoctonia solani* (Kiihn)); серебристая парша (возб. *Helminthosporium solani* (Durieu et Mont.); антракноз (возб. *Colletotrichum atramentarium* (Berk. et Br.) Taub.) и др. [7].

Вредоносность перечисленных выше болезней можно существенно уменьшить с помощью интегрированной защиты картофеля, включающей использование здорового семенного материала, болезнеустойчивых сортов, правильного агротехнического ухода за растениями, а также современных химических средств защиты.

Использование фунгицидов для обработки семенных клубней или применение их при посадке картофеля является первым и очень важным стратегическим этапом в формировании оптимального фитосанитарного состояния посадок картофеля. В России для обработки клубней картофеля наиболее часто используются препараты на основе флудиоксонила (Максим, Селест Топ), пенцикурона (Престиж); в основном, эти препараты предназначены для защиты картофеля от ризоктониоза.

В 2010 г. в список препаратов, разрешенных на территории РФ для борьбы с ризоктониозом, серебристой паршой и антракнозом картофеля, включен фунгицид на основе азоксистробина [3]. В последние годы для защиты картофеля от фитофтороза и альтернариоза применяются фунгициды из различных химических

классов, в том числе, Скор (д.в. дифеноконазол) и Ревус (д.в. мандипропамид).

*Скор* – системный фунгицид с длительным профилактическим и выраженным лечебным действием против альтернариоза картофеля;

*Ревус* – трансламинарный фунгицид с профилактическим и выраженным лечебным действием против фитофтороза [4]. Однако при выборе фунгицидов, картофелеводы предпочитают препараты с широким спектром действия, для одновременной защиты посадок картофеля от фитофтороза и альтернариоза.

Появление на рынке нового фунгицида – *Ревус Топ*, КС (д.в. мандипропамид+ дифеноконазол) – системно-трансламинарного фунгицида с широким спектром действия и обладающего профилактической и лечебной активностью против фитофтороза и альтернариоза позволило эффективно защищать посадки картофеля от данных болезней.

Целью опыта, проведенного нами в 2013 г. было оценить эффективность последовательного применения препаратов на картофеле: внесение фунгицидов в почву при посадке клубней и обработки растений в период вегетации растений с целью снижения вредоносности болезней, повышения урожайности и товарности клубней. Опыт был заложен на опытном участке ВНИИФ «Раменская Горка» в Одинцовском районе Московской области. Использовали восприимчивый к фитофторозу сорт картофеля Ред Скарлетт.

#### Варианты:

1. Внесение при посадке картофеля препарата Юниформ, содержащего в своем составе два действующих вещества: азоксистробин, (321,7 г/л) и мефеноксам, (123,7 г/л) в дозе 1,5 л/га.
2. Опрыскивание вегетирующих растений фунгицидами по схеме: Ридомил Голд МЦ, (2 обр.); Ревус Топ, (2 обр.); Ширлан.
3. Внесение при посадке картофеля препарата Юниформ в дозе 1,5 л/га, далее обработка вегетирующих

растений фунгицидами по схеме: Ридомил Голд МЦ, (2 обр.); Ревус Топ, (2 обр.); Ширлан.

#### 4. Контроль (без обработок).

В ходе исследований оценивали следующие показатели: в период полных всходов – пораженность растений ризоктониозом; на завершающих стадиях развития растений (за 5 сут до уборки) – пораженность ризоктониозом и антракнозом.

Учеты пораженности растений картофеля в поле фитоспорозом проводили от даты проявления болезни до отмирания листьев через каждые 7–10 сут по шкале Британского микологического общества [5]. На основе учетов пораженности ботвы в поле вычисляли потери урожая и площадь под кривой с помощью компьютерной программы «Потери» [6].

При уборке урожая оценивали пораженность клубней ризоктониозом и фитоспорозом, а через 4 нед после закладки клубней на хранение – пораженность их серебристой паршой [7].

Полученный экспериментальный материал подвергался математической обработке статистическому анализу при 95%-ном уровне достоверности [8].

**Результаты и обсуждение.** Сложившиеся в вегетационный период 2013 г. погодные условия в Московской области способствовали сильному поражению

растений картофеля ризоктониозом. По результатам оценки всхожести растений в контрольном варианте (без обработки) составила 87,9%, в вариантах 1 и 3, где применяли Юниформ – 95,9%; в дальнейшем на столонах и стеблях контрольных растений наблюдали глубокие язвы, вызванные поражением *Rhizoctonia solani*; в вариантах с препаратом Юниформ симптомов проявления ризоктониоза не отмечали. Действие препарата Юниформ на снижение вредоносности антракноза и серебристой парши было также существенным. Пораженность растений антракнозом за 5 сут до уборки урожая в контрольном варианте составила 13,5%, в вариантах с препаратом Юниформ – 0,8%.

Пораженность клубней серебристой паршой в контроле составила 29,7%, в вариантах с препаратом Юниформ 6,4%. Таким образом, наблюдалось достоверное снижение вредоносности указанных болезней в вариантах с препаратом Юниформ.

В условиях эпифитотийного развития фитоспороза в 2013 г. Юниформ задерживал проявление болезни, по сравнению с контролем в среднем на 17 дней; площадь под кривой, описывающая развитие фитоспороза была снижена на 1086 (рис. 1), прибавка урожая составила 75 ц/га (рис. 2). Вместе с тем, указанные варианты не отличались от контроля по содержанию

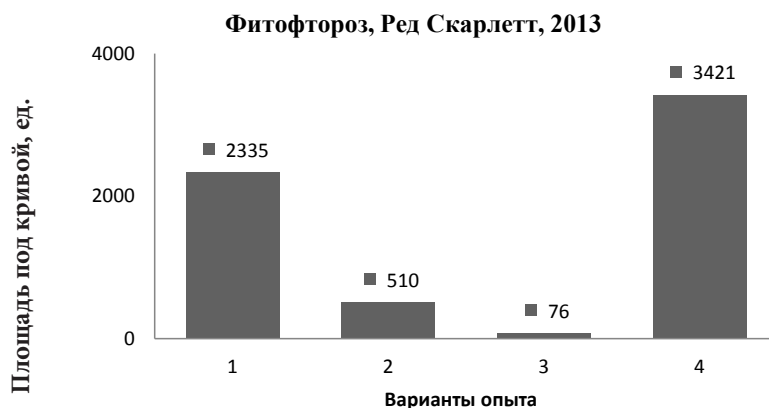


Рисунок 2. Площадь под кривой, ед. (AUDPC), в сравниваемых вариантах опыта, (сорт Ред Скарлетт, ВНИИФ, Раменская Горка, 2013 г.), (НСР<sub>0,95</sub> = 86).

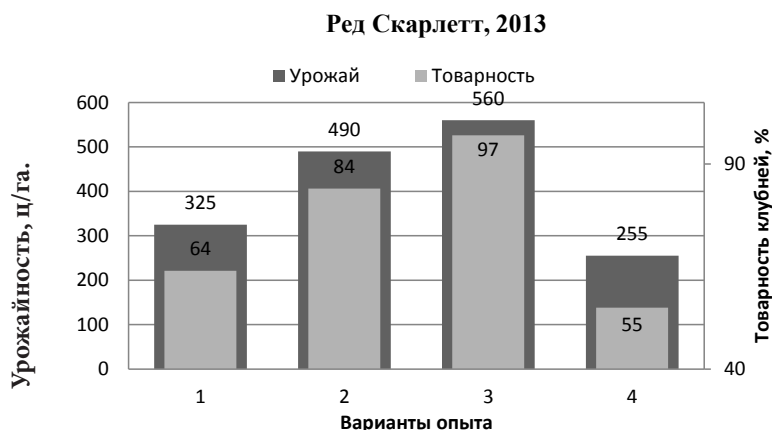


Рисунок 3. Урожайность картофеля (НСР<sub>0,95</sub> = 26,5) и содержание товарных клубней в сравниваемых вариантах опыта, сорт Ред Скарлетт, ВНИИФ, Раменская Горка, 2013г., (НСР<sub>0,95</sub> = 3,2).

пораженных клубней фитофторозом. Полученные результаты подтвердили данные многих исследователей [1, 6], показавших, что для снижения пораженности клубней фитофторозом важно не только задержать проявление болезни, но и в дальнейшем эффективно защищать вегетирующие растения.

В условиях сильнейшего развития фитофтороза в 2013 г., последовательное применение препаратов: внесение при посадке Юниформа и защита вегетирующих растений фунгицидами Ридомил Голд МЦ (2 обр.); Ревус Топ (2 обр.); Ширлан (1 обр.) позволило эффективно защитить картофель от болезней и получить высокую урожайность: задержка в проявлении болезни составила 40 сут, площадь под кривой развития болезни – снижена на 3345 ед (рис. 1), прибавка урожая составила 305 ц/га, товарность клубней повышена на 42% (рис. 2). Таким образом, препарат Юниформ показал высокую эффективность против ризоктониоза, антракноза и серебристой парши и задерживал старт эпифитотии фитофтороза в поле, а обработки вегетирующих растений фунгицидами Ридомил Голд МЦ, Ревус Топ и Ширлан позволили эффективно защитить растения картофеля от фитофтороза и получить существенную прибавку урожая.

Мы полагаем, что использование препарата Юниформ позволит защитить посадки картофеля от ризоктониоза, антракноза и серебристой парши, а также снять необходимость раннего применения

антифитофторозных препаратов в период вегетации растений и в большей степени повысит уровень контроля фитофтороза.

#### Список литературы

1. Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А. и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. М.: Картофелевод. 2009: 256 с.
2. Кузнецова М.А. Защита картофеля. Защ. карант.раст/ (Приложение). 2007; 5(1): 42.
3. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Изд. ориг. М.: Минсельхоз России. 2014: 691 с.
4. Кузнецова М.А., Деренко Т.А. Ревус – надежность в любых условиях: доказано. Евроблайт Картофель и овощи. 2011; 4: 29.
5. James WC, Shih CS, Hodson WA, Callbeck LC. The quantitative relationship between late blight of potato and loss in tuber yield. *Phytopathology*. 1972; 62: 92-6.
6. Филиппов А.В. Фитофтороз картофеля. Защита и карантин растений (приложение к журналу). 2012; 5: 64(4)-65(5) с.
7. Кузнецова М.А. Болезни картофеля при хранении. Защита и карантин растений. 2006: 10: 37-44.
8. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат. 1985: 351 с.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ

Маслиенко Л.В., Холод Н.А., Ковчигина М.А.

ВНИИ масличных культур им. В.С. Пустовойта, Краснодар  
Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства, Краснодар

Широкое использование пестицидов при интенсивных технологиях земледелия приводит к негативным экологическим и санитарно-гигиеническим последствиям: нарушению структуры биоценозов, снижению их способности к саморегуляции, накоплению высокотоксичных органических соединений в почве и воде, возникновению резистентности вредных организмов, и, как следствие, ухудшению качества сельскохозяйственной продукции. В этих условиях необходима разработка экологически безопасной стратегии природопользования, включая и совершенствование систем защиты растений, их переориентацию на предпочтительное использование биологического метода.

В ФГБНУ ВНИИМК в лаборатории биометода разрабатываются микробиопрепараты для защиты растений от болезней, на основе перспективных штаммов продуцентов, безопасных для человека, нефитотоксичных, проявляющих высокую активность против комплекса возбудителей заболеваний в широко варьируемых условиях, обладающих полифункциональным типом действия [1].

Против болезней земляники садовой испытывались микробиопрепараты Вермикулен (Рк-1-3 *Penicillium*

*vermiculatum* Dang.), Хетомин (ХК-1-4 *Chaetomium olivaceum* Cook et Ellis), Веррукозин (PV-3 *Penicillium verrucosum* Dierckx var. *cyclopium* Westling, Samson et al.), Фуникулозум (PF-1 *Penicillium funiculosum* Thom.) и Бациллин (В-5 *Bacillus licheniformis*).

Исследования проведены в СКЗНИИСИВ в мелкоделяночных опытах в ЗАО «ОПХ Центральное» на сорте земляники садовой Мармолада по стандартным методикам [2, 3, 4]. Оценка микробиопрепаратов проведена против пятнистостей листьев – белой (*Mycosphaerella fragariae* Tul / *Ramularia tulasnei* Sacc.) и бурой (*Diplocarpon earliana* Ell. et. Ev./ *Marssonina fragariae* Kleb.), серой гнили (*Botrytis cinerea* Pers.) и антракноза (*Colletotrichum acutatum* Sim.) Микробиопрепараты испытывали в препаративной форме жидкая культура (ЖК), с нормой расхода 3,0 л/га, расход рабочей жидкости 1000 л/га, повторность опытов 4-кратная [5].

В 2006 г. испытывались микробиопрепараты Вермикулен, Хетомин и Бациллин. На фоне высокого поражения земляники пятнистостями (Р – 79,5%, R – 11,6%) биологическая эффективность 2-кратной обработки Вермикуленом и Бациллином составила 82,4–97,8% соответственно, при эффективности



Хетомина 70,4%. Против антракноза, на фоне поражения в контроле ( $P - 27,0\%$ ,  $R - 75,0\%$ ), высокая биологическая эффективность отмечена в вариантах с обработкой земляники Вермикуленом и Хетоминном 80,2 – 90,1%, при эффективности Бациллина 40,2%.

В 2007 г. в опыт были дополнительно включены химический фунгицид Эупарен (эталон) и микробиопрепараты Веррукозин и Фуникулозум. На фоне поражения земляники пятнистостями в начале июня ( $P - 60,0\%$ ,  $R - 12,5\%$ ) лучшие результаты получены при применении Фуникулозума, Веррукозина и Хетомина (90–92,4%), немного ниже (85–88,5%) – при применении Вермикулена. Биологическая эффективность Эупарена (стандарта) составила 71,2%. На уровне стандарта – эффективность препарата Бациллина (73,0%).

На фоне поражения земляники серой гнилью в фенофазу «начало созревания ягод» ( $P - 12,7\%$ ) высокую биологическую эффективность проявили Хетомин (77,2%), Вермикулен (76,4%), Фуникулозум (74,8%), Веррукозин (72,4%), Бациллин (71,4%), при эффективности Эупарена 33,8%.

Таким образом, установлена возможность применения экологически безопасных препаратов с целью снижения поражения земляники садовой грибными болезнями. Установлена высокая эффективность всех испытанных микробиопрепаратов в борьбе с пятни-

стостями (70,4–97,8%), при эффективности химического стандарта 71,2%. Против антракноза высокая биологическая эффективность отмечена в вариантах с обработкой земляники Вермикуленом и Хетоминном 80,2–90,1%. Против серой гнили биологическую эффективность на уровне 71,6–77,2% проявили все испытанные микробиопрепараты, при эффективности химического стандарта 33,8%.

#### Список литературы

1. Маслиенко Л.В. Лаборатория биологических средств защиты растений (вчера, сегодня, завтра). История научных исследований во ВНИИМК за 90 лет. Краснодар. 2002: 191–7.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат. 1985: 416 с.
3. Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян с/х культур. М. 1985: 62 с.
4. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве. СПб. 2009: 378 с.
5. Холод Н.А. Экологизированная защита земляники садовой от грибных болезней. Повышение устойчивости многолетних агроценозов на основе экологизации систем защиты от вредных организмов: Научн. тр. ГНУ СКЗНИИСив. Краснодар. 2013; 2: 99–104.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ПАРШИ И МУЧНИСТОЙ РОСЫ ЯБЛОНИ

Маслиенко Л.В., Якуба Г.В., Ковчигина М.А.

ВНИИ масличных культур им. В.С. Пустовойта, Краснодар  
Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства, Краснодар

На современном уровне ведения агропроизводства доказано, что решить задачу борьбы с вредителями и болезнями растений только применением химических пестицидов невозможно. Наиболее приемлемо и перспективно использование биологического метода защиты растений в интегрированной системе с химическим. Подобный подход препятствует появлению устойчивых рас болезней, а также решает проблемы снижения загрязнения среды и сельскохозяйственной продукции пестицидами. Особенно это актуально для плодово-ягодных культур.

В лаборатории биометода ВНИИМК ведётся работа по созданию микробиологических препаратов в борьбе с болезнями масличных и других сельскохозяйственных культур. В основе лежит поиск штаммов антагонистов, безопасных для человека, нефитотоксичных, проявляющих высокую активность в широко варьируемых условиях [1].

На основе перспективных штаммов-продуцентов созданы полифункциональные микробиопрепараты Вермикулен (Pk-1-3 *Penicillium vermiculatum* Dang.), Хетомин (ХК-1-4 *Chaetomium olivaceum* Cook et Ellis), Веррукозин (PV-3 *Penicillium verrucosum* Dierckx var. *cus-loripium* Westling, Samson et al.), Фуникулозум (PF-1

*Penicillium funiculosum* Thom.) и Бациллин (B-5 *Bacillus licheniformis*).

Микробиопрепараты испытывались против парши *Venturia inaequalis* (Ске.) Wint и мучнистой росы яблони *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. в 2006 – 2009 гг. в ФГБНУ СКЗНИИСив в серии мелкоделяночных и производственных опытов в Краснодарском крае, согласно общепринятым методикам [2–4]. Они оценивались в различных вариантах систем защиты, отличающихся инфекционным фоном болезней.

В препаративной форме жидкая культура (ЖК), с нормой расхода 3,0 л/га, расход рабочей жидкости 1000 л/га, повторность опытов трёхкратная. Испытания проводили на сортах яблони, характеризующихся различной степенью полевой устойчивости к парше и мучнистой росе (сорта Айдаред в ЗАО ОПХ «Центральное» и сорте Джонатан в ОАО «Садовод» Тимашёвского района) [5, 6].

**Высоковосприимчивый к парше и мучнистой росе сорт яблони Айдаред**

*Парша.* В 2006 г. испытывались микробиопрепараты Вермикулен, Хетомин и Бациллин. На фоне эпифитотийного развития парши на наиболее сильно

повреждённых низкими температурами предыдущей зимы садах ( $P - 56,0\%$ ;  $R - 37,3\%$ ), при эффективности химического стандарта 56,6–62,5% все испытанные микробиопрепараты были эффективны.

Лучшие результаты показал Хетомин (61,8–77,2%), повышая эффективность предшествующей обработки, или сохраняя её прежний уровень, в двух последних перед съёмом урожая обработках. Бациллин и Вермикулен обеспечивали защиту на уровне химического стандарта (57,5–69,4% и 55,0–71,5% соответственно), при применении их с фенофазы «плоды опускаются вниз».

В 2007 г. в испытания были добавлены микробиопрепараты Веррукозин и Фуникулозум. Испытывались обработки биопрепаратами двух и трёхкратные, блоком. На фоне умеренного развития парши садов сорта Айдоред, поврежденных морозами зимы 2005–2006 гг. ( $P - 49,6\%$ ;  $R - 38,3\%$ ), эффективность химических фунгицидов составила 42,9–71,5%. Испытанные микробиопрепараты показали эффективность, превышающую химические фунгицидам на 10–30%, или соответствующие ей, при этом эффективность систем защиты возростала на 7–25%.

Биологическая эффективность микробиопрепаратов против парши по мере убывания составляла: Веррукозина – 87,9%, в фенофазу «завязь до 1,5 см», однократно и 77,4–89,2% – в период роста, двукратно; Хетомина – 67,7–87,9%, в фенофазу «плоды торчат вверх», трёхкратно и 72,9–73,4%, двукратно; Бацилина – 73,7–78,5%, в фенофазу «завязь до 1,5 см», двукратно и 57,0–84,3%, трёхкратно; Фуникулозума – 87,4%, в фенофазу «завязь до 1,5 см», однократно и 70,2–72,3%, двукратно; Вермикулена – 48,6–62,8%, в фенофазу «плоды торчат вверх», двукратно.

*Мучнистая роса.* При умеренном развитии мучнистой росы в 2006 г. ( $P - 30,8$ ;  $R - 11,4\%$ ), биологическая эффективность химических фунгицидов составляла 66,6–78,9%. Эффективность Хетомина на низком инфекционном фоне соответствовала уровню химического стандарта или была выше на 4,0–17,6%.

На высоком инфекционном фоне препарат предотвратил нарастание поражения деревьев. Оптимальная кратность обработок Хетомин – 2–3. Вермикулен на высоком фоне обеспечил повышение биологической эффективности системы защиты на 8–15%, или сохранение её прежнего уровня. В отдельных случаях уровень защиты препарата превышал уровень химических фунгицидов на 10%. Бациллин сохранял уровень предшествующей защиты, или повышал его на 18%.

В 2007 г., при умеренном развитии мучнистой росы ( $P - 39,0\%$ ;  $R - 18,8\%$ ), биологическая эффективность химических фунгицидов составила 63,2–86,2%. Биологическая эффективность всех испытанных микробиопрепаратов была выше химического стандарта. Так, Вермикулен, Бациллин и Хетомин были эффективны, как при двух-, так и при трёхкратных обработках (78,7–99,3% и 79,0–96,0%), (88,5–89,0 и 74,2–94,1%), (93,6–94,1% и 83,4–92,4%) соответственно и увеличили эффективность системы на 10–17%. Фуникулозум и Веррукозин при однократной обработке показали эффективность 95,0 и 96,7%, а при двукратной – 84,0–94,5% и 81,3–94,9% соответственно.

### Средневосприимчивый к парше и высоковосприимчивый к мучнистой росе сорт яблони Джонатан

*Парша.* В 2008 г. на фоне эпифитотийного развития парши ( $P - 57,7$ –58,4%;  $R - 18,8$ –25,3%), биологическая эффективность двукратной обработки химического стандарта Рубигана в период роста и созревания плодов составила 84,0–87%. Эффективность Фуникулозума, Веррукозина и Хетомина была близка к уровню Рубигана и составила 83,5–82,6%, 81,5–79,1% и 79,8–78,3% соответственно. Эффективность Вермикулена была ниже химического эталона на 11,5–13,5%.

В 2009 г. в фенофазу «завязь до 1,5 см» при низкой скорости инфекции парши ( $P - 6,3\%$ ;  $R - 2,5\%$ ), при эффективности Рубигана 97,8% все испытанные препараты показали высокую эффективность 84,5–97,3%, максимальная – у Бацилина. В период роста и созревания плодов при умеренном развитии парши ( $P - 42,3\%$ ;  $R - 37,7\%$ ) биологическая эффективность химического стандарта Рубигана через 10 сут после применения составила 96,2%. Испытанные препараты также блокировали болезнь на уровне химического стандарта (90,8–96,7%).

*Мучнистая роса.* В 2008 г. на фоне умеренного развития мучнистой росы ( $P - 36,3$ –32,0%;  $R - 27,9$ –23,2%), при эффективности двукратного применения Рубигана 90,7–91,4% Веррукозин, Фуникулозум и Хетомин показали высокую эффективность: 83,8–87,1%. Эффективность Вермикулена ниже химического эталона на 8–11%.

В 2009 г. при применении микробиопрепаратов в весенний период на низком фоне поражения ( $P - 18,5\%$ ;  $R - 11,6\%$ ), при эффективности Рубигана 92,5% микробиопрепараты показали эффективность ниже эталона на 19–31%. В период роста и созревания плодов, при умеренном развитии болезни, при эффективности Рубигана 94,6% микробиопрепараты показали эффективность 74,4–82,3%.

Таким образом, микробиопрепараты Вермикулен, Хетомин, Бациллин, Веррукозин и Фуникулозум показали эффективность против парши и мучнистой росы яблони, соответствующую уровню химических фунгицидов, и являются перспективными для применения в биологизированных системах защиты. Для сортов, различных по степени полевой устойчивости к парше и мучнистой росе, разработаны элементы технологии применения испытанных микробиопрепаратов.

Установлено преимущество систем защиты с включением испытанных микробиопрепаратов на деревьях, повреждённых аномально низкими температурами в сравнении с системой, основанной только на препаратах химического синтеза.

### Список литературы

1. Маслиенко Л.В. Обоснование и разработка микробиологического метода борьбы с болезнями подсолнечника. Автореф. дис. ... док. биол. наук. Краснодар. 2005: 48 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат. 1985: 416 с.
3. Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян с/х культур. М. 1985: 62 с.

4. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве. СПб. 2009: 378 с.
5. Якуба Г.В. Оперативный контроль микозов яблони на основе микробиологических препаратов. Повышение устойчивости многолетних агроценозов на основе экологизации систем защиты от вредных организмов: Научн. труды ГНУ СКЗНИИСиВ. Краснодар, 2013; 2: 53-61
6. Якуба Г.В. Перспективные микробиологические препараты для защиты яблони от парши. Плодоводство и виноградарство Юга России. [Электронный ресурс]. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2013; 22(4): 81-8. Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/13/04/09.pdf>

## АНТИФУНГАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОМИЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ СЕРЕБРА И СЕРЫ НА ПАТОГЕННЫЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ

Массалимов И.А.<sup>1,2</sup>, Медведев Ю.А.<sup>1</sup>, Зайнитдинова Р.М.<sup>1,2</sup>, Янахметов М.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИТИ гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством АНРБ, Уфа

<sup>2</sup>Баширский государственный университет, Уфа

Как известно, микроскопические грибы у людей могут вызывать микозы и микотоксикозы (острые и хронические интоксикации, вызываемые токсическими продуктами грибов – микотоксинами) [1]. Многие считают, что внедрение нанотехнологий может в корне изменить ситуацию, связанную с применением лекарственных препаратов, действующие вещества которых находятся в наноразмерном состоянии [2–4].

В работе изучены антифунгальные свойства препаратов наномизированных элементарных соединений серебра и серы, предназначенных для обработки пористых неорганических материалов [4].

Антифунгальные свойства наномизированных препаратов серебра и серы проверяли в отношении возбудителей оппортунистических микозов – кандидоза (*Candida albicans*), плесневых микозов (*Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*), и дерматофитий (*Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum*) путем учета полной задержки роста тест – культур грибов на плотной среде Сабуро, содержащей от 1 до 100 мг/мл соответствующих препаратов после культивирования при 28 °С в течение 50 сут.

Регистрировали концентрацию, вызывающую полную задержку роста грибов. Наномизированные препараты серебра и серы вносились в нативном виде. В качестве препаратов сравнения использованы препарат микронизированной элементарной серы и раствор официального препарата серебра «колларгол».

В исследовании установлено, что антифунгальные свойства нанопрепаратов серы превосходят препараты на основе микронизированной серы в 3–9 раз в отношении возбудителей «оппортунистических»

микозов, и более чем в 100 раз – возбудителей дерматофитий. В то же время фунгицидность препарата наномизированного серебра была сопоставима активностью растворимого препарата, содержащего серебро (колларгол) в отношении дрожжеподобных грибов, и в 2–4 раза превосходила активность – для возбудителей плесневых «оппортунистических микозов» и дерматофитий.

С учетом имеющихся данных о возможном антагонизме фунгицидных свойств этих соединений [5] вопрос о совместном применении наномизированных препаратов серебра и серы нуждается в дальнейшем изучении.

### Список литературы

1. Сбойчаков В.Б. Медицинская микология. Пособие для врачей. М.: Гоеэтар-медиа. 2008: 200 с.
2. Kewal KJ. The Handbook of Nanomedicine. Humana Press. 2008: 404 p.
3. Зайнитдинова Р.М., Медведев Ю.А., Муфазалова Н.А. и др. Сравнительная антифунгальная активность элементарной серы в микронизированном и наноразмерном состояниях. IV Съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». Мат. съезда 18–21 сент. 2012. Казань. 2012: 67.
4. Янахметов М.Р., Массалимов И.А., Медведев Ю.А. и др. Композиция, обеспечивающая антифунгальное действие в отношении грибов, вызывающих «оппортунистические» микозы и микогенную сенсibilизацию. Усп. мед. микол. 2014; 12: 442-4.
5. Levard C, Hotze EM, Colman B et al. Sulfidation of silver nanoparticles: Natural antidote to their toxicity from <http://pubs.acs.org> on Nov. 3, 2013/

## ОПЕРАТИВНОЕ РЕШЕНИЕ ЗАЩИТЫ КАРТОФЕЛЯ ОТ КОМПЛЕКСА РАСПРОСТРАНЕННЫХ И ВРЕДНОСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Мельникова Е.С., Мелькумова Е.А.

Воронежский государственный университет им. императора Петра Великого

Снижению вредоносности фитофтороза и альтернариоза способствует ряд мер профилактического характера: помимо соблюдения севооборота, пространственной изоляции участков с другими пасленовыми культурами, необходимо использовать здоровый посадочный материал районированных высокопродуктивных сортов картофеля.

Максимальный эффект от применения фунгицидов достигается при профилактическом опрыскивании, включая первые признаки проявления заболевания в фазу образования боковых побегов – до смыкания растений в рядках. Профилактические обработки целесообразно проводить препаратами комбинированного контактно-системного действия, которые способны сдерживать проявления болезни на 20–30 сут.

После появления заболеваний обработки проводят фунгицидами преимущественно контактного действия. Уборку урожая лучше осуществлять в теплую сухую погоду, не ранее, чем через 10–14 сут после скашивания ботвы, когда кожура клубней затвердеет. Это создает барьер, препятствующий проникновению инфекции. Затем клубни картофеля перебирают, отбраковывая больные и поврежденные. После протравливания семенного картофеля препаратом Максим (0,2 л/т) партия закладывается в хранилище, с соблюдением температуры +2–4 °С [1].

Важное место в снижении вредоносности болезней картофеля отводится учету и контролю в период вегетации культуры. В связи с чем, учеты пораженности ботвы картофеля фитофторозом и альтернариозом целесообразно проводить с фазы полных всходов, что составляет примерно 5 учетов [2].

А.В. Филиппов, Б.Е. Козловский и др. (1989) разработали методику, где опрыскивание посадок картофеля фунгицидами против фитофтороза, необходимо проводить с учетом суммарного метеорологического показателя (СМП) и краткосрочного прогноза.

Защита картофеля от комплекса болезней во многом зависит от последовательности применения малотоксичных фунгицидов с учетом прогноза развития и распространения патогенов, что корректируется сроками защитных обработок.

Наиболее распространенной ошибкой является запоздывание с опрыскиванием посадок картофеля фунгицидами, т. е. когда упущен момент и уже обнаружены симптомы болезней, а также нарушение кратности обработок в конечном итоге отражается на урожайности этой ценной культуры. Отрицательно сказывается также несоблюдение рекомендованных доз препаратов и последовательности их применения [2].

Различный характер развития болезней определяет и неодинаковый подход к установлению сроков проведения защитных обработок, эффективность защиты которых достигается в том случае, если фунгициды применяли профилактически до распространения

болезни. Известно, при поражении 1% листовой поверхности растений эффективность опрыскиваний снижается [3]. Препараты следует выбирать с учетом их высокой биологической активности. При этом подход к защите культуры от различных заболеваний должен быть комплексным. Для этого показан рейтинг эффективности фунгицидов против альтернариоза, который при составлении таблицы использованы данные экспертной группы Евросоюза по применению фунгицидов на картофеле [2].

Эффективность некоторых фунгицидов против альтернариоза (*Alternaria solani* и *A. alternata*), оцененный независимыми экспертами Евросоюза

Д.В. (Фунгицид)	Эффективность*
Дифеноканазол (Скор)	+++
Азоксистробин (Квадрис)	+++
Флуазинам (Ширлан)	(+)
Дитиокарбаматы (Манкоцеб 2), Дитан М-45, Новозир, Пеннкоцеб, Утан, Цинеб)	++
Хлороталонил (Браво)	+(+)
Фамоксадон+Цимоксанил (Танос)	++
Фенамидон+Манкоцеб (Сектин феномен)	++

Примечания. \* + умеренный эффект; ++ хороший эффект; +++ очень хороший эффект

\* эффективность (++) смесевых препаратов Ридомил Голд МЦ, Метамил МЦ, Метаксил, Юномил МЦ, Акробат МЦ обеспечивается манкоцебом.

В настоящее время наиболее эффективным против альтернариоза картофеля считается препарат Квадрис на основе азоксистробина [5]. Агротехнические мероприятия, способствуют лучшему развитию растений и имеют профилактическое значение, являясь экологически безопасными.

Существует ряд защитных мероприятий, способствующих снижению развития и распространения альтернариоза картофеля:

- применение устойчивых районированных и перспективных сортов картофеля к альтернариозу. По мнению специалистов, сорт остается самым эффективным средством повышения продуктивности, ресурсоэнергоэкономичности, экологической безопасности, устойчивости к болезням, а следовательно, рентабельности и конкурентоспособности любой сельскохозяйственной культуры. Его вклад в увеличение урожайности оценивается в 30–70%, а экономическая эффективность вложений в селекцию, по некоторым данным, составляет 1: 300.

Установлено, что неудовлетворительные условия произрастания (недостаточная техногенная оснащенность, влияние неблагоприятных погодных и почвенно-климатических факторов, негативная фитопатологическая ситуация), нивелируется сортом в формировании величины и качества урожая, а так же рентабельности производства [6].

Одно из основных защитных мероприятий является уничтожение источников болезни. Здесь ведущее место занимают агротехнические приемы: осенняя уборка и уничтожение остатков пораженных растений; глубокая зяблевая вспашка, а также севообороты, при которых картофель возвращается на прежнее место не ранее чем через 2–3 года. Кроме того, учитывая возможность заражения альтернариозом картофеля и томатов (культур из одного семейства) при размещении полей в севообороте необходимо избегать их близкого расположения [7].

Защите картофеля от комплекса распространенных и вредоносных болезней включает ряд последовательных этапов борьбы, направленных на получение стабильного урожая.

Важным элементом защиты от комплекса болезней является применение фунгицидного препарата контактного действия Максим (действующее вещество флудиоксонил, 25 г/л) в дозе 0,2 л/т перед закладкой клубней картофеля на хранение, а также при обработке семенного материала перед посадкой. Преимущество этого препарат заключается в том, что он обладает стимулирующим и иммуномодулирующим действием и повышает устойчивость к ряду болезней во время вегетационного периода [5].

Во время вегетационного периода для предотвращения альтернариоза и фитофтороза (если погодные условия не способствуют быстрому нарастанию и вспышкам инфекции) целесообразно использовать биологический препарат Альбит в дозе 50 мг/га. В случае роста заболеваний необходимо применение химических препаратов. Благодаря проведенным опытам на экспериментальном поле «Раменская горка» Одинцовского района Московской области сотрудниками ВНИИФ выявлены эффективные схемы применения фунгицидов: Ширлан, Ридомил Голд, Браво, Квадрис,

а также смеси препаратов: Реглон Супер+Ширлан, Скор+Ширлан, Скор+Браво [8].

Установлено, что развитие альтернариоза тесно связано с устойчивостью картофеля к болезни и сопряжено с онтогенезом культуры в конкретных эколого-географических условиях. Снижения вредоносности болезни в отношении изменения темпов роста растения, позволяет повысить их сопротивляемость.

Известно, что при достаточном калийном питании резистентность картофеля к альтернариозу и фитофторозу повышается, в то время как односторонняя подкормка азотом и фосфором снижает устойчивость культуры к альтернариозу [8].

#### Список литературы

1. Рекомендации по борьбе с вредителями, болезнями и сорной растительностью на посевах сельскохозяйственных культур и прогноз их появления в хозяйствах Воронежской области в 2009 г.
2. Филиппов А.В. Фитофтороз картофеля. Защ. карант. раст. 2005; 4: 28.
3. Ченкин А.Ф. Краткосрочный прогноз, определение потерь урожая и меры защиты картофеля от фитофтороза и альтернариоза. М.: Агропромиздат. 1988: 19 с.
4. Bradshaw N.J. Discussion of potato early and late blight fungicides, their properties and characteristics. Report of fungicide subgroup Proceedings of the 8th Workshop of and European network for development of an integrated control strategy of potato late blight. PPO Special Report, 2004; 10: 151-7
5. Syngenta. Средства защиты растений и семена. 2010: 3.
6. Ильяшенко Д.А., Иванюк В.Г. Методические указания по оценке картофеля на устойчивость к клубневому гнилям. РУП НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству: Самохваловичи. 2010: 52 с.
7. Попкова К.В. Болезни картофеля. М.: Колос. 1980: 304 с.
8. Мельникова Е.С., Мелькумова Е.А., Кузнецова М.А. Пути снижения вредоносности альтернариоза картофеля. Вестн. ВГАУ. 2011; 4(31): 30-3.

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕРБИЦИДНОГО МЕТАБОЛИТА, ОБРАЗУЕМОГО ГРИБОМ *PHOMA* SP. N19

Полуэктова Е.В., Большакова К.П., Берестецкий А.О.  
ВИЗР Россельхозакадемии, Санкт-Петербург, Пушкин

Поиск новых прототипов гербицидных веществ остаётся актуальной задачей для создания новых гербицидов. Для решения этой проблемы могут быть использованы фитотоксины (ФТ). На основе химической структуры некоторых ФТ разработаны более активные и стабильные аналоги, например, коммерческие препараты сулкотрион и глюфосинат.

Фитотоксические метаболиты известны у многих представителей грибов рода *Phoma* (*Ph. herbarum*, *P. exigua* и *P. macrostoma* и др.), некоторые из которых

обладают высоким гербицидным потенциалом, например гербарумин и макроцидин А.

Штамм *Phoma* sp. N19 был отобран в результате скрининга грибов, поражающих бодяк полевой, как проявивший сильные фитотоксические свойства. В ходе предварительной работы было выявлено, что при твердофазной ферментации на перловой крупе грибок образует гербицидный метаболит (выход 130 мг/кг), идентифицированный как известное соединение феосферид А (ФА) и проявивший сильные фитотокси-

ческие свойства. Так, ФА вызывал появление некрозов с минимальной концентрацией для бодяка полевого – 250 мкг/мл; для пырея ползучего – 125 мкг/мл.

В ходе данного исследования были изучены влияние состава субстрата, длительности культивирования и условий освещённости на выход ФА. В качестве субстрата использовали рисовую, пшённую и перловую крупы. Отбор субстрата, колонизированного мицелием, проводили на 10-, 15-, 20-, 25- и 30-е сут культивирования. Влияние освещённости изучали на перловой крупе, для этого колбы с инокулированным зерном культивировали в темноте, при переменном освещении (12 ч в день), в условиях освещения лампами дальнего (λ 300–400 нм) и ближнего (λ 280–315

нм) УФ-света. Содержание ФА в пробах анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Установлено, что на образование ФА оказывали влияние состав и влажность субстрата, сроки культивирования и условия освещения. Максимальный выход ФА (до 1,7 г/кг) выявили при культивировании гриба на перловой крупе на 25–30-е сутки роста гриба в темноте, что позволило увеличить выход гербицидного метаболита на порядок, по сравнению с первоначальным уровнем.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 14-26-00067.*

## СКРИНИНГ ФУНГИЦИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ОТ ФОМОЗА В ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКАХ БЕЛАРУСИ

*Середич М.О.<sup>1</sup>, Ярмолович В.А.<sup>1</sup>, Дишук Н.Г.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Белорусский государственный технологический университет, Минск

<sup>2</sup>Центральный ботанический сад НАНБ, Минск

Результаты фитопатологического обследования более 20 лесных питомников показал, что в 30% случаев причиной усыхания посадочного материала являлся фомоз, вызванный грибами *Phoma* [1]. Это новое и малоизученное заболевание на территории Беларуси.

Основными внешними признаками фомоза посадочного материала является приобретение хвоей текущего года золотисто-коричневого оттенка, далее хвоя буреет и становится пепельно-серой, засыхает и опадает. На начальных этапах развития болезни снижается текущий прирост растения, затем сеянец отмирает полностью.

Растения в возрасте двух лет и старше могут погибать частично – обычно усыхает побег текущего прироста вместе с хвоей [2–4].

Заражение растений происходит как через верхушечные почки (затем заболевание прогрессирует вниз по стеблю), либо проникновение инфекции в растение связано с заражением хвои, контактирующей с землей [5]. Этому во многом способствуют проливные дожди и дождевые брызги при искусственном поливе. Они приводят к образованию земляных конусов вокруг сеянцев или полному покрытию их почвой, что позволяет инфекции из почвы перейти на сеянец. Затем с пораженной части хвои грибок распространяется вдоль сеянца в его апикальную часть, вызывая последующую дефолиацию, а также гибель верхушечной почки. На фоне повреждения тканей грибом в пораженной хвое развивается хлороз, затем болезнь прогрессирует, вызывая гибель растения [6]. Мероприятия по защите сеянцев и саженцев в питомниках от фомоза практически не разработаны, поэтому в настоящее время имеется острая необходимость в подборе высокоэффективных по отношению к *Phoma* spp. фунгицидов.

Для оценки эффективности препаратов в защите древесных растений от фомоза в постоянном лесном питомнике Негорельского учебно-опытного лесхоза

был заложен полевой опыт с использованием следующих препаратов: Спирит СК, Менара СК, Ракурс СК, Колосаль про, КМЭ (табл. 1). Это современные двухкомпонентные препараты системного действия.

Табл. 1. Перечень применяемых для полевых обработок препаратов

Название препарата	Действующие вещества	Препаративная форма
Колосаль про, КМЭ	пропиконазол, 300 г/л тебуконазол, 200 г/л	концентрат микроэмульсии
Спирит, СК	эпоксиконазол, 160 г/л азоксистробин, 240 г/л	суспензионный концентрат
Ракурс, СК	ципроконазол, 160 г/л эпоксиконазол, 240 г/л	суспензионный концентрат
Менара, СК (эталон)	ципроконазол, 160 г/л пропиконазол, 250 г/л),	суспензионный концентрат

Менара СК была взята как эталон, так как этот фунгицид зарегистрирован в Государственном реестре средств защиты растений [7] для защиты хвойных пород от широкого спектра болезней в лесных питомниках и культурах. Колосаль про, КМЭ зарегистрирован, но только против инфекционного полегания всходов и сеянцев. Спирит, СК и Ракурс, СК новые препараты и в лесном хозяйстве не применялись.

Обработку проводили в посевном отделении питомника на всходах ели. Все рабочие растворы готовились в концентрации препаратов 0,1% (наиболее часто рекомендуемая к использованию в лесном хозяйстве), опрыскивание проводилось ручным ранцевым опрыскивателем. Первая обработка была произведена 02.07.14 г., вторая – через две недели после начала опыта, третья – через три недели после второй обработки. Контролем являлись участки, не обработанные препаратами. Между делянками во всех вариантах опыта оставлялась буферная зона в 1 м. Снятие результатов проводилось в октябре 2014 г. Обращалось внимание на внешний вид растений и их состояние, а так же симптомы болезней. Всего учетных делянок было 5 шт. для каждой повторности. В каждом варианте опыта рассчитывались показатели распространенности болезни и биологической эффективности препаратов по следующим формулам [8].

Распространённость болезни ( $P$ ):

$$P = \frac{100}{N}, \%$$

где  $n$  – количество больных и погибших растений на участке;  $N$  – общее количество учтенных растений.

Биологическая эффективность (БЭ):

$$\text{БЭ} = \frac{P^k - P^0}{P^k} \cdot 100\%$$

где  $P^k$  – степень поражения семян в контроле;  $P^0$  – степень поражения семян на опытной делянке.

Результаты защитных обработок в посевном отделении от фомоза приведены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты обработки семян ели фунгицидами в питомнике

Название фунгицида	Всего шт.	Поражено, шт.	Погибших, шт.	Распространённость, %	Биологическая эффективность, %
Ракурс, СК	214	3	4	3,3	90,8
Колосаль про, КМЭ	241	3	1	1,7	95,3
Спирит, СК	258	8	20	10,9	69,4
Менара, СК (эталон)	229	8	2	4,4	87,7
Контроль (без обработок)	155	39	16	35,5	–

Таким образом, в посевном отделении при обработках всходов от фомоза и смешанных инфекций наиболее высокую биологическую эффективность (95,3%) показал фунгицид Колосаль Про КМЭ, также хорошие результаты имел фунгицид Ракурс КЭ (90,8%). Указанные фунгициды показали лучшие результаты, чем эталон, поэтому их можно считать перспективными для регистрации и расширения спектра и сферы их действия в Государственном реестре средств защиты растений.

#### Список литературы

1. Ярмолович В.А. Фомоз посадочного материала в лесных питомниках. Лесн. охотн. хоз. 2013; 3: 18–24.
2. Davidson JA. A new species of *Phoma* causes *Ascochyta* blight symptoms on field peas (*Pisum sativum*) in South Australia. *Mycol. Soc. Amer.* 2009; 101: 120-8.
3. James RL. Lodgepole pine seedling chlorosis and mortality at the Bessey Nursery, Nebraska. *Biol. Eval.* R2-79-2. Denver, CO: US. Dept. Agricult, Forest Service, State and Private Forestry, Rocky Mountain Region. 1979: 10 p.
4. James RL. Engelmann spruce needle and twig blight at the Coeur d'Alene Nursery, Idaho. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Region. 1980: 7 p.
5. James RL. Mortality of Mugo pine seedlings at the Fantasy Farms Nursery, Peck, Idaho. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Region. 1983: 7 p.
6. Kliejunas JT, Allison JR, McCain, A.H, Smith RS, Jr. Phoma blight of fir and Douglas-fir seedlings in a California nursery. *Plant Disease.* 1985; 69: 773-5.
7. Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь. Минск: Промкомплекс. 2014: 627 с.
8. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве. Под ред. С.Ф. Буга; РУП «Ин-т защиты растений». Несвиж: Несвижская укрупн. типогр. им. С. Будного. 2007: 508 с.

## АНТАГОНИЗМ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ МОЛДОВЫ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM* К ФИТОПАТОГЕНАМ

Сырбу Т.Ф.

Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, Кишинев

Мицелиальные грибы, благодаря образованию внеклеточных ферментов и мицелиальному характеру роста, используют в промышленности для получения антибиотиков (пенициллы, цефалоспорины), ферментов (эндоглюканаза, инулиназа, липаза, пектинстераза, мацерирующие и утилизирующие ферменты в технологических процессах переработки растительного сырья, утилизации отходов лесной промышленности и др.), статинов (*Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*), гиббереллинов (*Fusarium*), каротиноидов, алкалоидов и органических кислот.

Микромицеты являются продуцентами биологических препаратов для контроля вредных организмов сельскохозяйственного производства, а также могут быть иммунно- и рост-стимуляторами растений (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Coniothyrium*, *Arthrobotrys*, *Lecanicillium*, *Beauveria* и др.) [1 – 6]. Применение био-препаратов в сельском хозяйстве является одним из наиболее безопасных и эффективных методов защиты растений от болезней и вредителей.

Преимуществами препаратов на основе микроорганизмов или их метаболитов являются: высокая длительность действия, они не накапливаются в растениях и не вызывают привыкания у насекомых, обладают биодеструкцией и способностью повышать иммунитет растений для борьбы с грибными и бактериальными болезнями [7–9].

**Цель исследований** – выявление наиболее активных штаммов-антагонистов грибных возбудителей болезней сельскохозяйственных растений.

**Материалы и методы.** В опытах использовали 65 штаммов микромицетов рода *Penicillium*, выбранных из 200 почвенных изолятов на соответствующих селективных средах и отличающихся хорошим ростом и антифунгальной активностью. Антифунгальную активность определяли методом агаровых блоков у представителей микромицетов, выделенных из почв Молдовы [10].

В опытах использовали 10 штаммов фитопатогенных грибов: *Aspergillus niger*; *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thielaviopsis basicola*; *Stemphilium botryosum*; *Rhizoctonia solani*; *Fusarium solani*; *F. oxysporum*; *F. gibbosum* – возбудителей болезней сельскохозяйственных растений, часто встречающихся в Молдове. Фитопатогенные грибы выделены от больных растений.

**Результаты и обсуждение.** Анализируя результаты полученных данных по определению антифунгальной активности выделенных из почвы центральной зоны Молдовы микромицетов можно отметить, что изучаемые штаммы *Penicillium* по-разному проявляли антагонистические свойства к тому или иному тест-организму. Доказано, что 25 из исследуемых штаммов *Penicillium* не проявляют антагонизма ни к одному из тестируемых патогенов, 7 проявляют против 1 штамма, 8 – против 2 патогенов, 6 – против 3, 5 – против 4, 4 – против 6, а 2 штамма (*Penicillium* sp.

32 и *Penicillium* sp. 62) проявляли свои антагонистические свойства сразу к 9 из 10 фитопатогенов. Зоны задержки роста (ЗЗР) тест-грибов были от 15 до 38 мм.

Из 65 изученных штаммов по отношению к *A. niger* образование ЗЗР наблюдалось только у 10 штаммов (12,0 – 26,0 мм). Антагонистами средней активности против возбудителей аспергиллезов можно считать *Penicillium* sp. 23, *Penicillium* sp. 104, *Penicillium* sp. 52, *Penicillium* sp. 6, *Penicillium* sp. 19, *Penicillium* sp. 62, *Penicillium* sp. 70, т. к. они давали ЗЗР 20,0 – 25,0 мм.

Особое внимание привлекают результаты определения антагонизма пенициллов к таким широко распространенным в Молдове фитопатогенам как *A. alternata*, *B. cinerea*, *T. basicola*. Так, 11 штаммов пенициллов способны в разной степени подавлять рост *A. alternata*. Зоны задержки роста варьировали от 16,0 мм до 25,0–35,0 мм. Можно отметить 2 штамма (*Penicillium* sp. 2 и *Penicillium* sp. 5), которые в равной степени проявляли свою способность активно подавлять рост этого фитопатогена, ЗЗР достигали 30,0 – 35,0 мм.

15 штаммов пенициллов задерживали с разной степенью активности рост такого фитопатогена как *B. cinerea* (ЗЗР 16 – 35,0 мм). Лучшим можно считать штамм *Penicillium* sp. 5, ЭМ которого вызывают образование ЗЗР 30,0 – 35,0 мм.

Для такого фитопатогена, как *T. basicola*, из исследуемых штаммов 14 штаммов вызывали задержку роста разного уровня (14,0 – 35,0 мм).

Для возбудителей фузариозов среди изучаемых микромицетов можно было обнаружить малоактивные штаммы, вызывающие появление небольших ЗЗР (12,0 – 18,0 мм) но были, например, и штаммы, под действием которых ЗЗР достигали 23,0–25,0 мм, – это штаммы *Penicillium* sp. 6, *Penicillium* sp. 17, *Penicillium* sp. 19, *Penicillium* sp. 23, *Penicillium* sp. 70. У штаммов *Penicillium* sp. 32, *Penicillium* sp. 62, по отношению к фузариозам зоны составляли 25 – 38 мм. Активными антагонистами против *Fusarium* можно назвать штамм *Penicillium* sp. 104, под действием эффективных метаболитов (ЭМ) которого у *F. solani* замечены зоны подавления роста 50,0 – 60,0 мм.

Пенициллы характеризовались слабой антифунгальной активностью к *Rh. solani* и *Sc. sclerotiorum*.

На *Rh. solani* – возбудителя черной парши картофеля, гнили всходов сахарной свеклы, томатов и других культур и дикорастущих растений, по-разному действовали 14 штаммов: ЗЗР варьировали от слабо заметных до 16,0 – 28,0 мм; для активного штамма *Penicillium* sp. 104 – 35 мм.

Возбудитель белой гнили – *Sc. sclerotiorum* практически не имел антагонистов среди микромицетов почвы Молдовы, за исключением штамма *Penicillium* sp. 6 с низкой способностью задерживать его рост и *Penicillium* sp. 2. Под действие их ЭМ для этого фитопатогена ЗЗР составляли 20,0–22,0 мм. Следует выделить только штамм *Penicillium* sp. 32 у которого ЗЗР была



25,0 мм. Антагонистическая активность исследуемых микромицетов обусловлена продуцированием антибиотиков и способностью к быстрой колонизации субстрата.

Из исследуемых штаммов были выбраны 2 штамма, более активные по отношению к большому спектру фитопатогенных грибов. Штамм *Penicillium* sp. 32 (рис. 1) в разной степени проявлял свою способность

подавлять рост патогенов (ЗЗР 18 – 38 мм). Можно отметить, что штамм *Penicillium* sp. 32 не действует только на *Alternaria alternata*. Штамм задерживает рост *A. niger* и *Stemphylium botryosum* (диаметр зон 18 мм). Более активно действует этот штамм против патогенов *Fusarium solani* и *Fusarium oxysporum*, ЗЗР достигали 38 мм. Этот штамм также активно действует против *Scl. sclerotiorum*, *F. gibbosum* и *T. basicola*; ЗЗР тест-грибов составляет 25–28 мм.

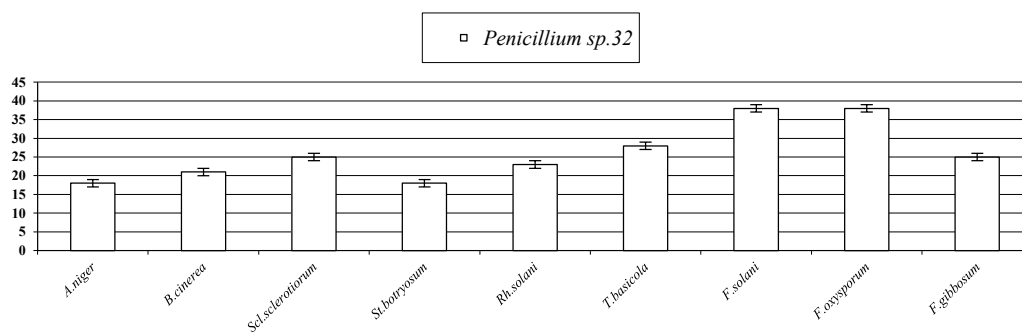


Рисунок 1. Антифунгальная активность штамма *Penicillium* sp. 32.

Штамм *Penicillium* sp.62 (рис. 2) также проявил себя как активный антагонист против 9 из 10 тест-культур. ЗЗР варьируют от слабо заметных (15 мм) до 35 мм. Антагонизма у этого штамма против *Sclerotinia sclerotiorum* не отмечен. Диаметр ЗЗР *T. basicola* и *Scl. sclerotiorum* составляет соответственно 15 и 20 мм. К остальным 7 тест-культурам действие этого

штамма более выражено, ЗЗР составляют 25 – 35 мм. Наибольшая активность была отмечена по отношению к *F. oxysporum* и *F. gibbosum* (зоны соответственно 35–32 мм).

Было проведено также изучение влияния экзо-метаболитов, полученных в результате глубинного культивирования штамма *Penicillium* sp. 6 на тех же

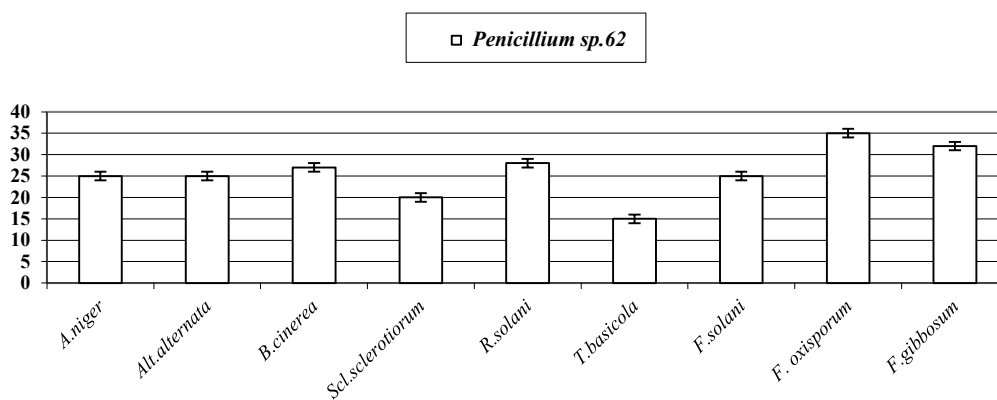


Рисунок 2. Антифунгальная активность штамма *Penicillium* sp. 62.

патогенов. Исследования по определению антифунгальной активности штамма методом агаровых блоков на агаризованной среде Чапека показали, что штамм не проявил чувствительность к *A. alternata* и *Botrytis cinerea*. В отношении других образований стерильных зон подавления роста: диаметры зон в отношении *Thielaviopsis basicola* составили 25 мм, в отношении *Rhizoctonia solani* и *F. solani* – 20 мм.

Патогены *A. niger* и *F. nivale* были менее чувствительны к антагонисту – диаметры зон составили 14–18 мм. В результате эксперимента отмечено, что ЭМ, полученные при культивировании *Penicillium* sp.6 на жидкой питательной среде, также оказывали инги-

бирующее действие на патогены: ЗЗР *F. solani* были в 2 раза больше, чем для штамма на агаризованной среде и составили 40,2 мм, а в отношении *Rhizoctonia solani* влияние ЭМ было слабее, чем гриба и диаметр стерильной зоны составил всего 7,2 мм. Штамм *B. cinerea* проявил чувствительность к ЭМ *Penicillium* sp. 6 с образованием зон, равных 22,3 мм, тогда как гриб влияния не оказывал. На сдерживание роста патогенов *A. alternata* и *Scl. sclerotiorum* ЭМ не влияли, а в отношении *F. oxysporum* и *F. gibbosum* зоны подавления роста были равны 45,3 и 22,8 мм соответственно.

Поскольку гриб и ЭМ *Penicillium* sp. 6 не всегда проявляли активность в отношении одних и тех же

патогенов на разных питательных средах, для получения ЭМ необходимо провести подбор компонентов сред для целенаправленного подавления отдельных групп фитопатогенов.

**Выводы.** Таким образом, штаммы *Penicillium* sp. 32 и *Penicillium* sp. 62 можно в дальнейшем исследовать как потенциальные продуценты для производства биопрепаратов, используемых против возбудителей болезней сельскохозяйственных растений.

Биопрепараты, приготовленные на основе метаболитов этих штаммов, могут с успехом применяться в растениеводстве.

#### Список литературы

1. Маслиенко Л.В., Лукомец В.М. Штамм гриба *Penicillium vermiculatum* dang. визр-24 для получения препарата против фитопатогенных грибов. Патент RU 2322490. Оpubл. 13.06.2006.
2. Юрченко Е.Г. Способ защиты многолетних культур от инфекционных заболеваний. Патент RU № 2458503, опубл. 20.08.2012.
3. Gomathinayagam S, Persand SA, Rekha M. Comparative study of biological agents *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for controlling brown spot disease in rice. *J Biopest.* 2012; 5 (Suppl.): 28-32.
4. Михайлова Р. Мацерующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии. Белорусск. наука. 2007: 406 с.
5. Махова Е.Г., Громовых В.С., Рязанова Т.В. Использование видов *Trichoderma* для твердофазной ферментации отходов лесной промышленности. *Мат. 1-го съезда микологов России. Разд. 12. М. 2002: 301.*
6. Шербакова Т.И., Попушой И.С., Одобеску В.А. Антагонистическая активность гриба *Trihoderma virens* по отношению к патогенам *Sc. sclerotiorum* и *Fusarium* sp. *Изв. Акад. наук Молдовы. Науки о жизни.* 2010; 1(310):106-9.
7. Микульская Н.И., Прищепа Л.И., Герасимович М.С. Микроскопический гриб *Lecanicillium lecanii* (ZIMM.) VIEGAS – потенциальный продуцент биологического препарата для защиты растений. *Мат. VI Межд. науч. конф. Минск. 2008.; 2: 318.*
8. Чекалова К.В. Разработка новой препаративной формы биологических фунгицидов на основе клеток микроорганизмов *Trichoderma viride* и *Pseudomonas fluorescens*. Автореф. ... дис. канд. биол. наук. М. 2007: 162 с.
9. Цавкелова Е.Л., Климова С.Ю., Чердынцева Т.Л., Нетрусов Л.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (Обзор). *Прикладная биохимия и микробиология.* 2006; 42(2):133-3.
10. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука. 2004: 528 с.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНГИЦИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕМЛЯНИКИ К БОТРИТИОЗУ

Скрипникова Е.В., Скрипникова М.К., Чиркин А.М.

Мичуринский государственный аграрный университет. Мичуринск

У большинства плодовых, ягодных и овощных культур значительный ущерб урожаю наносит заболевание, известное под названием «серая гниль», или «ботритиоз». Вызывает его Ботритис серый (*Botrytis cinerea*), анаморфа телеоморфы Ботриотинии Фуккеля (*Botryotinia fuckeliana*). Вид чрезвычайно полиморфен, живёт в различных климатических зонах, встречается в разных типах почвы, где обычно зимует, поражает огромное число организмов. Обладает высокой экологической устойчивостью [1].

Вид *B. cinerea*, обладая большим количеством ферментов, разрушающих ткани растения и фитотоксичными метаболитами, способен поражать различные ткани и органы широкого круга хозяев. Он способен паразитировать на 230 растениях, являясь для них факультативным и относительно неспециализированным паразитом [1].

Очень большой вред этот возбудитель наносит землянике. Потери урожая от ботритиоза на земляничных плантациях могут составлять до 80%. Против возбудителя этого заболевания используют широкий спектр химических пестицидов, имеющих, как правило, высокую результативность, но на земляничниках их применение часто бывает затруднено из-за их достаточно продолжительного срока ожидания и возможности накопления в созревающих ягодах [2].

В связи с этим в последнее время в качестве защитных препаратов стали применять продукты микробного синтеза, особенно те из них, которые обладают разнонаправленным действием. К таким препаратам относится и Бацикол. Он создан во ВНИИСХМ на основе *Bacillus thuringiensis* H10 (*darmstadiensis*), эффективен против жесткокрылых насекомых, обладает ярко выраженной антифунгальной активностью [3, 4].

Поскольку любой препарат, направленный на уничтожение вредителя или патогена, может влиять и на хозяина (растение), целью нашего исследования явилось выявление влияния Бацикола на повреждение плодов земляники ботритиозом на плантации и в период хранения, а также на отдельные показатели продукционного процесса и фотосинтетической деятельности листьев.

Исследования проводили на земляничной плантации сорта Кама агробиостанции МичГАУ. Схема посадки – однорядная 90 × 20 см. Плантация орошается, санитарное состояние плантации хорошее, обработки химическими пестицидами и внесение минеральных удобрений отсутствуют. Это связано с тем, что биостанция является полигоном органического садоводства наукограда г. Мичуринск.

Опыт заложен методом рандомизированных повторений (10 повторений) в следующих вариантах: 1

вариант – контроль (без обработок) (10 делянок); 2-й вариант – 5-кратная обработка растений с начала мая, последняя обработка за 7 дней до съема (10 делянок); 3 вариант – 5-кратная обработка растений (аналогично 2-му варианту) + обработка за сутки перед каждым съемом.

Во всех опытных вариантах опрыскивания проводили из расчёта 6 мл жидкого препарата на 1 м<sup>2</sup> насаждений до обильного смачивания растений.

По продуктивным показателям сравнения вели по 1-му варианту (контролю) и 2-му варианту, не подвергнутому дополнительным обработкам. Показатели продуктивности учитывали отдельно по каждой делянке. Для характеристики варианта данные по делянкам суммировали и находили средние значения.

Медленную индукцию флуоресценции хлорофилла (МИФ) определяли с помощью хлорофилл-флуориметра LPT-4CV-05020, обеспеченного компьютерной программой регистрации и обработки характеристик кривой Каутского.

Для получения средних значений МИФ по каждому варианту опыта отбирали по 20 здоровых, хорошо развитых листьев среднего возраста. Листья снимали в 5 сроков: через сутки после каждой предуборочной обработки делянок во втором варианте. Оценку МИФ проводили после 1 ч нахождения листьев в темноте при комнатной температуре.

Для контроля развития болезни в послеуборочный период с каждого варианта урожай собирали отдельно. Ягоды снимали в состоянии оптимальной спелости, т.е. типично окрашенные и с запахом. После второго сбора здоровые ягоды фасовали в пластмассовые короба (по 20 ягод в каждый) и помещали в бытовой холодильник при температуре 5 – 7 °С. Через неделю после закладки ягод на хранение подсчитывали количество повреждённых. Обработку результатов опыта проводили методом дисперсионного анализа с использованием программы «Статистика».

В результате проведённых исследований установлено, что обработка растений бациколом снизила поражаемость ягод ботритиозом. На опытных делянках в период первого сбора поражённых ягод не было. Во время второго сбора на 10 кг ягод пришлось всего 4 поражённых плода, что в 12 раз меньше, нежели в контроле. Во время 3- и 4-го сборов количество повреждённых ягод и в контрольном, и во 2-м варианте увеличивалось. В контроле было повреждено 22% плодов от общей численности, во 2-м варианте – 13%. В 3-м варианте повреждённых не было.

Также было установлено влияние Бацикола на поражаемость ягод второго сбора серой гнилью в период хранения. Результативность хранения ягод 2-го сбора, снятых в стадии оптимальной потребительской спелости, оказалась связанной с использованием препарата. После недели хранения в 3-м варианте не отмечалось ягод, поражённых серой гнилью. Во 2-м варианте в среднем было поражено 4% ягод, в контроле – 25%. Таким образом, опыты по использованию Бацикола на плантациях земляники с целью повышения устойчивости ягод к серой гнили показали, что этот препарат для сорта Кама является весьма перспективным.

Бацикол повлиял также на отдельные показатели продуктивности земляники. Незначительно (при-

близительно на 11%), но статистически достоверно повысился урожай ягод с 1 м<sup>2</sup> площади насаждений за счёт увеличения процента завязывания ягод, возросла и хозяйственная продуктивность листьев (приблизительно на 20%) (табл. 1).

Табл. 1. Влияние Бацикола на показатели продуктивности земляники сорта Кама.

Показатели	Контроль	Обработка Бациколом
Количество сборов	5	5
Процент завязывания ягод	76	81
Средняя масса ягод по всем сборам, г	8,2	8,8
Средняя масса ягод первого и второго сборов, г	23,5	22,8
Урожай с 1 м <sup>2</sup> площади насаждений, кг	2,8	3,2
Площадь листьев (м <sup>2</sup> ) на 1 м <sup>2</sup> площади насаждений	2,7	2,6
Хозяйственная продуктивность листьев, кг/м <sup>2</sup>	1,0	1,2

Хозяйственная продуктивность листьев часто связана с повышением активности фотосинтетического аппарата, которая может рассматриваться как один из критериев физиологического благополучия растений.

Однако, являясь интегрированным показателем многих разнонаправленных процессов, продуктивность листьев может оказаться малоинформативным показателем для характеристики действия только одного фактора. Для этих целей лучше использовать показатели медленной индукции флуоресценции хлорофилла, которые часто интерпретируют как показатель эффективного функционирования реакционного центра ФС2 [5].

На все даты измерений фотосинтетическая активность ФС2 была выше после обработки Бациколом (вариант 2), нежели в контроле (вариант 1). Коэффициент фотосинтетической активности (Kf<sub>n</sub>) и жизнеспособность пигментно-белкового комплекса реакционного центра ФС2 после обработок Ба к Бациколом на 33% превышали аналогичный показатель у контрольных листьев (табл. 2). Суммарная флуоресценция хлорофилла также оказалась на более высоком уровне в опытном варианте, что может свидетельствовать об увеличении доли реакционных центров в хлоропластах обработанных листьев.

Таким образом, изучение влияния Бацикола на показатели медленной индукции флуоресценции хлорофилла показало, что действие препарата положительно сказывается на работе второй фотосистемы. Поэтому можно считать, что для растений земляники сорта Кама данный препарат является стимулятором биосинтетических процессов.

Таким образом, в ходе проведенных исследований мы можем сделать следующее заключение. Бацикол – перспективный защитный препарат, снижающий

Таблица 2. Влияние Бацикола на показатели медленной индукции флуоресценции хлорофилла.

Показатели № вар. № обраб.	$F_m^*$		$F_T$		$F_m/F_T$		$Kf_T$		$Kf_n$	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	59,8	109,8	16,3	18,1	3,7	6,1	0,73	0,84	0,53	0,66
2	73,1	93,01	24,8	11,7	3,0	8,0	0,66	0,86	0,50	0,68
3	78,1	102,5	24,5	12,9	3,2	8,0	0,69	0,87	0,47	0,70
4	92,9	120,5	38,4	39,2	2,4	3,1	0,59	0,67	0,41	0,53
5	78,5	106,6	20,9	18,8	3,9	5,7	0,74	0,82	0,54	0,65
Среднее	75,9	106,4	26,0	20,5	3,1	6,3	0,67	0,82	0,48	0,64

\* $F_m$  – максимум флуоресценции;  $F_T$  – стационарный уровень флуоресценции;  $F_m/F_T$  – показатель относительного тушения флуоресценции (индекс жизнеспособности);  $Kf_T$  – показатель фотосинтетической активности;  $Kf_n$  – показатель фотосинтетической активности, рассчитанный в каждый текущий момент времени измерений.

поражение ягод земляники сорта Кама серой гнилью на плантации и в период послеуборочного хранения. Обладая антифунгальной активностью, Бацикол повышает активность ФС2, положительно влияет на отдельные показатели продуктивности насаждений.

#### Список литературы

1. Скрипникова Е.В. Грибные болезни плодов различных сортов яблони ЦЧР в период длительного хранения и меры их предупреждения: Монография. Мичуринск: Изд-во МГПИ. 2005: 309 с.
2. Скрипникова Е.В., Скрипникова М.К., Чиркин А.М. Влияние бацикола на развитие серой гнили земля-

ники и некоторые фотосинтетические и продукционные показатели листьев. Плодов. ягод. России. 2013:36(2): 213-9.

3. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве). М. 2005: 54 с.
4. Смирнов О.В., Гришечкина С.Д. Полифункциональная активность *Bacillus thuringiensis* Berliner. Сельскохозяй. биол. 2011; 3: 123-6.
5. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев: «Альтерпрес». 2002: 188 с.

## ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Сокоорнова С.В.<sup>1,2</sup>, Матвеева Т.В.<sup>2</sup>, Гасич Е.Л.<sup>1</sup>, Полуэктова Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург–Пушкин

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет

Предполагают, что горизонтальный перенос генов придает организмам селективные преимущества [1]. Некоторые виды родов *Nicotiana* и *Linaria* содержат в своем геноме и наследуют вставку, сходную с Т-ДНК агробактерий, и получившую название клДНК[2–4], являясь, таким образом, природно трансгенными растениями. Наиболее консервативным фрагментом среди онкогенотипных последовательностей является *rolC*. Предполагается, что *rol*- гены опосредовано увеличивают синтез вторичных метаболитов [[5]

Анализ литературы показывает, что виды растений, содержащие в геноме клДНК, в частности *L. vulgaris* Mill. и *L. genestifolia* (L.) Mill. богаты биологически активными веществами [7-12]. Также для *L. vulgaris* и *L. genestifolia* отмечается обедненный состав микобиоты, и доминирование в ее составе узкоспециализированных патогенных микромицетов, вызывающих заболевания пятнистости листьев, в частности, фомы-подобных грибов и *Ramularia linariae* Vaudys

& Picb. [13]. Для растений семейства Scrophulariaceae показано, что производные антигринозида могут участвовать в защите растений от фитофагов и болезней. Возможно, у природнотрансгенных растений выше синтез этих вторичных метаболитов, а потому они менее уязвимы для естественных врагов.

**Цель работы** – оценка фунгицидной активности грубых экстрактов растений рода *Linaria*, различающихся наличием клТ-ДНК, на примере *L. vulgaris* и *L. maroccana*.

Растения выращивались из семян при 18-часовом освещении эритемными лампами до фазы цветения. Экстракция из 20 г свежей биомассы наземной части растений проводилась последовательно растворителями метанол/вода (1:1), гексан и хлороформ. Все 3 фракции упаривали на ротаторном испарителе при температуре не более 60 °С, затем в количестве 200 мкг/диск оценивались на антибиотическую и фунгицидную активности.

Наибольшей активностью в отношении тестируемых микроорганизмов обладала гексановая фракция. Экстракт, полученный из *L. vulgaris*, проявлял как антимикробную (зона 6 мм) в отношении *B. subtilis*, так и фунгицидную в отношении *F. avenseum* (Fr.) Sacc. (зона 3 мм) активности, в то время как экстракт из *L. maroccana* обладал только антимикробной активностью (зона 4 мм). Выход грубого гексанового экстракта из *L. vulgaris* был достоверно выше, чем у *L. maroccana*. Невысокий уровень фунгицидной активности в целом может быть связан с тем, что она связана с активностью глюкозидаз растений [14].

В тоже время наличие проявления фунгицидной активности экстракта из *L. vulgaris* в отношении выделенного из микобиоты *L. vulgaris* штамма *F. avenseum* (Fr.) Sacc. согласуется с фактом, что этот штамм при инокуляции в искусственных условиях (инфекционная нагрузка 100 мг/мл) вызывал заболевание пятнистости листьев у *L. maroccana* и не поражал *L. vulgaris*.

Таким образом, предположение о том, что закрепление последовательности клТ-ДНК в геноме растений дало им селективные преимущества, получили косвенное подтверждение.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ 0.37.526.2013.

#### Список литературы

- Koonin EV, Makarova KS, Aravind L Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification *Annu Rev Microbiol.* 2001. 55: 709-42.
- White FF, Garfinkel DJ, Huffman GA et al. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* TDNA in the genomes of uninfected plants. *Nature.* 1983; 301: 348-50.
- Intrieri MC, Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol Phylogenet Evol.* 2001; 20: 100-10.
- Matveeva TV, Bogomaz DI, Pavlova OA et al. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in Nature. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2012; 25(12): 1542-51.
- Bulgakov VP, Shkryl YN, Veremeichik GN et al. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes* derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013; 134: 1-22.
- Ahmad VU, Kousar F, Zubair M et al. A new iridoid glycoside from *Linaria genestifolia*. *Fitoterapia.* 2006; 77: 12-4.
- Guiso M, Tassone G, Nicoletti M et al. Chemotaxonomy of iridoids in *Linaria vulgaris*. *Nat Prod Lett.* 2007; 21 (13): 1212-6.
- Handjieva NV, Ilieva EI, Spassov SL et al. Iridoid glycosides from *Linaria* species. *Tetrahedron.* 1993; 49(41): 9261-6.
- Ilieva E, Handjieva N, Popov S. Iridoid glucosides from *Linaria vulgaris* *Phytochemistry* 199231(3): 1040-1041;
- Ilieva E, Handjieva N, Popov S. Genistifolin and other iridoid glucosides from *Linaria genestifolia* (L.) Mill. *Z Naturforsch C.* 1992; 47(11-12): 791-3.
- Ilieva EI, Handjieva NV, Spassov SL, Popov SS. 5-O-allosylantirrinolide from *Linaria* species. *Phytochem Rev.* 1993; 32: 1068.
- Елькина ОВ, Шрамм НИ, Молохова ЕИ, Петриченко ВМ. Оптимизация процесса экстракции биологически активных веществ из травы льнянки обыкновенной. *Хим.-фарм. журн.* 2014; 4: 32-4.
- Сокорнова СВ, Гасич ЕЛ, Матвеева ТВ, Афонин АН. Микромитоты растений рода *Linaria*, содержащие в геноме Т-ДНК. *Микол. фитопатол.* 2015; 49(2).
- Sticher O. Isolation of antirrinolide from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry.* 1971; 10: 1974-5.

## ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИЙ ФУНГИЦИДНЫХ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ И СПОСОБОВ ОСНОВНОЙ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ НА КОМПЛЕКС ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОРНЕЕДА И ПРОДУКТИВНОСТЬ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Стогниенко О.И., Шамин А.А.

Всероссийский НИИ сахарной свёклы и сахара им. А.Л. Мазлумова, Рамонь

Сахарная свекла на ранних этапах онтогенеза восприимчива к возбудителям гнилей (корнеед). Эта проблема традиционно решается протравливанием семян. Наиболее широко применимыми в последние 20 лет является сочетание препаратов ТМТД, ВСК (400 г/л) (тирам) 8–12 л/т и Тачигарен, СП (700 г/кг) (гемиксазол) 6 кг/т [1], но установлено, что снижается эффективность рекомендованных доз протравителей, а поставщики семян обрабатывают их повышенными дозировками.

Нами были проведено исследование различных композиций фунгицидных протравителей на фоне разных способов основной обработки почвы, с целью установить влияние на патогенный комплекс и выявить наиболее эффективную комбинацию (табл. 1).

Действие фунгицидной обработки семян в совокупности с системами основной обработки почвы на различные виды и роды возбудителей было не одинаковым: представители класса *Zygomycota* эффективно подавлялись. *Absidia* sp. присутствовал в структуре возбудителей на контрольных вариантах при всех способах обработки, а частота встречаемости (ЧВ) составила 66,6%; в вариантах с максимальным вложением препаратов колоний данного рода не выделено. *Rhizopus stolonifer* при отвальной вспашке ЧВ = 33,3%, а при плоскорезной обработке – 100%, влияние фунгицидов незначительное.

Пространственная частота встречаемости *Alternaria alternata* на контрольных вариантах достигала 100%. Но на отвальной вспашке и среднем вложении

Таблица 1. Влияние способа основной обработки почвы и композиций протравителей на структуру популяции возбудителей корнееда.

Вариант	Отвальная вспашка				Плоскорезная обработка				Комбинированная обработка			
	К	1	2	3	К	1	2	3	К	1	2	3
<i>Absidia sp.</i>	66,6		33,3	66,6	66,6		33,3	33,3	66,6		66,6	66,6
<i>Mucor himalis</i>					33,3		33,3	33,3	66,6		33,3	33,3
<i>Mucor sp.</i>	100		66,6	66,6	33,3			33,3	100		33,3	66,6
<i>Rhizopus stolonifer</i>	66,6	33,3	66,6	33,3	100	66,6	100	100	66,6	66,6	100	66,6
<i>A.alternata</i>	100		33,3	100	100		33,3	100	100	33,3	66,6	66,6
<i>A. candidus</i>					33,3							
<i>A. flavus</i>	33,3				33,3		33,3	33,3				33,3
<i>A. niger</i>	33,3		33,3	33,3	66,6	33,3	33,3	66,6	33,3			33,3
<i>Botrytis cinerea</i>					33,3							
<i>Cl. herbarum</i>	100		33,3	33,3	100	66,6	100	100	66,6		66,6	66,6
<i>F.gibbosum</i>	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3		66,6	33,3	33,3	33,3	33,3
<i>F. oxysporum</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	66,6
<i>F. sambucinum</i>	33,3		33,3	33,3	33,3		33,3	33,3	33,3			33,3
<i>F. solani</i>	100	100	100	100	100	66,6	66,6	100	100	66,6	100	100
<i>Gliocladium sp.</i>	100	66,6	33,3	66,6	100	66,6	100	100	100	66,6	66,6	66,6
<i>Mortierella sp.</i>	66,6		33,3	33,3	66,6		66,6	100	66,6		33,3	66,6
<i>Penicillium ssp.</i>	66,6			66,6	66,6	66,6		66,6	66,6			66,6
<i>P. auranto-candidum</i>	66,6	33,3		33,3	66,6	33,3	66,6	66,6	66,6		33,3	
<i>P. chrysogenum</i>	66,6	33,3	66,6	33,3	66,6	33,3	66,6	33,3	66,6	33,3	33,3	66,6
<i>P. ciclopium</i>	66,6		33,3	33,3	66,6	33,3	66,6	66,6	100	33,3	33,3	66,6
<i>P. commune</i>	66,6	33,3		33,3	66,6	33,3	66,6	33,3	66,6	33,3	33,3	66,6
<i>Phoma betae</i>	33,3				33,3							
<i>Trichoderma viride</i>	66,6	66,6	66,6	66,6	100	100	100	66,6	100	66,6	100	100
Бактерии	100	100	66,6	100	100	100	100	100	100	100	100	100

**Примечание:** К – контроль без обработки фунгицидами; 1 – 15 л/т ТМТД, ВСК (400 г/л) + 20,7 кг/т Тачигарен, СП (700 г/кг); 2 – 12 л/т ТМТД, ВСК (400 г/л) + 13,6 кг/т Тачигарен, СП (700 г/кг); 3 – 8 л/т ТМТД, ВСК (400 г/л) + 6 кг/т Тачигарен, СП (700 г/кг). Все варианты и контроль обработаны инсектицидами: 25 л/т Круйзер, КС (350 г/л) + 30 л/т Форс, МКС (200 г/л)

препаратов – 33,3%. Представители рода *Aspergillus sp.* эффективно подавлялись фунгицидами при всех вариантах вложений, особенно при отвальной вспашке, здесь грибы за исключением *A. niger* не выявлены при всех дозах препаратов. Фунгициды снижали частоту встречаемости *C. herbarum* с увеличением дозировок (контроль – 100 %, среднее и минимальное вложение препаратов – 33,3%, а максимальное полностью искореняло).

На различные виды рода *Penicillium sp.* действие препаратов и обработок почв, было различным: *P. commune* и *P. ciclopium* одинаково хорошо подавлялись разными дозами фунгицидов, особенно при отвальной вспашке, а на *P. chrysogenum* фунгицидного действия не выявлено. Против представителей рода *Fusarium sp.*, наиболее вредоносных возбудителей корнееда, воздействие ни одного композита не повлияло.

Наиболее вредоносные и агрессивные представители рода *F. oxysporum* и *F. solani* были доминантами во всех вариантах опыта (ЧВ = 66–100%), что свидетельствует об отсутствии фунгицидного действия протравителей. Такие виды, как *Botrytis cinerea* и *Phoma betae* были выделены только на контролях плоскорезной обработки и отвальной вспашки.

Несмотря на то, что видовой состав возбудителей существенно не изменялся при сравнении различных вложений фунгицидов и способов основной обработки почвы, на распространенность, развитие и массу 100 растений они оказали свое воздействие (Табл. 2).

Наблюдалось угнетение проростков сахарной свеклы, от высоких доз фунгицидов: при всех способах основной обработки почвы наблюдалась тенденция снижения массы 100 растений при увеличении дозировок фунгицидов.

Таблица 2. Влияние способов основной обработки почвы и композиций фунгицидных протравителей на болезни и продуктивность сахарной свеклы

Основная обработка	Фунгицидная обработка	Всхожесть, %	Распространенность, %		Густота стояния перед уборкой урожая, тыс. шт./га	Биологическая эффективность, %		Продуктивность (сбор сахара) т/га
			корнеед	гнили корнеплодов		корнеед	гнили корнеплодов	
Отвальная вспашка	1	80	12,8	21,1	70	31,9	40,2	4,9
	2	94	14,4	20,2	71	23,4	42,8	5,2
	3	94	17,8	40,1	54	5,3	-13,6	4,1
	К	97	18,8	35,3	42	0,0	0,0	3,9
Плоскорезная обработка	1	77	15,9	25,1	60	23,2	16,3	4,4
	2	88	16,5	24,8	64	20,3	17,3	3,4
	3	94	16,5	28,5	56	20,3	5,0	4,2
	К	96	20,7	30,0	33	0,0	0,0	2,4
Комбинированная обработка	1	79	13,0	25,5	70	34,7	43,1	5,3
	2	92	14,6	37,4	53	26,6	16,5	5,1
	3	95	17,8	30,2	59	10,6	32,6	5,4
	К	96	19,9	44,8	47	0,0	0,0	4,4
НСР <sub>0,5</sub>		3,1	4,1	3,9	13,7	-	-	0,4

Распространенность корнееда была наибольшей на контрольном варианте с плоскорезной обработкой ( $P = 20,7\%$ ), наименьшей на варианте с отвальной вспашкой и максимальным вложением препаратов ( $P = 12,8\%$ ). В вариантах со средним вложением препаратов при отвальной вспашке и комбинированной обработке распространенность составляла 14,4–14,6%. Наблюдалось закономерное увеличение распространенности корнееда при снижении дозировок фунгицидов. При отвальной вспашке все дозы препаратов одинаково эффективно воздействовали на развитие болезни (10–10,9%), а в контроле этот показатель составлял 15%. При плоскорезном способе обработки почвы развитие болезни было наибольшим, даже при максимальном вложении фунгицидов (10,9%) что соответствовало варианту с минимальным вложением препаратов на отвальной вспашке.

С середины вегетации началось массовое развитие гнилей корнеплодов. В структуре возбудителей в июле доминировали *F. solani* (ЧВ=77,8%) и *F. oxysporum* (100%), а ближе к уборке урожая возросла частота встречаемости *Rhizopus stolonifer* (88,9%). В вариантах с плоскорезной и комбинированной обработками почвы при среднем вложении фунгицидов, наблюдалось снижение распространенности гнилей корнеплодов, а контрольные варианты при всех способах обработки высокими показателями – наибольшая при комбинированной обработке ( $P = 44,8\%$ ).

Наибольшая урожайность установлена при отвальной вспашке и среднем вложении фунгицидов (26,5 т/га) и комбинированной обработке в сочетании с максимальным вложением фунгицидов (26,9 т/га). В вариантах с необработанными семенами при всех обработках почвы урожайность была минимальна

(14,2–21,6 т/га). Дозировка со средним вложением препаратов в сочетании с отвальной вспашкой является оптимальной, здесь распространенность (14,4%) и развитие (10,8%) корнееда и распространенность гнилей корнеплодов (20,2%) были близки по значению варианту с максимальным вложением, при этом токсикация и угнетение растений были гораздо слабее (масса 100 растений – 137,4 г; всхожесть – 94%; густота стояния во время смыкания рядков – 92–71 тыс. шт./га, урожайность – 26,5 т/га, сбор сахара – 5,2 т/га).

Таким образом, было установлено, что рекомендованные дозы зарегистрированных фунгицидных протравителей (ТМТД 8-12 л/т и Тачигарен 6 кг/т) эффективны только при использовании глубокой отвальной вспашки под сахарную свеклу. При безотвальной обработке почвы, широко используемой в свекловодстве, необходимо использовать повышенные дозировки.

На видовой состав и частоту встречаемости возбудителей корнееда и гнилей корнеплодов, способ основной обработки почвы в сочетании с любыми дозировками исследуемых препаратов существенного действия не оказывает. Частота встречаемости *F. oxysporum* и бактерий во всех вариантах опыта была 100%-ной. Из чего можно сделать вывод, что используемые протравители и любые их дозировки не решают проблемы корнееда фузариозной и бактериальной этиологии, поэтому необходимо начать поиск новых препаратов эффективно снижающих заболевание.

#### Список литературы

1. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2014 г. Справ. изд. М. 2014: 692 с.

## АНТИФУНГАЛЬНЫЕ НАНОБИОКОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ И НАНОМАТЕРИАЛОВ ТИПА МУНТ ТАУНИТ И ПОЛИПИРРОЛ

Тимофеева А.В.<sup>1</sup>, Ильина М.В.<sup>2</sup>, Баратова Л.А.<sup>1</sup>, Катруха Г.С.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва

<sup>2</sup>РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

<sup>3</sup>НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва

В настоящее время инфекционные заболевания продолжают оставаться одной из наиболее серьезных проблем здравоохранения, поскольку бесконтрольная и не всегда целесообразная терапия антибиотиками привела к развитию множественной лекарственной резистентности бактерий к известным антимикробным препаратам во многих клиниках мира [1].

По той же причине, в последние десятилетия отмечается значительный рост числа грибковых заболеваний, вызываемых гл. обр. *Candida ssp.* и *Aspergillus spp.* [2]. Несмотря на использование новых методов в области терапии, существования множества ранее открытых и новых антибактериальных и антифунгальных препаратов, эффективность лечения остается достаточно низкой.

Достижения последних лет дают основания полагать, что разработка новых антибиотических средств – «наноантибиотиков» [3], полученных на базе современных наноматериалов, например, углеродных нанотрубок (УНТ) в комплексе с известными антибиотиками, смогут решить перечисленные проблемы.

Среди наиболее интересных работ – получение комплексов на базе: мультимодальных УНТ [4] и

функционализированных УНТ [5] с антибиотиком амфотерицином В, магнитных мультивалентных УНТ (МУНТ) с цефалоспориновыми антибиотиками [6], УНТ различной модификации с доксорубицином [7], коллаген-гидрогелей легированных УНТ с антибиотиком гентамицином [8].

С полипирролом такого рода работ нет, поскольку сам полипиррол обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [9]. Однако в ходе работы с этим материалом нами впервые было установлено, что полипиррол не активен в отношении микомицетов [10].

С целью создания оригинального «наноантибиотика» (комплекса наносорбент–антибиотик) в качестве наноматериала нами были использованы многостенные нанотрубы (МУНТ) типа «Таунит» [11] (рис. 1) с конфигурацией «матрешка» (рис. 2) [12], полученные в «ООО НаноТехЦентр», г. Тамбов (Россия) и новый оригинальный носитель – полипиррол (ПП), принадлежащий к группе электроактивных полимеров, разработанный в Институте высокомолекулярных соединений (ИВС, г. Санкт-Петербург).

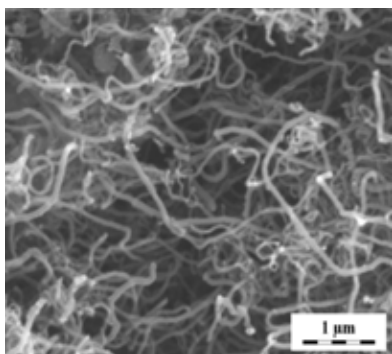


Рис. 1. Электронная сканирующая микроскопия многостенных углеродных нанотруб типа «Таунит»

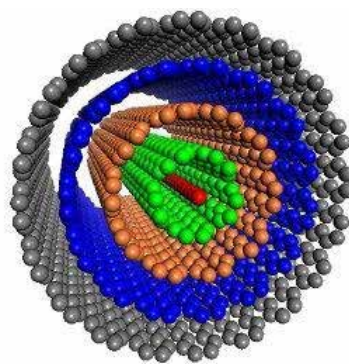


Рис. 2. Многостенные углеродные нанотрубы в форме «матрешка»

Известно, что «Таунит» имеет широкий спектр применения в промышленности [11], обладает высокой сорбционной способностью в отношении антибиотиков [13], но не проявляет биоактивности в отношении патогенной микрофлоры. Полипиррол не токсичен для животных и обладает высокой биодоступностью, что позволяет его использовать в различных областях науки [10].

**Цель работы** – исследование возможности получения комплексов «Таунита» и полипиррола с практически важными антифунгальными полиеновыми антибиотиками амфотерицином В [14], натамицином

[15] и нистатином А1 [16] (см. рис. 3) и изучения антифунгальной активности полученных комплексов в отношении тест-штаммов *Aspergillus niger* и *Candida albicans*.

**Материалы и методы.** Адсорбцию антибиотиков на «Таунит» и полипиррол проводили в статических условиях путем добавления к 5,0 мг сорбента 600 мкл раствора антибиотика в 10%-ном ДМСО в интервале концентраций 0,01– 6,0 мг/мл. Суспензии наносорбент – антибиотик выдерживали в течение 18 ч при 18–20 °С. По окончании сорбции раствор антибиотика отделяли от сорбента центрифугированием на ми-



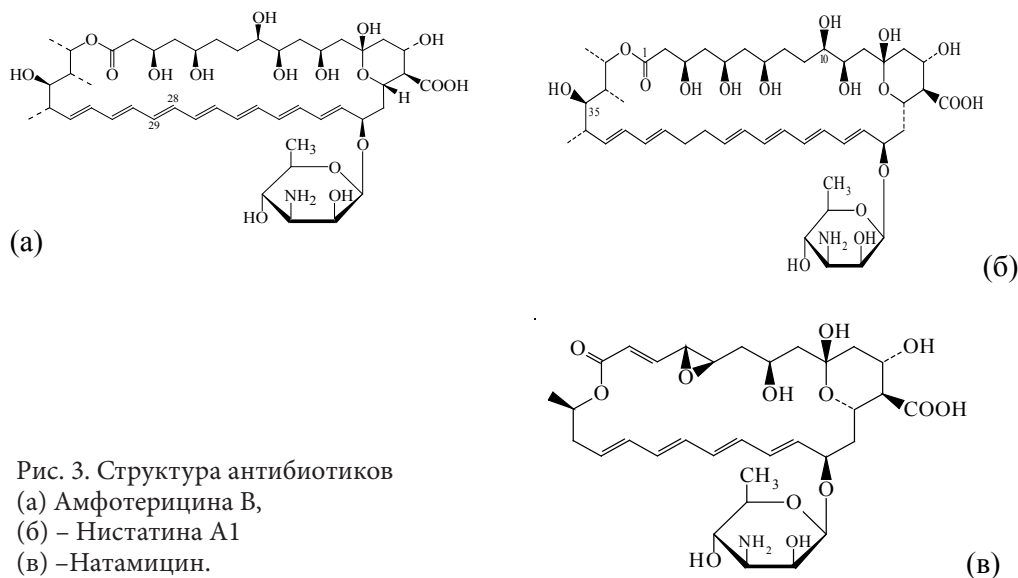


Рис. 3. Структура антибиотиков  
 (а) Амфотерицина В,  
 (б) – Нистатина А1  
 (в) –Натамицин.

кроцентрифуге фирмы Beckman Coulter™ Microfuge® 18 Centrifuge (США) в течение 5–7 мин при 11894 g. Полноту адсорбции полиеновых антибиотиков определяли диско-диффузионным методом [17], с тест-микроорганизмами *A. niger* и *C. albicans* и методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) [18]. Все антибиотики в описанных условиях полностью адсорбировались на наносорбентах. Таким образом, были получены и исследованы нанобиокомплексы с содержанием каждого

антибиотика в интервале 24 – 720 мкг в 1 г сорбента (для комплексов «Таунит» – антибиотик) и 1,2–30,0 мкг на 1 г сорбента (для комплексов ПП-антибиотик).

При испытании полученных нанобиокомплексов в опытах *in vitro* методом биоавтографии на агаровых пластинах [17], содержащих указанные выше тест-организмы *A. niger* и *C. albicans*, определена их антифунгальная активность. Результаты исследования представлены в таблице. Из таблицы следует, что высокой антифунгальной активностью обладают

Таблица. Антифунгальная активность полученных нанобиокомплексов типа «полипиррол» – антибиотик и «таунит»–антибиотик в отношении *A. niger* и *C. albicans*

Комплекс наносорбент-антибиотик (интервалы содержания антибиотика (в мкг) в 1 мг сорбента)	Антифунгальная активность нанобиокомплексов в отношении микромицетов:	
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>
Полипиррол – амфотерицин В (1,2–30 мкг/мг)	++*	Н/а**
Полипиррол– нистатин А1 (1,2–30 мкг/мг)	Н/а	Н/а
«Таунит» – амфотерицин В (24–720 мкг/мг)	Н/а	Н/а
«Таунит»–натамицин (96–720 мкг/мг)	+++	++
«Таунит»– нистатин А1 (24–720 мкг/мг)	+	Н/а

полученные нами нанобиокомплексы полипиррол – амфотерицин В и «Таунит»–натамицин, причем комплекс Полипиррол – амфотерицин В проявляет активность, в 80 раз меньшей концентрации антибиотика, чем высокоактивный комплекс «Таунит»–натамицин. Важно отметить, что «Таунит» – натамицин действует не только на *A. niger*, но и на *C. albicans*, т.е. проявляет более широкий спектр действия, что важно при лечении грибковых заболеваний.

Результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований механизма комплексообразования антибиотиков с полипирролом и «Таунитом», а также определения активности и токсичности комплексов в опытах *in vivo*. Полагаем, что полученные комплексы типа наносорбент–антибиотик будут более

стабильными и менее токсичными, чем исходные антибиотики, и найдут применение в медицинской практике.

Кроме того, такие нанобиокомплексы могут представить интерес для физико-химических исследований электропроводности модифицированных электропроводящих полимеров и, возможно, для мягкого введения антибиотика в организм под действием электрического поля.

#### Список литературы

1. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 2000; 406(6797): 775-81.
2. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units

- in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System Crit. Care Med. 199; 27(5): 887-92.
3. Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. J Control Release. 2011; 156: 128-45.
  4. Proto M, Kostarelos K, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. Acc Chem. Res. 2008; 41(1): 60-8.
  5. Prajapati VK, Awasthi K, Gautam S et al. Targeted killing of *Leishmania donovani* in vivo and in vitro with amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 874-9.
  6. Grumerescu AM, Ilinca E, Chifiriuc C et al. Influence of magnetic MWCNTs on the antimicrobial activity of cephalosporins. Biointerface Res Appl Chem. 2011; 1(4), 139-144.
  7. Wong BS, Yoong SL, Jagusiak A et al. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. 2013; 65(15): 1964-2015.
  8. Li H, He J, Zhao Y et al. The effect of carbon nanotubes added into Bullfrog collagen hydrogel on gentamicin sulphate release: In vitro. J Inorg Organomet Polym. Mater. 2011, 890-2.
  9. Zare EN, Lakouraj MM, Mohseni M. Biodegradable polypyrrole/dextrin conductive nanocomposite: Synthesis, characterization, antioxidant and antibacterial activity. Synthetic Metals. 2014; 187: 9-16.
  10. Тимофеева А.В., Малютина Н.М., Степашкина Е.А. и др. Получение и исследование комплексов типа полипиррол-полиеновый антибиотик. Биотехнология. 2014; 5: 50-8.
  11. Мищенко С.В. Ткачев Г.А. Углеродные наноматериалы. Производство, свойства, применение. М.: «Машиностроение». 2008: 320 с.
  12. Еременко А.С., Власов А.И. Исследование углеродных волокон и углеродных нанотрубок. Двенадцатая научная конференция «Шаг в будущее – Москва 2009». Докл. на тематической секции кафедры ИУ4 МГТУ им. Н.Э. Баумана. (2009) (ИУ4.BMSTU.RU)
  13. Тимофеева А.В., Ильина М.И., Иванова В.Т. и др. Исследование процессов сорбции и десорбции антибиотиков разных групп на многослойных углеродных нанотрубках типа "Таунит" Materiály IX mezinárodní vědecko-praktická conference «Moderní vymoženosti vědy-2013». Publishing House «Education and Science» s.r.o. Praha. 2012; 65, 47-54.
  14. Brajtborg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff GJ. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34(2): 183-8.
  15. Stark J, Tan HS. Natamycin. In: Food Preservatives. Russel NJ, Cloud GW (eds). NY, Cluwer Acad/Plenum. 2003; 179-95.
  16. Milton B, Sloane MD. A new antifungal antibiotic, Mycostatin (Nystatin), for the treatment of moniliasis: A preliminary report. J Invest Dermatol. 1955; 24: 569-71.
  17. Haese A, Keller U. Genetics of actinomycin C production in *Streptomyces chrysomallus*. J Bacteriol. 1988; 170(3): 1360-8.
  18. Тимофеева А.В., Ильина М.В., Терехова Л.П. и др. Получение и исследование антибактериальной активности комплексов типа «Таунит»-антибиотик в отношении *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Escherichia coli*. Биотехнология. 2014; 2: 51-6.

## ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA*

Торопова Е.Ю., Кириченко А.А.

Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск

Грибы рода *Alternaria* Nees широко распространены в посевах зерновых культур. Развитие *Alternaria* sp. в России отмечают на 20 видах культурных растений. Наиболее широкое распространение на зерновых культурах имеет вид *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire, который обнаружен во всех регионах страны. Возбудитель проникает внутрь созревающих семян, а его мицелий скапливается преимущественно в плодовой оболочке и эндосперме, вызывая симптомы черноты зародыша пшеницы и ячменя. Пораженное зерно, как правило, крупное, хорошо выполненное, чем отличается от пораженного гельминтоспориозом [1-3].

Токсическими свойствами, опасными как для растений, так для человека и животных обладают 33-100% штаммов *Alternaria* spp. Патогенность и токсичность штаммов *Alternaria*, выделяемых из семян зерновых культур, находится в стадии изучения и в ряде работ ставится под сомнение [4, 5]. В этой связи весьма актуальным для практики является вопрос обоснованности протравливания семян яровой пшеницы и ячменя против грибов *Alternaria*.

Исследования проводили в 2006-2012 гг. на возделываемых в Западной Сибири (Новосибирская, Омская, Кемеровская, Томская области, Алтайский край) и Восточном Зауралье (Курганская область) 59 сортах ячменя и 42 сортах яровой пшеницы. Изучение фунгицидной активности протравителей проводили на агаре Чапека с добавлением расчетных норм препаратов, лабораторной эффективности протравителей – методом влажных рулонов [6, 7]. При статистической обработке данных использовали методы дисперсионного, корреляционного анализа и вариационной статистики, пакет программ SNEDECOR [8].

Фитоэкспертиза семян яровой пшеницы и ячменя позволила выявить комплекс доминирующих на семенах фитопатогенов, который был представлен грибами *Bipolaris shoemakeri* (*Helminthosporium* Link), *Alternaria* Nees, *Fusarium* Link. Основным компонентом микоза зерна яровой пшеницы и ячменя были грибы *Alternaria*, заселенность которыми колебалась по партиям и годам, достигая на большинстве партий 20 – 30% (табл. 1). Заселение семян яровой пшеницы

Табл. 1. Заселенность зерна зерновых культур грибами рода *Alternaria*, %

Регион	Яровая пшеница		Яровой ячмень	
	лимиты	среднее	лимиты	среднее
Западная Сибирь	11,2–49,2	36,8	3,3–86,7	29,0
Восточное Зауралье	12,0–48,2	32,4	0–86,0	30,7
НСР <sub>05</sub>		5,6		8,1

*Bipolaris sorokiniana* Sacc. Shoem. и грибами *Fusarium* было значительно (в 2,5–13,3 раз) ниже, особенно в засушливые теплые годы.

Изучение биологических особенностей грибов *Alternaria* с использованием коллекции из более 150 изолятов позволило выявить 4 основных морфотипа, отличавшихся по морфолого-культуральным признакам, распространенности и патогенности [9].

Табл. 2. Влияние протравителей семян на радиальный рост колоний *Alternaria tenuissima*

№	Препарат, норма расхода (л/т)	Действующие вещества, г/л	Биол. эффективность, %*
1	Витавакс 200ФФ, 2,0	200 карбоксина +200 тирама	100
2	Максим Экстрим, 1,75	18,7 флудиоксомила + 6,25 ципроконазола	100
3	Кинто Дуо, 2,0	20 тритиконазола +60 прохлораза	98
4	Винцит Экстра, 0,8	50 флутриафол	97
5	Дивиденд Экстрим, 0,6	92 дифеноконазол + 23 мефеноксам	94
6	Раксил Ультра, 0,2	120 тебуконазола	93
7	Алькасар, 1,0	30 дифеноконазол + 6,3 ципроконазол	90
8	Ламадор, 0,2	250 протиоконазол + 150 тебуконазол	88
9	Иншур Перформ, 0,6	40 пираклостробин + 80 тритиконазол	85
10	Максим, 2,0	25 флудиоксонил	83
11	Премис Двести, 0,2	200 тритиконазола	82

Определение штаммов *Alternaria* по определителю [10] и методом ПЦР-диагностики показало, что доминирующим на территории Западной Сибири и Восточного Зауралья являлся вид *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire.

Каталог пестицидов и агрохимикатов разрешенных к применению на территории РФ, не содержит препаратов, зарегистрированных для подавления грибов *Alternaria* на зерновых культурах. Рекомендуется к использованию широкий ассортимент протравителей семян от возбудителей корневых гнилей, вызванных *B. sorokiniana* и *Fusarium* spp.

Однако, в связи с высокой инфицированностью семян зерновых культур грибом *A. tenuissima* и его возможной фитотоксичностью, нами были проведены лабораторные исследования эффективности 11 современных протравителей против изолятов *A. tenuissima* в нормах расхода рекомендованных в Каталоге против возбудителей корневых гнилей (табл. 2). Опыт проводили с добавлением в агар Чапека препаратов в рекомендуемых нормах расхода, измерения проводили на 9 сут, когда колония в контрольном варианте достигла площади чашки (9 см).

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что все препараты подавляли рост колоний *A. tenuissima* в сравнении с контролем. Максимально эффективными оказались Витавакс 200ФФ и Максим. Экстрим системно-контактного действия, которые после проникновения в организм патогена неспецифически нарушали важнейшие биохимические процессы, – биосинтез веществ, транспорт энергии и т.п.

Сходные результаты получены и в лабораторных испытаниях препаратов на семенах зерновых культур (табл. 3).

В экспериментах участвовали партии семян, инфицированные преимущественно грибами *Alternaria* на уровне более 30%.

Табл. 3. Биологическая эффективность протравителей семян против грибов рода *Alternaria*, среднее по 8 партиям семян, %

№	Вариант	Предел	В среднем по сортам
1	Кинто Дуо	78,6-95,5	89,2
2	Витавакс 200ФФ	71,4-93,5	88,1
3	Максим Экстрим	78,6-92,5	87,1
4	Раксил Ультра	78,6-89,2	85,4
5	Ламадор	73,7-87,3	83,9
6	Дивиденд Стар	71,4-86,9	83,1
7	Винцит	64,3-85,7	81,7
8	Виал ТТ	68,4-82,4	79,5
9	Сертикор	64,3-78,7	78,9
10	Винцит Экстра	57,1-75,7	76,1
11	Ранкона	57,1-73,5	68,9
12	Премис Двести	47,4-68,5	66,1
13	ТМТД	50,0-63,2	56,5
НСР <sub>05</sub>			8,9

Биологическая эффективность химических препаратов против грибов *Alternaria* была от умеренной (ТМТД) до высокой (Витавакс 200ФФ, Максим Экстрим, Раксил Ультра, Кинто Дуо). К группе наиболее эффективных были отнесены Витавакс 200ФФ и Максим Экстрим, в которых сочетаются действующие вещества контактного и системного действия, высокая эффективность которых против возбудителей корневых гнилей было ранее выявлено на пшенице [9].

В целом, степень влияния партии (сорта) на эффективность протравливания составила 7,6%, а самого препарата – 76,1%, что подтверждает необходимость дифференцированного подхода к выбору протравителей [11].

#### Список литературы

1. Ганнибал Ф.Б. *Alternaria* spp. в семенах зерновых культур в России. Микол. фитопатол. 2008; 4: 59-68.
2. Ганнибал Ф.Б., А.С. Орина, М.М. Левитин. Альтернариозы сельскохозяйственных культур на территории России. Защ. карант. раст. 2010; 5: 30-2.
3. Торопова Е.Ю. Экологические основы защиты растений от болезней в Сибири. Под ред. В.А. Чулкиной. Новосибирск. 2005: 370 с.
4. Гагкаева Т.Ю. Ганнибал Ф.Б., Гаврилова О.П. Зараженность зерна пшеницы грибами *Fusarium* и *Alternaria* на юге России в 2010 г. Защ. карант. растений. 2012; 1: 37-41.
5. Bräse S1, Gläser F, Kramer CS *Alternaria* metabolites. In: The Chemistry of Mycotoxins. Progr Chem Org Nat Prod. 2013; 97: 127-37.
6. ГОСТ 12044-93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. Межгосударственный совет по метрологии и сертификации. 1993: 35 с.
7. Фитосанитарная экспертиза зерновых культур. (Болезни растений): Рекомендации. М.: ФГНУ «Росинформагротех». 2002: 140 с.
8. Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере. Краснообск. ГУП РПО СО РАСХН. 2004: 162 с.
9. Кириченко А.А., Торопова Е.Ю. Биологические особенности сибирской популяции грибов рода *Alternaria*. Вестн НГАУ. 2013; 1(26): 21.
10. Simmons, EG. *Alternaria*. An Identification Manual. Utrecht: CBS. 2007: 775 p.
11. Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Порсев И.Н. К протравливанию семян и посеву сортов ячменя нужен дифференцированный подход. Защ. карант. раст. 2013; 2: 21-3.

## ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ГРИБА-АНТАГОНИСТА *TRICHODERMA* SP. IZR D-11

Войтка Д.В., Юзефович Е.К.

Институт защиты растений, Прилуки, Белоруссия

Изучение закономерностей роста и развития микроорганизмов – потенциальных основ биологических препаратов – имеет большое практическое значение в биотехнологическом аспекте, а также при оценке возможности интродукции в агробиоценозы. Показателями роста грибов являются скорость, продолжительность фаз роста культур, накопление биомассы, спорообразование [1]. Гриб-антагонист *Trichoderma* sp. IZR D-11 (депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов как *Trichoderma* sp. IZR D-11 БИМ F-457 Д) является основой препарата биологического Фунгилекс, ж.

Температурный оптимум определяется видовыми свойствами грибов и условиями культивирования. Для видов *Trichoderma* spp. характерна четкая дифференциация температурных оптимумов, хотя антагонистическая активность большинства видов проявляется при температуре 15 °С [2–3]. Для оценки влияния температуры на динамику роста штамм *Trichoderma* sp. IZR D-11 выращивали на среде на основе агаризованного пивного суслу при температурах 7, 10, 15, 20, 25, 30 и 35 °С.

В процессе роста анализировали среднюю скорость радиального роста ( $Kr$ ), рассчитывали ростовой коэффициент (РК), определяли титр спор. Рост штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11 наблюдали в диапазоне температур от 0 до 30 °С (табл. 1). Скорость роста штамма, ростовой коэффициент и титр спор были наибольшими при культивировании штамма при температуре

25 °С. Высокий РК и  $Kr$  в 1-е сут обуславливают быстрое начало спороношения и накопление биомассы [4]. Зона задержки роста и развития штамма, в которой низкие значения температурного фактора ограничивали жизнедеятельность микроорганизма, составила 10 °С, зона ингибирования, за пределами которой роста мицелия и спороношения гриба не наблюдали, составила 30 °С.

Таким образом, т.к. штамм является мезофиллом, для него характерна некоторая психротрофная составляющая. Анализ полученных результатов позволил установить корреляционную зависимость ростовых показателей штамма от температуры (табл. 2).

О влиянии света на формирование спороношения *Trichoderma* spp. есть разноречивые данные: некоторые исследователи утверждают, что виды *Trichoderma* spp. лучше растут в темноте, другие считают, что при глубинном и поверхностном культивировании освещение стимулирует образование фиалоспор [2, 3, 5, 6].

Влияние света объясняется тем, что процесс формирования спор связан с синтезом микоспоринов, образование которых, а также спорогенез, стимулируются УФ-облучением с  $\lambda = 310$  нм [3].

Для оценки влияния освещения на динамику роста штамм выращивали в условиях темноты, искусственного освещения (дневной свет: CRI = 90, CCT = 6000 К) и при чередовании освещения и темноты с экспозицией в 12 ч. Результаты эксперимента показали, что линейная скорость роста ( $Kr$ ) и ростовой коэффици-

Таблица 1. Динамика роста и развития штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11 в зависимости от температуры

t, °C	K <sub>r</sub> , мм/сутки			PK на сутки			Титр на 7-е сутки, 1×10 <sup>8</sup> спор/см <sup>2</sup>
	1-е	2-е	3-и	1-е	2-е	3-и	
+7	0	0	0	0	0	0	0
+10	0	0	2,8±0,82	0	0	1,9	0
+15	2,4±0,51	7,9±1,00	8,2±1,60	2,4	10,3	12,3	9,1
+20	4,6±0,68	11,1±0,69	14,8±0,56	9,1	15,7	121,8	10,8
+25	9,9±0,51	19,8±1,00	15,3±0,60	29,6	59,4	270	11,4
+30	7,5±0,73	13,2±1,05	24,3±1,00	7,5	41,4	150	4,5
+35	0	0	0	0	0	0	0
НСР <sub>05</sub>							0,54

Табл. 2. Корреляционная зависимость роста и развития штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11 от температуры

Показатели	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции, r
Температура, °C (x)		
Средняя скорость радиального роста колонии, мм/сут.	y=0,74x-5,3	0,97
Ростовой коэффициент	y=4,85x-48,3	0,80
Титр, 1×10 <sup>8</sup> спор/см <sup>2</sup>	y=14,9-0,26x	0,55

ент (PK) в первые сутки были выше в варианте с чередованием периода освещения, о чем свидетельствует более короткая продолжительность лаг-фазы (табл. 3).

Следовательно, начало спороношения и накопления биомассы происходит быстрее. При выращивании на свету титр препарата был незначительно выше, чем в темноте. Достоверно выражено влияние освещения на развитие штамма при чередовании периода освещения и темноты в 12 ч. Зависимость ростовых показателей штамма от освещения описывается уравнениями регрессии, приведенными в табл. 4.

Результаты исследований свидетельствуют, что для массового культивирования препарата на основе

Таблица 3. Влияние освещения на рост и развитие штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11

Продолжительность освещения, ч	K <sub>r</sub> , мм/сут			PK			Титр на 7-е сут, 1×10 <sup>8</sup> спор/см <sup>2</sup>
	1-е сут	2-е сут	3-и сут	1-е сут	2-е сут	3-и сут	
0	6,4±0,76	15,9±0,69	22,8±0,33	21	135	270	10,5
0/12	11,5±1,38	19,6±1,19	13,9±0,40	34,5	186,8	270	11,3
24	9,3±0,46	17,9±0,69	17,9±0,51	27,8	108,5	180	9,6
НСР <sub>05</sub>							0,45

Табл. 4. Корреляционная зависимость роста и развития штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11 от освещения

Показатели	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции, r
Освещение (x)		
Средняя скорость радиального роста колонии, мм/сут.	y=16,0-0,05x	0,85
Ростовой коэффициент	y=155,4-1,52x	0,62
Титр, 1×10 <sup>8</sup> спор/см <sup>2</sup>	y=10,9-0,04x	0,59

штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11 можно использовать прозрачные емкости, а также помещения с обычным освещением. Питательные вещества усваиваются микроорганизмами только при определенной кислот-

ности питательной среды (pH), так как проницаемость оболочки микробных клеток зависит от этого фактора. Большинство грибов развивается при pH 4,5–6,0. Реакция среды в процессе роста грибных культур может значительно изменяться. Каждая стадия развития гриба (прораствание спор, вегетативное развитие мицелия, спорообразование) требует определенных значений pH [5–6]. Для грибов *Trichoderma* характерен достаточно широкий диапазон оптимума кислотности среды. Причем устойчивость к изменениям pH среды штаммоспецифична [7–8].

Культивирование штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11 в широком диапазоне значений реакции среды показало, что оптимальное развитие гриба наблюдается при pH 4,5–6,0. Ростовые процессы снижались по мере повышения pH от 6,5 до 8,0. При pH 7,0 по сравнению с оптимумом ростовой коэффициент (PK) и продуктивность (титр спор) снижались в 2 раза (табл. 5).

Таким образом, штамм гриба *Trichoderma* sp. IZR D-11 является ацидофильно-нейтрофильным ми-

Таблица 5. Влияние кислотности питательной среды на рост и развитие штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11

рН среды	К <sub>r</sub> , мм/сутки			РК на сутки			Титр на 7-е сутки, 1x10 <sup>8</sup> спор/см <sup>2</sup>
	1-е	2-е	3-и	1-е	2-е	3-и	
3,0	0	0	0	0	0	0	0
3,5	0	0	0	0	0	0	0
4,0	9,1±1,10	2,0±0,08	1,1±0,17	18,1	61,6	256,5	9,8
4,5	11,1±0,50	1,9±0,07	1,0±0,10	22,1	64,4	262,5	11,1
5,0	11,3±0,75	1,9±0,08	1,2±0,05	22,6	96,8	270	12,5
5,5	11,6±0,95	1,8±0,04	1,2±0,05	36	127,3	270	12,7
6,0	11,8±0,82	1,9±0,08	1,1±0,05	23,6	97,5	180	8,8
6,5	9,8±0,56	1,4±0,17	1,5±0,15	19,5	76,3	168,3	6,7
7,0	7,8±0,92	1,5±0,06	1,4±0,11	12,4	73,5	161,5	6,7
7,5	8,0±0,17	1,5±0,19	1,4±0,10	16	48,9	157,3	4,2
8,0	7,9±0,68	1,6±0,18	1,2±0,11	7,9	40,6	152,3	3,3
НСР <sub>0,5</sub>							4,21

Табл. 6. Корреляционная зависимость роста и развития штамма *Trichoderma* sp. IZR D-11 от кислотности питательной среды.

Показатели	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции, <i>r</i>
рН среды (x)		
Средняя скорость радиального роста колонии, мм/сут.	$y=5-0,27x$	0,86
Ростовой коэффициент	$y=193,3-15,28x$	0,87
Титр, 1x10 <sup>8</sup> спор/см <sup>2</sup>	$y=21,3-2,14x$	0,86

кроорганизмом. Коэффициент корреляции между средней скоростью радиального роста, титром и кислотностью питательной среды составляет 0,86, между ростовым коэффициентом и рН – 0,87 (табл. 6).

Анализ результатов исследований позволил установить, что гриб *Trichoderma* sp. IZR D-11 отличается лабильностью к действию абиотических факторов. Предел толерантности гриба *Trichoderma* sp. IZR D-11 по абиотическим факторам составляет 7–25 °С, рН – 4,0–8,0. Оптимальным при культивировании штамма является чередование освещения и темноты с экспозицией 12 ч.

Корреляционная зависимость роста и развития гриба в зависимости от температуры и освещения более выражена для скорости радиального роста

колонии, в меньшей степени – для ростового коэффициента и титра спор. Зависимость роста гриба от кислотности среды практически равнозначна для всех изученных характеристик.

#### Список литературы

1. Методы экспериментальной микологии: справочник; Под ред. В.И. Билай. Киев: Наук. думка. 1982: 429 с.
2. Гринько Н.Н. Экофизиологические особенности штамма *Trichoderma harzianum* Rifai ВКМ F-2477Д. Защита растений: Сб. науч. тр. РУП «Институт защиты растений»; Ред. Л.И. Трепашко. Минск: ООО «Ан-Принт». 2006; 30(2): 90-103.
3. Patel SI, Mishra A. Some physiological studies on *Trichoderma harzianum*. Gujarat Agr Univ. Res J. 1994; 19(2): 53-6.
4. Дементьева М.И. Фитопатология. Учеб. пос. 3-е изд. М. 1985: 201-17.
5. Сейкетов Г.Ш. Грибы рода триходерма и их использование в практике. Отв. ред. Е.Н. Мишустин. Алма-Ата: Наука. 1982: 248 с.
6. Schmoll M, Esquivel-Naranjo EU, Herrera-Estrella AH. *Trichoderma* in the light of day – physiology and development. Fungal Genet Biol. 2010; 47(11-2): 909-16.
7. Singh A, Shahid M, Srivastava M et al. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. Virol Mycol. 2014; 3: 127 doi: 10.4172/2161-0517.1000127.
8. Sarojini CK, Nagamani A, Ratnakumari RY. Growth response of *Trichoderma* isolates against varying pH levels. Intern J Environ Biol. 2012; 2(4): 180-2.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Зачиняев Я.В.<sup>1</sup>, Зачиняева А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РГПУ им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

В современном производстве фторорганических продуктов весьма часто и широко используются фторорганические кислоты, фторангидриды, фторэфиры, фторалкены (фторолефины). Широкое применение фторорганических соединений указанных химических классов, с одной стороны, и наличие возможности взаимных реакционных переходов между соединениями этих классов, с другой, обуславливают как интерес к ним, так и сравнительное изучение их биологических эффектов. Необходимость токсиколого-гигиенической оценки большого числа ксенобиотиков (в том числе ФС) обуславливает целесообразность дальнейшее совершенствования имеющихся и создания новых систем моделирования и ускоренного прогнозирования характера и параметров токсичности химических веществ.

Проведены развернутые экспериментальные и теоретические исследования биологической активности, токсичности и опасности нескольких десятков вновь синтезированных ФС, относящихся к различным химическим классам (фторалкены, фторорганические кислоты, фторангидриды, фторэфиры).

Установлено, что при однократном ингаляционном поступлении в организм животных, исследуемые соединения характеризуются различной степенью токсичности. По величине среднесмертельных концентраций фторангидриды отнесены ко 2- и 3-му классу токсичности, фторкислоты к 3-му классу токсичности, фторэфиры и фторалкены – к 4-му. При гистоморфологических исследованиях наиболее выраженные изменения обнаружены при действии фторангидридов и фторкарбоновых кислот. При интоксикации этими соединениями отмечались повышенная проницаемость стенок сосудов, дистрофические изменения печени, почек и явления фиброза легких.

Выявлено, что фторангидриды и фторкарбоновые кислоты обладают сильным раздражающим действием на слизистые оболочки глаз и верхних дыхательных путей. Кроме того, они оказывают выраженное местное действие на кожные покровы, проявляющиеся изъязвлениями и некротическими изменениями. Фторэфиры и фторалкены обладают слабым раздражающим действием на кожные покровы и слизистые.

В хронических экспериментах исследовались два модельных ксенобиотика: фторэфир ФОЛИТОЛ-163 и ФОЛ-63. Результаты этих экспериментов показывают, что ФОЛИТОЛ-163 и ФОЛ-63 оказывают мембранотоксическое действие, проявляющееся в виде фазовых колебаний осмотической резистентности эритроцитов, нарушают минеральный обмен, вызывают поражение синтетических функций печени,

о чём свидетельствуют статистически достоверные изменения активности аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы.

Пороги эмбриотоксического и тератогенного действия для ФОЛИТОЛ-163 и порог эмбриотоксического действия для ФОЛ-63 выше порогов, установленных по общетоксическим показателям.

Нами были изучены мутагенные эффекты как ФОЛИТОЛ-163 и ФОЛ-63, так и фторэфиров ППЭ, ППП, АВЭ-4. При этом слабая мутагенная активность была обнаружена у фторэфира ППП. Остальные исследованные соединения не обладают мутагенным эффектом.

При изучении биологической активности фторкарбоновых кислот, фторангидридов, различных фторэфиров, гидразидов и других производных оценивалось влияние на тест-культуры бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Bacillus cereus*) и грибов (*Penicillium spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*).

Бактерицидная и фунгицидная активность ФС с использованием диско-диффузионного метода была отмечена у фторангидридов, фторкарбоновых кислот, гидразидов и дитиокарбаматов [1].

Выявлена и подробно проанализирована зависимость токсичности и биологической активности ФС от их молекулярной структуры. Для этого использовался комплекс математических методов, позволяющий получать прогностические оценки возможной биологической активности, токсичности и опасности ксенобиотиков.

Таким образом, проведенные исследования позволили оценить токсичность и биологическую активность большой группы ФС, относящихся к различным химическим классам [2]. Выявлена зависимость между молекулярной структурой и биологическим действием ФС. Наличие у фторангидридов, фторкарбоновых кислот и их некоторых производных химических группировок с высокой реакционной способностью обуславливают высокую чувствительность биологических объектов различных уровней организации к действию этих ксенобиотиков.

### Список литературы

1. Зачиняев Я.В. Химия фторангидридов перфторированных карбоновых кислот. Дис... д-ра хим. наук. СПб: СПб гос. технол. ин-т (технич. ун-т). 1998: 280 с.
2. Зачиняев Я.В., Гинак А.И. Перфторированные фторангидриды: синтез, нуклеофильные реакции, термическое разложение, биологическая активность и токсичность. М.: НИИТЭХИМ. 1995. Вып. 1. 32 с.

## ВЛИЯНИЕ РЕАЛЬДИРОНА И ОКСИМЕТИЛУРАЦИЛА НА ФУНГИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Муфазалова Н.А., Муфазалова Л.Ф., Мухаметзянова А.Я., Батракова К.В.  
Башкирский государственный медицинский университет. Уфа

Тетрахлорметан (ТХМ) оказывает выраженное повреждающее воздействие на организм [1] и, несмотря на то, что основной мишенью токсического действия ТХМ является печень [2], в значительной мере летальность обусловлена и его иммунотоксическим действием [3].

Исследована эффективность сочетанного применения реальдирона (рекомбинантный альфа-2b интерферон), оказывающего противовирусное, иммуномодулирующее и антифибротическое действие [4], и оксиметилурацила – антиоксиданта с иммуномодулирующей и гепатопротекторной активностью [5] для коррекции повреждающего действия ТХМ на фунгицидную активность полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) и перитонеальных макрофагов (ПМФ) в отношении грибов *Candida albicans* в условиях острой интоксикации. Результаты регистрировали на 7-, 14-, 28-, 46- и 60-сут.

Наблюдались формирование глубокой лейкопении, начиная с 7-х сут и вплоть до 46 сут наблюдения, и сопровождалось подавлением фунгицидной способности ПМЯЛ в условиях как функционирования, так и блокады азидом натрия оксидантных микробицидных систем. Отмечено угнетение как пероксидазозависимых, так и пероксидазозависимых оксидантных факторов. Следует подчеркнуть, что ни активность миелопероксидазы, ни интенсивность образования активных форм кислорода не восстанавливались к 60 сут наблюдения. Также наблюдалось глубокое подавление фунгицидности ПМЯЛ в условиях блокады кислороднезависимых микробицидных систем (с 7-х до 60-х сут), что сопровождалось глубоким снижением содержания катионных белков в них вплоть до 60 сут.

Клетки моноцитарно-макрофагального звена оказались несколько более устойчивыми к воздействию ТХМ. Так, статистически значимое снижение кислородзависимых факторов ОМС наблюдалось на 46- и 60-е сут и было обусловлено угнетением преимущественно пероксидазозависимых механизмов киллинга. В тоже время подавление неоксидантных микробицидных систем наблюдалось уже с 7-х сут наблюдения, что коррелировало с падением уровня катионных белков в них, и не восстанавливалось даже спустя 2 мес после интоксикации.

Применение препаратов коррекции устраняло индуцированную ТХМ лейкопению на 7-, 28-, 46- и 60-е сут. Сочетанное использование реальдирона и оксиметилурацила обеспечило восстановление активности кислородзависимых механизмов фунгицидности ПМЯЛ с 14-х сут, что обеспечивалось преимущественно устранением подавления пероксидазозависимых микробицидных систем ПМЯЛ.

Также наблюдалось восстановление фунгицидной активности ПМЯЛ в условиях блокады оксидантных механизмов киллинга уже с 7-х сут. наблюдения и

коррелировало с повышением в них уровня катионных белков.

Применение комбинации «Реальдирон+Оксиметилурацил» полностью устраняло подавление ТХМ фунгицидной активности мононуклеарных фагоцитов. При этом восстановление активности оксидантных механизмов киллинга обеспечивалось на 7-е и 14-е сутки преимущественно за счет активации пероксидазозависимых факторов, а на 28-, 46- и 60-е сут – равномерно в результате активации как пероксидазозависимых, так и пероксидазозависимых микробицидных систем. Таким образом, воздействие ТХМ приводит к формированию глубокой лейкопении, угнетению фунгицидной активности как нейтрофилов, особенно в условиях блокады оксидантного киллинга, так и мононуклеарных фагоцитов, которое не устраняется к 60-м сут наблюдения.

Применение реальдирона и оксиметилурацила устраняет индуцированную ТХМ лейкопению, а также восстанавливает фунгицидную активность нейтрофилов в условиях как функционирования (с 14-х суток), так и блокады (с 7-х сут) кислородзависимых микробицидных систем.

Использование препаратов коррекции полностью нивелирует негативное воздействие ТХМ на фунгицидную способность макрофагов, что коррелирует с интенсивностью кислородзависимого метаболизма, активностью миелопероксидазы и уровнем катионных белков в них.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности сочетанного применения реальдирона и оксиметилурацила для коррекции негативного воздействия острой интоксикации ТХМ на фунгицидную активность нейтрофилов и макрофагов.

### Список литературы

1. Мышкин В.А., Ибатуллина Р.Б., Бакиров А.Б. Поражения печени химическими веществами. (Функционально-метаболические нарушения, фармакологическая коррекция). Уфа. 2007: 177 с.
2. Лемза С.В., Ажунова Т.А., Мондодоев А.Г. Фармакотерапевтическая эффективность комплексного растительного средства «гепатон» при экспериментальном повреждении печени. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2010; (72):181-4.
3. Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., Лим В.Г. Изменение цитокинового профиля и редукция функции субпопуляций лимфоцитов при подостром отравлении тетрахлорметаном. Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2009; 147(1): 55-7.
4. Ивашкин В.Т. Буеверова А.О. Рациональная фармакотерапия в гепатологии. М. 2009: 294 с.
5. Лазарева Д.Н. Е.К. Алехин, В.В. Плечев Оксиметилурацил (иммурег) – стимулятор иммунитета. Мед. вестн. Башкортостана. 2007; 6: 70-5.



## Глава 12.

# Микотоксины и безопасность кормов

doi: 10.14427/cmr.2015.v.12

### БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ МИКОТОКСИКОЗАХ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ВНЕСЕНИЕМ В РАЦИОН КОМПЛЕКСА ИЗ ЭНТЕРОСОРБЕНТА ПОЛИСОРБА ВП, ПОЛИМИНЕРАЛЬНЫХ ПОДКОРМОК ПМП-2 И РУМЕНОСАНА

Агольцов В.А., Попова О.М.

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

В производственных опытах использовано 60 голов коров 3-й – 5-й лактации, по 12 голов в каждой группе. Опыты проводились в зимне-весенний период в хозяйствах Саратовской области.

Животные 1-й группы были контрольные – здоровые. Коровы 2–5-й групп – опытные (кормовые микотоксикозы). Всех животных содержали в одинаковых условиях кормления и никакие дополнительных манипуляций с ними не проводились.

Коровам 3-й группы 1 раз в день, ежедневно в течение 10 сут, давали энтеросорбент Полисорб ВП в дозе 300 мг/кг, в виде водной взвеси, разливая по поилкам. Затем делали перерыв на 30 сут и курс повторяли еще раз.

Животным 4-й группы 1 раз в день, ежедневно в течение 30 сут, скармливали полиминеральную подкормку ПМП-2 в дозе 200 г/гол и выпаивали с водой регулятор пищеварения Руменосана в дозе 250 г/гол.

В рацион коров 5-й группы вносили комплекс из энтеросорбента Полисорба ВП, полиминеральных подкормок ПМП-2 и регулятора пищеварения Руменосана в тех же дозах, что в 3- и 4-й группах.

Затем делали перерыв на 30 сут, и курс повторяли. Выбор полиминеральных подкормок осуществлялся, с учетом нарушенного минерального баланса в организме коров.

**Общий белок** в крови коров контрольной группы, весь период исследований, находилась на уровне 6,4–7,0%. В опытных группах (2- – 5-я) первичное исследование общего белка крови коров показало, что его уровень был ниже по сравнению с контрольными животными в 1,2–1,26 раза (на 1,2–1,5%).

Содержание общего белка в крови коров 2-й группы на протяжении всего периода проведения опытов поступательно снижалось. Показатель содержания общего белка в крови коров 2-й группы уступал фоновому и контрольному уровням коров 1-й группы к 15-м сут опыта в 1,02 и 1,25 раза (на 0,2 и 1,5%), к 30-м сут – в 1,05 и 1,26 раза (на 0,4 и 1,5%), к 45-м – в 1,09 и 1,39 раза (на 0,5 и 2,0%), к 75-м – в 1,15 и 1,4 раза (на 0,8 и 2,0%). Содержание общего белка в крови коров 3-й группы в процессе опыта умеренно повышалось. Его уровень превышал фоновое значение на 15-, 30-, 45- и 75-е сут соответственно, в 1,02, в 1,07, в 1,2 и 1,06 раза (на 0,3 на 0,4, на 0,5 и 0,2%), но был ниже результатов, полученных от животных 1-й группы в 1,15, в 1,05, в 1,2 и 1,11 раза (на 0,6, 0,3, 0,4 и 0,5%).

Общий белок в крови 4-й группы на протяжении всех 75 сут проведения экспериментов динамично повышался. Его уровень был выше фонового значения к 15-м сут опыта в 1,1 раза (на 0,5%), к 30-м – в 1,15 раза (на 0,9%), к 45-м – в 1,19 раза (на 1,1%), к 75-м сут – в 1,11 раза (на 0,8%). Содержание общего белка в крови коров 4-й группы, во все контрольные сроки опыта, продолжало уступать показателям животным 1-й группы: к 15-м сут – в 1,1 раза (на 0,5%), к 30-м – в 1,02 раза (на 0,2%), к 45-м – в 1,05 раза (на 0,46%), к 75-м – в 1,09 раза (на 0,6%).

Наиболее высокие показатели повышения уровня общего белка отмечено в крови коров 5-й группы. Динамика превышения фонового показателя к 15-м сут опыта составила 1,15 раза (на 0,9%), к 30-м – в 1,2 раза (на 1,2%), к 45-м – в 1,25 раза (на 1,35%), к 75-м – в 1,16 раза (на 1,1%). При этом с 30-х сут опыта содержание общего белка в крови коров 5 группы соответствовало значениям контрольной группы здоровых коров.

**Уровень альбуминов** в крови коров контрольной группы, за период опытов, практически не изменялся, находясь в пределах 2,88–3,16 г%. Содержание альбуминов в крови животных 2-й – 5-й групп перед началом экспериментов было понижено в 1,3–1,43 раза (на 0,7 – 0,92 г%), по сравнению с анализами контрольной группы коров

Содержание альбуминов в крови коров 2-й группы в ходе опыта, снижалось. Оно уступало фоновому и контрольному значениям на 15 день опыта в 1,15 и 1,5 раза (на 0,4 и 1,05 г%), на 30 день в 1,38 и 2,05 раза (на 0,6 и 1,62 г%), на 45 день в 1,93 и 2,65 раза (на 1,04 и 1,85 г%), на 75 день в 2,3 и 3,0 раза (на 1,18 и 1,2 г%).

Содержание альбуминов в крови коров 3 группы в процессе опыта повышалось: в 1,08, в 1,14, в 1,18 и 1,13 раза (на 0,2, на 0,34, на 0,43 и 0,3 г%), но было ниже, чем у контрольной группы к 15 дню в 1,15 раза (на 0,4 г%), к 30 дню в 1,3 раза (на 0,55 г%), к 45 дню в 1,09 раза (на 0,23 г%), к 75 дню в 1,15 раза (на 0,39 г%).

Несколько интенсивнее повышался уровень альбуминов в крови коров 4-й группы. Он повышался по сравнению с показателем фона к 15-, 30-, 45- и 75-м сут опыта в 1,24, в 1,23, в 1,33 и 1,3 раза (на 0,52, 0,55, 0,6 и 0,5 г%), однако по сравнению с контролем, в эти же дни исследований уступало, соответственно, в 1,06, в 1,15, в 1,02 и 1,13 раза (на 0,2, на 0,45, на 0,07 и 0,35 г%).

Максимальное увеличение содержания альбуминов было отмечено в крови коров 5-й группы.

Показатель альбумина был выше уровня фона к 15-м сут (0,75 г%), к 45-м – в 1,24 раза (на 0,59 г%), к 75-м в 1,25 раза (на 0,6 г%). Результаты на 15-е сут опыта свидетельствовали, что содержание альбуминов в крови животных опытных групп не уступало контрольному уровню.

**Билирубин** в крови коров контрольной группы находился в пределах от 11,0 до 12,5 мкМ/л. Наличие билирубина в крови животных 2- – 5-й групп в начале опытов было выше нормы в 1,32 – 1,56 раза (на 3,6 – 6,6 мкмоль/л). Билирубин в крови коров 2-й группы на протяжении всего эксперимента повышался. К 15 дню опыта его уровень был выше фоновых и контрольных значений в 1,05 и 1,6 раза, к 30-му дню в 1,15 и 1,6 раза, к 45 дню в 1,24 и 1,86 раза, к 75 дню в 1,14 и 1,7 раза.

Билирубин в крови животных 3-, 4- и 5-й групп в процессе опыта снижался. Его уровень снизился в крови коров 3-й группы по отношению к фону к 15-м сут опыта в 1,05 раза (на 0,6 мкМ/л), к 30-м – в 1,06 раза (на 1,2 мкМ/л), к 45-м – в 1,2 раза (на 1,6 мкМ/л), к 75-м – в 1,13 раза (на 1,7 мкМ/л). Содержание билирубина в крови коров 4-й группы снизилось к 15-, 30-, 45- и 75-м сут в 1,26 раза (на 4,2 мкМ/л), в 1,35 раза (на 5,0 мкМ/л), в 1,42 раза (на 5,5 мкМ/л), в 1,4 раза (на 5,3 мкМ/л), однако эти показатели были выше результатов животных контрольной группы к 15-м сут опыта в 1,33 раза (на 3,4 мкМ/л), к 30-м в 1,08 раза (на 4,0 мкМ/л), к 45-м – в 1,2 раза (на 1,3 мкМ/л), к 75-м сут – в 1,07 раза (на 1,1 мкМ/л).

Наиболее интенсивно снижался уровень билирубина в крови коров 5-й группы. Он понизился по сравнению с фоном к 15-м сут опыта в 1,22 раза (на 3,0 мкМ/л), к 30-м – в 1,26 раза (на 3,5 мкмоль/л), к 45-м в 1,7 раза (на 7,0 мкМ/л), к 75-м – в 1,65 раза (на 6,5 мкМ/л). Количество билирубина в крови коров 5-й группы уже к 30-м сут опыта соответствовало контрольному значению.

**Уровень холестерина** в крови контрольной группы, за период опытов, находился в пределах 3,26–3,55 мкМ/л. Количество холестерина в крови коров 2-й – 5 групп, перед началом опытов, было выше, чем в контроле в 1,44 – 1,56 раза (на 1,54 – 1,93 мкМ/л). Содержание холестерина в крови коров 2-й группы до 15-х сут опыта увеличивалось, превышая к этому сроку фоновый показатель в 1,05 раза (на 0,3 мкМ/л), контрольный – в 1,5 раза (на 1,7 мкМ/л). К 30-м сут опыта уровень холестерина в крови коров 2 контрольной группы упал, в сравнении с результатами на 15-е сут, в 2,35 раза (на 2,7 мкМ/л), уровнем контрольной группы в 1,6 раза (на 1,35 мкмоль/л). К 45-м сут содержание холестерина в крови животных этой группы было ниже, чем в контроле в 1,75 раза (на 1,4 мкМ/л), к 75 – дню в 3,1 раза (на 2,25 мкМ/л). Содержание холестерина в крови коров 3-, 4- и 5-й групп в ходе опыта также понижалось. Уровень холестерина в крови коров 3-й группы снизился, по сравнению с фоновым показателем к 15-, 30-, 45- и 75-м сут опыта в 1,26 раза (на 1,14 мкМ/л), в 1,5 раза (на 1,65 мкМ/л), в 1,5 раза (на 1,8 мкМ/л), в 1,5 раза (на 1,7 мкМ/л), превысив контрольный уровень в 1,2, в 1,02, в 1,05 и 1,05 раза

(на 0,66, на 0,07, на 0,23 и 0,16 мкМ/л). Холестерин в крови 4-й группы также интенсивно снижался, по сравнению с фоном к 15-, 30-, 45- и 75-м сут опыта, соответственно, в 1,34, 1,5, 1,54 и 1,56 раза, достигнув физиологического уровня. Холестерин в крови коров 5-й группы снизился по сравнению с фоном к 15-м сут опыта в 1,4 раза (на 1,35 мкМ/л), к 30-м – в 1,55 раза (на 1,76 мкМ/л), к 45-м – в 1,55 раза (на 1,7 мкМ/л), к 75-м – в 1,5 раза (на 1,7 мкМ/л). Содержание холестерина в крови коров 5-й группы, начиная с 15-х сут опыта, соответствовало физиологической норме.

**Глюкоза** в крови контрольной группы за период опытов была в пределах от 50,0 до 52,5 мг%. Содержание глюкозы в крови коров животных 2-й – 5-й групп, в начале опытов было ниже, чем в контроле в 1,15 – 1,19 раза (на 10,1–12,1 мг%).

Показатель глюкозы в крови коров 2-й группы снижался весь период проведения эксперимента. По сравнению с фоновым и контрольным показателями, к 15-м сут опыта уменьшение уровня глюкозы было в 1,05 и 1,26 раза, к 30-м – в 1,09 и 1,29 раза (, к 45-м в 1,12 и 1,36 раза), к 75-м сут – в 1,2 и 1,4 раза.

Глюкоза в крови коров 3-, 4- и 5-й групп, на всём протяжении проведения эксперимента повышалась. Ее уровень возрос в крови животных 3-й группы к 15-м сут опыта в 1,05 раза (на 2,4 мг%), к 30-м – в 1,06 раза (на 4,5 мг%), к 45-м – в 1,07 раза (на 5,3 мг%), к 75-м – в 1,06 раза (на 4,6 мг%). Содержание глюкозы в крови коров 3-й группы не достигало контрольного уровня, уступая в эти же сроки опыта, в 1,15 раза (на 9,0 мг%), в 1,07 раза (на 5,0 мг%), в 1,2 раза (на 7,0 мг%), в 1,06 раза (на 5,2 мг%). Содержание глюкозы в крови коров 4-й группы увеличилось по сравнению с фоном к 15-м сут опыта в 1,1 раза (на 5,5 мг%), к 30-м – в 1,15 раза (на 8,7 мг%), к 45-м – в 1,15 раза (на 9,9 мг%), к 75-м – в 1,11 раза (на 7,4 мг%). Данные показатели содержания глюкозы в крови коров 4-й группы также были ниже контроля, уступая ему на 15-е сут опыта в 1,1 раза (на 6,4 мг%), на 30-е – в 1,04 раза (на 1,5 мг%), на 45-е – в 1,04 раза (на 2,4 мг%), на 75-е – в 1,05 раза (на 2,6 мг%).

Уровень глюкозы в крови коров 5-й группы был выше уровня фона к 15-м сут опыта в 1,16 раза, к 30-м – в 1,26 раза, к 45-м – в 1,3 раза, к 75-м – в 1,25 раза. Количество глюкозы в крови коров 5-й группы к 15-м сут опыта было ниже контрольного значения в 1,05 раза, но затем превысило контроль: к 30-м в 1,05 раза, к 45-м – в 1,04 раза, к 75-м сут – в 1,05 раза.

Результаты, свидетельствуют о том, что кормовые микотоксикозы у коров вызывают значительные изменения биохимической реактивности организма (снижение в крови уровня глюкозы в 1,72 раза (на 20,6 мг%), общего белка в 1,43 раза (на 2,2 г%), альбуминов в 3,0 раза (на 2,0 г%), общего билирубина в 1,7 раза, резкого увеличения, а затем снижения холестерина в 3,1 раза (на 2,25 мкМ/л). Для коррекции биохимического статуса организма коров целесообразно проводить комплексную терапию, введением в рацион животных комплекса из антиоксиданта Полисорба ВП, полиминеральных подкормок ПМП-2 и Руменосана.

## ИЗУЧЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОХРАТОКСИНОМ А И ФУМОНИЗИНАМИ ПРОДУКТОВ ПРИКОРМА В 2010-2014 гг.

Аксенов И.В., Седова И.Б.  
НИИ питания, РАН, Москва

Микотоксины, образующиеся в процессе жизнедеятельности плесневых грибов, являются распространенными загрязнителями пищевых продуктов. Особую важность представляет проблема контаминации микотоксинами продуктов прикорма, которые предназначены для питания детей 1-го года жизни.

К числу приоритетных микотоксинов относят охратоксин А (ОТА) и фумонизины В1 и В2 (ФВ1 и ФВ2), обладающие широким спектром токсического действия.

Согласно техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) в продуктах прикорма, содержащих зерновой компонент, ОТА не допускается, а сумма ФВ1 и ФВ2 в детском питании на основе кукурузы не должна превышать 0,20 мг/кг.

**Цель работы** – изучение содержания ОТА, ФВ1 и ФВ2 в продуктах прикорма на зерновой основе. Определение микотоксинов в образцах проводили с использованием методик высокоэффективной жидкостной хроматографии: ОТА – МУК 4.1.2204-07, ФВ1 и ФВ2 – МУК 4.1.1962-05.

Содержание ОТА было изучено в 264 образцах продуктов прикорма, из которых 155 были представлены кашами (53 – на основе двух и более злаков, 33 – на основе зерна гречихи, 33 – риса, 18 – пшеницы, 16 – овса, 1 – кукурузы и 1 – просо) и 109 – консервами (86 – на основе зерна риса, 9 – на мультизерновой основе, 7 – на зерновой основе пшеницы, 4 – гречихи, 3 – овса).

ОТА был выявлен исключительно в образцах каш: 11 (7%) исследованных проб содержали микотоксин выше допустимых уровней (в количестве от 0,0005 до 0,0016 мг/кг, медиана 0,0007 мг/кг). Контаминированные ОТА каши были изготовлены из гречихи (6 проб содержали ОТА в количестве от 0,0007 до 0,0016 мг/кг, медиана – 0,0009 мг/кг), овса (1 проба – 0,0006 мг/кг) или смеси различных злаков (4 пробы содержали ОТА в количестве от 0,0005 до 0,0006 мг/кг).

Содержание ФВ1 и ФВ2 было исследовано в 108 образцах продуктов прикорма на основе кукурузы: 73 образцах каши и 35 – консервов. В кашах ФВ1 был обнаружен в 15 образцах в количестве от 0,04 до 3,66 мг/кг (медиана – 0,10 мг/кг); ФВ2 – в 3 пробах в количестве 0,12; 0,28 и 1,25 мг/кг. Суммарная концентрация ФВ1 и ФВ2, превышающая допустимый уровень (0,20 мг/кг), была выявлена в трех изученных образцах каш. В кашах зарубежного производства ФВ1 обнаруживали чаще и в большем количестве (26% образцов содержали ФВ1 в количестве от 0,07 до 3,66 мг/кг; медиана – 0,11 мг/кг), чем в отечественной продукции (17% контаминированных образцов, 0,04–0,18 мг/кг, медиана 0,07 мг/кг). В изученных образцах консервов фумонизины не были обнаружены.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии ОТА, ФВ1 и ФВ2 в продуктах прикорма на зерновой основе, что обуславливает необходимость регулярного контроля в них указанных микотоксинов.

## МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ЗЕРНА ОВСА И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

Буркин А.А.<sup>1</sup>, Кононенко Г.П.<sup>1</sup>, Гаврилова О.П.<sup>2</sup>, Гагкаева Т.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Москва

<sup>2</sup>ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург–Пушкин

В странах центральной и северной Европы и во многих регионах нашей страны под овес было занято около 4% посевных площадей [1]. Устойчивость растений к грибным заболеваниям является залогом не только высоких урожаев, но и безопасности зерна в связи с его контаминацией микотоксинами. По предварительным оценкам, овес больше чем другие колосовые культуры подвержен загрязненности Т-2 токсином (Т-2) и альтернариолом (АОЛ) [2, 3].

Северное Нечерноземье является регионом интенсивного возделывания овса и основным поставщиком зерна на перерабатывающие предприятия европейской части России. В этой связи в 2007 г. был проведен первый этап исследований пораженности грибами *Fusarium* и контаминации фузариотоксинами зерна из Новгородской, Вологодской, Псковской, Ленинградской, Кировской областей [4], а затем –

оценка встречаемости АОЛ в выборке образцов из Новгородской, Вологодской, Псковской, Кировской областей [5].

Мы использовали образцы из партий зерна, выращенного в 8 областях Северо-Западного и Приволжского федеральных округов; продукты переработки зерна овса (хлопья и хлебобулочные изделия из муки) разных производителей из торговой сети г. Москвы; зерно, собранное на полях селекционных станций ВИЗР (Ленинградская обл.) и Дальневосточной опытной станции ВИР (г. Владивосток), а также средние образцы от производственных партий фуражного зерна, предоставленные специализированными животноводческими хозяйствами Московской, Тульской, Рязанской, Брянской областей и Ставропольского края. Определение АОЛ и фузариотоксинов – Т-2, диацетоксисцирпенола (ДАС), дезоксиниваленола

(ДОН), зеараленона (ЗЕН), проводили с использованием иммуноферментного анализа.

В зерне, выращенном в Калининградской обл. (Багратионовский, Гурьевский, Правдинский р-ны) в 2007–2009 гг., Т-2 и ДОН встречались примерно в половине образцов в количествах 10–160 и 52–340 мкг/кг, соответственно, и две из 6 исследованных проб содержали 79 и 83 мкг/кг АОЛ. Результаты, полученные для зерна урожая 2014 г. из других областей Северо-Западного округа, а также из Нижегородской области и Республики Чувашия (Приволжский округ), суммированы в табл.

В целом, на территориях Северо-Западного округа Т-2 и ДОН имели равновысокую встречаемость (в 33 и 34 образцах из 55) со случаями накопления сверхнормативных количеств Т-2 в Вологодской обл. и ДОН в Архангельской и Новгородской областях. Ранее высокие (более 1000 мкг/кг) уровни загрязненности ДОН были выявлены в Новгородской, Псковской и Вологодской областях [4]. Таким образом, по ре-

зультатам двух этапов мониторинга к территориям с повышенным риском загрязненности зерна ДОН следует отнести Архангельскую, Вологодскую, Нижегородскую и Псковскую области. Частота выявления АОЛ составила 29%, и образцы с концентрациями 1000 мкг/кг и выше, были найдены в Новгородской и Псковской областях.

Редкие случаи низкой загрязненности ЗЕН выявлены в зерне из Архангельской и Псковской областей. В Приволжском округе (Нижегородская обл. и Республика Чувашия) более половины образцов имели контаминацию Т-2 (17/26, 4–250 мкг/кг), в том числе с превышением допустимых количеств, и несколько меньшее их число – ДОН (12/26) с диапазоном содержаний 52–300 мкг/кг. Ранее в Кировской обл., относящейся к тому же округу, были выявлены сверхнормативные уровни как Т-2, так и ДОН (4). Обнаружение АОЛ было столь же редким как в Архангельской и Вологодской областях, а ЗЕН не обнаружен (табл.).

Таблица. Встречаемость фузариотоксинов и альтернариола в зерне овса урожая 2014 г. с территорий Северо-Западного и Приволжского округов.

Территория выращивания	n	n <sup>+</sup> , количество мин./макс., мкг/кг			
		Т-2	ДОН	ЗЕН	АОЛ
Архангельская обл.	6	1 67	2 79, 1990	1 30	1 34
Вологодская обл.	20	16 4–185	12 49–255	–	4 49–155
Ленинградская обл.	12	6 8–100	6 50–245	–	3 20, 63, 125
Новгородская обл.	10	7 10–100	8 50–1160	–	5 120–1160
Псковская обл.	7	3 4, 5, 10	6 56–190	1 20	3 59, 200, 1545
Нижегородская обл.	10	6 6–250	5 52–78	–	1 85
Республика Чувашия	16	11 4–250	12 52–300	–	3 47, 85, 160

Выборочная проверка пищевой продукции из овса не выявила случаев ее загрязненности АОЛ и ЗЕН. В хлебобулочных изделиях с овсяной мукой (хлебцы, печенье, хлеб) российских производителей (6 образцов) и поступивших по импорту (3 образца) в четырех был найден Т-2 (4–20 мкг/кг) и в двух – ДОН (140, 160 мкг/кг). В овсяных хлопьях зарубежного изготовления только в одном образце из 4-х был найден ДОН (60 мкг/кг). В хлопьях, изготовленных на предприятиях Вологодской, Кировской, Московской, Калужской, Рязанской, Волгоградской Воронежской, Ростовской областей и Краснодарского края встречаемость Т-2 составила 6/22 с количествами 5–9 мкг/кг.

Тем не менее в 5 образцах хлопьев из Вологодской области ДОН содержался в значительных концентрациях – от 305 до 1900 мкг/кг, хотя в такой же продукции от других производителей он встречался гораздо реже (2/17) и в меньших количествах (56 и 125

мкг/кг). Эти результаты свидетельствуют о том, что выявление территорий зерносеяния с повышенным фоном возможной загрязненности микотоксинами имеет большое значение для обеспечения безопасности продуктов питания.

Для зерна, выращенного в 2008–09 гг. на сортоучастках в Ленинградской обл. (ГСУ «Волосовское», Волосовский р-н – 23 образца и ГСУ «Рождественское», Гатчинский р-н – 43 образца), показатели встречаемости Т-2 (13/66, 4–29 мкг/кг) и ДОН (18/66, 60–1000 мкг/кг) соответствовали найденным на территории этой области, несмотря на смещение диапазонов их содержаний. АОЛ по оценке 2008 г. встречался чаще, но в примерно тех же количествах (12/22, 24–240 мкг/кг) (табл.).

Зерно из коллекционного питомника Дальневосточной опытной станции ВИР имело множественную контаминацию фузариотоксинами – кроме Т-2

(5/21, 4–50 мкг/кг) и ДОН (19/21, 64–1775 мкг/кг), в 5-ти пробах присутствовал ЗЕН (40–180 мкг/кг) и в одной – ДАС (63 мкг/кг). Это вполне согласуется с особенностями микотоксикологической ситуации в Приморском крае, вызванной специфическим по видовому составу комплексом возбудителей фузариоза зерновых культур [6]. Для АОЛ установлена частая встречаемость (15/21 образцов) в количествах 20–315 мкг/кг. Факт обнаружения АОЛ в зерне в этом регионе является новым, и в этой связи распространенность токсичных метаболитов грибов рода *Alternaria* в зерне с Дальнего Востока должна стать предметом детального изучения.

Известно, что зерно овса имеет ограниченное применение для фуражных целей и используется для немногих видов животных, однако для коневодства оно представляет особую ценность. Кроме высокой питательности этот вид корма является источником биологически активных веществ, оказывающих стимулирующий эффект на поведенческие реакции лошадей.

В последние годы на этих животных начаты эксперименты по оценке характера негативного действия фузариотоксинов, которые могут содержаться в зерне [7, 8]. Пробная оценка партий кормового зерна, предоставленных конно-спортивными и племенными хозяйствами, показала их обширную контаминацию Т-2 (20/25, 4–100 мкг/кг), умеренную – ДОН (7/25, 63–410 мкг/кг) и АОЛ (7/25, 20–200 мкг), и редкую – ЗЕН (2 пробы, 120 и 125 мкг/кг).

К сожалению, многие территории нашей страны, имеющие потенциально высокий риск загрязненности зерна микотоксинами, до сих пор остаются необследованными. По данным, полученным в ходе выполнения двух российско-белорусских проектов 2003 и 2009 гг., в районах Витебской, Могилевской, Гомельской областей, приграничных с Брянской и Смоленской областями, встречаемость Т-2 и ДОН в зерне овса превышала 70% с предельными уровнями накопления до 145 и 1250 мкг/кг [9], при этом АОЛ выявлен в 40% образцов и в отдельных случаях с содержанием до 1000 мкг/кг.

Не менее важным является распространение поэтапного мониторинга и на другие территории страны с интенсивным возделыванием этой культуры.

*Авторы выражают признательность руководству и сотрудникам филиалов ФГБУ «РОССЕЛЬХОЗЦЕНТР» за организацию отбора образцов зерна для исследования.*

*Исследование частично финансировано за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-16-00072).*

### Список литературы

1. Основные показатели сельского хозяйства в России в 2005 году. ГМЦ РОССТАТА. М. 2006: 10.
2. Gruber-Schley S., Thalmann A. The occurrence of *Alternaria* spp. and their toxins in grain and possible connections with illness in farm animals. *Landwirtschaftliche Forschung*, 1988, 41(1-2): 11–29.
3. Кононенко Г.П., Буркин А.А. О контаминации фузариотоксинами зерна злаков, используемых на кормовые цели. *Сельскохозяйств. биол.* 2009; 4: 81–8.
4. Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю., Буркин А.А., Кононенко Г.П. Зараженность грибами рода *Fusarium* и контаминация микотоксинами зерна овса и ячменя на севере Нечерноземья. *Сельскохозяйств. биол.* 2009; 6: 89–93.
5. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Иммуноферментный анализ альтернариола для оценки риска контаминации агропродукции. *Прикл. биохимия и микробиология*, 2011; 47(1): 79–83.
6. Пирязева Е.А., Малиновская Л.С. Грибы рода *Fusarium* Link., поражающие фуражное зерно в Дальневосточном регионе РФ. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*, 2009, 2: 20–6.
7. Raymond S.L., Smith T.K., Swamy H.V. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, metabolism, and indices of athletic performance of exercised horses. *J Anim Sci*, 2005, 83: 1267–73.
8. Khol-Parisini A, Hellweg P, Razzari-Fazeli E. et al. Highly deoxynivalenol contaminated oats and immune function in horses. *Arch Anim Nutr.*, 2012, 66(2): 149–61.
9. Жуковский А.Г., Буркин А.А., Кононенко Г.П. Микотоксикологический мониторинг зерна. Опыт международного сотрудничества. *Иммунопатол., аллергия, инфектол.* 2010; 1: 191.

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АЛЬТЕРНАРИОЛА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

*Буркин А.А., Кононенко Г.П.*

*ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Москва*

Современная наука располагает убедительными доказательствами того, что грибы рода *Alternaria* являются носителями серьезной токсикологической опасности. Благодаря способности к активному росту на разных субстратах в широком диапазоне температур и влажности они занимают обширную экологическую нишу и приносят в нее сложный метаболический ответ в виде многокомпонентного комплекса из веществ, сочетающих генотоксичность, мутагенное и тератогенное действие. Альтернариол (АОЛ), гидрок-

силированный 6'-метилдibenzo- $\alpha$ -пирон, является одним из них. Разработка методики избирательного определения АОЛ на основе иммуноферментного анализа [1] позволила нам получить первые сведения о характере контаминации агропродукции, составляющей основу рационов сельскохозяйственных животных [2], и за последние несколько лет расширить обследование таких объектов как кормовые растения, консервированные травяные корма, зернофураж, кормовая продукция перерабатывающих производств

(жмыхи, шроты), комбикорма для разных категорий животных, а также зерно от партий, заготовленных на отдельных территориях европейской части страны и продукты переработки зерна.

Встречаемость АОЛ в фуражном зерне пшеницы ( $n = 99$ ) и ячменя ( $n = 101$ ) составила 17,2 и 9,9%, так что средний показатель 13,5% вполне соответствовал найденному ранее [2]. Токсин был обнаружен только в 1 из 33 образцов кукурузы (20 мкг/кг), а в зерне овса встречался несколько чаще – 7/25 с диапазоном 20–200 мкг/кг. В 16 из 18 анализированных проб кормового зерна пшеницы, ячменя и овса урожая дождливого 2006 г. с юга Швеции также был найден АОЛ в количествах 9–335 мкг/кг [3].

Соевый шрот имел фоновую загрязненность АОЛ в содержаниях, близких пределу определения метода. Жмыхи и шроты из подсолнечника, напротив, были контаминированы АОЛ в значительно большей степени (56/77 образцов) и могли содержать уровни до 1990 мкг/кг. После первого случая обнаружения в двух пробах семян подсолнечника из Италии [4] была установлена его значительная распространенность в этой продукции в Бразилии [5].

В полнорационных комбикормах для свиней и птицы встречаемость АОЛ, оцененная в 2009–2014 гг. по 882 образцам, составила 35,6% с варьированием диапазонов содержания по годам от 20–63 мкг/кг до 20–1770 мкг/кг. В сухих смесях для кошек и собак, а также в комбикормах для лабораторных животных (крыс, мышей и хомяков), контаминация была умеренной. Однако в комбикормах для кроликов, содержащих травяную муку, она оказалась заметно выше – с частотой, достигающей 100%, и количествами до 610 мкг/кг.

Действительно, при обследовании травяных кормов выяснилось, что ситуация с их загрязненностью АОЛ является весьма напряженной. На полях с многоукосным использованием как бобовые, так и злаковые отрастающие травы практически повсеместно содержали этот токсин, причем, если в злаковых травостоях его количества варьировали от 20 до 120 мкг/кг, то в травосмесях с клевером могли достигать 2820 мкг/кг. Такие различия вполне могут быть обусловлены либо участием в комплексе патогенных грибов нескольких видов *Alternaria*, контрастных по токсинообразующей способности, или особенностями развития этих грибов на растении-хозяине. К сожалению, до сих пор токсигенный потенциал даже для тех видов грибов, которые широко распространены на основных видах агропродукции, остается малоизученным.

В естественных луговых травах, обследованных в трех районах Московской области путем ежемесячных сборов, наблюдалась такая же обширная контаминация АОЛ при постепенном расширении диапазона его содержаний – в июне (20–260 мкг/кг), июле (40–830 мкг/кг), августе (40–2040 мкг/кг), сентябре (70–10 000 мкг/кг). По сборам того же года, в Тверской области отмечалась аналогичная тенденция – в июле (50–1780 мкг/кг), а в сентябре – (20–9800 мкг/кг). Дикорастущие травы из Северной Карелии в конце августа содержали АОЛ в количествах от 40 до 4700 мкг/кг, в Астраханской области – от 32 до 2510 мкг/кг. По-видимому, постепенное нарастание степени загрязненности

носит закономерный характер, т.к. в сборах 2011 г. и те же сроки в Северной Карелии и Астраханской области максимальные показатели были равны 8300 и 1260 мкг/кг. Выявленные особенности сезонных изменений уровней АОЛ в травах следует учитывать при заготовке кормов, которая предпочтительна в первой половине вегетации.

Анализ консервированных зеленых кормов (сена, силоса и сенажа) показал, что загрязненность в целом сохраняла тот же характер, что и в травостоях перед скашиванием. По-видимому, накопление АОЛ в сырье является главной причиной контаминации сенажа и силоса, поскольку в анаэробных условиях грибы *Alternaria* утрачивают способность к росту. При напочвенном высушивании трав в результате продолжения жизнедеятельности продуцентов уровни АОЛ могут возрастать, а при укосах в поздние сроки – достигать критических значений (до 10 000 мкг/кг).

Тем не менее, несмотря на возможность интенсивной контаминации АОЛ травяных кормов и случаи аномально высоких содержаний в комбинированных рационах, острые интоксикации животных, вызванные токсинами *Alternaria*, не описаны. Возможно, в организме жвачных животных есть барьеры, сдерживающие поступление этого токсина в организм.

В рамках фундаментальных исследований лишайников как редких видов кормов нами был выявлен новый научный факт – формирование в этих организмах особого метаболического профиля из микотоксинов в дополнение к вторичным продуктам собственного обмена [6]. Пока неясно, можно ли относить *Alternaria* к эндолишайниковым грибам, но распространенность и количества АОЛ у представителей многих таксономических групп оказались весьма значительными. Это касалось не только лишайников, поедаемых дикими и одомашненными животными в северном ареале, но и тех, что используются в диетологии, косметологии и производстве лекарственных средств.

Для большинства обследованных родов содержание АОЛ составляло от 300 до 1000 нг/г (*Alectoria*, *Arctoparmelia*, *Cladonia*, *Hypogymnia*, *Melanelia*, *Nephroma*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Platismatia*, *Vulpicida*, *Xanthoria*). Уровни менее 300 нг/г были найдены в лишайниках родов *Bryoria*, *Cetraria*, *Evernia*, *Flavocetraria*, *Letharia*, *Melanohalea*, *Pseudevernia*, *Usnea*. В то же время представители рода *Umbilicaria* заметно выделялись среди всех других способностью к накоплению АОЛ, и особенно два вида – *U. hyperborea* и *U. deusta*, содержащие этот токсин в количествах 1035–5370 и 1605–5010 нг/г соответственно. Интересно, что уже при первых исследованиях микобиоты лишайников грибы *Alternaria* были найдены в слоевищах нескольких видов *Cladonia* (*A. alternata* и *A. tenuissima*), а также у *Parmelia taractica* и *Peltigera praetextata* (*A. alternata* и *Alternaria* sp.) [7, 8].

В сфере продовольственной безопасности продолжается дискуссия, начатая еще в 80-х гг. прошлого столетия, по поводу ситуации с интенсивной пораженностью зерновых культур грибами *Alternaria* в нескольких провинциях Китая и повышением заболеваемости населения раком пищевода [9]. Было установлено, что в эндемичных районах с 80%-ной загрязненностью зерна этими грибами в 20 из 22

анализированных образцов содержали АОЛ в количествах 116–731 мкг/кг и средним значением 335 мкг/кг [10].

В доступной для обследования продукции переработки зерна овса, хлебобулочных изделий отечественных и зарубежных производителей АОЛ не был найден. Однако, по данным 2007 г. и 2014 г., для отдельных партий заготавливаемого зерна ячменя и овса на территориях Северо-Западного и Приволжского округов случаи обнаружения АОЛ были нередкими (55/137), и содержание токсина составляло от 20 до 2505 мкг/кг.

Эти предварительные результаты свидетельствуют о том, что в регионах, где отмечалась наиболее частая контаминация, целесообразно проводить регулярные мониторинговые исследования в режиме ежегодного повторения на протяжении нескольких лет. Ранее указания на связь интенсивности контаминации зерна овса АОЛ с местом произрастания этой культуры были сделаны немецкими коллегами [11].

Обнаружение АОЛ в зерне должно вызывать вполне объяснимые опасения, поскольку реальная угроза может оказаться гораздо большей из-за сочетанного эффекта сопутствующих токсинов. Так, в зерне из китайских провинций с эндемическим раком пищевода, кроме АОЛ, были найдены еще 2 контаминанта – не уступающий ему по генотоксичности метиловый эфир альтернариола (52–1426 мкг/кг, в среднем 443 мкг/кг) и самый токсичный из метаболитов грибов *Alternaria* – тенуазоновая кислота со средним содержанием 2419 мкг/кг и максимальным – 6432 мкг/кг [10].

Более того, было отмечено, что в образцах зерна с самым высоким уровнем АОЛ количества его метилового эфира и тенуазоновой кислоты были также наибольшими. В этой связи усилия мирового научного сообщества по формированию принципиальной позиции по строгому контролю и регламентации потребления продукции с высоким риском контаминации токсинами грибов *Alternaria* [12] являются вполне обоснованными.

### Список литературы

1. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Иммуноферментный анализ альтернариола. Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2009; 2: 7-8.
2. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Иммуноферментный анализ альтернариола для оценки риска контаминации агропродукции. Прикл. биохим. микробиол. 2011; 47(1): 79-83.
3. Haggblom P, Stepinska A, Solyakov A. Alternaria mycotoxins in Swedish feed grain. Abstr Conf 29th Mycotoxin-Workshop, Fellbach, Germany, 14th-16th May 2007. Sprint-Gigital-Druck GmbH, Stuttgart, Germany. 2007: 35.
4. Logrieco A, Bottalico A, Visconti A, Vurro M. Natural occurrence of Alternaria mycotoxins in some plant products. Microbiologie-Aliments-Nutrition. 1988; 6: 13-7.
5. Pozzi CR, Braghini R, Arcaro JPR et al. Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. J Agric Food Chem. 2005; 53(14): 5824-8.
6. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Контаминация ягеля микотоксинами. Докл. РАСХН. 2011; 2: 54-6.
7. Petrini O, Hake U, Dreyfuss MM. An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. Mycologia. 1990, 82(4): 444-1.
8. Girlanda M, Isocrono D, Blanco G, Luppi-Mosca AM. Two foliose lichens as microfungus ecological niches. Mycologia. 1997; 89(4): 531-6.
9. Dong ZG, Liu GT, Dong ZM et al. Induction of mutagenesis and transformation by the extract of Alternaria alternata isolated from grains in Linxian, China. Carcinogenesis. 1987; 8(7): 989-91.
10. Li FQ, Yoshizawa T. Alternaria mycotoxins in weathered wheat from China. J Agric Food Chem. 2000; 48(7): 2920-4.
11. Gruber-Schley S, Thalmann A. The occurrence of Alternaria spp. and their toxins in grain and possible connections with illness in farm animals. Landwirtschaftliche Forsch. 1988, 41(1-2): 11-29.
12. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of Alternaria toxins in feed and food. EFSA J. 2011; 9(10): 2407.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА ТРАМЕТИН НА ОСНОВЕ *TRAMETES PUBESCENS* (SHUMACH.:FR.)PILAT. В БИОТЕХСИСТЕМАХ В БОРЬБЕ С САЛЬМОНЕЛЛЁЗОМ ТЕЛЯТ И ПОРОСЯТ

Чхенкели В.А., Анисимова А.В.

Иркутский государственный агрономический университет им. А.А. Ежовского. Иркутск

В первой половине XXI века сальмонеллезы являются наиболее распространенными зоонозами, проявляя стойкую тенденцию к дальнейшей активизации [1, 2]. Наибольший социально-экономический ущерб от сальмонеллезов несут экономически развитые страны [3]. Кроме эпидемической значимости, сальмонеллезы являются не менее проблематичными и в санитарном плане, вызывая экономические проблемы, связанные с недополучением прибыли производителями пищевой продукции. Актуальной, связанной с предыдущей

проблемой, является и эпизоотическая ситуация по сальмонеллезу [3, 4]. Сальмонеллы играют важную роль в этиологии массовых желудочно-кишечных болезней молодняка сельскохозяйственных животных.

Множественная структура возбудителей заболеваний, обладающих разной чувствительностью к применяемым антибактериальным средствам, во многих случаях не приводит к желаемым результатам [2, 5 – 9]. С каждым годом растет количество изолятов сальмонелл с высокими показателями резистентности

как к традиционным, так и к новым антимикробным препаратам [2, 10, 11]. Снижение распространенности сальмонеллеза у сельскохозяйственных животных и бактериальных нагрузок в окружающей среде важно для снижения риска зоонозных сальмонеллезных инфекций [12, 13]. Все это приводит к необходимости дальнейшего поиска новых эффективных противомикробных средств против сальмонеллеза.

**Цель работы** – изучение профилактической эффективности препарата траметин на молодняке сельскохозяйственных животных.

**Материалы и методы.** Использовали новый ветеринарный препарат траметин – продукт жидкофазного культивирования гриба-ксилотрофа *T. pubescens* при добавлении в среду культивирования соединений цинка и селена с последующим отделением биомассы от культуральной жидкости и её лиофилизацией.

Профилактическую эффективность препарата в сравнительном аспекте с препаратом иммунофлор, любезно предоставленным для исследований ООО «Лафид» (г. Москва), в производственных условиях проводили на поросятах на базе свинофермы п. Оек ООО «Академия» и на телятах на базе молочной фермы ООО «Возрождение».

В научно-хозяйственных экспериментах использовали 2-месячных поросят помеси ландраса с крупной белой породой. На группу в течение эксперимента (10 сут) давали по 18 г траметина и по 10 г иммунофлора. В экспериментах телят черно-пестрой породы. Траметин задавали на группу в дозе 60 г в течение 7 дней, а иммунофлор – с комбикормом из расчёта 50 г препарата на 50 кг комбикорма.

Поросят и телят делили на 3 группы по принципу аналогов по 10 особей в каждой:

1. Интактные животные;
2. Животные в качестве сравнения получавшие перорально иммунофлор;
3. Животные, получавшие весь подопытный период траметин. Перед и после окончания опытов животных взвешивали, проводили забор крови для определения биохимических, иммунологических и гематологических показателей.

Кровь у поросят забирали из ушной вены, а у телят – из яремной вены в верхней трети шеи. Биохимические показатели крови поросят исследовали в лаборатории ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория». Определяли щелочную фосфатазу, общий белок, кальций, фосфор с использованием общепринятых методов исследования [14]. Биохимические показатели крови телят исследовали в лаборатории Иркутской городской ветеринарной поликлиники с использованием биохимического анализатора Rayto 1904C (Китай) и тест-систем фирмы «Cormay».

Гематологические показатели изучали в лаборатории Иркутской городской ветеринарной поликлиники с использованием ветеринарного автоматического гематологического анализатора VetAbc (Франция).

Иммунологические показатели крови исследовали на базе ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр», в соответствии с общепринятыми рекомендациями [15].

При зоогигиенической оценке помещения определяли комплекс параметров – температура, влажность,

скорость движения воздуха, атмосферное давление, естественная и искусственная освещенность, газовый состав воздуха (аммиак, сероводород) и загрязненность воздуха микроорганизмами общепринятыми методами зоогигиенических исследований [17].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью лицензионного пакета прикладных программ STATISTICA 6.1. (Statsoft Inc., США); правообладатель лицензии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (г. Иркутск). Статистическую обработку проводили параметрически с учетом t-критерия Стьюдента, причем разность различий средних арифметических признавали значимой при  $p \leq 0,05$ .

При профилактическом использовании препаратов траметин и иммунофлор на поросятах наблюдали повышение привесов по сравнению с группой контроля. Так, после применения препаратов в течение 10 дней в контрольной группе привесы составили в среднем 350 – 400 г/сут, в группе с препаратом траметин – 600 – 650 г (на 17,6% выше контроля) в сутки, в группе с препаратом иммунофлор – 550 – 600 г/сут (на 15,4% выше контроля). Сохранность поголовья поросят при этом составила в группах 2 и 3 – 100,0%, в группе 1 – 80,0%.

**Результаты и обсуждение.** По результатам биохимических исследований сыворотки крови содержание белка увеличилось на 16,0% у животных в группе 3, в группе 2, изменение белка не превышало контроль. Содержание щелочной фосфатазы в группе, получавшей на протяжении опыта препарат траметин, увеличилось на 6,8%. Содержание фосфора в сыворотке крови в опытных группах превышало содержание элементов на 32,0 и 28,0% соответственно. Содержание кальция увеличилось на 20,0% в обеих подопытных группах.

Наблюдали незначительное уменьшение содержания лейкоцитов, при этом содержание эритроцитов увеличилось на 6,6% в группе 3. Содержание гемоглобина увеличилось на 9,4 и 7,7% в группах 3 и 2 соответственно.

Фагоцитарная активность крови поросят в группе 3, увеличилась на 20,5% по отношению к контролю, и на 20,7% в группе 2. Наблюдали повышение фагоцитарного индекса на 28,0 и 22,0%, фагоцитарного числа на – 43,0 и 39,0% соответственно.

При профилактическом использовании препаратов траметин и иммунофлор у телят наблюдали повышение привесов по сравнению с группой контроля. Так, после применения препаратов в течение 7 дней прирост живой массы в группах с использованием траметина и иммунофлора на 19% выше контрольной. Сохранность поголовья в подопытных группах на 10% была выше, чем в контрольной группе.

Наблюдали также и изменение биохимических, гематологических, иммунологических показателей крови телят. Траметин способствовал снижению активности ферментов аланинаминотрансферазы (АлТ), аспаратаминотрансферазы (АсТ) и амилазы на 4,1 – 30,9%, увеличению содержания белка в крови на 6,1%, глюкозы – на 3,5%. Использование иммунофлора способствовало повышению активности ферментов, повышению содержания глюкозы, белка.



В группе, в которой применяли препарат траметин, наблюдали увеличение эритроцитов на 13,8%, гемоглобина – на 31,2%, повышение фагоцитарной активности – на 4,2%, повышение фагоцитарного числа в группе траметина на 12,3%, повышение фагоцитарного числа – на 12,3%. В группе иммунофлора наблюдали изменение показателей в тех же пределах.

При это было установлено, что некоторые параметры микроклимата не соответствуют нормативным показателям в помещении для содержания молодняка.

В заключение следует отметить, что уникальный ветеринарный препарат Траметин является перспективным объектом изучения для ветеринарной практики в условиях импортозамещения продуктов животноводства для повышения ветеринарного благополучия в животноводстве.

### Список литературы

1. Медведева Н.В., Брусина Е.Б., Дроздова О.М. и соавт. Эпидемический процесс сальмонеллеза в Кемеровской области и возможности профилактического применения бактериофагов. Медицина в Кузбассе. 2013; 12(3): 39-45.
2. Correia S, Nunes-Miranda JD, Pinto L et al. Complete proteome of a quinolone-resistant *Salmonella typhimurium* phage type DT104B clinical strain. Int J Mol Sci. 2014; 8: 14191–219.
3. Наконечный И.В., Наконечный А.И. Эколого-эпизоотические аспекты формирования серопейзажа и биоценоотические особенности циркуляции сальмонелл в природных экосистемах юго-запада Украины. Уч. зап. УО ВГАВМ. 2011; 47(2): 63-7.
4. Макаров В.И. Ветеринарно-санитарная экспертиза и оценка продуктов убоя кобыл якутских лошадей при сальмонеллезном аборте. Автореф. дисс. ... к. в. н. Якутск. 2011: 19 с.
5. Чхенкели В.А., Мартынова А.Ю., Горяева Н.А. с соавт. Лечебно-профилактическая эффективность препарата Леван-2 на основе продуктов глубинного культивирования базидиомицета *Trametes pubescens* (Schumach.:Fr) Pilat при колибактериозе телят. Вестн. ИрГСХА. 2011; 43: 118-25.
6. Чхенкели В.А., Калинович А.Е. Индикация и диагностика энтерогеморрагической кишечной палочки. Метод. рекомендации. Иркутск: ИрГСХА. 2012: 27 с.
7. Овчинников А.К. Профилактическая и иммуномодулирующая роль споробактерина в схемах специфической вакцинопрофилактики сальмонеллеза у телят. Дисс. .... канд. биол. наук. Оренбург. 2004: 130 с.
8. Coward C, Restif O, Dybowski R et al. The effects of vaccination and immunity on bacterial infection dynamics in vivo. PLoS Pathogens. 2014. doi: 10.1371/journal.ppat.1004359.
9. Zouhir S, Bernal-Bayard J, Cordero-Alba M et al. The structure of the SlrP-hTrx1 complex sheds light on the autoinhibition mechanism of the type III secretion system effectors of the NEL family. Biochem J. 2014; 464(1): 135-44
10. Ahmed D, Ud-Din AI, Wahid SU et al. Emergence of bla<sub>TEM</sub> type extended-spectrum β-Lactamase producing *Salmonella* spp. in the urban area of Bangladesh. ISRN Microbiol. 2014 2014: 715310. doi: 10.1155/2014/715310.
11. Plym F, Wierup M. Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. Rev Sci Tech. 2006; 25(2): 541-54.
12. Lu Z, Mitchell RM, Smith RL et al. Invasion and transmission of *Salmonella* kentucky in an adult dairy herd using approximate Bayesian computation. BMC Vet Res. 2013. doi:10.1186/1746-6148-9-245.
13. Stevens MP, Humphrey TJ, Maskell DJ. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009; 364(1530): 2709-23. doi: 10.1098/rstb.2009.0094.
14. Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И. и др. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. Справочник. М.: Колос. 2004: 520 с.
15. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. и др. Оценка иммунного статуса человека при массовых обследованиях. Метод. рекомендации. Иммунология. 1992; 6: 51-62.

## ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ КОНЪЮГАТОВ ОХРАТОКСИНА А

Дюсенова Г.Т.

Казахский НИИ переработки сельскохозяйственной продукции, Астана

Охратоксины – это группа токсичных метаболитов, которые продуцируются некоторыми видами микроскопических грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Охратоксин А – самый опасный из них, считается, в первую очередь, нефротоксином [1, 2]. Существующие методы определения охратоксина А имеют низкие специфичность и чувствительность. Для преодоления этих проблем разрабатывают специфические антитела.

При этом получение специфических иммуноглобулинов к охратоксину остается трудновыполнимой задачей, поскольку при использовании его в качестве антигена в чистом виде он не вызывает иммунного ответа [3, 4]. В связи с этим целью работы было

приготовление конъюгированных препаратов ОА с высокомолекулярными носителями. В качестве высокомолекулярных белков-носителей использовали гемоциан моллюска (ГМ) (Sigma), овальбумин (ОВА) с молекулярной массой 45 кД (Sigma). Для конъюгации использовали ochratoxin A (Sigma) (ОА). Синтез конъюгатов проводили по методике, описанной F.S. Chu et al. Были получены конъюгаты охратоксина А с белковыми носителями: ОА-ГМ и ОА-ОВА.

Трех мышей линии Balb/c иммунизировали препаратом коммерческого конъюгата ОА-БСА (Sigma) путем серии внутрибрюшинных инъекций.

Спустя 4 сут после последней инъекции отбирали кровь и тестировали сыворотку в непрямом вариан-

те иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого лунки полистироловых планшет сенсibilизировали препаратами синтезированных конъюгатов (ОА-ГМ и ОА-ОвА) в концентрации 1 мкг/мл в ФСР рН 7,5 и, в качестве контроля, чистых носителей (ОА-ГМ и ОА-ОвА) в концентрации 10 мкг/мл в ФСР рН 7,5. Сыворотку крови вносили в разведениях на ФСР с 0,05% Твина-20. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин (ТМБ). Результаты ИФА учитывались с помощью спектрофотометра при  $\lambda$  450 нм (таблица).

Результаты тестирования сыворотки крови мышей иммунизированных конъюгатом ОА-БСА в ИФА

Номер животного	ОА-ГМ	ГМ	ОА-ОвА	ОвА
1 мышь	1:6400	РО	1:6400	1:200
2 мышь	1:6400	1:100	1:12800	1:100
3 мышь	1:6400	РО	1:12800	1:200
Контроль	РО	РО	РО	РО

Примечание: РО – реакция отрицательная

Результаты иммуноферментного анализа показывают, что синтезированные препараты конъюгатов ОА-ГМ и ОА-ОвА специфически связываются с антителами. Конъюгат ОА-ГМ связывается с антителами

до разведения 1:6400, конъюгат ОА-ОвА – до 1:12800. При этом контроль ГМ дает практически отрицательный результат, контроль ОвА имеет некоторый фон: 1:100-1:200, что объясняется, вероятно, родством гаптенных носителей, на которые вырабатываются антитела.

Исходя из результатов, можно сделать вывод, что использованные методы позволяют получать конъюгаты с достаточным количеством молекул гаптена на поверхности носителей, позволяющие проводить детекцию специфических исходному гаптену антител в иммунной сыворотке.

#### Список литературы

1. Krogh P, Hald B, Pedersen EJ. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 1973; 81: 689-95.
2. Mislivec PB. Mycotoxin production by conidial fungi, In: GT Cole & B Kendrick (ed.). Biology of conidial fungi. Acad Press, Inc., NY. 1981: 37-74.
3. Oryacheva IYu, De Saeger S, Lobeau M et al. Approach for ochratoxin A fast screening in spices using clean-up tandem immunoassay columns with confirmation by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS. Anal Chim Acta. 2006; 577(1): 38-45.
4. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Микотоксины как источник получения аналитических иммунореагентов. Усп. мед. микол. 2003; 1: 124-7.

## ОБОСНОВАНИЕ ПДК ТОКСИКАНТОВ ТЕХНОГЕННОГО И ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ СОЧЕТАННОМ ОТРАВЛЕНИИ ЖИВОТНЫХ

*Егоров В.И., Папуниди Э.К.*

*ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань*

**Актуальность исследования.** На современном этапе развития человечества экотоксиканты различного происхождения, как загрязнители окружающей среды, из виртуальной категории превратились в реальную опасность для всего человечества [7].

Глобальное загрязнение окружающей среды, несоблюдение ветеринарно-санитарных и гигиенических условий содержания животных и кормления, активное применение лекарственных средств, наличие стресс-факторов и использование интенсивных технологий часто приводят к снижению реактивности организма животных. Влияние различных антропогенных факторов вызывает глубокие изменения и проявление определенных системных патологий. В такой ситуации организм животного оказывается неспособным к адекватному ответу, что особенно актуально в условиях современного животноводства [6].

Продуктивность и состояние здоровья сельскохозяйственных животных во многом зависят от качества скармливаемых растительных кормов. Из ряда факторов, влияющих на качество и сохранность зерна, зерновых продуктов и грубых кормов, существенная роль принадлежит микроскопическим,

токсикообразующим, плесневым грибам. Так как плесневые грибы, по сравнению с бактериями и дрожжами, имеют способность развиваться при более низких температурах и влажности, склонны к аэробизму и продуцированию микотоксинов, как правило, устойчивых к воздействию высоких температур [2]. Попадая с продуктами питания в организм человека и животных, микотоксины проявляют мутагенный, канцерогенный, иммунодепрессантный эффекты, вызывают аллергии, поражения печени и почек, органов воспроизводительной системы и др. Снижая титры антител, они повышают восприимчивость к заболеваниям [1].

Усиление токсического воздействия кормов загрязненных микотоксинами нередко происходит на фоне одновременной их контаминации с соединениями антропогенного происхождения – синтетическими пиретроидами и тяжелыми металлами [4].

Большинство тяжелых металлов – биологически активные соединения, вследствие чего, попадая в результате антропогенной деятельности в природные среды, они начинают мигрировать, включаясь в той или иной степени в биологический круговорот [5].

Особую опасность для животных и людей представляет циркуляция пестицидов по пищевым цепям с накоплением остатков в кормах для животных и продуктах питания растительного и животного происхождения [8]. К сожалению, на сегодняшний день не установлены максимально допустимые уровни большинства пестицидов в продуктах питания животного происхождения, так как «Санитарные правила и нормативы» не регламентируют содержание их остатков в продуктах питания [3].

**Цель исследования.** Изучение механизма сочетанного воздействия на животных токсикантов техногенного и природного происхождения, а также распределения остаточных количеств токсических веществ в органах и тканях.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводились на трех группах телят по 3 животных в каждой. Контрольная группа телят получала обычный корм, вторая – вместе с кормом децис (синтетический пиретроид), Т-2 токсин (микотоксин) и кадмий на уровне существующих ПДК, третья группа – на уровне ПДК с учетом коэффициента запаса.

Для экспериментальных исследований использовали децис, содержащий 98,2% активного действующего вещества – дельтаметрина и кристаллический Т-2 токсин, не отличающийся от существующих стандартов. Кадмий задавали в виде соли – кадмия хлорида. В качестве продуцентов микотоксина использованы грибы *Fusarium sporotrichiella* штамм 2м-15. Токсиканты вводились вместе с кормом в течение месяца.

Гематологические исследования проводили с помощью гематологического анализатора «Mythic 18». Биохимические показатели в сыворотке крови животных определяли с помощью биохимического анализатора «Microlab 300». При проведении патоморфологических исследований органов и тканей телят препараты были окрашены гематоксилином Эрлиха, водным эозином, визуализированы в проходящем свете. Индикация дециса в органах и тканях подопытных телят проводилась методом ГЖХ на хроматографе «Dimension-1». Количество Т-2 токсина определяли методом ТСХ и биоавтографии, согласно методическим указаниям. Биоавтографическое проявление хроматограммы осуществлялось с использованием тест – культуры *Candida pseudotropicalis*, штамм 44 пк, с подтверждением результатов с помощью хроматомасс-спектрометрического анализа на приборе «Хитачи – 80м». Индикация кадмия проводилась атомно-абсорбционным методом на ААС Perkin Elmer Analyst 200.

**Результаты исследования.** В ходе эксперимента у телят, получавших совместно с кормом токсиканты на уровне существующих ПДК, наблюдалось угнетение, взъерошенность шёрстного покрова, снижение аппетита, диарея, эрозии и некрозы кожи губ и слизистых оболочек ротовой полости. Отмечалось снижение количества эритроцитов, лейкоцитов и содержания гемоглобина, увеличение активности аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы. Клиническое состояние, гематологические и биохимические показатели телят, получавших совместно с кормом токсиканты на уровне разработанных нами ПДК, от биологического контроля существенно не отличались.

В ходе патоморфологических исследований выявлено, что сочетанное действие в течение месяца кадмия, дециса и Т-2 токсина в дозах существующих ПДК приводит к развитию белковой дистрофии печени с очаговыми некробиозами гепатоцитов. На отдельных участках гепатоциты безъядерные. Диффузно определяется зернистость цитоплазмы паренхиматозных клеток печени. Кроме того, замечено, что Купферовские клетки набухают, деформируются, численность их выше, чем у контрольного животного. В головном мозгу развивается нерезко выраженный отек глии, набухание стенок сосудов, периваскулярный отек. Нарушается проницаемость сосудов головного мозга с формированием единичных экстрavasатов. Некоторые нейроны набухшие, деформированные, ядра в них либо увеличены и смещены, либо полностью отсутствуют, на некоторых нейронах скапливаются микрофаги. Какие-либо изменения в тонком кишечнике, сычуге, почках, сердце и легких не выявлены. При гистологическом исследовании телят затравленных в течение месяца кадмием, децисом и Т-2 токсином в дозах рекомендованных нами ПДК патоморфологические изменения были менее выражены. Также наблюдалась белковая дистрофия в печени с некробиозами единичных гепатоцитов и реакцией Купферовских клеток. В головном мозге дистрофические изменения и отек были выражены значительно меньше.

При определении остаточных количеств данных токсикантов в органах и тканях телят Т-2 токсина обнаружено не было; кадмий был выявлен в обеих опытных группах, но в количествах соответствующих требованиям нормативной документации.

При определении остаточных количеств дельтаметрина в органах и тканях телят, получавших сочетано микотоксин, пиретроид и кадмий на уровне рекомендуемых ПДК, было обнаружено в почках – 0,0002, мозге – 0,0003, в печени – 0,0017 мкг/кг. В органах и тканях телят, получавших совместно микотоксин, пиретроид и кадмий на уровне существующих ПДК, децис был обнаружен в следующих количествах (мкг/кг): мышцы – следы, легкие – 0,0018, сердце – 0,0017, почки – 0,006, мозг – 0,007, печень – 0,024.

**Выводы.** Установлено, что при сочетанном воздействии дециса, Т-2 токсина и кадмия на уровне рекомендуемых нами ПДК в течение месяца они не оказывают токсического действия на организм телят, что подтверждается результатами клинических, гематологических и биохимических исследований. В мышцах телят, получавших сочетано токсиканты в рекомендуемых нами ПДК, дельтаметрин не обнаружили, что позволяет использовать мясо в пищу.

Таким образом, полученные результаты подтверждают безопасность рекомендуемых нами ПДК дециса, Т-2 токсина и кадмия при сочетанном воздействии на организм животных.

#### Список литературы

1. Антипов В.А. Микотоксикозы – важная проблема животноводства. Ветеринария. 2007; 11: 7-9.
2. Бурдов Г.Н., Арзаматова О.В. Контаминация кормов микроскопическими грибами и их микотоксинами в Удмуртской Республике. Мат. междуна. симп.

- «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний», 28-30 ноября 2005 г. Казань. Часть I. 2005: 63-5.
3. Герунова Л.К. К вопросу о потенциальной опасности синтетических пиретроидов. *Сельское хозяйство Сиб.* 2003; 3: 12-3.
  4. Иванов А.В. Изучение сочетанного воздействия микотоксина, пиретроида и тяжелого металла на организм животных. *Труды ВИЭВ.* 2009; 75: 280-2.
  5. Конюхова В.А., Шарафутдинова Д.Р., Коростелева В.П. Мониторинг тяжелых металлов в кормах Республики Татарстан. Мат. IV Съезда фармакологов и токсикологов России «Актуальные проблемы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации». М. 2013: 330-3.
  6. Майорова Т. Ветеринарно-гигиеническое обоснование применения природных минералов в качестве энтеросорбентов для животных и птицы. *Корма и корм. добавки.* 2008; 9: 63-5.
  7. Шабунин С.В. Экотоксиканты, распространение, профилактика и лечение. *Ветеринария.* 2014; 7: 3-8.
  8. European Commission: Monitoring of pesticide residues in products of plant origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein 2004. Commissions Staff Working Document. 2006. [http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticides\\_index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticides_index_en.htm).

## МИКРОМИЦЕТЫ И МИКОТОКСИНЫ В КОРМОВЫХ СЕЯНЫХ ТРАВАХ

Гагкаяева Т.Ю.<sup>1</sup>, Гаврилова О.П.<sup>1</sup>, Кононенко Г.П.<sup>2</sup>, Буркин А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ВНИИ защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Москва

В последние годы в литературе все чаще стали появляться сообщения о множественной контаминации микотоксинами травяных кормов [1, 2]. Эта проблема имеет важное хозяйственное значение, поскольку во многих странах доля площадей под посевами кормовых растений составляет значительную часть сельскохозяйственных угодий. Для оценки вклада отдельных этапов заготовки корма в его загрязненность необходимо иметь представление о количественном и качественном составе микобиоты и особенностях микотоксикологической нагрузки в растениях, возникающей к моменту скашивания. К сожалению, такие сведения пока весьма немногочисленны [1, 3].

**Цель работы** – изучение характера контаминации микроскопическими грибами и микотоксинами травостоев злаковых и бобовых культур на полях с многоукосным использованием. Отбор материала проводили в конце мая – начале июня 2014 г. перед укосом растений в стадии выхода в трубку и начала бутонизации на засеянных в 2007–2013 гг. полях животноводческих хозяйств, находящихся в пяти районах Ленинградской области. Травостои были смесевыми и состояли из злаков (тимофеевка, овсяница+фестулолиум) – I тип, из клевера и злаков (ежа сборная, тимофеевка, райграс) – II тип, а также из люцерны и тимофеевки (III тип), встречались и сорные растения – одуванчик, лютик, ромашка, бодяк, горец, фиалка. Пробы отбирали на нескольких площадках 30×30 см, срезаая надземную часть растений на расстоянии 2–3 см от поверхности почвы.

Для микологического анализа к 10 г измельченного образца добавляли 90 мл стерильной дистиллированной воды, встряхивали на качалке (30 мин, 120 об/мин), стерильно фильтровали, и из полученной суспензии готовили серию разведений для посева в чашки Петри на картофельно-сахарозную агаризованную среду с тритоном X-100. Через 8–10 сут культивирования при 23 °С определяли таксономическую принадлежность микромицетов и подсчитывали

количество колониеобразующих единиц (КОЕ) для представителей каждого таксона. Пробоподготовку и определение микотоксинов – альтернариола (АОЛ), циклопиазоновой кислоты (ЦПК), эмодаина (ЭМО), охратоксина А (ОА), стеригматоцистина (СТЕ), микофеноловой кислоты (МФК), цитринина (ЦИТ), афлатоксина В1 (АВ1), РR-токсина (РR), Т-2 токсина (Т-2), диацетоксисцирпенола (ДАС), дезоксиниваленола (ДОН), зеараленона (ЗЕН), фумонизинола (ФУМ), эргоалкалоидов (ЭА), роридина А (РоА), с помощью аттестованных тест-систем для иммуноферментного анализа проводили как описано в работе [4].

Микологические исследования показали, что в травах перед укосом формируется особая микобиота, состоящая из представителей нескольких таксонов (табл.). В образцах всех типов травостоев среди микромицетов доминировал род *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *Cladosporium* spp.), ему несколько уступали грибы родов *Phoma* и *Alternaria* (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *Alternaria* spp.) и далее следовали *Fusarium* и *Aureobasidium* (*A. pullulans*). Грибы *Fusarium* были выявлены в 13 образцах из 29 анализированных. Всего идентифицировано 9 видов, из которых *F. avenaceum*, *F. anguioides*, *F. sporotrichioides* и *F. tricinctum* встречались во всех травостоях, *F. semitectum* и *F. culmorum* не находили в люцерне, а *F. equiseti*, *F. proliferatum* и *F. poae* были обнаружены только в травосмесях с клевером и в малых количествах 33, 67 и 83 КОЕ/г.

Таким образом, разнообразие видового состава и интенсивность контаминации грибами *Fusarium* (суммарная численность 4667 КОЕ/г) в клеверо-злаковых травостоях были выше, чем найденные для посева I и III типов с меньшим числом видов и количествами 766 и 650 КОЕ/г. Во всех травах преобладали близкородственные виды *F. avenaceum* и *F. anguioides*, несколько реже встречался *F. sporotrichioides*. Суммарная их численность в травостоях с клевером (3934 КОЕ/г) также была значительно выше, чем в злаках (667 КОЕ/г) и травосмесях с люцерной (550 КОЕ/г).

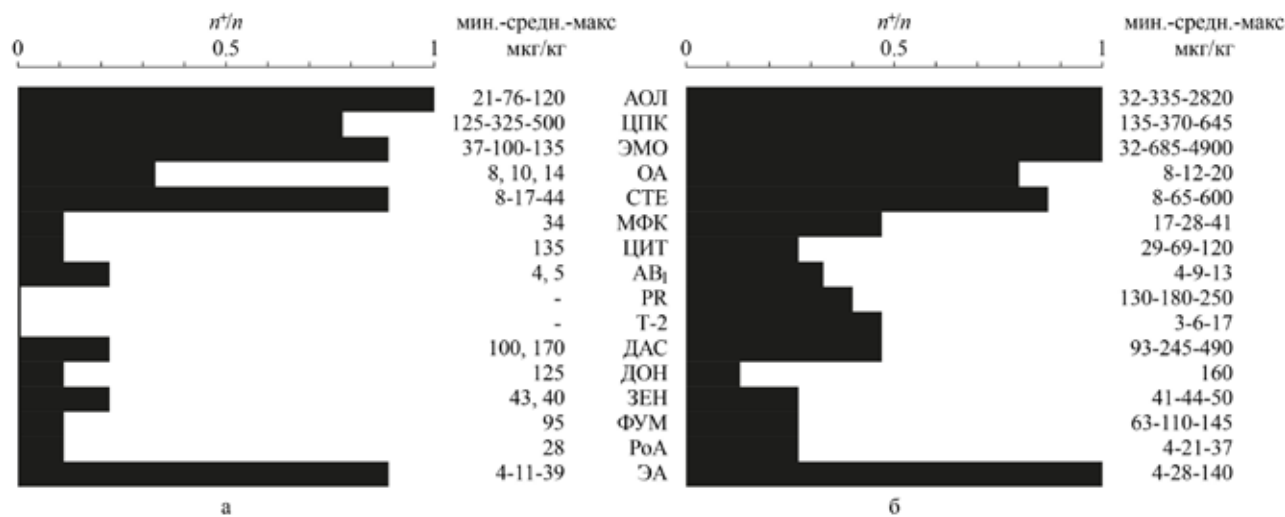
Таблица. Состав микобиоты в разных типах травостоев.

Таксон	тип I (n = 9)		тип II (n = 15)		тип III (n = 5)	
	n <sup>+</sup>	КОЕ/г	n <sup>+</sup>	КОЕ/г	n <sup>+</sup>	КОЕ/г
<i>Cladosporium</i> spp.	8	25689	13	15067	5	18820
<i>Phoma</i> spp.	8	7022	13	7147	5	8480
<i>Alternaria</i> spp.	6	6800	13	3533	4	7360
<i>Fusarium</i> spp.	2	444	9	1600	2	720
<i>Aureobasidium</i> sp.	4	756	3	240	1	160
<i>Penicillium</i> spp.	4	222	1	53	1	80
<i>Acremonium</i> spp.	2	489	5	1413	0	0
<i>Scopulariopsis</i> sp.	0	0	1	53	1	160
<i>Trichoderma viride</i>	1	44	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> spp.	1	44	0	0	0	0
<i>Gliocladium</i> spp.	0	0	1	160	0	0
Mucoraceae	2	444	0	0	0	0

Встречаемость грибов рода *Penicillium* (*P. brevicompactum*, *P. roqueforti*, *Penicillium* spp.) была еще ниже и с меньшей численностью. Остальные таксоны грибов обнаруживали только в злаках (тип I) – *Trichoderma viride*, *Aspergillus* spp., грибы из семейства Mucoraceae в травосмесях с клевером (тип II) – *Gliocladium* spp., в травостоях I и II типов (III spp.) или II и III (*Scopulariopsis* sp.). Во всех травах были обнаружены грибы *Mycelia sterilia*, не образующие спор, в количествах 200, 4907 и 960 КОЕ/г, а также неидентифицированные грибы с численностью, соответственно, 133, 560 и 880 КОЕ/г. Суммарная интен-

сивность контаминации травостоев микромицетами была сопоставимой – 43287, 34733 и 37620 КОЕ/г.

Характер контаминации микотоксинами травостоев I и II типов представлен на рис. В травосмесях с люцерной (III тип) всегда содержались АОЛ (80–250 мкг/кг), ЦПК (200–365 мкг/кг), ЭМО (75–390 мкг/кг) и ЭА (5–12 мкг/кг), в 4-х образцах – МФК (17–41 мкг/кг) и СТЕ (16–200 мкг/кг), в 3-х – Т-2 (3–5 мкг/кг), ДАС (160–250 мкг/кг), ЗЕН (33–50 мкг/кг), ОА (9–12 мкг/кг), в 2-х – ДОН (130, 135 мкг/кг), ЦИТ (63, 125 мкг/кг), АВ1 (3, 4 мкг/кг), в единичных пробах – PR (180 мкг/кг) и РоА (48 мкг/кг), а ФУМ не был обнаружен.



Встречаемость и содержание микотоксинов в травостоях I типа (а) и II типа (б)

В целом, сочетанный характер контаминации трав микотоксинами соответствовал таксономическому многообразию их микобиоты. Во всех травах к моменту укоса АОЛ, ЦПК, ЭМО, ЭА встречались практически повсеместно, а СТЕ лишь немного уступал им по частоте обнаружения. Тем не менее все остальные микотоксины встречались в клеверо-злаковых травостоях гораздо чаще, чем в злаках, и это смещение было особенно отчетливым для ОА, ЦИТ, МФК и для

фузариотоксинов (ДАС и ФУМ). PR и Т-2, найденные почти в половине анализированных проб, в злаках отсутствовали, как и ФУМ в травосмесях с люцерной. Все травостои имели сходство по одинаково низким содержаниям ОА, МФК, ЗЕН, АВ1 и РоА, количеству ЦПК, ЦИТ, ДОН, ДАС, а также СТЕ и ЭА (поскольку крайние значения 600 и 140 мкг/кг были найдены только в единичных пробах злаков), но травосмеси с клевером отличались большей микотоксино-

гической нагрузкой – кроме повышенной частоты встречаемости многих микотоксинов они содержали АОЛ и ЭМО в значительно больших концентрациях. Травостои III типа по количеству АОЛ и ЭМО были сходны со злаками.

Характер контаминации микотоксинами кормовых трав при укосном использовании может быть связан с особенностями состава микобиоты, существующей на определенных видах растений. Большее накопление фузариотоксинов в травосмесях с клевером вполне согласуется с более выраженной контаминацией их грибами *Fusarium*, а ФУМ – с присутствием *F. proliferatum*. Однако объяснить факт большего накопления АОЛ в травостоях с клевером при меньшей интенсивности колонизации их грибами *Alternaria* можно лишь на основе предположения о неоднородности видового состава этих грибов, участвующих в поражении злаковых и бобовых культур. Тем не менее следует иметь в виду, что при обсуждении состава микобиоты и комплекса микотоксинов в растениях какие-либо сопоставления могут быть только ориентировочными, поскольку характер возникновения этих ситуаций к моменту обследования неодинаков – накопительный для микотоксинов и конкурентный для микромицетов. Изменчивость состава микобиоты в процессе вегетации растений, которая затрагивает и токсинообразующие виды, не дает оснований для каких-либо однозначных суждений.

В обзорной литературе к микотоксинам, которые образуются в растениях в поле, до сих пор принято относить только трихотецены, зеараленон, фумо-

низины, афлатоксины и эргоалкалоиды [2]. Наши результаты показывают, что эта группа гораздо шире и содержит все 16 анализированных микотоксинов, хотя с неодинаковой частотой встречаемости и в разных, в том числе в крайне низких, содержаниях. Причины, которые способствуют формированию множественной контаминации трав микотоксинами в условиях отрастания остаются пока неясными, но они, безусловно связаны с колонизацией растений грибами из числа возможных продуцентов.

*Авторы выражают признательность сотрудникам компании ООО «Биотроф+» за организацию отбора образцов растительного материала. Исследование частично финансировано за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-16-00114).*

#### Список литературы

1. Mansfield M.A., Jones A.D., Kuldau G.A. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology*. 2008; 98(3): 330-6.
2. Driehuis F. Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. *Agric Food Sci*. 2013; 22: 16-34.
3. Skladanka J et al. How do grass species, seasons and ensiling influence mycotoxin content in forage? *Int J Environ Res. Public Health*. 2013; 10: 6084-95.
4. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Толпышева Т.Ю. Иммуноферментный анализ вторичных метаболитов микромицетов в составе лишайниковых веществ. *Прикл. биохим. микробиол.* 2012; 48(1): 81-7.

## УТОЧНЕНИЕ МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ГРИБОВ *FUSARIUM EQUISETI*, *F. HETEROSPORUM* И *F. INCARNATUM*

Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П.  
ВНИИ защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург

Установление таксономического статуса, основанное на комплексном методическом подходе значительно повышает надежность определения видовой принадлежности грибов [1]. Размытость морфологических характеристик *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. incarnatum* (Desm.) Sacc. (= *F. semitectum* Berk. & Ravenel), *F. heterosporum* Nees & T. Nees, длительный период образования типичных морфологических структур, высокое сходство экологических требований значительно затрудняют идентификацию этих видов классическими микологическими методами [2, 3]. При выращивании на питательных средах штаммы этих видов образуют характерный желто-охряный пигмент, что создаёт дополнительные сложности при установлении их таксономического статуса.

Показано существование нескольких видов грибов морфологически сходных с *F. equiseti* и *F. incarnatum*, которые в настоящее время объединены в комплекс филогенетически близких видов «*incarnatum-equiseti*» [4]. Виды широко распространены, встречаются на многих растениях различных ботанических групп, но обычно их рассматривают как вторичные патогены,

поскольку выделяют, в основном, из растений уже колонизированных другими микроорганизмами.

Кроме того, эти грибы являются возбудителями оппортунистических микозов, кератозов и онихомикозов [5]. Гриб *F. heterosporum* выявляется на различных культурных и дикорастущих растениях, а также этот гриб трофически связан со склероциями видов *Claviceps* и *Sclerotinia*. Сведения о способности этих видов образовывать токсичные вторичные метаболиты весьма противоречивы.

Цель исследований – уточнение таксономического статуса штаммов *Fusarium*, характеризующихся образованием желто-охряного пигмента, по морфологическим признакам и их способности продуцировать трихотеценовые микотоксины (диацетоксисцирпенол (ДАС), дезоксиниваленол (ДОН), Т-2 токсин) и зеараленон (ЗЕН).

Охарактеризовали морфологические свойства 44 штаммов *Fusarium*, выделенных из различных растений, имеющих широкое географическое происхождение. Все анализированные штаммы грибов являются моноспоровыми культурами и хранятся в

коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР. Описание макроморфологических характеристик штаммов – обильности и цвета воздушного мицелия, наличия пигмента проводили после 7 суток культивирования грибов на картофельно-сахарозной среде (КСА) при 23 °С в темноте. Выявление микроморфологических признаков штаммов проводили в тех же условиях, но на среде с низким содержанием углеводов SNA [3]. Способность к образованию микотоксинов определяли через 7 сут выращивания штаммов на 1 мл КСА. Экстракцию проводили 1 мл водного раствора ацетонитрила (вода: ацетонитрил — 1: 6). Определение содержания микотоксинов выполняли с помощью коммерческих тест-систем для непосредственного иммуноферментного анализа (Россия), которые обеспечивали нижний предел определения ДОН и ДАС – 10 нг/мл, Т-2 токсина и ЗЕН – 4 нг/мл.

На основании суммы морфологических признаков исследованные культуры грибов отнесены к видам *F. equiseti* – 14, *F. heterosporum* – 4 и *F. incarnatum* – 26 штаммов.

*F. equiseti* (Corda) Sacc., 1886 (телеомор. *Gibberella intricans* Wollenw., 1930). Изоляты *F. equiseti* происхождением из Воронежской, Иркутской, Кировской, Ленинградской, Московской, Саратовской областей, Адыгеи, Северной Осетии, Приморского края, Казахстана выделены из семян пшеницы, овса, ячменя, ежи сборной, листьев картофеля и моркови, листьев и плодов томата, репки лука, корней ячменя.

Культуры средние и быстро растущие, воздушный мицелий бархатистый, воздушно-бархатистый, рыхлый, хлопьевидно-охряно-коричневых, желто-коричневых оттенков. Пигментация реверса – охряно-коричневых, темно-коричневых оттенков, часто неровная, с темными пятнами. Типичные микроконидии в воздушном мицелии не образуются, часто присутствуют недоразвитые конидии разнообразной формы с 0–3 перегородками. Конидиеносцы с вытянутыми клетками, вначале неразветвленные, позже густо ветвящиеся, несущие монофиалидные конидиогенные клетки.

Макроконидии образуются в спородохиях и пионнотах, веретеновидно-серповидные, дорсивентральные, с наибольшим диаметром в верхней части, эллиптически изогнутые, серповидные, с 3–4 перегородками. Апикальные клетки изогнутые, удлиненные, постепенно и равномерно суженные, конические. Базальные клетки прямые или слегка изогнутые, с ярко выраженной ножкой. Хламидоспоры в гифах образуются быстро, интеркалярные, в цепочках и кластерах, охряно-коричневые, с грубой бурой оболочкой. Быстрое и обильное образование хламидоспор, характерное для многих культур, затрудняет выявление особенностей конидиогенеза, позволяющих достоверно установить видовой статус.

Анализ микотоксинов, образуемых 14 культурами грибов *F. equiseti* показал, что только один штамм продуцировал Т-2 токсин в следовых количествах. Других трихотеценовых микотоксинов штаммы *F. equiseti* не образовывали. ЗЕН выявлен у всех анализируемых штаммов в диапазоне 50–39810 нг/мл.

*F. heterosporum* Nees & T. Nees, 1818 = устар. *F. graminum* Corda, 1837 (телеомор. *Gibberella gordonii*

C. Booth, 1971). Изоляты из Северной Осетии, Голландии, Южной Америки выделены из спорыньи ковра, соцветия свинороя пальчатого, семян свёклы и гречихи.

Культуры средне-быстрорастущие, воздушный мицелий бархатисто-пушистый, часто в центре более высокий, беловатый, бледно-персиковый, иногда бледно-розового оттенка. Реверс светлый, светло-песочный, кремовый, с возрастом в центре могут появляться розово-красноватые оттенки. Микроконидии не образуются. В воздушном мицелии часто образуются конидии разнообразной формы с 0–3 перегородками. Конидиеносцы разветвленные, густо ветвящиеся, несущие короткие монофиалидные конидиогенные клетки. В свежих культурах спородохии обильные, ярко оранжевые, образуются по всей поверхности культуры, часто отражаются на реверсе, как оранжево-бурые пятна. Макроконидии, образуемые в спородохиях, выровненные, веретеновидно-серповидные, эллиптические, слегка дорсивентрально изогнутые, в большинстве с 3–5 перегородками. Апикальные клетки конические, вытянутые. Базальные клетки прямые с отчетливой ножкой. Хламидоспоры в гифах образуются редко. С возрастом культуры характерно прекращение спороношения, что создаёт трудности при определении видовой принадлежности штамма.

Анализ микотоксинов выявил, что ни один из исследованных штаммов не продуцировал анализируемых метаболитов.

*F. incarnatum* (Desm.) Sacc., 1886 = *F. semitectum* Berk. & Ravenel, 1875.

Изоляты *F. incarnatum* происхождением из Бурятии, Дагестана, Амурской и Ленинградской областей, Приморского и Краснодарского краёв, Северной Осетии и Молдовы выделены из семян овсяницы, пшеницы, риса, сои, сорго, ячменя, плодов перца болгарского, стручков редьки, стеблей сои и бодяка, корней рапса и подсолнечника, листьев яблони.

Культуры быстрорастущие, воздушный мицелий обильный, плотно-пушистый, светло-желтый, бело-охряный, песочный. Реверс равномерно-песочный, кремовый, желто-охряный, с возрастом темнеющий до охряного. Конидиогенные клетки фиалиды, бластические, имеющие от 2 до 5 локусов, симподиально расположенные на гифе. Макроконидии эллиптически изогнутые со слегка вытянутой конической апикальной клеткой с 3–5 перегородками. Мезоконидии веретеновидные, к обоим концам постепенно суженные, с крайними клетками от конической до клиновидной формы, прямые или слегка согнутые, без ножки или с сосочком в основании, имеющие 1–5 перегородки.

Обильное конидиообразование бластического типа придаёт культуре порошистый вид. В воздушном мицелии встречаются разнообразные недоразвитые конидии с 0–3 перегородками. Хламидоспоры образуются с различной обильностью в зависимости от штамма, интеркалярные, одиночные, в цепочках или кластерах, коричнево-охряные. Некоторые культуры теряют способность к образованию типичного спороношения после культивирования на аксеничной питательной среде. Анализ микотоксинов, продуцируемых 26 культурами *F. incarnatum*, выявил, что из них 7,4% штаммов образовывали Т-2 токсин в низких

количествах (12–20 нг/мл), 29,6% штаммов – ДАС (110–2500 нг/мл), и ни один штамм не образовывал ДОН. Микотоксин ЗЕН выявлен у всех штаммов этого вида в количествах 130–181970 нг/мл.

В результате исследований показан характерный для видов *F. equiseti* и *F. heterosporum* потенциал токсинообразования. В тоже время, для выяснения таксономической однородности штаммов *F. incarnatum* необходимы дальнейшие исследования.

*Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории микотоксикологии сектора методов физико-химических исследований ВНИИВСГЭ (г. Москва) к.м.н. Буркину А.А. и д.б.н. Кононенко Г.П. за помощь в проведении исследований.*

*Исследование частично финансировано грантом Российского научного фонда (проект № 14-26-00067).*

### Список литературы

1. Гагкаева Т.Ю. Классификация грибов рода *Fusarium* – дискуссия длиной в двести лет. Микология сегодня. Дьяков Ю.Т., Сергеев А.Ю. (ред.). 2011; 2: 14-29.
2. Booth C. The genus *Fusarium*. Commonwealth. Mycol Inst Kew, UK. 1971.
3. Gerlach W, Nirenberg Hl. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Mitt Biol Bundesanst Land-Forstw. Berlin – Dahlem. 1982.
4. O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MGet all. Novel Multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum* – *F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. J Clin Microbiol. 2009; 47(12): 3851-61.
5. Diepeningen AD van, Al-Hatmi AMS, Brankovics B, de Hoog GS. Taxonomy and clinical spectra of *Fusarium* species: where do we stand in 2014? Curr Clin Micr Rept. 2014; 1: 10-18.

## АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВА ГРИБОВ-ХИТРИДИОМИЦЕТОВ В РУБЦЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

*Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Филиппова В.А., Никонов И.Н.  
ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург*

Рубец крупного рогатого скота является первым отделом преджелудков, в котором под действием микроорганизмов-симбионтов происходят биохимические превращения питательных веществ кормов в метаболиты, используемые в обменных процессах организма животного (Hungate, 1966). В настоящее время широко известно, что анаэробные грибы также являются одними из наиболее значимых групп микроорганизмов рубца (Trinci et al., 1994; Orpin et al., 1997) – главными инициаторами колонизации бактериями лигноцеллюлозных материалов в рубце (Vauchor, 1979; Akin et al., 1990).

По сообщениям многих авторов, анаэробные хитридиомицеты проявляют лигноцеллюлазную, целлюлазную, ксиланазную, амилазную и различные полисахаразные активности, а также обладают протеазами (Williams, Orpin, 1987; Paul et al., 2003). Все это облегчает грибку мицелию быстрое проникновение внутрь растительных компонентов кормов и быструю колонизацию на них (Williams, Orpin, 1987; Fonty, Joblin, 1990).

Тем не менее, определение количества биомассы анаэробной микофлоры классическими методами микробиологии наталкивается на трудности методического характера. Дело в том, что грибной мицелий глубоко проникает в растительные субстраты, поэтому даже *in vitro* проанализировать количество биомассы практически невозможно. По мнению Орпина (Orpin, 1981), *in vivo* микофлора может составлять до 8% общей биомассы, однако отсутствие достоверных прямых методов количественной оценки биомассы анаэробных грибов в рубце жвачных не позволяет сегодня определить ее истинную долю.

В связи с этим актуальным является поиск современных подходов к анализу их содержания в рубце.

В 2014 г. впервые в России для анализа количества грибов-хитридиомицетов класса *Neocallimastigales* рубца КРС был использован современный молекулярно-генетический метод – ПЦР в реальном времени. Для выявления количества данных грибов был проведен их сравнительный анализ в рубце 18 коров черно-пестрой породы из животноводческих хозяйств России с разным составом рациона, различной продуктивности и состояния здоровья.

Результаты ПЦР в реальном времени показали, что количество грибов класса *Neocallimastigales* составляло от  $1,3 \times 10^5$  до  $2,9 \times 10^7$  экв. ген./мл (эквивалентов геномов в миллилитре) рубцового содержимого исследованных животных.

При сравнительном анализе количества грибов-хитридиомицетов с различными типами кормления (концентратном, малоконцентратном и объемистом) обнаружена достоверная отрицательная связь их содержания с долей концентрированных кормов и положительная – с количеством грубых кормов рациона. Следует отметить, что ранее исследователями установлено, что при повышенном количестве концентратов в рационе за счет увеличения содержания молочной кислоты вследствие деятельности амилитических бактерий и последующего снижения кислотности в рубце может наблюдаться нарушение бактериального состава микофлоры рубца КРС, при котором происходит резкое уменьшение содержания чувствительных к рН среды целлюлозолитических и лактат-утилизирующих бактерий (Лаптев, 2010; Nocek, 1997; Fernando et al., 2010).



По мнению авторов, подобные изменения в экосистеме рубца приводят к развитию в рубце патогенных бактерий рода *Fusobacterium* и нарушению состояния здоровья, вследствие чего происходит снижение продуктивности и выбраковка животных из стада. Кроме того, известно, что грибы-хитридиомицеты, как и многие целлюлозолитические бактерии рубца, чувствительны к снижению рН среды (Hungate, 1966).

Сравнение количества хитридиомицетов у животных с различным состоянием здоровья показало, что их наибольший уровень наблюдался в рубце здоровых коров ( $1,2-2,9 \times 10^7$  экв. ген./мл), а наименьший – в рубце коров пред- и послеотельного периода ( $1,15 - 1,4 \times 10^6$  экв. ген./мл) и с различными заболеваниями, в том числе с маститом, диареей, копытной гнилью ( $2 - 4 \times 10^6$  экв. ген./мл) и выбракованных коров ( $1,3 - 1,6 \times 10^5$  экв. ген./мл). Помимо этого, был выявлен факт наибольшего содержания хитридиомицетов в рубце у животных с наиболее высоким уровнем среднесуточной молочной продуктивности.

Таким образом, результаты исследований дают возможность предположить, что снижение удоев и выбраковка животных, вероятно, произошли в результате нарушения микробного сообщества рубца.

Приведенные нами данные использования метода ПЦР в реальном времени для анализа количества хитридиомицетов класса Neocallimastigales в рубце показали его перспективу для выявления статистически значимых различий, связанных с кормлением, возрастом, уровнем продуктивности, состоянием здоровья и физиологическим статусом КРС. Помимо этого, по результатам исследования грибы-хитридиомицеты можно отнести к симбиотическим микроорганизмам рубца – индикаторам здоровья, по содержанию которых можно судить о нарушениях обмена веществ в организме животного, что указывает на возможность направленной коррекции микробиологического сообщества рубца для повышения продуктивного потенциала и улучшения здоровья КРС.

### Список литературы

1. Hungate RE. The Rumen and its Microbes. Acad Press, New York. 1966.
2. Trinci APJ, Davies DR, Gull K et al. Anaerobic fungi in herbivorous animals. J Mycol Res. 1994; 98: 129-52.
3. Orpin CG, Joblin KN. The rumen microbial ecosystem, 2nd edn. Chapman & Hall, New York, NY. 1997: 140-95.
4. Bauchop T. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. J Appl Environ Microbiol. 1979; 38: 148-58.
5. Akin DE, Ames GN, Hartly RD et al. Microspectrometry of phenolic compounds in Bermuda grass cell walls in relation to microbial digestion. Crop Sci. 1990; 30: 396.
6. Williams AG., Orpin C.G. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative stages of the rumen fungi *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate grown on a variety of carbohydrates. Can J Bot. 1987; 33: 427-34.
7. Paul SS, Kamra DN, Sastry VRB et al. Effect of phenolic monomers on growth and hydrolytic enzyme activities of an anaerobic fungus isolated from wild nilgai (*Boselaphus tragocamelus*). Lett Appl Microbiol. 2003; 36: 377-81.
8. Fonty G, Joblin KN. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In: Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants (Ed. T Tsuda, Y Sasaki & R Kawashima). Academic Press, Toronto, ON. 1990: 665-80.
9. Orpin C.G. Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. J Gen Microbiol. 1981; 123: 287-96.
10. Лаптев Г.Ю. Исследование бактериального сообщества рубца с помощью метода T-RFLP. Молочн. мясн. скотов. 2010; 3: 16-8.
11. Nocek JE. Bovine acidosis: implications on laminitis. J Dairy Sci. 1997; 80: 1005-28.
12. Fernando SC, Purvis HT, Najar FZ et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. Appl Envir Microbiol. 2010; 76: 7482-90.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ МИКОТОКСИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

*Иванов А.А., Папуниди К.Х., Самсонов А.И., Плотникова А.М., Семёнов Э.И., Тремасов М.Я., Матросова Л.Е.*

*ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань*

Вопросы этического, разумного и экономного использования животных в современных биологических исследованиях привлекают все большее внимание специалистов и общественности. На сегодня они вполне решаемы, поскольку существуют достаточные возможности не только для сведения количества подопытных животных к минимуму, но и к полной или частичной их замене. На практике подобное можно осуществить благодаря широкому внедрению в эксперимент альтернативных биологических моделей, в том числе культуральных.

Культуры клеток занимают все более заметное и важное место в токсикологических, фармакологиче-

ских и других исследованиях. При этом сфера применения расширяется, а техника культивирования *in vitro* совершенствуется и автоматизируется. Использование культуральных тестов является свидетельством высокого уровня эксперимента в любой сфере как фундаментальных, так и прикладных народно-хозяйственных отраслях [1].

Между тем, дороговизна общепринятых химических методов анализа микотоксинов и изучения их токсических свойств на животных вынуждает к поиску и разработке новых более чувствительных и быстрых тестов. Биологические методы в этом плане перспективны и, несмотря на неспецифичность при

идентификации микотоксинов, позволяют выявлять их присутствие в исследуемом субстрате [2, 3, 4 и др.].

В ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» накоплен определённый опыт с 1963 г [5] по использованию клеточных культур для определения токсичности микотоксинов.

**Цель исследований** – использование клеточных культур (КК) как альтернативы традиционной методике определения токсичности микотоксинов.

**Материалы и методы.** Используемые клеточные линии:

1. MDBK – линия клеток почки бычка, полученная S. Madin и N. Darby 1957 г. [6].
2. MDCK – линия клеток почки взрослой самки кокер-спаниеля, полученная Madin S., Darby N. в 1958 г. [6].
3. СПЭВ – линия клеток почки эмбриона свиньи, полученная К.С. Куликовой в 1959 г. [7].
4. ППТЭО – линия клеток почки эмбриона овцы, полученная Хаертыновым С.Х. и др. в 1988 г. [10].

**Хранение и культивирование культур.** Перевиваемые культуры клеток хранят в жидком азоте при  $t = 196^\circ\text{C}$ . перед использованием клетки размораживают и культивировали при  $t = 37^\circ\text{C}$  до нормализации ростовых свойств.

Культивирование проводят в стандартных условиях монослойно при температуре  $37^\circ\text{C}$  на основе питательных сред Игла-МЕМ и 199, 0,5%-ного раствора гидролизата лактоальбумина (ГЛА), сывороток крови бычьей и плодов коров (табл. 1).

Табл. Составы культуральных питательных сред

Компоненты среды, %	Клеточные линии			
	СПЭВ	MDBK	MDCK	ППЭО
0,5%-ый раствор ГЛА	40	-		0
Среда Игла - МЕМ	40	80		-
Среда 199	10	10		10
Сыворотка крови бычьей	10	10		-
Сыворотка крови плодов				10

Антибиотики стрептомицин, пенициллин и канамицин вносят в дозе 100 ЕД/мл, 3%-ный раствор глутамина – по 2,5 мл на 1,5 л готовой среды. Клеточные линии поддерживают путем периодического пассирования в культуральных матрасах объемом 200 – 250 мл. Пересев проводят по мере формирования монослоя, как правило, через 4–5 сут культивирования. Клетки снимали бесцентрифужным способом с использованием смеси растворов версена и трипсина в соотношении 1: 3.

**Определение цитотоксического эффекта.** Цитотоксический эффект исследуемых микотоксинов на перевиваемые КК определяют по пролиферативной активности. Для этого клеточную суспензию разливают в пенициллиновые флаконы по 2 мл в каждый. Спиртовой раствор микотоксина вносят в количестве 10 мкл. В качестве контроля во флаконы с клеточной

суспензией вносят в таком же соотношении 96%-ный этиловый спирт. Затем флаконы с культурой выдерживали в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 96 ч, после чего клетки диспергировали смесью растворов версена и трипсина в количестве 0,2 мл на флакон и выдерживают в термостате 15–20 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Для прекращения действия трипсина и версена во флаконы вносили готовую питательную среду с сывороткой крови бычьей в количестве 1 мл на пенициллиновый флакон.

Подсчет посеянных и выросших клеток осуществляют в камере Горяева, учитывая только те, что расположены в границах камеры, очерченных сеткой (225 больших квадратов). Для определения жизнеспособности клеток к 1 мл пробы суспензии добавляют 1 мл 0,5%-ного водного раствора трипанового синего. При этом живые клетки остаются бесцветными, а мертвые окрашиваются в синий цвет.

Проведённые в ФГУ ФЦТРБ-ВНИВИ исследования ([7] и др.) показали, что при определении цитотоксичности микотоксинов для перевиваемых культур клеток животных с помощью стандартных показателей ИЦ (по Дьяконову Л.П., 2000) и ЦТИ (по [8]) получаются противоречивые и трудно сопоставимые результаты. Кроме того, у обоих этих методов расчета имелись определенные недостатки. ИЦ необходимо рассчитывать и для контроля, и лишь затем сравнивать полученные результаты.

Данный индекс не определяется при 100%-ной гибели клеток в контроле. При расчете ЦТИ невозможно точно определить процент погибших клеток, так как при этом они открепляются от монослоя, попадая в среду инкубации, которая сливается из флаконов перед обработкой клеток смесью растворов трипсина и версена. Кроме того, значение данного индекса только при наличии скрытого повреждения в культуре не имело сильного разброса результатов (оно колебалось в данном опыте от  $-0,01$  до  $-0,15$ ), тогда как при 50- и 100%-ной гибели клеток различия были значительными. Например, при 50% гибели они колебались от  $-0,88$  до  $-6,28$ , а при отсутствии неповрежденных клеток в культуре от  $-59,61$  до  $-237,1$ .

Коэффициент жизнеспособности клеток в культуре (КЖ) также нельзя рассматривать самостоятельно, отдельно от индекса пролиферации (ИПТ). Например, в контроле КЖ равен  $99,08 \pm 0,43$ , при индексе пролиферации  $4,03 \pm 0,05$ , а при обработке токсином в дозе  $2,08 \times 10^9$  М КЖ был равен  $96,33 \pm 1,22$ , тогда как ИП –  $2,09 \pm 0,12$ .

В связи с вышеизложенным мы провели поиск нового показателя, оптимально отражающего токсические эффекты на клетки *in vitro* и, на основании полученных результатов, предлагаем цитотоксичность рассчитывать через отношение живых клеток, оставшихся после экспозиции с препаратом, к числу живых клеток в контроле по формуле:

$$\text{ЦИ} = A/B$$

где: ЦИ – цитотоксический индекс;

A – число живых клеток, после экспонирования с токсином,

B – число живых клеток в контроле.

По показателю цитотоксического индекса определяется степень цитотоксичности микотоксина.

**Список литературы**

1. Червонская Г.П. Культура клеток как биологическая модель в токсикологических исследованиях. Тез. докл. 1 съезда токсикологов России. М.: 1998: 328.
2. Watson D. A critical review of biological methods for the detection of fungal toxins in foods and foodstuffs. *Science of Food and Agriculture*. 1982; 33: 59-67.
3. Buckle A. An appraisal of bioassay methods for the detection of mycotoxins a review. *Lett Appl Microbiol*. 1990; 10(4): 155-60.
4. Babich H. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *Appl Environ Microbiol*. 1991; 1: 2101-3.
5. Абдуллин Х.Х. Определение токсичности грибов на культурах тканей. Материалы докладов всесоюзной научной конференции посвященной 90-летию Казанского ветеринарного института. 1963: 58-9.
6. Madin SH, Darby NB, Jr. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1958; 98: 574-6.
7. Куликова К.С. Тез. докл. 2 научн. конф. МНИИВП, М. 1960: 57.
8. Тертичная М.В. Использование клеточных культур при изучении действия Т-2 токсина. Автореф. дис. ... к. б. н. 2005: 19 с.
9. Червонская Г.П. Цитотоксическое действие химических веществ, содержащихся в виде примесей в некоторых медицинских иммунобиологических препаратах. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол*. 1988; 12: 85-90.
10. Хаертынов С.Х. и др. Инф. бюл. ассоциации клеточных культур. 1997.

---

**ПОКАЗАТЕЛИ ГОМЕОСТАЗА ОВЕЦ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ Т-2 ТОКСИНА В МАЛЫХ ДОЗАХ****Кадиков И.Р.***ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань*

**Актуальность проблемы.** Из природных экотоксикантов широко распространенным считается Т-2 токсин – метаболит грибов *Fusarium*. Интоксикация данным ксенобиотиком влечет за собой патофизиологические и гемато-биохимические изменения, которые наряду с другими системами непосредственно затрагивают иммунную систему, повреждая отдельные звенья клеточного и гуморального иммунитета, приводя к снижению адаптивности и способствуя развитию иммунодепрессивного состояния [1, 2].

Микотоксин характеризуется широким распространением в Европе, включая Россию и близлежащие территории, и обладает исключительно высокой токсичностью. Т-2 токсин вызывает значительные потери от снижения роста и развития животных, а так же ухудшения конверсии корма [3].

**Цель исследования** – изучение воздействия Т-2 токсина на клинико-гематологические, биохимические, иммунобиологические показатели, а также на гистоструктуру органов при длительном поступлении его в организм овец.

**Материалы и методы.** Опыты проводились на овцах, которые были разделены на 2 группы по 3 животных в каждой. Первая группа получала обычный рацион, вторая микотоксин в дозе 200 мкг/кг массы корма. Исследования проводили в течение 60 сут. В ходе затравки проводили клинико-гематологические исследования, включающие определение массы тела, содержания эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов.

Количество общего белка сыворотки крови исследовали на рефрактометре ИРФ-22, белковых фракции сыворотки крови методом Олла и Маккарда в модификации С.А. Карпюка (1962). Активность ферментов, содержание углеводов, продуктов белкового и липидного обменов определяли на биохимическом анализаторе Microlab 300.

Продукты перекисного окисления липидов определяли по работе [4] в модификации В.А. Гурьяновой и Е.И. Трошина (1997). Фагоцитарную активность нейтрофилов в периферической крови определяли по методике [5], а активность лизоцима в сыворотке крови устанавливали нефелометрическим методом [6].

Уровень Т- лимфоцитов в периферической крови устанавливали методом спонтанного розеткообразования с гетерогенными эритроцитами (Е-РОК). Идентификацию В-клеток проводили методом ЕАС - розеток по Г. Фримелю [7].

Для гистологических исследований от убитых животных брали кусочки печени, почек, селезенки и мозга. Заливку материала в парафин осуществляли по схеме Волковой–Елецкова (1996). Окраску гистопрепаратов проводили гематоксилин–эозином по Ганзену.

**Результаты исследований.** В группе животных, получавших токсин клинические признаки появились к 40 сут в виде уменьшения потребления корма. К 60 сут эксперимента масса тела была ниже исходного уровня на 2,7 кг. Температура тела оставалась в норме. Содержание эритроцитов и лейкоцитов снижалось к концу опыта на 20 и 12% соответственно.

Биохимические исследования показали, что во второй группе содержание общего белка снижалось на 60 сут на 11%,  $\beta$ -глобулины повысились на 40 и 60 сут на 28 и 28%. Отмечалось увеличение концентрации печеночных ферментов. Так, концентрация АСТ увеличивалась на 40 и 60 сут в 1,6 и 2,1 раза. Максимальное повышение концентрации АЛТ прослеживалось на 20 день исследования – в 1,5 раза, в дальнейшем происходило понижение данного фермента. Содержание глюкозы понижалось на 20 и 40 сут – на 11 и 68% соответственно.

Концентрация ЛДГ и мочевины увеличивалась в данные сроки исследования в 2,6, 1,4, 1,4 и 1,3, 1,7,

2,1 раза соответственно. Увеличивалось содержание количества общего билирубина и холестерина – 21, 29, 35% и 26, 26, 34% от исходных значений.

Содержание МДА в крови подопытных животных увеличивалось в среднем в 1,4–1,7 раза от фона.

При исследовании показателей естественной резистентности у животных 2-й группы наблюдалось снижение фагоцитарной емкости на 40 и 60 сут на 10 и 10%, Т-лимфоцитов на 11 и 10%, В-лимфоцитов на 5 и 6%.

Гистологическое исследование животных, затравленных Т-2 токсином показало, что на фоне сниженного кровенаполнения внутренних органов в головном мозге было отмечено оседание клеток микроглии на некоторых нейронах, внутриклеточный отёк имел умеренную выраженность. В сердце обнаруживались мелкочаговые скопления круглых клеток и единичных гистиоцитов в соединительной ткани, клетки проводящей системы были увеличены из-за внутреннего отека. В печени также обнаружены межлочечковые слабо выраженные скопления лимфоцитов. В почках явления десквамации были выражены неравномерно, до полного слущивания клеток эпителия извитых канальцев на некоторых участках.

**Заключение.** Таким образом, при длительном поступлении Т-2 токсина в организм овец в количестве

200 мкг/ кг корма, отмечаются внешние признаки отравления, изменения гематологических, биохимических, иммунологических показателей крови и выявляются гистологические изменения внутренних органов.

#### Список литературы

1. Иванов А.В. Микотоксины (в пищевой цепи): монография. М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2012: 136 с.
2. Трёмасов М.Я. Профилактика микотоксикозов животных в России. Ветеринария. 2002; 9: 3-8.
3. Фисинин В.И. Микотоксины и антиоксиданты: непримиримая борьба (Т-2 токсин – метаболизм и токсичность). Птица и птицепродукты. 2012; 3: 38-41.
4. Гончаренко М.С. Метод оценки перекисного окисления липидов. Лаб. дело. 1985; 1: 60-61.
5. Кост С.А., Стенко М.И. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов. Клиническая гематология. 1974; 99-100.
6. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом. Лаб. дело. 1968; 1: 28-30.
7. Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина. 1987: 472 с.

## О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ГИСТОМОРФОЛОГИИ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ С КОРМОМ ЗЕАРАЛЕНОНА

*Каранетян А.Ф.*

*Ереванский государственный университет, факультет биологии, Армения*

**Актуальность исследования.** Среди возбудителей болезней растений значительная часть относится к грибам, многие из которых образуют токсины, загрязняя ими продукты урожая. Микотоксикоз зерна, овощей, картофеля, фруктов и другой сельскохозяйственной продукции представляет большую угрозу здоровью человека и животных. Прямые потери урожая только зерновых могут достигать 50%, а собранный урожай может оказаться совершенно непригоден для человека и животных из-за содержания микотоксинов [1, 2].

Микотоксины обладают высокой термостойкостью и поэтому попадают в продукты питания. Микотоксины обладают канцерогенным, мутагенным действием, подавляют иммунитет организма, поражают почки, печень, нервную и кровеносную системы, желудочно-кишечный тракт, вызывают заболевания крови, септическую ангину, дерматиты, судороги, острые боли, состояние тяжелого опьянения, нарушают гормональное равновесие и функции воспроизводства [1, 3, 4].

Зеараленон (токсин Ф2) является одним из основных продуктов микробиологического загрязнения зерна. Его токсическое действие наступает уже при низких концентрациях, поэтому количественное определение зеараленона является важной задачей

пищевого и ветеринарного контроля. Наиболее важный эффект, который вызывает зеараленон – это эстрогенный и действует он прежде всего на репродуктивную систему [3, 4, 5].

**Цель работы** – гистологическими методами изучить морфофункциональные особенности семенников крыс в условиях поступления с кормом зеараленона.

**Материал и методы.** Материалом для нашей работы послужили семенники крыс весом 150–200 г, которые ежедневно получали с кормом зеараленон в дозе 0,0064 мг. Подопытные животные были разделены на группы, которые отличались между собой по продолжительности опыта. Животные 1-й группы ежедневно получали загрязненный микотоксином корм в течение 15 дней, животные второй группы – в течение 30 сут, а животные 3-й группы – в течение двух месяцев. Контролем служили семенники крыс, содержащихся в одинаковых условиях с подопытными, но получавшими незагрязненный корм.

По завершении опыта животные взвешивались и забивались декапитацией в условиях глубокого обезболивания. Образцы семенника фиксировались в жидкостях Буена и Карнуа, подвергались общей гистологической обработке и заливались в парафин. Серийные парафиновые срезы окрашивались гематокси-

лином и эозином, раствором Гимзы и Май-Грюнвальда по Паппенгейму. На срезах семенников определяли количество разных клеток сперматогенного ряда на стандартной площади среза.

**Результаты и обсуждение.** Гистоморфологическое изучение семенников крыс, получавших зеараленон в течение 60 сут, позволило выявить ряд изменений, несущих деструктивный и патологический характер.

Начиная с 15 сут поступления в организм микотоксина, в семенниках подопытных крыс проявились дегенеративные изменения, которые наиболее были выражены через 30 сут после начала опыта. В большинстве семенных канальцев высота сперматогенного

эпителия по сравнению с контролем была понижена, что свидетельствовало о понижении активности сперматогенеза. О состоянии пониженной активности органа в этот срок опыта свидетельствовали также отсутствие зрелых сперматозоидов и наличие большого количества отечных очагов в основной части семенных канальцев. В них в основном встречались сперматиды.

В этот срок опыта в семенных канальцах отчетливо выделялись клетки Сертоли, являющиеся следствием нарушения хода сперматогенеза и разрозненно расположенных клеток сперматогенного эпителия и приводящее к истощению и гипоплазии семенников (рис. 1).

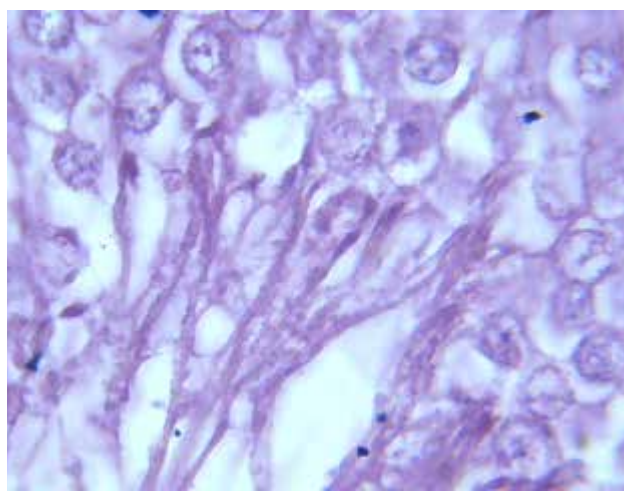


Рис. 1 Клетки Сертоли в семеннике крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1000х.

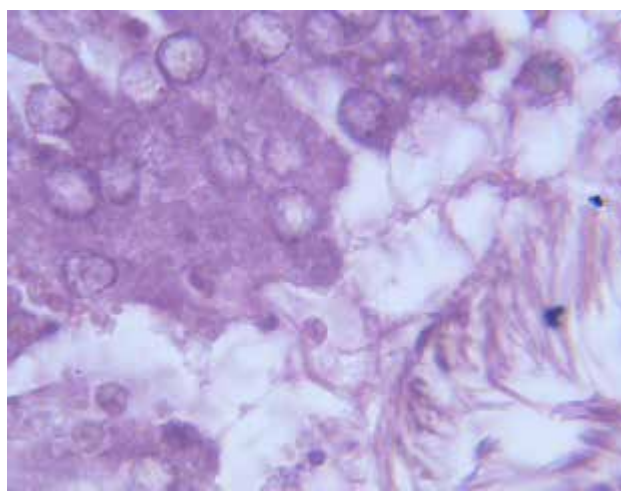
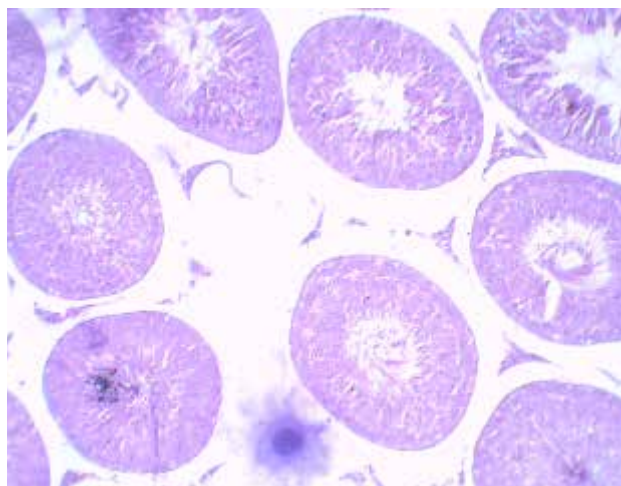


Рис. 2 Семенник крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1000х.

Рис. 3 Реактивные изменения в интерстициальной ткани семенника крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400х.



Вышеописанные изменения наблюдались в семенниках крыс также в последний срок наших наблюдений – через 2 мес после начала поступления в организм зеараленона. В этот срок опыта в семенниках выявлялись реактивные изменения, которые проявлялись в увеличении соединительнотканых элементов и накоплении жидкости в интерстициальной ткани органа.

Обобщая полученные в работе данные, можно заключить о том, что что поступление с кормом зеараленона в течение двух месяцев вызывает деструктивные и дегенеративные изменения в семенниках крыс, явно преобладающие над защитными и компенсаторно-приспособительными.

#### Список литературы

1. Alwakeel SS. The effect of mycotoxins found in some herbal plants on biochemical parameters in blood of female albino mice. *Pak J Biol Sci.* 2009; 12(8): 637-42.
2. Obremski K, Gajecka M, Zielonka et al. Morphology and ultrastructure of small intestine mucosa in gilts with zearalenone mycotoxicosis. *Pol J Vet Sci.* 2005; 8(4): 301-7.
3. Tiemann U, Dänicke S. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit Contam.* 2007; 24(3): 306-14.
4. Wang DF, Zhang NY et al. Interaction of zearalenone and soybean isoflavone in diets on the growth performance, organ development and serum parameters in prepubertal gilts. *Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2012; 96(5): 939-46.
5. Yamini B, Bursian SJ, Aulerich RJ. Pathological effects of dietary zearalenone and/or tamoxifen on female mink reproductive organs. *Vet Hum Toxicol.* 1997; 39(2): 74-8.

## СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА СВИНЕЙ ПРИ ИНВАЗИИ *BALANTIDIUM COLI*

Карнеева Е.А., Ильина Н.А.

Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова

С нарастающим неблагополучием экологической ситуации в России наблюдаются патологические изменения микрофлоры пищеварительного тракта макроорганизмов [1, 2]. Наиболее активно микроорганизмы заселяют желудочно-кишечный тракт ввиду обилия и разнообразия в нем питательных веществ [5]. Характер взаимоотношений этих микроорганизмов с хозяином может быть различным и в первую очередь зависит от особенностей его рациона [3, 4].

Контроль состояния микрофлоры у сельскохозяйственных животных позволит своевременно корректировать нежелательные изменения аутохтонной части нормальной микрофлоры, исправить нарушения за счет искусственного введения полезных бактериальных представителей: бифидобактерий или лактобактерий и т. д., и не допустить развития дисбактериоза. Такой контроль осуществим, если провести микробиологические, микологические исследования видового состава и количественных соотношений, в первую очередь в аутохтонной строго анаэробной микрофлоре кишечника свиней [6, 7].

**Цель работы** – изучение изменения качественного состава и количественного учета микроорганизмов при инвазии *Balantidium coli* в весенне-осенний периоды.

Проведена серия научно-хозяйственных и лабораторных экспериментов с использованием 60 свиней крупной белой породы, подобранных по принципу аналогов, составляющих группы опытных и контрольных животных. Материалом для исследования служили фекалии свиней крупной белой породы. Для изучения состава микрофлоры кишечника свиней использовали стандартные методы микробиологических исследований: микроскопический и микологический.

Анализ результатов изучения микрофлоры кишечника обследованных свиней в весенний период показал, что у инвазированных животных происходит снижение *Bifidobacterium* spp. до уровня  $lg 7,7 \pm 0,2$  КОЕ/г. Кроме того, отмечено снижение содержания *Lactobacillus* spp. до значения  $lg 7,4 \pm 0,5$  КОЕ/г ( $8,9 \pm 0,6$  КОЕ/г в контроле), *Bacteroides* spp. до уровня  $lg 8,0 \pm 0,5$  КОЕ/г ( $10,1 \pm 0,3$  КОЕ/г в контроле)

Наряду с этим, значительных изменений в содержании кишечных палочек не происходит. Показатель их количества в микропейзаже кишечника составил  $lg 7,1 \pm 0,3$  КОЕ/г. Однако выявлялись и кишечные палочки с гемолитическими свойствами ( $lg 2,0 \pm 0,5$  КОЕ/г).

Анализ условно-патогенной микрофлоры показал, что плотность колонизации данными микроорганизмами представлена весьма высокими концентрациями. У инвазированных свиней отмечено значительное увеличение содержания таких условно-патогенных микроорганизмов как *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., грибы *Candida* spp. и *Ш* spp. Так, доминирующее положение среди перечисленных микроорганизмов занимали *Klebsiella* spp., составив

самую многочисленную группу по плотности колонизации. Показатель их содержания превышал таковой у неинвазированных свиней практически в 2 раза ( $lg 6,4 \pm 0,3$  КОЕ/г ( $lg 3,3 \pm 0,5$  КОЕ/г).

Второе место занимали по плотности колонизации *Staphylococcus* spp. Уровень содержания этих микроорганизмов составил  $lg 5,7 \pm 0,3$  КОЕ/г. Высокими концентрациями представлено вегетирование *Proteus* spp., *Clostridium* spp. ( $lg 5,3 \pm 0,4$  КОЕ/г и  $lg 5,5 \pm 0,2$  КОЕ/г.). Достаточно высокая обсемененность была установлена для грибов рода *Candida* spp. –  $lg 6,6 \pm 0,3$  КОЕ/г.

Следует отметить, что анализ результатов изучения микрофлоры кишечника инвазированных свиней в осенний период показал, что уровень содержания представителей облигатной флоры варьировал от  $lg 8,5 \pm 0,2$  КОЕ/г и  $lg 8,1 \pm 0,9$  КОЕ/г для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. соответственно, до  $lg 8,4 \pm 0,2$  КОЕ/г для *Ш* spp.

Содержание *Esherichia* spp. значительно снижалось в у инвазированных свиней ( $lg 5,9 \pm 0,8$  КОЕ/г), по сравнению с контролем ( $lg 7,3 \pm 0,3$  КОЕ/г). Также в микробиоценозе кишечника персистировали гемолизирующие кишечные палочки. Средняя плотность их колонизации составила  $lg 3,2 \pm 0,6$  КОЕ/г.

Спектр высеваемых условно-патогенных микроорганизмов у инвазированных животных в значительной мере превышал таковые показатели контрольной группы. В наибольшем количестве обнаруживали *Enterococcus* spp. –  $lg 8,2 \pm 0,2$  КОЕ/г и *Staphylococcus* spp. –  $lg 6,2 \pm 0,1$  КОЕ/г.

Менее всего отмечалось увеличение уровня содержания *Candida* spp. Показатель количества данных микроорганизмов у инвазированных свиней в осенний период составил  $lg 4,5 \pm 0,1$  КОЕ/г. Отмечено, что средняя плотность колонизации *Klebsiella* spp. и *Proteus* spp. заметно выше у инвазированных свиней в осенний период, чем в у неинвазированных ( $lg 5,8 \pm 0,3$  КОЕ/г и  $lg 4,9 \pm 0,4$  КОЕ/г соответственно).

Следует также отметить, что частота вегетирования *Clostridium* spp. в микробиоценозе кишечника у неинвазированных свиней практически не отличалась от инвазированных свиней, составив  $lg 6,5 \pm 0,7$  КОЕ/г.

Таким образом, у инвазированных свиней в весенний и осенний периоды также отмечены дисбиотические сдвиги в составе микрофлоры кишечника, проявившиеся снижением уровня содержания облигатной нормофлоры и увеличением количества микроорганизмов условно-патогенной группы, что необходимо учитывать в общем мониторинге микрофлоры сельскохозяйственных животных.

### Список литературы

1. Зотов О.Г., Хуснатдинова Е.А. Основы лабораторной диагностики микозов: практические рекомендации по курсу «Микология», «Микробиология с основами микологии». УлГПУ им. И.Н. Ульянова, Ульяновск, 2013. 18 с.

- Карпеева Е.А., Ильина Н.А. Зотов О.Г. Влияние грибов рода *Candida* на микрофлору кишечника свиней. В сб. мат. конф. «48-Евсевьевские чтения», 2012: 25-9.
- Карпеева Е.А., Ильина Н.А. Экологическая оценка микробиоценоза кишечника свиней при инвазии *Balantidium coli*. В сб. научн. тр. по мат. Межд. молодежн. научн. конф.: «Человек, экология, культура: современные практики и проблемы». Саратов. 2014: 111-14.
- Коршунов В.М. Проблема регуляции микрофлоры кишечника. Журн. микробиол. 1995; 3: 48-55.
- Петровская В.Г., Марко О.П. Микрофлора человека в норме и патологии. М.: Медицина. 1976: 221 с.
- Сорокин В.В. Нормальная микрофлора кишечника животных. Кишинев: Штиинца, 1973: 80 с.
- Чахава О.В. Микробиологические и иммунологические основы гнотобиологии. М.: Медицина. 1982:159 с.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГУМАТА ЖЕЛЕЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИКОТОКСИКОЗА

Хусаинов И.Т., Гаврилов С.Г., Валиев А.Р., Канарская З.А., Семёнов Э.И., Папуниди К.Х.  
ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань  
Казанский государственный технологический университет

Гуминовые вещества (ГВ) – природные органические соединения, в больших количествах содержащиеся в почвах, торфах, углях и сланцах. В минеральных почвах на долю ГВ приходится до 80–90% суммарного содержания органических веществ, в торфах – до 50%, в земляных бурых углях – до 60%. ГВ выполняют ряд важнейших функций: принимают участие в геохимической миграции минеральных компонентов, катионов и анионов, в комплексообразовании, окислении и восстановлении элементов, влияют на разнообразные природные процессы с участием органической ее компоненты и т.д. Способность ГВ к образованию как водорастворимых так и водонерастворимых хелатных соединений с ионами и гидроксидами металлов, а также к взаимодействию с минеральными и органическими соединениями может быть использована для создания на их основе природных экотоксикантов и носителей макроэлементов [1, 2].

Хелатные соединения на основе гуминовых веществ применяются в различных областях народного хозяйства, в частности в растениеводстве – как безопасная альтернатива удобрениям с точки зрения окружающей среды и животноводстве – как кормовая добавка [3, 4].

**Цель эксперимента** – определить эффективность химически чистого гумата железа полученного электрохимическим способом при микотоксикозе.

**Материалы и методы.** Для экспериментов использовались самцы нелинейных белых крыс массой тела 180–200 г. Сформировали 4 группы животных по 10 крыс в каждой. 1-й группе животным скармливали вволю естественно контаминированный микотоксином корм, содержащий Т-2 токсин в концентрации 178,3 мкг/кг, НТ-2 токсин в концентрации 23,8 мкг/кг корма. 2-й группе крыс давали этот же корм, и с 5 по 15 сут опыта вводили внутримышечно химически чистый гумат железа полученный электрохимическим способом в дозе 0,1 мл на животное. 3-й группе крыс давали этот же корм, и с 5 по 15 сутки опыта вводили внутримышечно гумат железа в дозе 0,1 мл на животное. Четвертой группе – чистый корм без токсинов (группа биологического контроля). Кормление животных и наблюдение за ними вели в течение 20 сут. Каждые 5 сут проводили взвешивание, в конце опыта

провели отбор крови для гематологических и биохимических исследований, диагностическое вскрытие и определение содержания железа в печени.

**Результаты испытания.** Животные 1-й группы во вторую половину опыта были малоподвижны, плохо поедали корм или отказывались от него, наблюдалась затруднённое дыхание, 4 крысы из 10 погибли, при вскрытии павших животных отмечались: кровоизлияния и катарально-геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, токсическая дистрофия печени, почки бледные, на разрезе корковый и мозговой слой сглажены, селезёнка сморщенная, отек легких и головного мозга.

Оставшиеся животные были угнетены, малоподвижны, наблюдались рвота, диарея, отказ от корма и воды. В крови отмечалось достоверное снижение количества лейкоцитов на 26,8%, эритроцитов на 28,6%, общего белка сыворотки крови на 24,8%, снижение содержания железа в печени на 28,5%, увеличение активности ферментов аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы на 88,2 и 59,8% соответственно, СОЭ в 3,5 раза в сравнении с группой биологического контроля, что свидетельствует о негативном действии микотоксинов на организм животных.

В группе животных, получавших гумат железа внутримышечно, за это же время наблюдали гибель 1 крысы из 10, животные были угнетены, но более активны в сравнении с животными 1-й группы, подвижны, признаки диареи выражены слабо, аппетит сохранен. В крови отмечалось достоверное снижение количества лейкоцитов на 7,0%, эритроцитов – на 3,2%, общего белка сыворотки крови на 18,6%, увеличение содержания железа в печени на 132%, увеличение активности ферментов аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы на 47,3 и 65,9% соответственно (в сравнении с группой контроля), что свидетельствует о негативном действии микотоксинов на организм животных, однако эти изменения были менее выражены в сравнении с показателями группы животных потреблявших токсичный корм.

В группе животных, получавших гумат железа внутримышечно, за это же время наблюдали гибель 1 крысы из 10, животные были угнетены, но более активны в сравнении с животными 1-й группы. В крови

отмечалось достоверное снижение количества лейкоцитов на 18,3%, эритроцитов на 9,5%, общего белка сыворотки крови на 7,2%, увеличение содержания железа в печени на 8,6%, увеличение активности ферментов аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы на 56,2 и 44,3% соответственно, в сравнении с группой биологического контроля, что свидетельствует о негативном действии микотоксинов на организм животных, однако эти изменения были менее выражены в сравнении с показателями группы животных, потреблявших токсичный корм.

**Вывод.** Гумат железа обладает определённым профилактическим и противоанемическим действием при алиментарных микотоксикозах животных. Необходимо продолжение исследований для определения оптимальной схемы и дозы применения.

### Список литературы

1. Бурмистрова Т.И. Исследование свойств торфа для решения экологических проблем. Хим. растит. сырья. 2009; 3: 157-60.
2. Бурмистрова Т.И. Роль микробактериальных сообществ торфа в решении экологических проблем. Вест. ТГПУ 2010; 3(93): 137-41.
3. Топорова Л. Изучение пищевой и биологической ценности мяса при добавлении в корм хелатных соединений микроэлементов. Свиноферма. 2011; 02: 48-9.
4. Инишева Л.И. Метод исследования биологической активности гуминовых кислот торфов и сапропелей. Вестник АГАУ. 2008; 44(6): 29-32.

## КОРМОВАЯ ДОБАВКА МИКОСОРБ В РАЦИОНАХ САМОК И МОЛОДНЯКА НОРОК

Лоенко Н.Н., Чернова И.Е.<sup>1</sup>

НИИ пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева, Родники Московской обл.  
ФГУП «Русский соболь», Зверосовхоз. Московская область

Применение сорбентов в звероводстве способствует снижению токсигенной нагрузки на органы детоксикации и экскреции, улучшению гуморальной среды и иммунного статуса. При нарушении барьерной функции желудочно-кишечного тракта сорбенты тормозят всасывание токсических продуктов из химуса [1].

В кормлении пушных зверей в качестве сорбентов применяют цеолиты и бентонитовые глины, препараты на основе микроорганизмов, их элементов, смешанные и комплексные энтеросорбенты, поскольку они оказывают стимулирующее действие на физиологические и продуктивные показатели животных [2, 3, 4].

**Цель работы** – изучение влияния кормовой добавки Микосорб на сохранность и рост молодняка норок в раннем возрасте.

**Материалы и методы.** Микосорб – натуральный адсорбент микотоксинов, полученный на основе внутренних оболочек инактивированных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Препарат оказывает свое действие в пищеварительном тракте; за счет большой адсорбирующей поверхности он быстро связывает микотоксины (афлатоксин, зеараленон, vomitоксин, охратоксин и целый ряд других), что препятствует проникновению их в кровь, печень и другие органы и ткани организма.

**Результаты и обсуждение.** Опыт проведен на норковой ферме ОАО «Племзавод «Салтыковский». Отобрали 98 благополучно щенившихся молодых самок норок чёрной породы и полученных от них щенков, разделили на 2 группы, выравненные по количеству щенков в помете. Схема опыта: I группа (49 самок и 311 родившихся щенков) – контрольная, II – опытная группа (49 самок и 352 родившихся щенка) дополнительно получала с кормом Микосорб в период лак-

тации. С 01.05 по 19.05.2014 в корм самкам опытной группы добавляли препарат Микосорб в количестве 0,4 г на голову в сутки, с 20.05 по 14.06.2014 самкам и подсосным щенкам – по 0,8 г на помёт.

После окончания опыта проведен учет показателей: сохранность молодняка и выход молодняка на благополучно щенившуюся самку. Для оценки влияния испытуемой добавки на рост молодняка норок в раннем возрасте измерена живая масса щенков в возрасте 43 дней, полученные данные обработаны статистически.

**Результаты применения профилактического курса препарата Микосорб.** В опытной группе за период опыта сохранность молодняка была на 4,6% выше, чем в контрольной (93,7 против 89,1% в контроле). Это обеспечило увеличение выхода молодняка на благополучно щенившуюся самку на 1,08 (11,9%) щенка в опытной группе (6,73±0,1 против 5,65±0,2% щенка,  $p<0,001$ ) по сравнению с контрольной группой. При измерении живой массы щенков в возрасте 43 сут при отсадке от матерей установили, что самцы из опытной группы росли лучше и к этому возрасту имели живую массу больше – на 23,0 г (5,3%), при живой массе 458,4±11,5 г против 435,4±9,4 г в контроле ( $p<0,1$ ). Живая масса самок в обеих группах была практически одинаковой.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения Микосорба в рационах норок в период лактации для профилактики микотоксикозов. Установлено, что введение в корм самок препарата Микосорб повышает сохранность и обеспечивает увеличение выхода молодняка (на благополучно щенившуюся самку) на 1,08 щенка (11,9%), положительно влияет на рост молодняка норок в раннем возрасте.



**Список литературы**

1. Крюков В. Полимикотоксикоз: оценка действия. Комбикорма. 2013; 10: 82-7.
2. Гайнуллина М.К. Использование природных сорбентов для оптимизации кормления молодняка поросят. Уч. зап. КГАВМ им. Н.Э. Баумана. Казань. 2006; 182: 42-9.
3. Валиуллина Д.А., Михайлова Р.И. Комплексный препарат микробонд в кормлении поросят. Уч. зап. КГАВМ им. Н.Э. Баумана. Казань, 2011; 205: 31-6.
4. Кровина Е.В. Эффективность применения пребиотика Био-Мостм при выращивании поросят. Кролиководство и звероводство. 2014; 3: 6-7.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ АФЛАТОКСИКОЗА ПОРОСЯТ РЕТИНОЛА АЦЕТАТОМ****Мухарлямова А.З., Тремасов М.Я.**

ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

Об огромном вреде, который в мировом масштабе приносят токсины – продуценты микроскопических грибов, сообщений довольно много [1]. По оценкам специалистов, примерно четверть зерновых, производимых во всем мире, контаминирована микотоксинами. Возможно, еще немалая часть поражена пока не идентифицированными микотоксинами.

Микотоксины отличаются высокой токсичностью, а многие из них обладают мутагенными, тератогенными, канцерогенными свойствами. Контаминируя продукты животноводства (молоко, мясо, яйца) и растениеводства могут представлять опасность и для здоровья человека [2]. Среди микотоксинов своими токсическими свойствами и широким распространением выделяются афлатоксины. Афлатоксины, продуцируемые грибами *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, являются сильными гепатотоксинами. Увеличение их концентрации приводит к разрушению печени и подавлению роста организма [3].

Канцерогенная активность афлатоксинов отличается от действия других гепатоканцерогенных веществ некоторыми особенностями. Она выражается в возможности развития опухолевого процесса не только при длительном влиянии малых доз токсина, но и при однократном введении большой дозы, в возможности развития опухоли печени часто без предшествующего цирроза, развития на фоне длительно сохраняющейся биллиарной пролиферации гепатоцеллюлярного рака, а не аденокарцином [4]. Случаи острых микотоксикозов при технологичном сельскохозяйственном производстве – явление редкое в современном животноводстве, однако небольшие дозы микотоксинов часто являются причиной низкой продуктивности и повышенной чувствительности животных к инфекционным и незаразным заболеваниям. А при отсутствии специфических средств профилактики и лечения эти вопросы являются важной проблемой для сельскохозяйственных предприятий.

**Материалы и методы.** Проведено изучение профилактической эффективности доступного и дешевого сырья – ретинола ацетата – при моделировании хронического афлатоксикоза на поросятах. Для этого были сформированы группы поросят: первая группа служила биологическим контролем и получала «чистый» корм на протяжении всего опыта; животным второй, третьей и четвертой группы вводили афлатоксин В1 путем включения в корм в дозе 3 ПДК в

течение 25 сут (в период с 30-х по 55 сут.). Вторая группа служила контролем затравки. Поросятам третьей и четвертой группы на протяжении всего опыта в течение 55 сут дополнительно вводили в рацион препарат ретинола ацетата в количестве 6000 и 12000 МЕ в сутки соответственно.

До начала опыта, на 35-, 45- и 55-е сут эксперимента из хвостовых сосудов поросят брали кровь для проведения гематологических и биохимических исследований. Количество эритроцитов, лейкоцитов, содержание общего гемоглобина в периферической крови определяли по общепринятым методикам, содержание общего белка устанавливали рефрактометрически, количественное соотношение белковых фракций – нефелометрически; глюкозу – ортотолуидиновым методом.

**Результаты исследований.** При морфологическом исследовании крови группы поросят, получавших «токсичный корм» на 35-, 45- и 55-е сут опыта содержание эритроцитов уменьшалось на 7,2; 18,4 и 27,6%; лейкоцитов – на 4,9; 15,9 и 22,9%; гемоглобина – на 6,5; 7,9 и 18,2% соответственно относительно группы биологического контроля. В третьей группе поросят наблюдали снижение количества эритроцитов на 35, 45 и 55 сут на 5,9; 13,9 и 21,8%; лейкоцитов – на 0,6; 8,4 и 15,8%; гемоглобина – на 1,9; 5,5 и 12,6% соответственно по сравнению с группой биологического контроля. У животных четвертой группы количество эритроцитов на 35, 45 и 55 сут уменьшалось на 6,3; 13,3 и 20,8%; лейкоцитов – на 1,6; 7,7 и 15,4% по сравнению с группой контроля. Содержание гемоглобина повысилось к 35 сут на 2,6% и на 45- и 55-е сут наблюдали уменьшение данного показателя соответственно на 1,6 и 6,9% от группы биологического контроля.

Для определения эффективности применения ретинола ацетата при афлатоксикозе провели изучение некоторых биохимических показателей крови. В результате исследований во 2-й группе поросят-отъемшей на 35, 45 и 55 сут опыта было отмечено снижение общего белка – на 6,3; 17,9 и 27,7% и альбуминов – на 5,2; 10,5 и 14,9% соответственно относительно биологического контроля. Содержание  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов увеличилось на 35-, 45- и 55-е сут на 2,2; 5,9 и 9,1% и на 4,3; 9,7 и 16,7% соответственно. Концентрация фракции  $\gamma$ -глобулинов уменьшалась на 35, 45 и 55 сут на 0,9; 3 и 5,1% соответственно в сравнении с группой биологического контроля.

В 3-й группе животных на 35-, 45- и 55-е сут наблюдали понижение общего белка относительно контрольной группы на 4,6; 14,4 и 23,2% и альбуминов – на 1,4; 5,4 и 9,5% соответственно. Концентрация  $\alpha$ -глобулинов на 35-, 45- и 55- сут увеличилась на 1,6; 3,3 и 6,2% соответственно. Содержание  $\beta$ -глобулинов на 35 сут понизилось на 3,6% относительно группы контроля; на 45 и 55 сут отмечали повышение данного показателя на 1,7 и 7% соответственно.

Количество фракции  $\gamma$ -глобулинов имело тенденцию к уменьшению, однако было выше аналогичного показателя группы контроля на 35- и 45-е сут на 2,1 и 0,6% соответственно; на 55 сут зарегистрировано понижение данного показателя на 0,9%.

Снижение содержания общего белка и альбуминов было отмечено и в 4-й группе на 35, 45 и 55 сут на 0,9; 9,9 и 18,9% и на 0,3; 2,8 и 6,7% соответственно. Содержание  $\alpha$ -глобулинов повышалось на 35-, 45- и 55-е сут исследований на 1,0; 2,5 и 4,3% относительно контроля. Концентрация  $\beta$ -глобулинов на 35-е сут в данной группе была ниже на 4,6% относительно контроля, на 45 и 55 сут данный показатель повысился на 0,4 и 5,4%. Концентрация  $\gamma$ -глобулинов на 35- и 45-е сут была выше аналогичного показателя группы контроля на 1,5 и 0,3%, на 55 сут наблюдали понижение данного показателя на 0,8%.

Динамика содержания глюкозы показала следующие результаты. Так, если во 2-й группе животных уменьшение содержания глюкозы происходило на 35,

45 и 55 сут на 1,1; 2,7 и 6,2% относительно контрольной группы, то в 3- и 4-й группах наблюдалась обратная тенденция. К 35-м сут уровень глюкозы в данных группах повысился относительно группы контроля – на 2,8 и 4,2% соответственно. На 45- и 55-е сут данный показатель в 3-й группе уменьшился на 0,7 и 2,2%. В 4-й группе к 45 сут содержание глюкозы было выше контрольной группы на 0,4%, на 55-е сут наблюдали понижение данного показателя на 2,0%.

**Заключение.** Как видно из представленных данных, наличие даже незначительного количества афлатоксина в корме снижает интенсивность обменных процессов в организме. Однако дополнительное введение в рацион поросят-отъемышей ретинола ацетата оказало благоприятное влияние на гематологические и биохимические показатели. Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о защитном действии на организм ретинола ацетата при афлатоксикозах.

#### Список литературы

1. Иванов А.В. Микотоксикозы животных (этиология, диагностика, лечение, профилактика). М.: Колос, 2008: 140 с.
2. Тремасов М.Я. Профилактика микотоксикозов животных в России. Ветеринария. 2002; 9: 3-8.
3. Папазян Т.Л. Микотоксины: экономический риск и контроль. М.: ООО «Оллтек». 2010: 65 с.
4. Тутельян В.А. Микотоксины. М.: Медицина. 1985: 320 с.

## ВЗАИМОВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА А И АФЛАТОКСИНА В1

*Мухарлямова А.З.*

*ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань*

Микроскопические грибы поражают, в основном, растительные объекты в процессе их вегетации или хранения. Испорченное зерно при этом зачастую используют на корм скоту. При потреблении таких кормов и продуктов питания у животных и человека возникают отравления – микотоксикозы [1, 2]. Как показывают исследования многих авторов, одним из опасных и часто встречаемых токсикозов является афлатоксикоз [3, 4].

Убедительно показано влияние на биологическую активность афлатоксинов компонентов пищи (белок, углеводы, жиры), а также алиментарных факторов, среди которых следует выделить липотропные вещества, микроэлементы и витамины, а именно, витамин А. Однако данные о влиянии этого витамина на биологическую активность афлатоксинов малочисленны.

**Цель исследования** – изучение взаимовлияния витамина А и афлатоксина В1.

**Материалы и методы.** В условиях вивария «ФЦТРБ-ВНИВИ» были проведены опыты на 24 кроликах породы Шиншилла живой массой 3,5–4 кг, сформированных в 4 группы по 6 в каждой. Условия содержания и кормления животных соответствовали зоогигиеническим нормам.

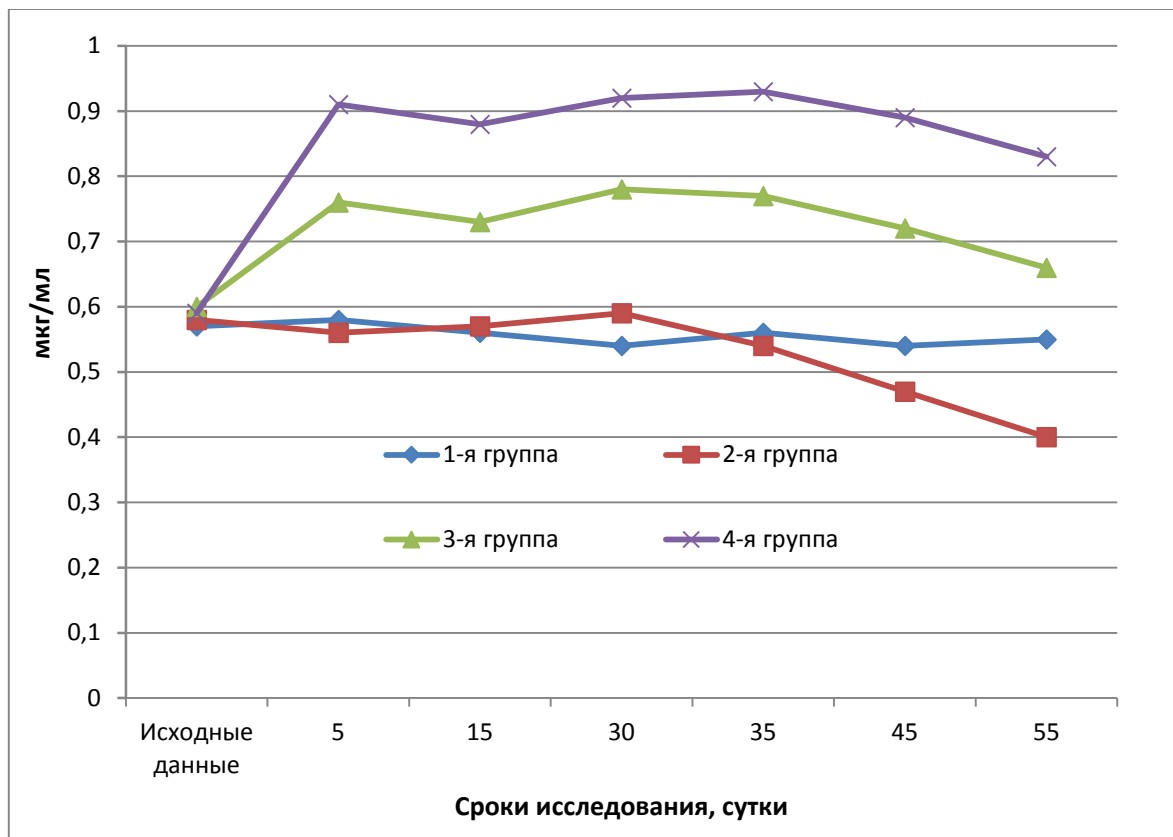
Первая группа служила биологическим контролем и получала «чистый» корм на протяжении всего

опыта. Животные опытных групп получали корм, контаминированный афлатоксином В1 в количестве 3 ПДК в период с 30-х по 55 сут. 2-я группа служила контролем заправки. Кроликам третьей и четвертой группы на протяжении всего опыта в рацион дополнительно вводили препарат ретинола ацетата в количестве 700 и 1500 МЕ в сутки. Учетный период опыта составил 55 дней.

В ходе эксперимента наблюдали за изменениями содержания витамина А в крови и остаточным количеством афлатоксина в печени кроликов. Сыворотку получали из цельной крови, которую брали из краевой вены уха, измерения проводили до начала эксперимента, на 5, 15, 30, 35, 45 и 55 сут, а печень путем декапитации в конце опыта.

Содержание витамина А определяли в крови по методике, описанной К. Hosotani, М. Kitagawa (2003). Детекцию результатов проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1260». Количество афлатоксина В1 в печени определяли на жидкостном хроматографе «WATERS».

**Результаты исследований.** На рисунке представлена динамика изменения содержания витамина А в сыворотке крови кроликов. Так, у животных группы заправки наблюдали незначительные колебания изучаемого показателя в течение первых 30-ти сут, однако



Содержание витамина А в сыворотке крови кроликов

потребление рациона, контаминированного афлатоксином В1 в период с 30-х по 55 сут привело к уменьшению уровня витамина А в сыворотке крови к концу исследований на 31% в сравнении с первоначальными данными и, на 27,3% в сравнении с контрольной группой. В 3- и 4-й группах уровень витамина существенно повысился к 5 сут в 1,27 и 1,54 раза соответственно относительно исходных значений и в 1,31 и 1,57 раза соответственно относительно группы контроля, что связано с тем, что кроликам данных групп в рацион дополнительно вводили ретинола ацетат. Высокий уровень витамина поддерживался в течение первых 30 сут опыта. Однако в период с 30-х по 55-е сут эксперимента, при потреблении животных микотоксина, исследуемый показатель также имел тенденцию к уменьшению, но оставался выше фоновых данных в 1,10 и 1,41 раза соответственно и выше данных группы контроля в 1,20 и 1,51 раза соответственно.

После проведения декапитации животных на 55 сут опыта из каждой группы были взяты пробы печени для определения в них количества афлатоксина В1. При анализе было установлено, что микотоксин обнаружился во всех пробах печени, но наибольшая концентрация отмечалась в группе кроликов, получавших «токсичный корм» и составила в среднем 2,88 мкг/кг, в группах где животные получали совместно с «токсичным кормом» ретинола ацетат в дозе 700

и 1500 МЕ/сут, концентрация афлатоксина В1 была ниже на 3,5 и 12,8% соответственно по сравнению с данными группы затравки.

**Заключение.** Таким образом, в ходе исследования было установлено, что потребление рациона контаминированного афлатоксином приводит к уменьшению количества витамина А в сыворотке крови животных, однако дополнительное введение в рацион ретинола ацетата поддерживает уровень витамина А на более высоком уровне. Результаты эксперимента показывают, что введение в рацион кроликов ретинола ацетата из расчета от 700–1500 МЕ/сут при поступлении малых доз афлатоксина в некоторой степени препятствовало накоплению афлатоксина в печени.

#### Список литературы

1. Фетисов Л.Н. Микотоксины в кормах – одна из проблем современного животноводства в южном федеральном округе. Усп. мед. микол. 2006; 7: 125-7.
2. Тремасов М.Я. Проблема микотоксикозов животных. От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: матер. науч.-практ. конф. Саратов. 2011: 308-10.
3. Тремасов М.Я. Профилактика микотоксикозов животных в России. Ветеринария. 2002; 9: 3-8.
4. Антипов В.А. Микотоксикозы животных и птиц на Кубани. Мат. межд. симпозиума. 2005: 42-7.

## ДИНАМИКА ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* В ЭНТЕРОБИОЦЕНОЗЕ ТЕЛЯТ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИНБИОТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ

Николаева О.Н., Андреева А.В.  
Башкирский ГАУ, Уфа

В условиях ухудшающейся экологической обстановки, интенсификации животноводства, лекарственного прессинга отмечается тенденция к расширению спектра патологических состояний, сопровождающихся нарушением микроэкологического равновесия различных полостей макроорганизма [1].

Микроскопические грибы *Candida* характеризуются широким спектром факторов патогенности и персистенции, с помощью которых они способны адаптироваться к факторам врожденного и адаптивного иммунитета, вызывая развитие заболеваний, в том числе дисбиотического характера [2].

Рядом авторов установлены различные механизмы ингибирования факторов естественной защиты макроорганизма, а также установлена связь выраженности персистенции микроскопических грибов *Candida* со степенью дисбиоза кишечника. При дисбиозе 3–4 степени *Candida* обладают более выраженной антилизоцимной и антикомплемментарной активностью [3, 4].

В современной ветеринарной практике для лечения микозов используются химические препараты разного состава. Однако их применение вызывает развитие побочных эффектов. С учетом мировых тенденций максимального ограничения применения синтетических фармакологических препаратов, восстановление нормобиоза с помощью синбиотиков становится необходимым элементом современного производства животноводческой продукции [5, 6].

**Цель исследований** – изучение динамики грибов рода *Candida* в энтеробиоценозе телят при применении фитопробиотиков на основе лактобактерий и лекарственного растительного сырья.

Проведены опыты на новорожденных телятах черно-пестрой породы, которых по принципу аналогов разделили на 3 группы (контрольная и две опытных). Телята контрольной группы содержались в условиях принятой технологии содержания и кормления; 2-я группа с кормом получала жидкий пробиотик; 3-я группа – фитопробиотик с люцерной посевной и барбарисом обыкновенным по 20 мл в течение 10 дней [7].

До начала опытов, а затем на 10-, 20- и 30-е сут от начала исследований, проводилось взятие фекалий для микробиологических исследований. Грибы *Candida* выделяли на среде Сабуро с полимиксином согласно методических рекомендаций [8]. Посев проводили из разведений  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$ . Через 2 сут инкубации бело-матовые выпуклые колонии отсеивали на крахмальный агар для выявления филаментации, еще через 2 сут проводили просмотр выросших колоний под лупой. Отбирали колонии, которые содержали грамположительные крупные почкующиеся бактерии удлиненной формы. Клетки *Candida* ферментировали с образованием кислоты без газа лактозу, сахарозу, глюкозу, не ферментировали манит, не проявляли гемолитической активности.

Результаты бактериологического исследования фекалий переводили в десятичные логарифмы (lg) и

устанавливали относительное соотношение различных групп микроорганизмов в кишечной популяции.

Статистическую обработку результатов исследования оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Установлено, что до начала опыта количество грибов *Candida* у телят контрольной и опытных групп было на уровне  $4,2 \pm 0,03$  lg КОЕ/г –  $4,35 \pm 0,04$  lg КОЕ/г. На 10-е сут исследований в контроле количество грибов увеличилось на 0,6 lg КОЕ/г, а во 2- и 3-й опытных группах их количество снизилось, соответственно, на 0,3 lg КОЕ/г и 0,65 lg КОЕ/г. На 20-е сут исследований данная тенденция сохранилась.

К 30-м сут опыта максимальное снижение микроскопических грибов *Candida* регистрировалось у телят 3-й группы, получавших синбиотические композиции. Количество грибов было ниже контроля на 2,0 lg КОЕ/г, во 2-й группе – на 0,3 lg КОЕ/г.

Таким образом, установлено, что синбиотические композиции на основе лактобактерий и лекарственного растительного сырья обладают выраженной антимикотической активностью по отношению к грибам *Candida*.

### Список литературы

1. Зинченко Е.В. Практические аспекты применения пробиотиков. Вет. консультант. 2003; 3: 12-4.
2. Капустина О.А., Карташова О.Л., Чайникова И.Н. Факторы персистенции грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов. Пробл. мед. микол. 2010; 12(2): 92.
3. Перунова Н.Б. Характеристика биологических свойств микроорганизмов в бактериально-грибковых ассоциациях кишечника: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2003: 25 с.
4. Свиридов М.А., Долгушин И.И., Карташова О.Л. Оценка персистентных характеристик *Candida albicans*. Мед. наука и образ. Урала. 2008; 4: 104-6.
5. Андреева А.В., Николаева О.Н. Иммунобиологические изменения в организме телят под влиянием композиций фитопробиотиков и полисолей микроэлементов. Достиж. науки и техн. АПК. 2008; 4: 36-9.
6. Андреева А.В., Николаева О.Н., Кадырова Д.В., Алтынбеков О.М. Пробиотики для коррекции энтеробиоценоза телят. Бюлл. Оренбургского научного центра УрО РАН. 2014; 3: 4.
7. Назырова Н.Р. Влияние экстрактов лекарственных растений на биологическую активность штамма *Lactobacterium plantarum* 8P-A3. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2007. 23 с.
8. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника. М. 1986: 13.

## ВИДЫ СЕМЕЙСТВА MUCORACEAE В КОРМАХ

Пирязева Е.А.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Москва

Представители семейства Mucoraceae принимают активное участие в процессах порчи кормов в период хранения, снижая их питательную ценность и санитарное качество. Особый интерес эти микромицеты представляют в связи с наличием у некоторых из них патогенных свойств. При интенсивном развитии, например, видов *Absidia*, возможно возникновение микотических заболеваний животных (мукоморикоз), характеризующихся остро протекающей диареей или пневмонией, при этом в пораженных органах отмечаются язвы, некрозы, геморрагии, а также гранулематозные процессы, сходные с туберкулезом. Кроме того, эти грибы, наряду с другими патогенными микромицетами, могут являться причиной абортос у животных (микотические аборты).

С целью изучения распространенности видов семейства Mucoraceae проведено микологическое исследование 146 проб кормов, в том числе комбикормов – 82, зернофуража – 21, жмыхов и шротов – 18, белково-витаминно-минеральных добавок (БВМД) – 1, премиксов – 2, муки животного происхождения – 11, зернобобовых – 5, отрубей пшеничных – 3, зерноотходов пшеничных – 1, глютена кукурузного – 2.

Микологическое исследование включало первичное выделение грибов, выделение их в чистые культуры и их видовую идентификацию.

Для первичного выделения грибов из кормов использовали метод посева взвесей, приготовленных путем последовательных десятикратных разведений измельченного корма, в чашки Петри на поверхность агаризованной среды Чапека – Докса, содержащей 10% медицинской консервированной желчи и антибиотиков. С этой целью отбирали навеску 10 г предварительно измельченного на лабораторной мельнице

корма и помещали ее в колбу со 100 мл стерильного 0,1%-ного раствора ПАВ в дистиллированной воде, получая при этом первичное разведение 1: 10. Затем проводили дезинтеграцию пробы встряхиванием колбы с содержимым в течение 15-20 мин и готовили последующие разведения, используя аналогичные стерильные разбавители, разлитые по 9 мл в пробирки. В каждую чашку вносили по 1 мл тщательно перемешанной взвеси. Культивировали грибы при комнатной температуре (23–25 °С) в течение 7–10 сут.

Полученные результаты свидетельствуют о значительной пораженности кормов мукомориковыми грибами. Эти микромицеты выявлены в 88 (60,3%) пробах: в 56 (68,3%) комбикормов, 5 (22,7%) – зернофуража, 4 – зернобобовых, 10 – жмыхов и шротов, 7 – муки животного происхождения, 2 – отрубей, 1 – глютена, 1 – премикса и во всех изученных пробах БВМД и зерноотходов.

Представители рода *Mucor* обнаружены в 69 пробах кормов (47,3% от числа исследованных), в том числе в 44 пробах (78,6% от числа пораженных мукомориковыми грибами) комбикормов. Доминировали два вида: *M. racemosus* Fres. (36 проб) и *M. hiemalis* Wehm. (25 проб). В единичных случаях отмечали *M. plumbeus* Bonord., *M. jansseni* Lendn., *M. griseo-ochraceus* Naumov, *M. globosus* Fisch.

Из 146 исследованных проб лишь 15 (10,3%), из которых 10 являлись комбикормами, поражены единственным представителем рода *Rhizopus* – *R. nigricans* Ehrenb.

В 11 пробах (7,6%), 6 из них комбикорма, выявлен гриб *Absidia corymbifera* (Cohn) Sacc. et Trott.; в 1-й пробе комбикорма (0,7%) – *Actinomyces elegans* (Eidam) Benjamin et Hesseltine.

## ВЛИЯНИЕ КОРМОВЫХ МИКОТОКСИКОЗОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА МЯСА И ИХ КОРРЕКЦИЯ ВНЕСЕНИЕМ В РАЦИОН КОРОВ КОМПЛЕКСА ИЗ ЭНТЕРОСОРБЕНТА ПОЛИСОРБА ВП, ПОЛИМИНЕРАЛЬНЫХ ПОДКОРМОК ПМП-2 И РУМЕНОСАНА

Попова О.М., Агольцов В.А.

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Для снижения токсического действия микотоксических грибов, контаминировавших корм и с целью коррекции рационов коров использовали комплекс из энтеросорбента, с антиоксидантными свойствами – Полисорб ВП, полиминеральной подкормки – ПМП-2 и регулятора рубцового пищеварения – Руменосана.

В производственных опытах было использовано 36 голов коров 3- – 5-й лактации, по 12 голов в каждой группе. Опыты проводились в зимне-весенний период. Животные 1-й группы были здоровые (контроль). Коровы 2- – 3-й групп – опытные (кормовые мико-

токсикозы, с нарушенным минеральным обменом). Животные 1- и 2-й групп содержались в одинаковых условиях кормления и содержания с коровами опытных групп и никакие дополнительные манипуляции с ними не проводились. В рацион коров 3-й группы ежедневно в течение 10 дней, вносили комплекс из Полисорба ВП в дозе 300 мг/кг, в виде водной взвеси, разлитой по поилкам, а также давали им 1 раз в сут полиминеральную подкормку ПМП-2, в течение 30 сут, в дозе 200 г/гол и выпаивали с водой Руменосан в дозе 250 мл/гол. Затем делали перерыв на 30 сут, и

курс повторяли еще раз. Выбор полиминеральных подкормок осуществлялся, с учетом нарушенного минерального баланса в организме коров.

В ходе экспериментов были исследованы биохимические показатели качества мяса (сухое вещество, ААА, жир, белок, ЛЖК, влага, зола, триптофан, оксипролин, БКП) при кормовых микотоксикозах на фоне нарушенного минерального баланса и их восстановление под влиянием комплекса из антиоксиданта Полисорб ВП, полиминеральных подкормок из ПМП-2 и Руменосана.

Отбор проб мяса от животных 1-, 2- и 3-й групп для биохимического анализа производили во время сдачи скота на мясокомбинат.

Для определения химического состава мяса отбирали часть мышечной ткани из 4 мускулов разных анатомических областей туши (плечеголовная, трехглавая мышца плеча, поясничная часть длинной мышца спины и двуглавая мышца бедра).

С целью оценки биологической полноценности белков мяса определяли белково-качественный показатель (БКП).

Сухое вещество в мясе от животных контрольной группы составило 24,1%. Показатель сухого вещества в мясе от животных 2-й группы в конце был ниже, чем в мясе от животных контрольной группы в 1,18 раза (на 3,7%). Описываемый показатель в мясе животных 3-й группы увеличился, по сравнению с его уровнем у коров 2-й группы, в 1,08 раза (на 1,8%). Однако он не достигал его значения в мясе коров контрольной группы, уступая ему в 1,03 раза (на 0,9%).

Уровень аминокислотного азота (ААА) в мясе от коров контрольной группы составил 70,4%. Значение ААА в мясе от животных 2-й группы было выше, чем в контроле, в 1,09 раза (на 7,0%). Исследование ААА в мясе от коров 3-й группы показало его снижение, по сравнению с данными в мясе животных 2-ой группы в 1,06 раза (на 4,8%). Но при этом ААА в мясе коров описываемой группы был выше контрольной цифры в 1,03 раза (на 2,2%).

Содержание жира в мясе коров контрольной группы составило 3,6%. Его значение в мясе от животных 2-ой группы было значительно ниже, чем в контроле – в 1,38 раза (на 1,0%). Внесение в рацион коров комплекса из антиоксиданта Полисорб ВП, полиминеральных подкормок ПМП-2 и Руменосан способствовало повышению уровня жира в мясе от коров 3-й группы, по сравнению с его значением в мясе от животных 2-й группы в 1,09 раза (на 0,3%). Но уровень жира в мясе от животных описываемой группы был ниже, чем в мясе от коров контрольной группы в 1,12 раза (на 0,4%).

Уровень белка в мясе от коров контрольной группы был равен 19,6%. Содержание белка в мясе от животных 2-й группы было значительно ниже, чем в контроле – в 1,34 раза (на 5,0%). Данный показатель в мясе от коров 3-й группы увеличился, по сравнению с его значением в мясе от животных 2-й группы – в 1,17 раза (на 2,5%), но не достигал контрольного уровня, уступая ему в 1,14 раза (на 2,5%).

Содержание летучих жирных кислот (ЛЖК) в мясе животных контрольной группы составило 2,19 мг. Уровень ЛЖК в мясе от коров 2-й группы было

повышено, по сравнению с контрольным значением, в 1,47 раза (на 1,04 мг). Показатель ЛЖК в мясе от животных 3-й группы снизился, по сравнению с данными животных 2-й группы – в 1,35 раза (на 0,84 мг, но при этом превышал показатель контрольной группы – в 1,09 раза (на 0,2 мг).

Уровень содержания влаги в мясе от коров контрольной группы составил 70,9%. Данный показатель в мясе от животных 2-й группы был увеличен, по сравнению с контрольной цифрой, в 1,06 раза (на 4,7%). Уровень влаги в мясе от коров 3-й группы был ниже, чем в мясе животных 2-й группы – в 1,03 раза (на 2,9%).

На долю золы в мясе от животных контрольной группы приходилось 1,21%. Его значение в мясе от животных 2-й группы уступало показателю контроля в 1,68 раза (на 0,49%). Данный показатель в мясе от коров 3-й группы был выше его значения у животных 2-й группы в 1,34 раза (на 0,25%), но также не достигало показателя в мясе коров контрольной группы, уступая ему в 1,24 раза (на 0,24%).

Содержание триптофана в мясе от животных 1-й группы составило 350,7%. Его значение в мясе от животных 2-й группы было пониженным и уступало контрольной цифре в 1,26 раза (на 74,3%). Показатель уровня триптофана в мясе от животных 3-ой группы увеличился, по сравнению с его значением у коров 2-й группы в 1,33 раза (на 93,4%) и соответствовало физиологическому значению для данного вида мяса.

Уровень оксипролина в мясе от животных контрольной группы составил 51,4%. Содержание оксипролина в мясе от коров 2-й группы было выше контрольной цифры в 1,12 раза (на 6,2%). Показатель уровня оксипролина в мясе от коров 3-й группы составил 52,4, что соответствовало нижней границе физиологических норм.

О потенциальной биологической ценности белка можно судить по величине белково-качественного показателя мяса, представляющего собой отношение количества триптофана к оксипролину. Белково-качественный показатель мяса от животных 2-й группы был понижен 1,42 раза (на 2,03 ед.), а в мясе от коров 3-й группы превысил контроль в 1,03 раза (на 0,23 ед.).

Кормовые микотоксикозы вызывают значительное изменение баланса биохимических показателей качества мяса, проявляющиеся снижением уровня сухого вещества в 1,18 раза (на 4,0%), жира в 1,38 раза (на 1,0%), белка в 1,34 раза (на 5,0%), золы в 1,68 раза (на 0,49%), триптофана в 1,26 раза (на 74,3%), белково-качественного показателя (БКП) – в 1,42 раза (на 2,03 ед.) и повышением в мясе ААА в 1,09 раза (на 7,0%), ЛЖК в 1,47 раза (на 1,04 мг), влаги в 1,06 раза (на 4,7%), оксипролина в 1,12 раза (на 6,2%), рН в 1,19 раза (на 1,1 ед.).

Результаты по изучению биохимических показателей мяса свидетельствуют о том, что кормовые микотоксикозы, протекающие на фоне нарушенного минерального обмена способствуют значительному снижению качественных показателей мяса. Проведение комплексного лечения, с применением энтеросорбентов – антиоксиданта, в виде препарата Полисорба ВП, полиминеральной подкормки ПМП-2 и регулятора рубцового пищеварения Руменосана

способствовало значительному улучшению биохимических показателей качества мяса.

На основании проведенных исследований установлено, что внесение в рацион коров комплекса из энтеросорбента – антиоксиданта Полисорба ВП, полиминеральной подкормки ПМП-2 и регулятора

рубцового пищеварения Руменосана, при кормовых микотоксикозах с нарушенным минеральным обменом, способствует восстановлению до уровня физиологических норм биохимических показателей качества мяса (по сухому веществу, ААА, жиру, белку, ЛЖК, влаге, золе, триптофану, оксипролину, БКП и рН).

## ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК ОРГАНОВ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ПОРОСЯТ ДИОКСИНОМ, Т-2 ТОКСИНОМ И ЛЕЧЕНИИ

Саитов В.Р., Идиятов И.И., Папуниди К.Х., Кадиков И.Р.

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

**Актуальность проблемы.** Современная экологическая обстановка не исключает вероятности одновременного загрязнения биосферы соединением техногенного происхождения – диоксином и микотоксинами, в частности Т-2 токсином. Данные вещества считаются суперэтоксикантами и не имеют себе равных по глобальности экологических последствий, опасности для здоровья человека и животных. Они чрезвычайно токсичны, высоко устойчивы и широко распространены в окружающей среде [1, 2, 3]. Одновременно с этим, сведений о сочетанных токсикозах, их лечении и профилактике крайне мало. Множественность клеточных мишеней для диоксина и Т-2 токсина определяет широкий спектр токсических эффектов и проявление патологических изменений в клетках и тканях органов.

**Материалы и методы.** Использованы технический 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-пара-диоксин (2,3,7,8-ТХДД) и кристаллический Т-2 токсин, полученный в лаборатории микотоксинов ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». В качестве терапевтических средств применяли цеолит Майнского месторождения Ульяновской области и препарат димефосфон.

Исследования проводились на поросятах породы «Крупная белая» в возрасте 8 недель и живой массы 14–17 кг, разделенных по принципу аналогов на 3 группы по 3 головы в каждой. 1-я группа являлась контролем и в составе рациона получала адекватное количество растительного масла, служившего растворителем диоксина. Животных 2-й группы подвергали ежедневной пероральной заправке 2,3,7,8-ТХДД в дозе 15 мкг/кг массы тела, что соответствует 1/400 от ЛД<sub>50</sub> и Т-2 токсином на уровне 2 ПДК (0,2 мг/кг корма/сут или 1/200 от ЛД<sub>50</sub>), 3-й группе поросят наряду с токсикантами (ТХДД в дозе 1/400 от ЛД<sub>50</sub> и Т-2 токсином – 1/200 от ЛД<sub>50</sub>) выпаивали 15%-ный раствор димефосфона в дозе 90 мг/кг массы тела (0,6 мл/кг) и задавали цеолит из расчета 2% от рациона.

Продолжительность опыта составила 45 сут, в ходе эксперимента оценивали клиническое состояние, потребление корма и воды, проводили контрольное взвешивание животных, взятие и анализ крови. Для гистологических исследований брали кусочки сердца, печени, почек. Материал фиксировали в буферном растворе 10%-ного формалина, рН 8,0. Далее проводили обезвоживание и уплотнение отобранных тканей погружением их в серию спиртов возрастающей

крепости, затем осуществляли заливку в парафин и изготавливали из подготовленных блоков гистологические срезы. Окраску гистопрепаратов проводили гематоксилин–эозином.

С помощью электронного микроскопа исследовали ультраструктуру клеток паренхимы печени, коркового слоя почек, миокарда. Подготовка отобранного материала проводилась по принятой классической схеме. Образцы фиксировали в 1%-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Постфиксацию проводили в 2%-ном растворе четырехоксида осмия на том же буфере 2 ч. После дегидратации в спиртах и ацетоне кусочки ткани заключали в смесь эпоновых смол. Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100СХ.

**Результаты исследований.** У поросят, подвергнутых сочетанному воздействию диоксина в дозе 15 мкг/кг массы тела (1/400 от ЛД<sub>50</sub>) и Т-2 токсина на уровне 200 мкг/кг корма (2 ПДК) в течение 45 дней, при патологоанатомическом исследовании отмечали истощение, отсутствие жировых отложений в подкожной клетчатке, гиперемии конъюнктивы и слизистой оболочки носовой полости, корочки подсохшего экссудата в углу глаз и вокруг ноздрей. Кожа паховой области была окрашена в бурый цвет.

При вскрытии обнаруживали скопление серозной жидкости в брюшной полости. Желудок и тонкий отдел кишечника были умеренно наполнены кормом, их серозная оболочка и брыжейка густо инъецированы кровеносными сосудами, слизистая – в состоянии катарального воспаления. В толстом отделе присутствовали каловые массы кашицеобразной консистенции, слизистая была анемичной. Печень характеризовалась незначительным увеличением в размере, дряблой консистенцией, выраженной зернистостью, признаками венозного застоя, мозаичным рисунком: участками от серо- и бело-желтого до темно лилового цвета. Легкие были в состоянии катарального воспаления. Сердечная мышца – дряблая, бледная, листки перикарда сращены между собой и эпикардом. Вещество головного мозга отечно, кровеносные сосуды кровенаполнены. Почки умеренно упругие, капсула органа снималась легко, граница между корковым и мозговым слоями сглажена. Мочевой пузырь был умеренно наполнен мочой бурого цвета, слизистая оболочка бледно-розовая. Селезенка в размере не увеличена, вишнево-красного цвета, края тупые.

Гистологическими методами исследования в препаратах печени установили дистрофию клеток с некрозами некоторых из них, периваскулярные кровоизлияния, межлочный отек и полиэкссудативную инфильтрацию. Имели место сосудистые и дистрофические изменения. Отмечали внутриклеточный и периваскулярный отек в сердце, дистрофические изменения эпителия извитых канальцев почек с очаговыми некробиозами и десквамацией эпителия.

При электронно-микроскопическом исследовании в эпителиоцитах проксимальных канальцев почек отмечали большое количество крупных и мелких вакуолей, полиморфизм митохондрий: пустые митохондрии – вакуоли, митохондрии с просветленным матриксом и отдельными кристами, митохондрии с плотным матриксом и хорошо развитыми пластинчатыми кристами, много пероксисом. В ядрах имелись участки с мелкогранулярным хроматином, в подоцитах – изменение формы малых цитоподий. В гепатоцитах отмечали очень крупные вакуоли, просветление цитоплазмы, конденсирование хроматина, резкое уменьшение гранулярного эндоплазматического ретикула, мелкую вакуолизацию цитоплазмы. В большинстве клеток выявляли появление мелкоглобулярного зухроматина, некоторое набухание перинуклеарного пространства, увеличение количества пероксисом, множество митохондрий с плотным матриксом и единичными кристами, отсутствие гликогена.

Таким образом, по выявленным морфологическим изменениям и результатам ранее проведенных исследований на белых крысах, кроликах и овцах обосновано применение препаратов сорбционного и политерапевтического действия. Выбор был сделан в пользу цеолита и димефосфона, которые задавали ежедневно в дозах 2% от рациона и 90 мг/кг массы тела соответственно.

При вскрытии трупов поросят на фоне сочетанного поражения диоксином и Т-2 токсином и применения лекарственных средств патологических изменений органов обнаружено не было. Печень в объеме не увеличена, красно-бурого цвета, плотной консистенции. Легкие бледно-розовые, селезенка в размере также не увеличена, лиловой (темно-вишневой) окраски, края острые. Почки упругие, граница слоев хорошо выражена. Мочевой пузырь умеренно наполнен мочой светло-соломенного цвета.

В гистологических препаратах тканей явлений пролиферации не отмечали, дистрофические и некробиотические проявления нивелировались. В клетках печени наблюдался положительный эффект лечения: в цитоплазме происходило накопление гликогена, наличие множества митохондрий, малое количество пероксисом, ядра гепатоцитов не отличались от таковых контрольной группы, в ядерной оболочке присутствовало много пор. Интересной особенностью клеток являлось наличие отдельных или собранных в группы электроннопрозрачных вакуолей, центральная часть которых имела мелкодисперсное содержимое неправильной формы. В клетках почек также отмечали выраженный терапевтический эффект: крупные, иногда неправильной формы митохондрии с ламеллярными кристами, плотный или хлопьевидный матрикс.

**Закключение.** Результаты проведенных патоморфологических исследований органов и тканей свидетельствовали о политропности диоксида и Т-2 токсина, вовлечении в патологический процесс большинства систем организма, что характеризовалось наличием дегенеративно-дистрофических, пролиферативных процессов, кровоизлияниями, развитием стаза, отека стромы внутренних органов и головного мозга, нарушением структурной целостности клеток, изменением количественных и функциональных параметров органелл. На фоне применения димефосфона и цеолита установлено отсутствие патологических изменений в органах, сохранялась их нормальная архитектура, таким образом, имела место органопротекторная активность препаратов и отмечалась высокая терапевтическая эффективность их комбинированного применения.

#### Список литературы

1. Желтов В.А. Изучение токсичности и опасности диоксинов и диоксиноподобных соединений. Ветеринария. 2008; 10: 52-4.
2. Смирнов А.М. Эффективность энтеросорбентов при микотоксикозах животных. В сб. : Совр. проблемы вет. фармакол. и токсикол. Мат. II съезда вет. фармакологов и токсикологов России. Казань. 2009: 489-93.
3. Дорожкин В.И. Актуальные вопросы ветеринарно-санитарных мероприятий на территориях, загрязненных экотоксикантами. Пробл. вет. санит., гиг. и эколог. 2010; 2: 1.

## ДОСТИЖЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ МИКОЛОГИИ И ПРОБЛЕМЫ УСТОЙЧИВОГО РАЗВИТИЯ ЖИВОТНОВОДСТВА В ЕВРОСОЮЗЕ

*Саркисов К.А., Коваленко К.Н.*

*Национальная академия микологии, Москва*

В Елгаве, Латвия, 27–28 ноября 2014 г. состоялась конференция, посвященная 95-летию ветеринарного факультета Латвийского сельскохозяйственного университета, в которой участвовало более 500 специалистов в области ветеринарной медицины из стран Европы, Азии и США (Великобритания, Германия, Ирландия, Италия, Казахстан, Литва, Мальта, Польша,

Россия, США, Турция, Финляндия, Франция, Швеция, Эстония).

Работа проходила в нескольких секциях: безопасность продовольствия, паразитология, инфекционные заболевания, эндокринология, кардиология, хирургия, фармакология, репродукция, альтернативная медицина.



Представитель латвийской фирмы Alltech Latvia выступил с докладом о методах индикации и идентификации микотоксинов в кормах и продуктах питания. Было отмечено, что высокая чувствительность, используемых методов, позволяет значительно повысить качество сельскохозяйственной продукции. Российские ученые (ВНИИ ветеринарии санитарии, гигиены и экологии, Москва) презентовали подробный доклад "Дерматомикозы животных. Профилактика и терапия этих заболеваний".

Подчеркнуто, что заражаются и заболевают дерматомикозами животные в возрасте от 4 до 9 мес. Переболевший молодняк во взрослом состоянии не болеет трихофитией вследствие напряженного иммунитета. Также было отмечено, что высокие титры антител у иммунизированных животных наблюдаются только в течение 4–8 мес после 2-й иммунизации их биопрепаратами и к 6–9-месячному возрасту резко снижаются до первоначального уровня.

Большое внимание было уделено проблемам повышения квалификации специалистов разного уровня

и системе после дипломного образования в странах Европы. С докладами на эту тему выступили А. Робинсон (Великобритания), В. Ришкавичиене (Литва) и Т. Орро (Эстония). Так, в эстонском Университет в Тарту программа подготовки квалифицированных научных сотрудников рассчитана на 3 года, а программа докторантуры на четыре года. Эти программы действуют уже в течение 9 лет и дали положительные результаты. В Литве подготовка специалистов в докторантуре осуществляется на протяжении 4 и 6 лет. Общую панораму подготовки специалистов в области ветеринарной медицины Европы представил А. Робинсон.

Во время конференции проходила выставка "Ветинфо-2014". Свыше 20 латвийских и иностранных компаний представили широкий ассортимент лекарственных препаратов, инструментариев и принадлежностей, используемых в ветеринарии, в том числе биопрепараты для профилактики и лечения дерматомикозов кошек и собак и иммуностимуляторы, изготовленные фирмой "Зооветцентр" РФ.

---

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ МИКОТОКСИНОВ В КОРМАХ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

*Комаров А.А., Метальников П.С., Панин А.Н., Селимов Р.Н.  
Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации  
лекарственных средств для животных и кормов*

Исследование было направлено на определение широкого спектра микотоксинов в кормах отечественного производства в рамках программы Государственного ветеринарного лабораторного мониторинга остатков запрещенных и вредных веществ в организме живых животных, продукции животного происхождения и кормах.

Исследование включало анализ проб кормов на содержание микотоксинов, максимально допустимые уровни (МДУ) которых установлены законодательством, но в 1-ю очередь было ориентировано на изучение других микотоксинов, о распространенности которых в России имеются ограниченные данные.

С этой целью провели анализ 180 проб кормов и кормового сырья с помощью методики на основе метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для одновременного определения 50 микотоксинов.

Применяемая методика основана на анализе экстрактов образцов корма без этапа очистки, ввиду

трудности подбора метода очистки для широкого спектра токсинов. Образцы экстрагировали при помощи смеси ацетонитрил/вода/уксусная кислота (79/20/1 соответственно), экстракты анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС двукратно – в режиме положительной и отрицательной ионизации.

Микотоксины были выявлены в 165 образцах (92%). 36% проб содержали одновременно по меньшей мере, 5 микотоксинов, максимальное количество в одном образце составило 12 микотоксинов. Среди микотоксинов с установленным МДУ наиболее часто выявляли Т-2 токсин (средняя концентрация 73 мкг/кг), зеараленон (средняя концентрация 11 мкг/кг) и фумонизины (средняя концентрация суммы фумонизинов В1 и В2 составила 1074 мкг/кг). Среди микотоксинов без установленного МДУ наиболее часто встречались токсины грибов рода *Alternaria* (альтернариол, альтернариолметилэфир, тентоксин, тенуазоновая кислота); среди прочих токсинов регулярно выявляли НТ-2 токсин, боверицин, микофеноловую кислоту, монилиформин.

---

## КОНТАМИНАЦИЯ ЗЕРНА, СОЛОМЫ И ПОЖНИВНЫХ ОСТАТКОВ МИКОТОКСИНАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕХНОЛОГИИ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ

Солдатенко Н.А.<sup>1</sup>, Дробин Ю.Д.<sup>1</sup>, Русанов В.А.<sup>2</sup>, Фетисов Л.Н.<sup>1</sup>, Бокун Е.А.<sup>1</sup>, Сухих Е.А.

<sup>1</sup>Северо-Кавказский зональный НИВИ, Новочеркасск,

<sup>2</sup>Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

Исследованиями, проведенными в ФГБНУ СКЗ-НИВИ, установлено нарастающее загрязнение кормов микотоксинами в ряде хозяйств Ростовской и Воронежской областей, Краснодарского и Ставропольского краев, Кабардино-Балкарской АР., Производителями этих микотоксинов являются микромицеты *Fusarium* (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum* и др.) [1, 2, 3], что свидетельствует об увеличении интенсивности фузариозных эпифитотий. На полях, с которых собран урожай, было установлено наличие микотоксинов в пожнивных остатках (солома, стерня), а также загрязнение их микромицетами – потенциальными продуцентами фузариотоксинов.

Поражение зерновых культур токсинообразующими грибами в период вегетации вызвано изменением климата, изменениями в агротехнических приемах, когда зараженные спорами микромицетов остатки растений остаются на поверхности почвы и становятся причиной новых эпифитотий. Использование соломы в качестве подстилки с зараженных полей без предварительной проверки на наличие микотоксинов стало причиной заболевания и гибели животных в ряде хозяйств Юга России. Проводимые исследования направлены на выявление причин загрязнения кормов для животных в период их производства.

**Цель работы** – определить степень загрязнения микотоксинами зерновых в период их вегетации и установить уровень загрязненности урожая зерновых культур на полях с безотвальной обработкой почвы и со вспашкой с оборотом пласта.

**Материалы и методы.** Исследовали пробы с 32 полей, по 10 проб с каждого поля. Отбор проб проводили до уборки (брали полностью стебель и колосок), после уборки на полях собирали пожнивные остатки. Исследовали как различные участки стеблей, так и зерно из колоса на наличие микотоксинов и токсинообразующих микромицетов. Пробы с каждого поля перед исследованиями объединяли и измельчали. Содержание микотоксинов определяли методом конкурентного иммуноферментного анализа (Ерошкин, Буркин, Кононенко, 2002), в соответствии с ГОСТ Р52471-2005, используя диагностические наборы ООО «Фарматех».

В экстрактах кормов устанавливали количественное содержание фузариотоксинов (Т-2 токсин, фумонизин В1, зеараленон, и аспергиллотоксинов (афлатоксин АВ1, стеригматоцистин, охратоксин). Также учитывали технологию выращивания культур и их предшественников с учетом обработки почвы.

Первичное выделение токсинообразующих микромицетов из зерна и соломы проводили на средах

Сабуро, Чапека и сусло-агаре. Видовую идентификацию их определяли с использованием традиционных методов (Билай, 1977; Билай, Коваль, 1988; Андреюк и др., 1980; Саттон, Фотергилл, Ринальди, 2001).

**Результаты и их обсуждение.** При исследовании стеблей и зерна колоса ячменя, пшеницы и сорго, взятых на полях, обработанных по безотвальной или нулевой технологии, в ряде хозяйств Ростовской, Воронежской областей, Краснодарского края было выявлено наличие Т-2-токсина в зерне и стеблях пшеницы и ячменя на уровне до 25 см, от корневища в количествах, превышающих минимально допустимые уровни (МДУ), а в стерне его количество превышало МДУ в 5 раз. Содержание Т-2-токсина в зерне, выращенном на полях при посеве по парам или со вспашкой с оборотом пласта растений, не превышало 0,3 МДУ, а в соломе его обнаружить не удалось.

В зерно сорго, выращенное при использовании безотвальной или нулевой технологии, Т2-токсина не обнаружено, но в зерне и стеблях сорго установлено наличие микотоксина зеараленона на уровне МДУ или с превышением его (табл. см. след. стр.).

Также было установлено в соломе наличие аспергиллотоксинов афлатоксина В1, стеригматоцистина и охратоксина А – 2,3, 38,2 и 64,0 мкг/кг соответственно.

Из образцов, контаминированных Т2 токсином при микологических исследованиях, выделены *Fusarium tricinctum* (*F. sporotrichioides*), а загрязнённых зеараленоном – *F. graminearum*.

**Выводы.** Полученные данные показывают, что при вегетации зерновых культур в зерне и соломе накапливаются фузариотоксины в количествах опасных для здоровья животных при использовании безотвальной и нулевой обработки почвы.

При производстве зерновых кормов с использованием паров и вспашки с оборотом пласта контаминация микотоксинами в опасных уровнях не установлена

### Список литературы

1. Фетисов Л.Н., Солдатенко Н.А., Русанов В.А. Микотоксины – возрастающая угроза здоровью животных. Вестн. ветер. 2005; 35(4): 12-5.
2. Солдатенко Н.А., Фетисов Л.Н., Коваленко А.В., Русанов В.А. Микотоксины – скрытая опасность в кормах. Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел. Мат. между. науч.-практ. конф. (к 110-летию ВИЭВ). М. 2008: 356-61.
3. Клименко А.И., Фетисов Л.Н., Солдатенко Н.А. и др. Микотоксины и безотвальная технология обработки почвы. Пробл. вет. санит., гиги. экол. 2012; 2: 63-65.

Контаминация образцов зерна, соломы и стерни микотоксинами, мкг/кг

Исследованные образцы	Технология обработки почвы	T-2	Афлатоксин В1	Стеригматотоксин	Охратоксин А	Фумонизин В1	Зеараленон
Зерно пшеницы и ячменя	Нулевая технология	338,0	0	0	0	0	0
Зерно сорго	Нулевая технология	0	0	0	0	0	92,0
Солома пшеничная и ячменная	Нулевая технология	256	2,3	38,2	64,0	200,0	20,0
Стерня пшеницы и ячменя	Нулевая технология	518,0	2,0	44,0	0	2814,0	54,0
Стебли сорго	Нулевая технология	0	0	0	0	1981,0	100,0
Зерно пшеницы и ячменя	Посев по парам и вспашка с оборотом пласта	30	0	20	0	0	0
Солома пшеницы	Посев по парам и вспашка с оборотом пласта	0	0	10,0	0	0	0

## МИКОТОКСИКОЗЫ И СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ БОРЬБЫ С НИМИ

*Тремасова А.М.*

*ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань*

Микотоксины даже в малых дозах способны вызвать значительное снижение продуктивности, прироста массы, ослабление резистентности организма, при этом создаются благоприятные условия для возникновения многих инфекционных заболеваний [1, 2].

Одним из эффективных подходов к проблеме снижения вреда от воздействия токсикантов на организм животных является применение энтеросорбентов. Они снижают биологическую доступность токсинов, замедляют их всасывание, уменьшают токсическое действие на организм, предохраняют продукцию от загрязнения, не изменяя при этом питательность самого корма [3].

Перспективными для профилактики негативного воздействия токсикантов на организм животных и улучшения их клинического статуса являются природный минерал шунгит и синтетический сорбент Полисорбин. Шунгит – древняя углеродсодержащая порода, встречается в сплошных массах черного или графитного цвета. Твердость по Моосу – 3–4, уд. вес – 1,8–2 г/см<sup>3</sup>. Полисорбин – лекарственное средство в форме порошка, предназначенное для применения животным в качестве энтеросорбента при желудочно-кишечных заболеваниях и патологических состояниях, сопровождающихся интоксикацией организма.

**Цель исследования** – определить профилактическую эффективность шунгита и Полисорбина при афлатоксикозе свиней.

**Материалы и методы.** Определение адсорбционной способности сорбентов *in vitro* проводили по методике Крюкова В.С. и соавт. [4]. Производственные

опыты проведены на свиньях. Для этого было сформировано 4 группы подсвинков массой 20 – 25 кг по 15 животных в каждой.

Животные 1-й группы – контроль, они получали обычный рацион. Поросята 2-й группы – затравка, получали корм, контаминированный афлатоксином (200 мкг/кг). Поросята 3-й группы – афлатоксин (200 мкг/кг) и сорбент Полисорбин (100 мг/кг массы животного) с рационом. 4-я группа – рацион с афлатоксином и шунгитом (2% от рациона).

Срок исследования – 20 сут. Гематологические исследования крови проводили общепринятыми методами, содержание общего белка определяли на рефрактометре ИРФ-22, белковых фракций – турбидиметрическим методом [5]. Концентрацию глюкозы, холестерина, мочевины, активность АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы определяли на анализаторе «Microlab 300». Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по методике А.Н. Кост и М.И. Стенко [6], лизоцимную активность – по Ю.М. Маркову [7]. Ветеринарно-санитарную экспертизу мяса проводили в соответствии с ГОСТами [8, 9, 10].

**Результаты исследования.** Нами установлено, что шунгит Зажогинского месторождения и сорбент Полисорбин не обладают токсическими, кумулятивными, раздражающими свойствами, не вызывают аллергическую реакцию, не нарушают репродуктивную функцию, не оказывают отрицательного влияния на ЦНС и антиоксидантную функцию печени, что позволило отнести их в соответствии с ГОСТ 12.1.007.76 к 4-му классу – вещества мало опасные.

В исследованиях *in vitro* выявлена выраженная сорбционная активность испытуемых сорбентов в отношении афла-, Т-2-токсина и микотоксина патулина. Оценка эффективности сорбентов при микотоксикозах, проведенные в опытах на с/х животных, показала, что заправка поросят афлатоксином В1 способствует снижению массы животных на 10,6%.

В группах поросят, получавших дополнительно сорбенты, наблюдалось увеличение данного показателя, отмечено увеличение СОЭ, уменьшение количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина. Так, на 20 сут исследования содержание лейкоцитов в крови поросят опытных групп было ниже данного показателя группы контроля: 3-й – на 26,5%; 4-й – на 22,9%. Аналогичный показатель группы заправки был ниже на 34,2%. Количество эритроцитов во 2-й группе на протяжении всего эксперимента снижалось, к 20 сут оно составило 8,1% относительно контроля.

В группах же с применением сорбентов в этот срок данный показатель был на уровне такового животных группы контроля. Кроме того, при интоксикации афлатоксином регистрировалось снижение количества глюкозы, общего белка, альбуминов и  $\gamma$ -глобулинов, а также повышение  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов. Так, содержание глюкозы на 20 сут исследования в опытных группах снизилось на 3,8 и 1,9%, по сравнению с контролем, в группе заправки – на 11,7%. В 3-й группе поросят на 20 сут снижение общего белка составило 6,2%, а в 4-й – 4,9%, относительно контроля.

Содержание альбуминов в сыворотке крови на 20 сут было ниже: во 2-й группе – на 11,1%; в 3-й – на 3,3%; в 4-й – на 2,2%, относительно контроля. Процентное содержание  $\beta$ -глобулинов на 20 сут в опытных группах (3- и 4-я) было выше данных биологического контроля на 2,2 и 1,6% соответственно, в группе заправки превышение составило 21,7%. Содержание  $\gamma$ -глобулинов во 2-й, 3-й и 4-й группах было выше на 2,2; 3,7 и 0,7% соответственно относительно группы контроля. На 20 сут исследования во 2-й группе поросят наблюдалось увеличение щелочной фосфатазы на 34,4% в сравнении с контролем. В опытных группах показатель щелочной фосфатазы на 20 сут был ниже: в 3-й – на 11,6%; в 4-й – на 22,4%, по сравнению со 2-й группой.

Содержание АЛТ и АСТ в опытных группах на 20 сут также было ниже относительно группы заправки: в 3-й группе – на 15,7 и 25,5 %; в 4-й – на 22,7 и 34,2% соответственно, при этом были превышены показатели группы контроля в 3-й группе на 14,1 и 20,1%, в 4-й – на 4,6 и 6,1% соответственно. Уровень холестерина в крови поросят, групп с применением сорбентов, на 20 сут был ниже относительно животных 2-й группы, в которой сорбенты не применяли: в 3-й группе – на 9,7 %; в 4-й – на 14,2%, и выше данных контроля на 10,2 и 4,8% соответственно. В крови поросят 3-й группы наблюдали повышение уровня мочевины на 20 сут исследования по сравнению с контролем заправки на 10 %, в 4-й – на 13,5%.

Во всех группах наблюдали увеличение содержания МДА, в группе заправки – более выраженное. К 20 сут эксперимента в группе животных, получавших с кормом токсин, отмечали увеличение МДА относительно показателей группы контроля – на 118,5%, в

то время как в 3-й группе – на 68,3%, в 4-й – на 43,3%, что свидетельствует о защитном действии сорбентов при воздействии афлатоксина.

Введение в рацион животных сорбентов способствовало нормализации факторов естественной резистентности. Фагоцитарная активность нейтрофилов крови поросят после применения Полисорбина на 20-е сут опыта снижалась на 1,8%; при применении шунгита – на 0,1%, в группе же заправки – на 9,7%, по отношению к группе контроля. На 20-е сут фагоцитарное число, индекс и емкость в опытных группах достоверно превышали данные группы заправки, но при этом были ниже данных контроля.

Это связано с увеличением поглотительной способности нейтрофилов у опытных животных на фоне применения сорбентов. Показатель фагоцитарного числа превысил данные 2-й группы, в 3-й – на 12,3%; в 4-й – на 26%. Оставаясь на 11,4 и 0,6% соответственно, ниже, чем показатели контроля. Активность лизоцима сыворотки крови у животных, получавших сорбенты Полисорбин и шунгит, увеличилась на 9,6 и 12,4% соответственно по отношению к группе заправки.

Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса животных, получавших токсичный корм и сорбенты, показала, что по органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям оно соответствует нормам, предусмотренным для свежего доброкачественного мяса. Следовательно, применение сорбентов Полисорбин и шунгит способствует снижению негативного воздействия афлатоксина В1 на организм животных.

#### Список литературы

1. Трмасов М.Я. Микотоксикозы – проблема распространения и профилактики в животноводстве. Мат. Всерос. научно-практич. конф. Казань, 2005: 41-51.
2. Дорожкин В.И. Профилактика микотоксикозов животных. I съезд ветеринарных фармакологов России. Мат. съезда. Воронеж, 2007: 699.
3. Смирнов А.М. Эффективность энтеросорбентов при микотоксикозах животных. «Современные проблемы ветеринарной фармакологии и токсикологии»: Мат. II съезда вет. фармакологов и токсикологов России. Казань, 2009: 489-93.
4. Крюков В.С. Применение клиноптилолита для профилактики микотоксикозов. Ветеринария. 1992: 9(12): 28-9.
5. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. Справочник. М.: КолосС. 2004: 520 с.
6. Кост А.Н. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов. Клиническая гематология животных. М.: Колос. 1974: 99-100.
7. Марков Ю.М. Естественная резистентность организма животных. Л.: Колос, 1979: 33-5.
8. ГОСТ 21237-75. Мясо. Методы бактериологического анализа. М.: Стандартинформ, 2007: 25 с.
9. ГОСТ 23392-78. Мясо. Методы химического и микроскопического анализа свежести. М.: Стандартинформ, 2009: 6с.
10. ГОСТ 7269-79. Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести. М.: Стандартинформ. 2006: 7 с.

## Т-2 ТОКСИКОЗ ТЕЛЯТ: РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Тремасов М.Я., Тремасова А.М., Папуниди К.Х.  
ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

**Актуальность исследования.** Несмотря на то, что проблемой микотоксинов занимаются все большее количество ученых, научных школ и специалистов сельскохозяйственного профиля экологи, медицинские работники, плесневые микроскопические грибы продолжают представлять обширную группу организмов, широко распространенных в природе и встречающихся практически везде, на всех континентах, включая тропики, северные и южных полушария, даже во льдах Антарктиды [1, 2].

Количество мицелиальных грибов исчисляются 1,5 млн, представляют обособленное царство органического мира и являются вторичными после насекомых группой. В настоящее время известны лишь несколько десятков видов, вырабатывающих ядовитые, низкомолекулярные вторичные метаболиты – микотоксины, роль которых в общем ущербе превышает многие миллионы долларов. Об этом свидетельствует проведенный нами мониторинг сельскохозяйственной продукции в Поволжском регионе РФ.

Мониторинг микотоксинов в сельскохозяйственной продукции в Поволжском регионе РФ показывает возрастание случаев контаминирования, прежде всего зерновых, грибами рода *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pentecillium*, *Mucor* и т.д. В зерновых культурах в регионе от 12 до 65% образцах проб выявлялись микотоксины, преимущественно Т-2 токсин (33%), афлатоксины (8%), в основном – афлатоксин В1, в силосе – патулин в 10% образцах проб. В регионе увеличилось число субхронического микотоксикоза, особенно Т-2 токсикоза.

**Цель исследования** – оценка токсического эффекта при Т-2 токсикозе животных и разработка мероприятий по лечению и профилактике микотоксикозов.

**Материалы и методы исследования.** Опыты проведены на 12 телятах голштинской породы 2,5-3-х месячного возраста. Для проведения экспериментов было сформировано 3 группы животных: 1 группа – телята с комбикормом ежедневно получали Т-2 токсин в дозе 2 ПДК, сорбент стимул – 2% к рациону, пробиотик энтероспорин в дозе 10 см<sup>3</sup>, 3-кратно; 2-я группа – контрольная, аналогичного возраста получила только Т-2 токсин, в дозе 2 ПДК; 3-я опытная группа получала сорбент фитосорб – 1% к рациону, Т-2 токсин 2 ПДК, ферментный препарат (ФП) – 0,1 кг на животное.

Гематологические показатели, включающие определение количества эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, моноцитов, лимфоцитов, гематокрита, тромбоцитов проводили на анализаторе «Mythie 18» и по общепринятым методикам [3]. Определение белковых фракций сыворотки крови проводили методом Олла и Маккарда в модификации С.А. Карнюка (1962), количество продуктов перекисного окисления липидов по М.С. Гончаренко и А.В. Латиновой (1985) по содержанию малонового диальдегида [4]. Для определения ферментов АЛТ и АСТ использовали

биохимический анализатор «MicroLab 300». Определение гистамина и серотонина осуществляли на флюорометре.

**Результаты исследований.** При продолжительном пероральном введении Т-2 токсина у телят на 10- –15-е сут выявляли общее угнетение, снижение двигательной активности, потребления корма и воды, блеклость волоса, взъерошенность кожного покрова, прирост живой массы резко уменьшился до 200 г в сутки. В крови количество эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина на 30 сут снизилось на 25; 30 и 22%. Содержание общего белка в эти сроки уменьшилось – на 20%, альбуминов – на 37%. Содержание α-глобулинов на 30-е сут уменьшилось – на 27%, фракции β-глобулинов увеличилось на 30 сут – на 73%. Уровень малонового диальдегида в плазме крови увеличилось на 32% от исходного значения. У телят контроля, которые получали обычный рацион, ежедневный прирост привесов составил от 400 до 650 г.

У телят 3-й группы, получавших сорбент фитосорб 1% к рациону, Т-2 токсин 2 ПДК, ферментный препарат (ФП) – 0,1 кг на животное, отмечалось снижение количества лейкоцитов на 30 сут – на 8%, содержание эритроцитов и гемоглобина была практически в пределах нормы для вида и возраста животных. Происходило снижение фракции β-глобулинов – на 12% и стабилизировалась на уровне фона, количество β-глобулинов повысилось на 17%. Снижалось содержание γ-глобулинов – на 16%, содержание МДА увеличилось – на 22%. Температура тела на 30 сут у контрольных животных была снижена на 3,5 °С, пульс – неравномерный, одышка, отмечался тремор мышц верхних и нижних губ, слабое слезотечение, аллергические реакции, возрастание содержания гистамина в тканях легких и крови павшего теленка составило 9,1 и 2,0%

**Выводы.** Т-2 токсин при субхроническом воздействии вызывает изменения гематологических, биохимических, иммунологических показателей. Снижает устойчивость животных, повышает вероятность возникновения аллергии.

Введение в организм телят сорбентов, пробиотика, ферментного препарата, способствует повышению защитных сил организма, сохранности и прироста живой массы.

### Список литературы

1. Иванов А.В. Микотоксикозы (биологические и ветеринарные аспекты). М.: Колос. 2010: 392 с.
2. Тремасов М.Я. Профилактика микотоксикозов животных в России. Ветеринария. 2002; 9: 3-8.
3. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник. М.: КолосС. 2004: 520 с.
4. Гончаренко М.С. Метод оценки перекисного окисления липидов. М. Лаб. дело. 1985; 1: 60-1.

## МОНИТОРИНГ МИКОТОКСИНОВ В ПИЩЕВОЙ ЦЕПИ

Тремасов М.Я., Папуниди К.Х., Семенов Э.И., Иванов А.В.

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

Напряжённая экологическая ситуация в мире способствует загрязнению кормов, продовольственного сырья и пищевых продуктов опасными экотоксикантами, среди которых ведущее место занимают микотоксины. Скармливание таких кормов может привести к отравлению животных и птицы, а потребление загрязнённых продуктов представляет опасность для человека [1, 2].

В настоящее время насчитывают более трехсот микотоксинов, обладающих высокой токсичностью, иммуносупрессивным, канцерогенным, эмбриотоксическим, нефротоксическим, нейротоксическим, а некоторые мутагенным и аллергенным действием [3].

В получении высококачественных, экологически безопасных продуктов питания важная роль отводится эколого-токсикологическому состоянию места обитания животных и последующей санитарно-гигиенической оценке продукции на содержание в ней посторонних веществ, включая микотоксины [4, 5]. Поэтому необходим действенный, постоянный и систематический контроль по показателям качества, питательности и безопасности кормов, пищевой продукции, продовольственного сырья, в том числе импортного, на содержание микотоксинов.

**Цель исследований** – проведение мониторинга кормов, с.-х. продукции и продуктов питания в некоторых регионах РФ.

**Материалы и методы.** Объектом исследований служили корма растительного, животного и минерального происхождения (зерно, комбикорм, мясокостная, рыбная мука, кормовые дрожжи, БВМД, премиксы и т.д.), продукты питания. При проведении анализов на содержание токсикантов руководствовались действующими санитарными нормами: «Гигиеническими требованиями к качеству и безопасности продовольственного сырья, пищевых продуктов» (СанПиН 2.3.2.178-01) и «Ветеринарно-санитарным требованиям к кормам для животных» (1991). Определение микотоксинов проводили по ГОСТ 30711-2001, Р 5116-97, 28038-89, МУ 5177-90, МУ 3184-84, МУ 3245-85. Токсичность кормов и кормового сырья – согласно ГОСТ Р 52337-2005. Для экспериментальных исследований использовали кристаллические Т-2 токсин, афлатоксин В1, зеараленон, полученные в ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

**Результаты исследований.** Проведен мониторинг по оценке безопасности кормов, сельскохозяйственной продукции в Республиках Мордовия, Татарстан, Чувашия, Нижегородской области, Приморском, Краснодарском и Ставропольском краях.

Проведен анализ кормов, кормового сырья, продуктов питания и продовольственного сырья, поступивших из различных регионов РФ на содержание экотоксикантов. Исследовано 1940 образцов, проведено 15940 анализов на содержание микотоксинов (Т-2 токсин, ДОН, афлатоксины В1, В2, G1, G2, М1, фумонизины), микроскопических грибов, выяснялась токсичность кормов.

Установлено, что корма, доставленные из Республики Мордовия, в частности из Октябрьского, Рузаевского, и Чамзинского районов токсичностью не обладали, а из Дубенского района были токсичными. В комбикормах, поступивших из Дубенского района обнаруживались Т-2 токсин и НТ-2 токсин с диапазоном выявления до 290 мкг/кг корма.

В образце кукурузного силоса и сенажа из Октябрьского района выделен афлатоксин В1 в количестве 0,006 и 0,010 мг/кг соответственно. В образце готовой кормосмеси из птицефабрики Чамзинского района также был обнаружен афлатоксин В1 в концентрации 0,005 мг/кг. В пробах ячменя из этого же района идентифицирован Т-2 токсин в количествах 48; 84; 37,5 и 40 мкг/кг.

Установлено, что преимущество в контаминации кормов принадлежит микроскопическим грибам рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*. В частности, в кормах Октябрьского района обнаружены следующие изоляты: *Aspergillus flavus* – 25%, *A. fumigatus* – 25%, *Mucor* sp. – 50%. Корма из Рузаевского района контаминированы *A. fumigatus* – 30%, *A. niger* – 25%, *Mucor* sp. – 20%, а готовые кормосмеси Чамзинского района *A. fumigatus* – 20%, *A. niger* – 20%, *A. ochraceus* – 5%, *A. candidus* – 7%, на долю представителей рода *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. приходится менее 10%.

Выявлено, что корма, доставленные из Дальнеконстантинского района Нижегородской области в 42% случаев обладали токсичностью, 31% – слабой токсичностью, в 15,8% образцах токсичность была обусловлена микотоксинами, так как обнаруживался афлатоксин В1 в концентрациях от 3 до 75 мкг/кг (ПДК 25 мкг/кг). В основном токсичными были образцы жмыха, пивной дробины и овса. Определено, что преимущество в контаминации кормов данного района принадлежит микроскопическим грибам родов: *Aspergillus*, *Mucor*.

Обнаружены изоляты грибов: *Aspergillus flavus* – 80%, *A. ochraceus* – 20%, *Mucor* sp. – 100% образцов, в отдельных образцах обнаруживали *A. fumigatus* – от 30 до 70% от общего числа изолятов, превышение содержание пропагул *A. fumigatus* – в 5% образцов, на долю представителей рода *Fusarium* sp. приходится менее 10%. Выявлено, что корма из Большеболдинского района анализируемой области в 100% случаев обладали токсичностью, в них обнаруживался афлатоксин В1 в концентрациях от 3 до 6 мкг/кг. Установлено, что преимущество в контаминации кормов данного района принадлежит микроскопическим грибам родов: *Aspergillus*, *Mucor* и *Trichoderma*, наличие последнего в образцах ячменя, свидетельствует, что зерно загрязнено почвой.

В кормах из Приморского края дезоксиниваленон обнаруживался в до 52,9% образцов зерна, зеараленон – до 30,8% в диапазоне доз от 100 до 1000 мкг/кг. Чаше встречались ДОН и зеараленон в зерне пшеницы (до 80,0 и 71,7%), Т-2-токсин определяли в 25,3% образцах, в концентрациях ниже ПДК.

Кроме того, проводились исследования кормов из Республики Татарстан, Башкортостан, Марий Эл, Чувашии, Пермского, Алтайского, Краснодарского, Ставропольского края и др. регионов. Анализ продовольственного сырья и продуктов питания на содержание микотоксинов выявил, что образцы проб продуктов питания в основном отвечают требованиям существующих норм. В пшенице из Краснодарского и Ставропольского краев выявлены Т-2 токсин и ДОН в концентрациях  $0,3 \pm 0,1$  и  $1,7 \pm 0,6$  мг/кг.

Выявлены причины массовых отравлений животных и птиц на некоторых с.-х. предприятиях в республике Татарстан (Кукморский, Пестречинский, Балтасинский районы); Марий Эл: (Моркинский, Волжский, Параньгинский и Медведевский районы); Мордовия (Октябрьский, Чамзинский, Дубенский, Рузаевский, Атяшевский районы); республике Чувашия (Цивильский, Вурнарский районы) и Пермском крае (Пермский район).

В исследуемых кормах выявлялись в опасных концентрациях афлатоксины (афлатоксин В1 и др. до 1 мг/кг в плющеном зерне) и трихотеценовые микотоксины в частности токсичный метаболит опасного Т-2 токсина – НТ-2 токсин в диапазоне доз от 69 до 290 мкг/кг, в пробах сенажа и силоса выявлялись токсичные изоляты микроскопических грибов *Aspergillus*. В некоторых районах Республики Марий Эл, выявлен в пробе викоовсяного сенажа Т-2 токсин в концентрации  $0,02-0,05$  мг/кг. В сенаже, поступившем из Кукморского района Республики Татарстан, обнаружен патулин – 0,5 мг/кг.

В патоке свекольной, поступившей из Чувашской Республики, обнаружено высокое содержание нитратов – 6249,0 мг/кг (норма не более 1500,0 мг/кг), превышение в 4,2 раза.

В пробах мясо-костной муки, поступивших из г. Москвы и Самары, обнаружено превышение содержания кадмия (МДУ – 0,4 мг/кг) в 1,5 и 1,75 раз. Выявлено повышенное содержание цинка (МДУ – 50 мг/кг) в 1,13–1,82 раза в комбикормах для кроликов, поступивших из Высокогорского района РТ, содержание ртути (МДУ 0,1 мг/кг) составляло  $0,0005-0,0010$  мг/кг. В образцах проб кормов из Республики Марий Эл обнаружен микотоксин ДОН в пшенице в количестве  $0,13-0,41$  мг/кг. Проведены прецизионные исследования кормов, с.-х. продукции, патматериала, крови. Устанавливалась высокая общая токсичность

кормов. При биопробе на тест-объектах отмечалась высокая их гибель. В кормах выявлялись афлатоксины (афлатоксин В1) и трихотеценовые микотоксины (Т-2 токсин), фузариотоксины (дезоксиниваленол) в диапазоне доз от 6 до 480 мкг/кг, в пробах сенажа и силоса регистрировалось повышенное содержание масляной кислоты (до 0,2%), низкое содержание молочной кислоты, высокая кислотность, высокая бактериальная обсемененность, выявлялись токсичные изоляты микроскопических грибов родов *Aspergillus* и *Fusarium*.

В результате проведенных экспериментов разработаны новые и усовершенствованы существующие методы анализа (ТСХ, ВЭЖХ, ХМ/СМ, ГЖХ, ИФА и др.) для индикации в кормах и продуктах животноводства микотоксинов – монилиформина, афлатоксина, Т-2 токсина и зеараленона.

**Заключение.** В рамках токсикологического контроля проведено усовершенствование существующих и разработка новых методик определения химико-токсикологических веществ. Проведено 15940 анализов на содержание микотоксинов, в образцах проб кормов, продовольственного сырья, пищевых продуктов, предназначенных для реализации, которые в целом обеспечивают их безопасность для жизни и здоровья населения и животных.

По результатам целенаправленного мониторинга в республиках Мордовия, Чувашия, Татарстан, Приморского края и других регионов РФ выявлены характер и степень загрязнения кормов микотоксинами и микроскопическими грибами.

#### Список литературы:

1. Тремасов М.Я. Принципы диагностики отравлений животных. Ветеринария. 2010; 6: 56-8.
2. Иванов А.В. Микотоксикозы животных (этиология, диагностика, лечение, профилактика). М.: Колос. 2008: 140 с.
3. Тутельян В.А. Микотоксины. М.: Медицина, 1985: 320 с.
4. Папуниди К.Х. Обеспечение химической безопасности. Совр. пробл. вет. фармакол. токсикол. Мат. II-го съезда вет. фармакологов и токсикологов России. Казань. 2009: 312-4.
5. Иванов А.В. Микотоксикозы (биологические и ветеринарные аспекты): монография. М.: Колос. 2010: 392 с.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОЙ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТРИХОФИТИИ И МИКРОСПОРИИ ЛОШАДЕЙ

Умитжанов М., Боранбаева Р.С.

Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Алматы

Патогенные грибы, развиваясь и паразитируя в организме животного, вызывают тяжелые хронические заболевания, известные под названием микозов (дерматомикозы, актиномикозы и другие).

Численность лошадей в нашей стране, по данным Агентства Республики Казахстан по статистике за

2014 г., составила более 1,7 млн голов. Успешному развитию коневодства препятствуют особо опасные грибковые болезни, такие как трихофития и микроспория лошадей.

В настоящее время для изготовления вакцины против трихофитии и микроспории лошадей исполь-

зуются коллекционные производственные штаммы патогенных грибов *Trichophyton equinum* F-0181 и *Microsporum equinum* F-0182. Указанные штаммы грибов депонированы в лаборатории генофонда микроорганизмов ТОО «КазНИВИ», на них получены инновационные патенты Республики Казахстан.

Для получения качественной коневодческой продукции (кумыса, мяса и кожевенного сырья) необходимо своевременно проводить плановые профилактические ветеринарно-санитарные мероприя-

тия и специфическую профилактику с применением разработанной нами инактивированной ассоциированной вакцины против трихофитии и микроспории лошадей. С использованием вакцинных штаммов *T. equinum* F-0181 и *M. equinum* F-0182 нами разработана технология изготовления инактивированной ассоциированной вакцины против трихофитии и микроспории лошадей. При испытании вакцины на лабораторных животных получены положительные результаты, которые приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Профилактическая эффективность опытно-экспериментальной инактивированной ассоциированной вакцины против трихофитии и микроспории лошадей на кроликах.

№ п/п	Наименование вакцин	Кол-во ж/х, голов	Доза вакцины (см <sup>3</sup> )	Кратность введения вакцины	Доза заражения (LD <sub>50</sub> ), 2 млн/см <sup>3</sup>	Результаты исследований		Эффективность вакцины (%)
						Заболели	Не заболели	
1	Инактивированная ассоциированная вакцина против трихофитии и микроспории лошадей	10	1,0	2 раза с интервалом 14 сут	5LD <sub>50</sub>	-	10	100
2	Контроль (физиологический раствор)	10	1,0	2 раза с интервалом 14 сут	5LD <sub>50</sub>	10	-	-

Таблица 2. Терапевтическая эффективность опытно-экспериментальной инактивированной ассоциированной вакцины против трихофитии и микроспории лошадей на кроликах

№ п/п	Наименование вакцины	Количество заболевших животных (голов)	Доза вакцины (см <sup>3</sup> )	Кратность введения вакцины	Результаты исследования		Эффективность вакцины (%)
					Заболели	Выздоровели	
1	Инактивированная ассоциированная вакцина против трихофитии и микроспории лошадей	10	2,0	2 раза с интервалом 14 сут	-	10	100

Из данной табл. 1 видно, что кролики были иммунизированы профилактической дозой вакцины дважды с интервалом 14 сут. На 21-е сут после последней иммунизации кроликов нами был подготовлен скарифицированный участок (размером 5x5 см<sup>2</sup>) для заражения. Далее путем втирания заранее отитированной аналогичной эпизоотической культуры трихофитии и микроспории в дозе 0,5 см<sup>3</sup> (5LD<sub>50</sub>) с содержанием 2 млн/см<sup>3</sup> макро- и микроконидий проводили испытание указанной вакцины. При этом установлено, что профилактическая доза вакцины предохраняет лабораторных животных от грибковой инфекции на 100% случаев.

В контрольной группе у кроликов наблюдали типичную клиническую картину трихофитии и микро-

спории. Для этой группы животных была испытана двойная профилактическая доза вакцины (терапевтическая доза), результаты представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что больные трихофитией кролики после двукратного применения терапевтической дозы инактивированной ассоциированной вакцины против трихофитии верблюдов с интервалом 14 сут в дозе 2,0 см<sup>3</sup> на 28–30-е сут после последнего введения терапевтической дозы вакцины начали выздоравливать. На местах заражения наблюдали шелушение и отпадение корок и появление новой шерсти. Эффективность терапевтической дозы инактивированной ассоциированной вакцины против трихофитии и микроспории лошадей составила 100%.



## РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФОРМАТОВ ЭКСПРЕССНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ

Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.  
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Микотоксины, низкомолекулярные метаболиты плесневых грибов, являются одними из приоритетных токсичных контаминантов пищевой продукции. Для обеспечения широкого и производительного мониторинга контаминации необходима разработка аналитических методов, обеспечивающих снижение предела обнаружения и сокращение продолжительности тестирования (включая пробоподготовку). С этой целью были разработаны новые форматы иммунохроматографического и иммуноферментного анализов (ИХА и ИФА) микотоксинов, проведена их апробация.

Для высокочувствительного детектирования аналитов в иммунохроматографии предложено использование сочетания немодифицированных специфических антител и меченных коллоидным золотом антивидовых антител. Данный подход обеспечивает более эффективное выявление конкурентного взаимодействия специфических антител с потенциально содержащимся в тестируемой пробе аналитом и тем самым сдвигает рабочий диапазон анализа в область более низких концентраций. На примере афлатоксина В1 показано, что предлагаемое не прямое мечение иммунных комплексов в иммунохроматографии приводит к снижению предела обнаружения в 10 раз, позволяя выявлять до 20 пг/мл микотоксина.

Для иммуноферментных аналитических систем предложено использование иммуносорбентов на основе магнитных наночастиц. Данный подход позволяет:

- проводить иммунохимические взаимодействия в объеме реакционной среды (минимизируя диффузионные затруднения) с последующим быстрым отделением в магнитном поле детектируемых иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов – что приводит к сокращению продолжительности анализа;
- концентрировать детектируемый аналит из большого объема пробы, – тем самым снижая предел обнаружения.

Особенностью предлагаемых методик является непосредственное выявление иммунных комплексов с помощью ферментной метки, связанной с магнитным иммуносорбентом, – без элюции антигена, используемой в обычных схемах иммуноаффинной очистки. Благодаря этому суммарная продолжительность ИФА составляет не более 30 мин (с 5-минутным специфическим иммунным взаимодействием), а предел детекции в случае афлатоксина В1 – 2 пг/мл.

Установлено также, что иммобилизация антител на поверхности нанодиспергированного оксида железа повышает их стабильность к денатурирующему действию органических растворителей. Данное свойство позволяет проводить тестирование водно-метанольных экстрактов растительной сельскохозяйственной продукции с минимальным разведением (конечное содержание метанола при проведении иммунохимической реакции – 30%), тем самым снижая потери чувствительности аналитической системы.

Разработанные методики апробированы для тестирования проб кукурузы и ячменя, предварительно охарактеризованных традиционно используемыми хроматографическими методами. Показана высокая степень достоверности данных ИФА и ИХА: степень выявления микотоксинов – не менее 90%.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения разработанных методов для массового скринингового контроля контаминации микотоксинами сельскохозяйственной продукции, кормов и продуктов питания.

*Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (контракт 14.607.21.0015 от 05 июня 2014; уникальный идентификатор соглашения: RFMEFI57714X0034).*

## СКРИНИНГ СРЕДСТВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ПРИ Т-2 МИКОТОКСИКОЗЕ

Валиев А.Р., Семенов Э.И., Хусаинов И.Т., Спиридонов Г.Н., Тремасов М.Я.  
ФЦ токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

У исследователей особый интерес вызывает иммунодепрессивные свойства микотоксинов (Рухляда В.В. и др. 2009), которые проявляются уменьшением хемотаксиса и фагоцитоза нейтрофилов и макрофагов (Gerberic G. et al., 1984; Niyo K. et al., 1988; Vidal D., 1990). Одним из наиболее токсичных микотоксинов является Т-2 токсин. Многочисленными исследованиями показано, что органами-мишенями Т-2 токсина являются костный мозг, селезенка, вилочковая железа,

лимфоидная ткань, а у птиц еще и фабрициева сумка (Красников Г.А. и др., 1992; McDonald E., 1987). При этом регистрируют подавление иммунной системы, задержку роста и снижение продуктивности животных и птицы, нарушение функции воспроизводства (Котик А.П., 1997; Труфанов О.В., 2011). Снижая резистентность организма, они могут способствовать развитию инфекционных и незаразных заболеваний. Одним из компонентов комплексного лечения живот-

ных с отравлениями может быть иммунотерапия с целью восстановления реактивных свойств иммунной системы и организма в целом (В.В. Исаев и др., 2004). Такой подход к лечению животных с отравлениями представляется перспективным в свете существования единой системы иммунонейроэндокринной регуляции гомеостаза (А.Б. Полетаев, С.Г. Морозов, И.Е. Ковалев, 2002).

**Цель исследований** – скрининг эффективных и доступных иммуномодуляторов для фармакокоррекции иммуносупрессии, вызванной микотоксином Т-2.

**Материалы и методы.** Опыты проведены на 60 половозрелых самцах нелинейных белых крыс массой тела 160–180 г, разделённых на 5 групп по 12 особей в каждой. Животным 1-й группы вводили Т-2 токсин в виде 5%-ного водно-спиртового раствора внутрижелудочно, в дозе 1/5 ЛД<sub>50</sub> (0,64 мг/кг массы тела), ежедневно. Крысам 2-й группы вводили ежедневно Т-2 токсин в виде 5%-ного водно-спиртового раствора внутрижелудочно, в дозе 1/5 ЛД<sub>50</sub> и иммуностимулятор левамизол внутрижелудочно в дозе 4 мг/кг массы в течение 3 сут, после 4-дневного перерыва, вновь вводили в течение 3 сут. Животным 3-й группы – ежедневно внутрижелудочно Т-2 токсин (1/5 ЛД<sub>50</sub>) и ксимедон в дозе 75 мг/кг массы ежедневно. 4-й группе крыс ежедневно вводили внутрижелудочно Т-2 токсин и димефосфон в дозе 90 мг/кг массы каждый день. Животным 5-й группы – ежедневно вводили внутрижелудочно Т-2 токсин (1/5 ЛД<sub>50</sub>) и тималин внутримышечно в дозе 0,2 мг/кг массы в течение 5 сут. Длительность опыта составила 15 сут. Кроме того, всех животных вакцинировали вакциной против эшерихиоза животных, изготовленной в лаб. болезни молодняка ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», внутримышечно в дозе 0,5 мл/гол.

Для экспериментальных исследований использовали кристаллический Т-2 токсин, предварительно полученный нами в лаборатории микотоксинов ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». В качестве продуцента Т-2 токсина использовали грибок *Fusarium sporotrichioides* штамм 2м15, любезно предоставленный д. б. н. А.Н. Котиком.

В качестве параметров контроля течения токсикоза служили клинические признаки, гематологические показатели, показатели неспецифической резистентности крыс, содержание Т- и В-лимфоцитов и титры антител. Полученные данные сравнивали с фоновыми. В качестве потенциальных лечебно-профилактических средств использовались следующие препараты: левамизол, ксимедон, димефосфон, тималин. Гематологические исследования, включающие определение количества эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина определяли с помощью гематологического анализатора «Mythic 18» и общепринятыми методами (Кондрахин И.П., 2004).

Животных в ходе опыта вакцинировали вакциной против эшерихиоза животных, произведенной в ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и любезно предоставленной зав. лаб. болезней молодняка, к.в.н. Спиридоновым Г.Н. Титры антител определяли в реакции агглютинации (РА). За титр антител принимали последнее разведение, в котором наблюдалась четкая агглютинация. Постановка реакции агглютинации сопровождалась контролем сыворотки и антигена. Учет пробирочной

реакции агглютинации производили предварительно через 2 ч инкубации пробирок при 37 °С и окончательно через 18 – 20 ч.

Лизоцимную активность сыворотки крови определяли по Маркову Ю.М. (1979). Определение фагоцитарной активности нейтрофилов проводили по Гостеву В.С. с соавт. (1979). Содержание Т- и В-лимфоцитов в периферической крови определяли с помощью метода спонтанного розеткообразования с эритроцитами козла.

**Результаты исследований.** Динамика изменений гематологических показателей при Т-2-токсикозе на фоне использования иммуностимуляторов представлена в табл. 1.

Табл. 1. Гематологические показатели белых крыс при экспериментальном Т-2 токсикозе на фоне применения иммуностимуляторов (n=6)

Срок иссл., сут	Группа	Показатель		
		эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Нб, г/л
Фон		7,34±0,23	9,52±0,41	152,50±4,0
7	1	6,81±0,21	8,83±0,21	149,80±3,9
	2	7,07±0,25	9,18±0,19	151,40±4,1
	3	7,06±0,22	9,18±0,29	150,10±3,8
	4	7,04±0,21	9,23±0,24	150,20±3,7
	5	7,05±0,29	9,21±0,22	150,10±3,8
15	1	5,56±0,19***	7,01±0,23***	144,80±3,5
	2	5,88±0,27*	7,48±0,21***	146,20±3,7
	3	5,97±0,24*	7,37±0,27***	145,10±2,9
	4	6,18±0,26	7,95±0,24**	147,20±3,4
	5	6,14±0,27	8,07±0,28*	147,50±4,6

Примечание: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

Из данных табл. 1 следует, что у животных во всех группах регистрировалось уменьшение количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина. Так, в 1-й группе животных на фоне введения токсина без применения иммуностимуляторов («токсический контроль»), количество эритроцитов на 7 и 15 сут уменьшалось на 7,2 и 24,3%; количество лейкоцитов – на 7,3 и 26,4%; содержание гемоглобина на 1,8 и 11,6% соответственно.

Во 2-й группе животных с применением левамизола на 7-е сут снижение количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина было незначительно и составило 3,7; 3,6 и 0,7%; однако на 15-е сут уменьшение было более выраженным и составило – 19,9; 21,4 и 9,4% соответственно, относительно фоновых величин, но менее выражено относительно показателей 1-й группы крыс.

В 3-й группе животных с применением ксимедона на 7-е сут уменьшение содержания эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина незначительно отличалась от

показателей 2-й группы и составило 3,8; 3,6 и 1,6%; на 15-е сут применение препарата оказало определённое защитное действие на гематологические показатели, а уменьшение данных относительно фоновых величин составило – 18,7; 22,6 и 10,1% соответственно. Но это снижение было менее выражено в сравнении с группой токсического контроля.

В 4-й группе животных с применением димефосфона, на 7 сут снижение количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина составило 4,1; 3,1 и 1,6%; на 15 сут – на 15,8; 16,5 и 8,7% соответственно.

В 5-й группе животных с применением тималина, на 7-е сут снижение количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина составило 4,0; 3,3 и 1,6%; на 15 сут – на 16,4; 15,2 и 9,2% соответственно. Результаты опытов свидетельствуют, что применение ксимедона, димефосфона и тималина оказывало защитный эффект на гематологические показатели животных.

Результаты исследований неспецифической резистентности крыс при введении Т-2 микотоксина на фоне применения иммуностимуляторов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Показатели неспецифической резистентности белых крыс при экспериментальном Т-2 токсикозе на фоне применения иммуностимуляторов (n=6)

Срок иссл. сут.	Группа	Показатель			
		ФА, %	ФЧ, ед.	ФЁ, 10 <sup>9</sup> /л	Активность лизоцима, %
Фон		63,93±1,17	5,22±0,47	49,69±3,04	46,25±0,81
7	1	66,82±1,34	5,40±0,39	47,68±3,17	44,74±1,07
	2	67,71±1,57	5,36±0,51	49,20±2,57	45,23±0,93
	3	65,73±1,19	5,38±0,49	49,39±3,08	45,07±1,17
	4	64,94±1,07	5,41±0,62	49,93±2,75	45,14±1,09
	5	65,82±1,12	5,41±0,54	49,83±3,19	44,93±0,87
15	1	54,87±1,28***	4,60±0,56	32,25±3,41**	42,52±0,96*
	2	56,36±1,39**	4,83±0,74	36,13±3,82*	42,53±1,24*
	3	58,05±1,57*	4,87±0,68	35,89±2,94**	42,96±0,98*
	4	59,94±1,49	5,26±0,59	41,82±3,79	42,71±1,29*
	5	59,06±1,61*	5,03±0,73	40,59±3,19	42,82±1,34

Примечание: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

Из данных табл. 2, следует, что лизоцимная активность у животных в 1-й группе снижалась на 7 и 15 сут на 3,3 и 8,1%; во 2-й группе – на 2,2 и 8,0%; в 3-й – на 2,6 и 7,1%; в 4-й – на 2,4 и 7,7%, в пятой – на 2,9 и 7,4% соответственно.

Фагоцитарная активность у крыс в 1-й группе на 7-е сут увеличивалась на 4,5%, на 15-е сут уменьшалась на 14,2%. Во 2-й группе на 7-е сут возрастала на 5,9%, а на 15-е сут снижалась на 11,8%. В 3-й на 7-е сут увеличивалась на 2,8%, а на 15-е сут – уменьшалась на 9,2%. В 4-й группе животных на 7-е сут увеличивалась на 1,6 %, а на 15-е сут – уменьшалась на 6,2%. В 5-й – на 7-е сут увеличивалась на 3,0%, а на 15-е сут – уменьшалась на 7,6%.

Фагоцитарное число в 1-й группе животных на 7-е сут увеличилось на 3,5%, к 15 сут уменьшилось – на 11,9%. Во 2-й группе происходило увеличение на 7-е сут на 2,7% и уменьшение фагоцитарного числа к 15-е сут на 7,5%. В 3-й группе животных на 7-е сут фагоцитарное число увеличилось на 3,1%, на 15-е сут уменьшалось – на 6,7%. В 4-й группе на 7-е сут фагоцитарное число увеличилось на 3,6%, а к 15-е сут увеличивалось – на 0,8%. В 5-й группе на 7-е сут фагоцитарное число увеличилось на 3,6% и на 15-е сут уменьшалось – на 3,6%.

Фагоцитарная ёмкость животных в первой группе закономерно снижалась на 7- и 15-е сут на 2,1 и 32,6% соответственно. Во 2-й группе на 7-е сут увеличилась – на 0,5%, на 15-е – снизилась на 25,4%. В 3-й группе данный показатель снизился на 7-е и 15-е сут на 1,6 и 22,6% соответственно. В 4-й группе животных снижение показателя в эти же сроки составило 1,1 и 14,9% соответственно. В 5-й группе величина фагоцитарной ёмкости снизилась на 7- и 15-е сут на 1,6 и 22,6% .

Результаты изучения содержания Т- и В-лимфоцитов на 15-е сут опыта представлены в табл. 3.

Табл. 3. Содержание Т- и В – лимфоцитов в крови белых крыс при экспериментальном Т-2 токсикозе на фоне применения иммуностимуляторов (n=6)

Срок иссл. сут.	Группа	Показатель	
		Т-лимфоциты, %	В-лимфоциты, %
Фон		55,34±0,78	22,54±0,51
15	1	46,37±0,57***	20,06± 0,59**
	2	48,32± 1,18***	20,53± 0,53*
	3	48,84± 1,12***	20,68± 0,69
	4	50,08± 0,59***	21,17± 0,68
	5	50,84± 0,73**	21,13± 0,71

Содержание Т- и В-лимфоцитов животных в крови всех групп закономерно снижалось на 15-е сут. В частности, изменения были следующими: в 1-й группе опытных животных (введение Т-2 токсина в дозе 1/5 ЛД50) снижение количества Т- и В-лимфоцитов составило 16,2 и 11,0% соответственно. Во 2-й группе животных (введение Т-2 токсина и левамизола) понижение было менее значительным и составило 12,7 и 8,9% соответственно. Показатели животных 3-й группы (введение Т-2 токсина и ксимедона) характеризовались также незначительным снижением Т- и В- клеток и составили на 15-е сут – 11,8 и 8,3% соответственно. У опытных животных 4-й группы (введение Т-2 токсина и димефосфона) снижение Т- и В- лимфоцитов составило 9,5 и 6,1% соответственно. Показатели крови 5-й группы (введение Т-2 токсина и тималина) отличились минимальным снижением количества Т- и В-лимфоцитов, которое составило 8,1 и 6,3% соответственно относительно фоновых результатов.

Результаты исследования содержания антител сыворотки крови белых крыс при различных разведениях на фоне применения иммуностимуляторов представлены в табл. 4.

Табл. 4. Содержание антител в реакции агглютинации сыворотки крыс при вакцинации на фоне применения иммуностимуляторов при подостром Т-2 токсикозе ( $n=6$ ).

Разведение сыворотки	Группа животных				
	1	2	3	4	5
1:5	#	#	#	#	#
1:10	#	#	#	#	#
1:20	#	#	#	#	#
1:40	#	#	#	#	#
1:80	–	#	#	#	#
1:160	–	–	#	#	#
1:320	–	–	#	–	#
1:640	–	–	–	–	–
1:1280	–	–	–	–	–
Контроль: Ат+физ. р-р	–	–	–	–	–

Как показали результаты исследований, максимальное количественное содержание антител в сыворотке (титр) наблюдается в 3-й (Т-2 токсина + ксимедон) и пятой (Т-2 токсина + тималин) группах опытных животных (1:320). Для 1-й группы (Т-2 токсин) закономерно характерен наименьший показатель титра – 1:40. Уровень титра антител отмечался во 2-й

(Т-2 токсина + левамизол) и четвертой (Т-2 токсин + тималин) группах – 1:80 и 1:160 соответственно.

Таким образом, результаты опыта свидетельствуют, что все иммуностимуляторы оказали защитный эффект, который выражался в положительных изменениях гематологических, иммунологических показателей, параметров неспецифической резистентности. Установлено, что из изученных иммуностимуляторов наиболее выраженный защитный эффект при интоксикации крыс Т-2 токсином показали (по возрастающей) ксимедон, димефосфон и тималин. Однако по показателям титра антител тималин оказался более эффективным.

#### Список литературы

- Исаев В.В. Средство коррекции иммунологического гомеостаза у телят с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней. Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных: материалы междунар. науч.-практ. конф. Воронеж. 2004: 471-5.
- Котик А.Н. Препараты для лечения и профилактики субклинических микотоксикозов. Ветеринария. 1997; 8: 14-7.
- Красников Г.А. Гистологические и биохимические изменения при микотоксикозах птицы. Ветеринария. 1992; 4: 32-4.
- Полетаев А.Б. Регуляторная метасистема (иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза). М.: Медицина. 2002: 168 с.
- Рухляда В.В. Микромитозы зерна пшеницы разных почвенно-климатических регионов Украины и токсичность *Fusarium* spp. Труды ВИЭВ: Всерос. науч.-исслед. ин-т эксперим. ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2009; 75: 555 с.
- Труфанов О.В. Диагностика и предупреждение микотоксикозов в птицеводстве. Семинар по проекту Седьмой Рамочной Программы ЕС Mucored «Пути снижения контаминации микотоксинами сельскохозяйственной продукции в России и ЕС: современные исследования и практические разработки». Материалы. Москва. 9-10 июня 2011 г. М. 2011: 43-5.
- Gerberick GF, Sorenson WG, Lewis DM. The effects of T-2 toxin on alveolar macrophage function in vitro. Environ Res. 1984; 33(1): 246-60.
- Mc Donald E. Effect of acute oral administration of the cardiovascular systems of rats. Pharmacol Toxicol Suppl. 1987; 60(3): 206-16.
- Niyo KA. Effects of T-2 mycotoxin ingestion on phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by rabbit alveolar macrophages and on hematologic, serum biochemical, and pathologic changes in rabbits. Am J Veter Res. 1988; 49(10): 1766-73.
- Vidal D. Proprietes immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothecenes. Bull Inst Pacteur. 1990; 88: 159-82.

## МИКОТОКСИНЫ В СИЛОСЕ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ОПАСНОСТЬ ВОЗНИКНОВЕНИЯ МИКОТОКСИКОЗОВ У КОРОВ

*Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Лантев Г.Ю., Новикова Н.И., Филиппова В.А., Никонов И.Н.  
БИОТРОФ+, Санкт-Петербург*

Проблемы, связанные с неполноценным кормлением, сопряжены в первую очередь с неправильной заготовкой и хранением кормов. Следствием этого является поражение силоса микотоксинами. Присутствие микотоксинов в сырье – серьезная проблема, которая связана с тем, что поступление микотоксинов в организм вызывает патологические изменения, представляющие собой синдром, названный микотоксикозом. Присутствие микотоксинов в организме животных в малых дозах приводит к снижению продуктивности, прироста массы тела, созданию благоприятных условий для развития многих инфекционных заболеваний. Наибольшая восприимчивость к негативному воздействию микотоксинов проявляется у высокопродуктивных коров, поскольку рост продуктивности всегда сопровождается повышенной чувствительностью к стрессам. Выявлено, что до 6% микотоксинов, поступающих в организм КРС с кормами, могут проникать в молоко, следовательно, могут представлять опасность для здоровья человека (Диаз и др., 2006).

Исследования по анализу накопления микотоксинов в кормовом растительном сырье и готовом силосе были проведены в лаборатории ООО «БИОТРОФ+» в 2014 году. Анализ содержания микотоксинов был проведен в 19 пробах кормового растительного сырья из пяти животноводческих хозяйств Ленинградской области и в 71 пробе готового силоса из 17 животноводческих хозяйств Ленинградской, Ярославской областей и Краснодарского края. Анализ количества микотоксинов (афлатоксина, охратоксина, Т-2-токсина, зеараленона, дезоксиниваленола (ДОН)) в образцах кормового растительного сырья и силоса проводили с использованием иммуноферментного метода (ИФА) согласно ГОСТ 31653-2012.

На сегодняшний день практически отсутствуют сведения по распространению микотоксинов в сочных кормах, поскольку в России не проводится систематический мониторинг их присутствия. Целью исследования был поиск микотоксинов в кормовом растительном сырье и в силосе, заготавливаемом для крупного рогатого скота.

Присутствие микотоксинов было зафиксировано во всех образцах кормового растительного сырья и силоса из хозяйств Ленинградской, Ярославской областей и Краснодарского края. В исследованных образцах было выявлено наличие следующих микотоксинов: афлатоксины, дезоксиниваленол, охратоксин, зеараленон и Т-2-токсин – с высокими уровнями накопления.

При этом количество проб кормового растительного сырья, пораженного двумя и более микотоксинами, составило 100% от общего количества исследованных проб, а силоса – 91,7% в Ленинградской области и 100% – в Ярославской области и Краснодарском крае.

Превышение ПДК по содержанию отдельных микотоксинов в растительном сырье из хозяйств

Ленинградской области было обнаружено в 32–79% случаях, в готовом силосе из хозяйств Ленинградской области – в 29–82%, Ярославской области – в 22–100%, Краснодарского края – в 7–100% случаев.

В отдельных случаях концентрации микотоксинов достигали значений, во много раз превосходящих максимально допустимые уровни: в кормовом растительном сырье – до 4,6 раза, в готовом силосе – до 23,0 раз.

Доминирующими среди набора различных микотоксинов в кормовом растительном сырье были афлатоксины и ДОН с превышениями ПДК в среднем в 2,8 и 2 раза соответственно. При этом в силосе доминирующими были афлатоксины, охратоксин и Т-2-токсин со значительными превышениями предельно допустимых концентраций – в 2,7, 10,1 и 1,9 раза соответственно в Ленинградской области, в 2,9, 10,5 и 1,8 раза – в Ярославской области, в 1,9, 8,2 и 4 раза – в Краснодарском крае.

Анализ накопления отдельных микотоксинов показал, что в готовом силосе по сравнению с кормовым растительным сырьем количество проб, пораженных афлатоксинами с превышением ПДК, увеличивается незначительно, тогда как пораженных охратоксином и Т-2-токсином – увеличивается в среднем в 3 и 1,6 раза соответственно, ДОН – снижается в среднем в 3 раза. При этом количество проб, пораженных зеараленоном с превышением ПДК, наблюдается в 77,2% случаев в готовом силосе, тогда как в кормовом сырье не было выявлено ни одного случая.

Полученные закономерности связаны с тем, что продуценты микотоксинов можно разделить на так называемые «полевые» и «амбарные». «Полевые» грибы рода *Fusarium* (продуценты зеараленона, Т-2-токсина и ДОН) начинают выработку микотоксинов во время вегетации растений и могут продолжать её при благоприятных условиях в период хранения кормов. «Амбарные» грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* (продуценты афлатоксинов и охратоксина) по данным исследователей активизируются только при хранении кормов (Диаз, 2006).

Тем не менее проведенные исследования показывают, что в процессе роста растений наряду с микотоксинами (в основном Т-2-токсином и ДОН), продуцируемыми «полевыми» грибами, выявляются также и микотоксины (афлатоксины и охратоксин), продуцируемые «амбарными» грибами.

При этом отмечено, что в процессе силосования закономерно снижается количество ДОН и увеличивается – охратоксина. Интересно отметить, что количество зеараленона и Т-2-токсина, продуцируемое «полевыми» грибами, увеличивается, что связано, вероятно, с созданием при хранении силоса благоприятных условий для синтеза данных микотоксинов.

Таким образом, результаты анализа накопления микотоксинов впервые показали, что уже на стадии роста растения поражаются микотоксинами в ре-

зультате развития как «полевых», так и «амбарных» грибов. В процессе хранения силоса накопление микотоксинов, продуцируемых «амбарными» и «полевыми» грибами, усугубляется, что свидетельствует о создании благоприятных условий для их синтеза. Учитывая важность проблемы, на основании полученных результатов для заготовки качественного силоса необходимо применять консервирующие препараты с мощной антифунгальной активностью, сдерживающие накопление грибов – продуцентов микотоксинов.

В заключение, необходимо отметить, что широкое распространение микотоксинов в силосе может являться причиной возникновения микотоксикозов у коров. Необходимо отметить особую опасность афла-

токсинов – микотоксинов, которые могут переходить в молоко и другие молочные продукты.

*Исследование выполнено при использовании гранта Российского научного фонда по научному проекту «Выявление биоразнообразия и трофического статуса микробиоты кормовых культур в связи с созданием качественных и биологически безопасных кормов» № 14-16-00114.*

#### Список литературы

1. Диаз Д. Микотоксины и микотоксикозы. М.: Печатный город, 2006: 382 с.
2. ГОСТ 31653-2012. Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА БИОКОНТРОЛЯ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РОСТА ОХРАТОКСИГЕННЫХ ГРИБОВ ИЗ СЕКЦИИ *ASPERGILLUS NIGRI* В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ ИЗЮМА

*Григорян К.М., Акопян Л.Л., Саргсян М.П.*

*Ереванский государственный университет, Биологический факультет*

Проблема контаминации разных видов сушеного винограда охратоксигенными грибами из секции *A. Nigri* является актуальной для многих стран с развитым виноградарством. Из всех известных сухофруктов, сушеный виноград и разные виды изюма являются наиболее благоприятным субстратом для роста и развития грибов из секции *A. Nigri*.

**Цель работы** – разработка метода биологического контроля для предотвращения развития микотоксигенных грибов в изюме в период его хранения.

Результаты проведенного мониторинга образцов изюма, приготовленных из темных армянских сортов винограда, показали, что виды *A. niger* van Tiegh., *A. carbonarius* (Bainier) Thom и *A. tubingensis* (Mosseray) для этого наиболее полезны.

В экспериментальных условиях изучено влияние прополиса, смеси перекиси водорода с прополисом и экстракта чайного гриба на рост и развитие охратоксигенных штаммов *A. carbonarius*, изолированных из образцов изюма. Оценку антигрибной активности приготовленных смесей проводили дисковым методом, с определением процента ингибирования роста штамма *A. carbonarius*.

Экстракт чайного гриба не проявил ингибирующее действия на рост охратоксигенного штамма *A. carbonarius*. Результаты определения антигрибной активности прополиса и смеси прополиса с перекисью водорода показали, что наиболее высокой ингибирующей активностью обладал 0,15%-ный раствор

смеси прополиса с перекисью водорода. При этом имело место 100%-ное ингибирование роста мицелия *A. carbonarius* в чашках Петри при использовании широкого спектра селективных сред.

В контрольном варианте диаметр роста тестируемого штамма составил 65–75 мм в конце 14 сут инкубирования. При испытании более низких концентраций смеси прополиса и перекиси водорода отмечалось подавление роста тестируемого штамма на 65,3% по сравнению с контрольным вариантом.

При испытании спиртовых экстрактов разных концентраций прополиса, максимальное ингибирование роста тестируемого штамма (на 55%), отмечали при использовании 50%-ного спиртового экстракта прополиса.

Одновременно изучено влияние экстракта прополиса и смеси экстракта прополиса с перекисью водорода на рост охратоксигенных грибов в изюме. Образцы изюма, предварительно инокулированные суспензией спор тестируемого штамма *A. carbonarius*, обрабатывали испытуемыми веществами. В контрольных образцах наблюдали обильный рост *A. carbonarius*. В образцах изюма, обработанных спиртовым раствором прополиса, имело место сильное торможение роста гриба, при этом после 30-сут хранения наблюдали незначительный рост гриба *A. carbonarius*.

В образцах изюма, обработанных смесью прополиса и перекиси водорода, не отмечался рост гриба при их хранении в течение 6 мес при 25 °С.

**Национальная академия микологии**  
ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

## **СОВРЕМЕННАЯ МИКОЛОГИЯ В РОССИИ**

Current Mycology in Russia

Том 5

Выпуск 6.

**Грибные биотехнологии**

Глава 13.

**Культивируемые грибы**

Volume 5

Issue 6.

**Biotechnology from fungi**

Chapter 13.

**Cultivable fungi**

DOI: 10.14427/cmr.2015.v.13

## Глава 13. Грибные биотехнологии

ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА МАРГАНЦА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ АКВАНАНОТЕХНОЛОГИЙ, НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ МИЦЕЛИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В КУЛЬТУРЕ Аль-Маали Г.А. ....	267
ПОЛУЧЕНИЕ БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК ГРИБОВ В КАЧЕСТВЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ Альмяшева Н.Р., Бескоровайная Д.А., Копицын Д.С., Барков А.В., Новиков А.А. ....	269
ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ Ананьева Е.П., Гурина С.В., Псурцева Н.В. ....	270
ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА МОЛОДЫХ КОНЬЯЧНЫХ СПИРТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОТДЕЛЬНЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА Арутюнян М.Ж., Нанагюлян С.Г., Арутюнян Ш.Г. ....	273
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ И МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МИЦЕЛИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛИПОРОВЫХ ГРИБОВ Бадалян С.М., Гарибян Н.Г. ....	275
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА ДВУХ ПОЛИПОРОВЫХ ВИДОВ: <i>FOMES FOMENTARIUS</i> И <i>FOMITOPSIS PINICOLA</i> Бадалян С.М., Шахбазян Т.А. ....	277
ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТИВНОСТИ СУБСТРАТОВ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ ГРИБОВ РОДА <i>PLEUROTUS</i> Бандура И.И. ....	279
ОБРАЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ МИКРОМИЦЕТА <i>ASPERGILLUS TERREUS</i> В УСЛОВИЯХ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Баранова Н.А., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Пискункова Н.Ф., Звонарева Е.С., Кураков А.В., Егоров Н.С. ....	282
ОТБОР ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ – ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ ПО ПРОДУКТИВНОСТИ БИОМАССЫ Бардашева А.В., Косогова Т.А., Теплякова Т.В. ....	284
ПОЛУЧЕНИЕ ОБОГАЩЕННОГО ЭНДОГЛЮКАНАЗОЙ 1 ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА С ПОМОЩЬЮ НОВОГО МУТАНТА <i>TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM</i> TW1-59-27 – ПРОДУЦЕНТА ЦЕЛЛЮЛАЗ И КСИЛАНАЗ Беккаревич А.О., Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Бубнова Т.В., Матыс В.Ю., Окунев О.Н., Осипов Д.О., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. ....	286
ПЛОДОНОШЕНИЕ КСИЛОТРОФНЫХ ГРИБОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ Богдаев А.А., Богдаев А.Г. ....	287
О РОЛИ МУТАЦИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕ ШИИТАКЕ ( <i>LENTINUS EDODES</i> ) Богдаев А.Г., Богдаев А.А. ....	287
РОЛЬ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В БИОСИНТЕЗЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ Богомолова Е.В., Панина Л.К. ....	288
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА КАРОТИНОИДОВ: ДРОЖЖИ РОДА <i>RHODOTORULA</i> Бондаревич Н.В., Кантерова А.В., Новик Г.И. ....	290
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПРИ ХРАНЕНИИ ШТАММОВ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ Борисенко О.А. ....	291
ПОЛУЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ МИКРОМИЦЕТА <i>ASPERGILLUS NIGER</i> CNMN FD-10. Чилочи А.А., Тюрина Ж.П., Клапко С.Ф., Лаблюк С.В., Дворнина Е.Г. ....	291



АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ – ЭНДОБИОНТОВ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Васильева Б.Ф., Ефременкова О.В. ....	294
ТЕХНИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПОЛУЧЕНИЕ БИОДИЗЕЛЯ Феофилова Е.П., Ивашечкин А.А., Мысякина И.С., Бокарева Д.А., Лунин В.В. ....	295
ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ <i>PLEUROTUS ERYNGII</i> (DC) Quel. – МАКРОМИЦЕТА, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В ПИЩЕВЫХ И МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЯХ Гарибова Л.В., Завьялова Л.А., Инсарова И.Д., Джавахян Б.Р. ....	296
ЭКЗОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОМИЦЕТА <i>PENICILLIUM CITRINUM</i> – ПРОДУЦЕНТА КЕРАТИНАЗЫ Гордонова И.К., Никитина З.К. ....	297
ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА ОКСИДАЗНЫЙ КОМПЛЕКС <i>TRAMETES HIRSUTA</i> CF-28 – ПРОДУЦЕНТА ВЫСОКОПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЛАККАЗЫ Горшина Е.С., Русинова Т.В., Анисимова Е.О., Бирюков В.В. ....	299
МУЛЬТИЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ДИКОРАСТУЩИХ МАКРОМИЦЕТОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ Гродзинская А.А., Самчук А.И. ....	301
ВЛИЯНИЕ КОГЕРЕНТНОГО СВЕТА НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА МИЦЕЛИЯ ШТАММОВ <i>LAETIPORUS SULPHUREUS</i> (BULL.) MURILL, <i>FOMITOPSIS OFFICINALIS</i> (VILL.: FR.) BOND. ET SING., <i>FOMITOPSIS PINICOLA</i> (SW.: FR) P. KARST. И <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> (L.: FR.) LLOYD Громовых Т.И., Жилинская Н.В., Иванов А. В. ....	303
ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ <i>PENICILLIUM TARDUM</i> Гудзенко Е.В. ....	305
ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГРИБОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ Гунар О.В., Сахно Н.Г. ....	306
РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ РЕШЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИЭНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ПОЧВЕННЫМИ АКТИНОМИЦЕТАМИ Ибрагимов В.Х. ....	307
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПИТАТЕЛЬНОГО СУБСТРАТА В ИНТЕНСИВНОЙ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (CURTIS) P. KARST Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Гарибова Л.В., Лихачев А.Н. ....	310
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОЦЕССА СТУПЕНЧАТОЙ БИОКОНВЕРСИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СУБСТРАТА ГРИБАМИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКИХ ГРУПП Ильин Д.Ю., Ильина Г.В., Гарибова Л.В., Лихачев А.Н. ....	311
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ДЛЯ ПРЯМОЙ КОНВЕРСИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ В БИОЭТАНОЛ Кожевникова Е.Ю., Барков А.В., Бескоровайна Д.А., Винокуров В.А. ....	313
ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА ПОВЕРХНОСТНУЮ И ПОГРУЖЕННУЮ КУЛЬТУРУ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА <i>GANODERMA LUCIDUM</i> Краснопольская Л.М., Ярина М.С., Шипилов Я.С. ....	314
СОЗДАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОМАССЫ ВЫСШИХ ГРИБОВ Круподёрова Т.А., Барштейн В.Ю., Пешук Л.В., Гащук А.И., Москалюк О.Е. ....	315
ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ <i>HYPsizYGUS MARMOREUS</i> Кудрявец Е.В., Красинько В.О., Ломберг М.Л. ....	317
ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ РОДА <i>PLEUROTUS</i> Кузнецова О.В. ....	317
ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИЦЕЛИЯ ДОЖДЕВИКА ГИГАНТСКОГО НА РАЗЛИЧНЫХ ПО СОСТАВУ ТВЕРДЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ Лавлинский А.В., Богдаев А.Г., Гамаюнова М.А. ....	320
СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА, СЕРЕБРА, СЕЛЕНА, КРЕМНИЯ И ГЕРМАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ РАЗНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП Ветчинкина Е.П., Лощинина Е.А., Курский В.Ф., Буров А.М., Никитина В.Е. ....	321

ПОДБОР СТАБИЛИЗАТОРОВ И КОНСЕРВАНТОВ ПРЕПАРАТА КАТАЛАЗЫ <i>PENICILLIUM PICEUM</i> БИМ F-371 Д Мороз И.В., Михайлова Р.В. ....	324
РАЗНООБРАЗИЕ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ Мурадов П.З., Бунятова Л.Н., Гасанова В.Я., Гасанова А.Р. ....	326
АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СТАТИН-СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА ИЗ <i>ASPERGILLUS TERREUS</i> Насметова С.М., Расулова Г.А., Каримова Ф.А., Гулямова Т.Т. ....	327
ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО ( <i>HELICHRYSUM ARENARIUM</i> ) НА РОСТ ШТАММОВ <i>MYSOBACTERIUM</i> <i>TUBERCULOSIS</i> МЛУ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO Наволокин Н.А., Скворцова В.В., Полуконова Н.В., Манаенкова Е.В., Панкратова Л.Э., Курчатова М.А., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. ....	328
ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА УГЛЕРОДНОГО СУБСТРАТА НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ <i>FUSARIUM</i> <i>SAMBUCINUM</i> ШТ. D-104 – ПРОДУЦЕНТОМ МИКОПРОТЕИНА Неманова Е.О., Горшина Е.С., Русинова Т.В., Бирюков В.В. ....	330
ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНОГО ЦЕЛЛЮЛАЗНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НОВОГО ГРИБНОГО ШТАММА <i>PENICILLIUM VERRUCULOSUM</i> В1-221-61 Немашкалов В.А., Беккаревич А.О., Бубнова Т.В., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н. ....	332
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕИМУЩЕСТВ РАЗНОСТОРОННЕГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПОЧВЕННЫХ ДЕЙТЕРОМИЦЕТОВ РОДА ТРИХОДЕРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МНОГОЦЕЛЕВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ Никитина М.Б. ....	334
ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КИТАЙСКОГО ШТАММА <i>GANODERMA LUCIDUM</i> НА ЕСТЕСТВЕННОМ СУБСТРАТЕ Новикова Л.В., Устюжанин И.А. ....	334
МИКРОМИЦЕТЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ Пархоменко Ю.М., Супрун С.М., Донченко Г.В., Степаненко С.П., Чеховская Л.И., Харкевич Е.С., Нечитайло Г.С. ....	335
ЛИГНОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ <i>PORODAEDELEA NIEMELAEI</i> M. FISCHER ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТАХ Павлов И.Н., Литовка Ю.А., Литвинова Е.А., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. ....	337
ОБРАЗОВАНИЕ ПРОТЕИНАЗ С КОЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОЙ И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ МИКРОМИЦЕТАМИ <i>ASPERGILLUS OCHRACEUS</i> , <i>ASPERGILLUS TERREUS</i> И <i>ASPERGILLUS USTUS</i> В УСЛОВИЯХ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Попова Е.А., Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Егоров Н.С. ....	339
ВЛИЯНИЕ СВЕТА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ МАКРОМИЦЕТОВ Поединок Н.Л., Михайлова О.Б., Негрейко А.М., Дудка И.А., Васильева Б.Ф., Ефременкова О.В. ....	341
ФОТОАКТИВАЦИЯ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МАКРОМИЦЕТОВ Поединок Н.Л., Михайлова О.Б., Ходаковский В.М.З, Дудка И.А. ....	343
РОСТОВЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ <i>GALERINA MARGINATA</i> (VATSCHE) KÜNNER, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ, В УСЛОВИЯХ ПОВЕРХНОСТНОГО И ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Псурцева Н.В., Шахова Н.В. ....	345
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ МАКРОМИЦЕТЫ В КОЛЛЕКЦИЯХ КУЛЬТУР КАК НАДЕЖНЫЕ БИОРЕСУРСЫ ДЛЯ НАУЧНОГО И ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ Псурцева Н.В., Озерская С.М. ....	347
ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА ГРИБА <i>PHALLUS IMPUDICUS</i> ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Пучкова Т.А., Осадчая О.В., Костеневич А.А., Буко В.У. ....	349
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУБСТРАТА ПОСЛЕ ПЛОДОНОШЕНИЯ ГРИБА ВЕШЕНКА ОБЫКНОВЕННАЯ ( <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> ) В КАЧЕСТВЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ Пучкова Т.А., Осадчая О.В., Костеневич А.А., Козинец А.И., Надаринская М.А. ....	351

ЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ – ИНГИБИТОРЫ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ Рузиева Д.М., Абдулмянова Л.И., Гулямова Т.Г. ....	352
ПОИСК ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ-ПЕПТАИБОЛОВ СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ГРИБОВ РОДА <i>TRICHODERMA</i> Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварица А.Е., Коршун В.А., Рогожин Е.А., Баранова А.А. ....	352
ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР <i>GANODERMA LUCIDUM</i> Сашенкова С.А. ....	354
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТОВ ЛИПИДНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА Шарипова Д.А., Копицын Д.С., Барков А.В., Новиков А.А. ....	355
ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЭКСТРАКТОВ НЕКОТОРЫХ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ Шнырева А.В., Бадалян С.М. ....	356
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И ПИВНОГО СУСЛА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ <i>LENTINUS TIGRINUS</i> НА СОЛОМЕ Шутова В.В., Кадималиев Д.А. ....	357
ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> B5, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ГЛЮКОЗОКСИДАЗУ Смотрова Н.Г. ....	359
ОТРАБОТКА ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА <i>P. ACULEATUM</i> 225 В ПОЛУПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ Стойко В.И., Айзенберг В.Л. ....	360
ВИТАМИНСОДЕРЖАЩИЕ КОМПЛЕКСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ Супрун С.М., Донченко Г.В., Пархоменко Ю.М., Харкевич Е.С., Курченко И.Н., Степаненко С.П., Нечитайло Г.С. ....	361
ОТБОР ПЕРСПЕКТИВНЫХ ВИДОВ И ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ИЗ БИОРАЗНООБРАЗИЯ СИБИРИ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ БИОТЕХНОЛОГИИ Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Бардашева А.В., Ананько Г.Г., Ильичева Т.Н., Горбунова И.А., Власенко В.А. ....	363
ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА МОРФОЛОГИЮ КОЛОНИЙ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ <i>TRAMETES</i> Титова Л.А., Клечак И.Р. ....	364
ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ ВОЛНЫ И КОГЕРЕНТНОСТИ СВЕТА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И СИНТЕЗ МЕЛАНИНА <i>INONOTUS OBLIQUUS</i> (ACH.: PERS.) PILÁT Тугай Т.И., Поединок Н.Л., Тугай А.В., Михайлова О.Б., Негрейко А.М., Дудка И.А. ....	365
ШТАММ <i>GANODERMA LUCIDUM</i> – НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ КСИЛОМАННА НА КМGL, ПОЛИСАХАРИДА С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СВОЙСТВАМИ Усов А.И., Краснопольская Л.М., Автономова А.В., Шуктуева М.И., Исакова Е.Б., Бухман В.М. ....	366
БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТАНОЛА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> Захарчук Л.М., Татарникова Н.Ю. ....	367
АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ РОДА <i>TRAMETES</i> Зарипова Г.Ф., Широких А.А., Широких И.Г. ....	370
ВЫЯВЛЕНИЕ БИОМИМЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКОСИНТЕЗИРОВАННОГО ЭЛЕМЕНТНОГО СЕЛЕНА Цивилева О.М., Панкратов А.Н., Цымбал О.А., Маркин А.В., Перфильева А.И. ....	372

---

**Для заметок**

## Глава 13.

# Грибные биотехнологии. Культивируемые грибы

doi: 10.14427/cmr.2015.v.13

## ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА МАРГАНЦА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ АКВАНАНОТЕХНОЛОГИЙ, НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ МИЦЕЛИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В КУЛЬТУРЕ

Аль-Маали Г.А.

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАНУ, Киев

Выращивание грибного мицелия ксилотрофных базидиомицетов на синтетических жидких питательных средах дает возможность изменять и модифицировать минеральный состав культуральной жидкости, тем самым влияя на прирост биомассы и синтез биологически активных веществ. Чаще всего для выращивания мицелия грибов в культуральных средах используют неорганические соли металлов.

Но последние обладают рядом недостатков, среди которых следует отметить их низкую химическую чистоту и меньшую биологическую доступность в сравнении с органическими соединениями металлов. Перспективны в этом плане соли пищевых карбоновых кислот, в том числе цитраты металлов, разрешенные к использованию в пищевой промышленности.

Интенсивное развитие нанотехнологий позволило создать ряд методов, с помощью которых стало возможно промышленное производство цитратов металлов с высокой степенью чистоты. Ряд исследований, проведенных с растительными объектами и микроорганизмами, показали высокую биологическую активность цитратов различных металлов, полученных методом аквананотехнологий.

**Цель работы** – исследование влияния цитрата марганца на прирост биомассы штаммов лекарственных грибов *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1900 и *Trametes versicolor* (L.) Lloyd 353 из национальной коллекции шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАНУ.

Мицелий выращивали 7 сут в поверхностной культуре при температуре 26 °С в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды. Штаммы культивировали на двух средах, содержащие разные источники азота: пептон или аспарагин. Среда, в состав которой входил пептон (ГПД), имела следующий состав, г/дм<sup>3</sup>: глюкоза – 25; пептон – 3; дрожжевой экстракт – 3; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,25; дистиллированная вода – 1 дм<sup>3</sup>; рН 6,5.

Вторая среда (ГАСп), используемая в нашем исследовании, была следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: глюкоза – 25; аспарагин – 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5; CaCl – 0,1; FeSO<sub>4</sub> – 0,02; CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,005; ZnSO<sub>4</sub> – 0,02; дистиллированная вода – 1 дм<sup>3</sup>; рН 6,5.

В опытных вариантах в питательные среды добавляли цитрат марганца в различных концентрациях. Контролем служили питательные среды без марганца, а также питательные среды с различными концентрациями сульфата марганца, в которых содержание марганца было эквивалентно содержанию марганца в опытных вариантах. Биомассу фильтровали через капроновый фильтр и высушивали при 105 °С до постоянного веса.

На 1-м этапе мы сравнивали влияние цитрата и сульфата марганца на рост мицелия *T. versicolor* и *G. lucidum* в среде, содержащей пептон в качестве источника азота. Наибольший прирост биомассы *T. versicolor* наблюдался в присутствии 1 мг/ дм<sup>3</sup> цитрата марганца в ГПД среде (рис. 1). При этом, биомасса мицелия *T. versicolor* в среднем увеличивалась на 28,82% по отношению к контролю без марганца. Тогда как в среде с сульфатом марганца наблюдался лишь незначительный прирост биомассы.

Наибольшие показатели биомассы мицелия *G. lucidum*, также были получены при добавлении в ГПД-среду марганца в цитратной форме, в концентрации 1 мг/дм<sup>3</sup> (рис. 2). При данной концентрации микроэлемента биомасса увеличивалась на 15,2% относительно контроля без марганца. Следует заметить, что в отличие от *T. versicolor*, сульфат марганца стимулировал рост мицелия *G. lucidum* на 10,8% по отношению к контролю без марганца, а его эффективная концентрация составила 0,5 мг/ дм<sup>3</sup>, что в два раза меньше эффективной концентрации марганца в цитратной форме.

Полученные результаты показали, что добавление цитрата марганца в ГПД среду стимулировало прирост биомассы изучаемых видов лучше, чем эквивалентные концентрации сульфата марганца. Но в связи с тем, что и пептон, и дрожжевой экстракт, добавляемые в ГПД-среду, имеют примеси марганца, мы решили на 2-м этапе нашего исследования использовать полностью синтетическую среду.

Мы предполагали, что замена комплексной среды на синтетическую, не содержащую экзогенных органических соединений марганца, даст возможность увидеть более выраженное влияние цитрата марганца

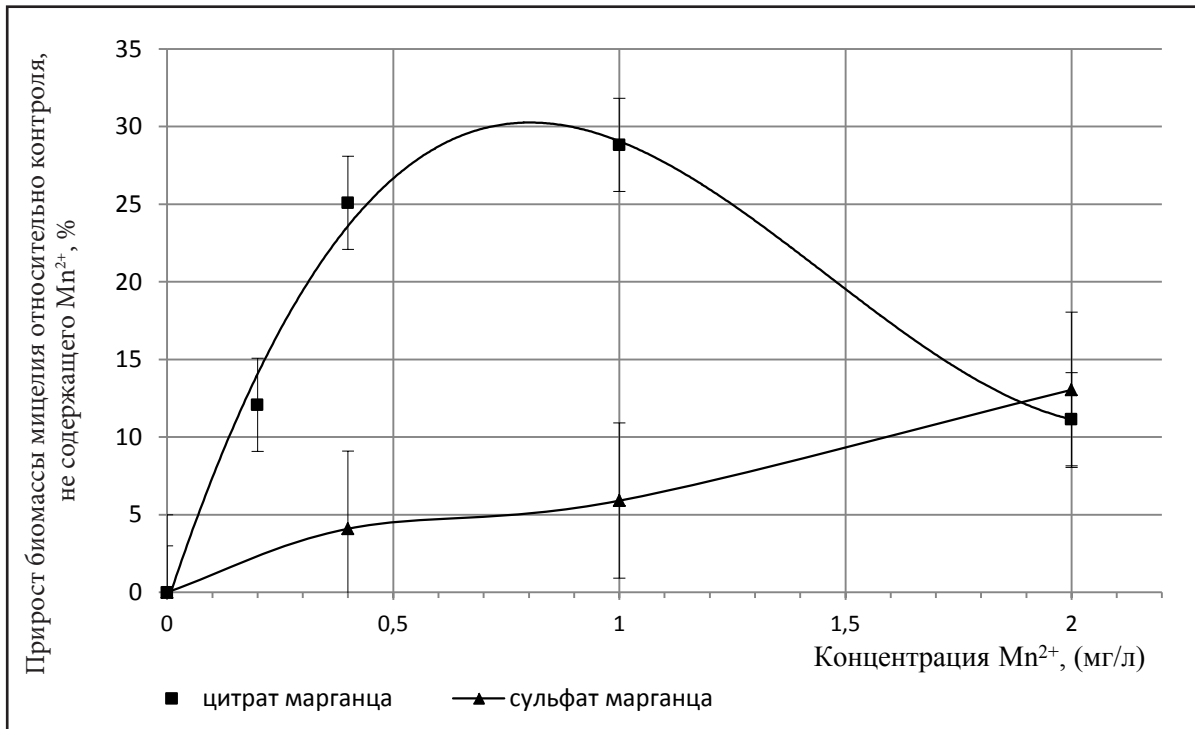


Рисунок 1. Зависимость прироста биомассы мицелия *T. versicolor* на ГПД-среде от концентрации марганца.

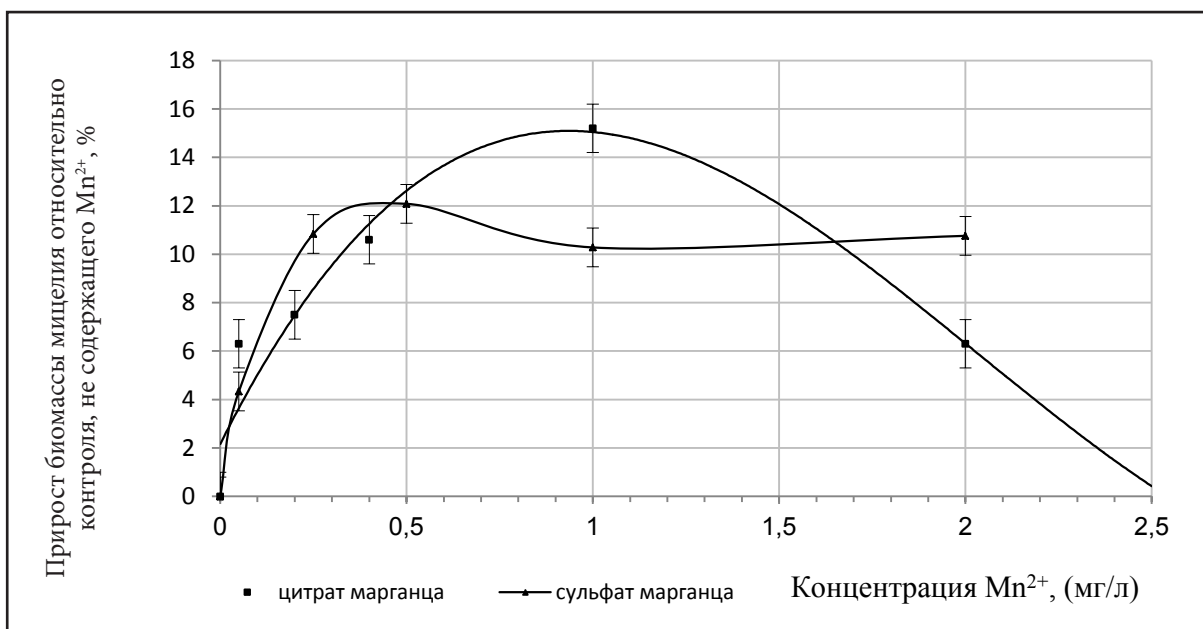


Рисунок 2. Зависимость прироста биомассы мицелия *G. lucidum* на ГПД-среде от концентрации марганца.

на рост мицелия относительно сульфата. Но результаты оказались неожиданными. Так, при добавлении в ГАСп среду 1 мг/дм<sup>3</sup> цитрата марганца, наблюдали увеличение биомассы мицелия *G. lucidum* на 82,79% относительно контрольной среды, не содержащей марганца (рис. 3).

При дальнейшем увеличении концентрации до 2 мг/дм<sup>3</sup> прирост биомассы составлял 25,9% по отношению к контрольной среде. Но при добавлении в ГАСп среду 1 мг/дм<sup>3</sup> сульфата марганца биомасса мицелия возросла на 119,17%, относительно контрольной, что на 36,38% больше биомассы полученной в опытах с

цитратом марганца. При дальнейшем увеличении концентрации марганца в форме сульфата до 2 мг/дм<sup>3</sup> прирост биомассы составил 147,2% относительно контрольной среды.

В опытах с *T. versicolor* биомасса, полученная при добавлении цитрата марганца в ГАСп-среду, была такая же, как в случае добавления аналогичных концентраций сульфата марганца.

**Вывод.** Таким образом, впервые было продемонстрировано, что влияние, которое оказывают соединения марганца на рост мицелия штаммов *G. lucidum* 1900 и *T. versicolor* 353, зависит не только от их хими-

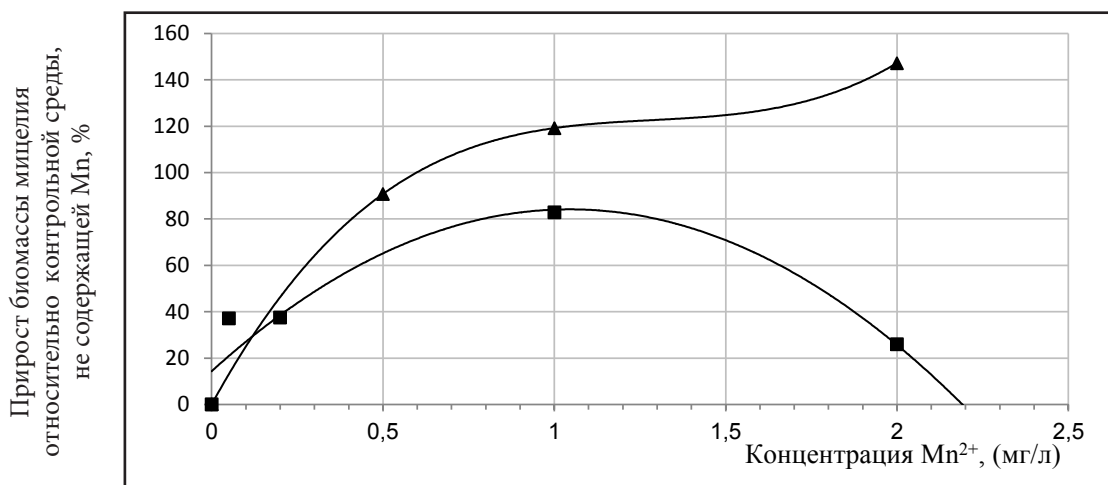


Рисунок 3. Зависимость прироста биомассы мицелия *G. lucidum* на ГАсп среде от концентрации марганца.

ческой формы, но и от состава среды в которую они добавляются. Так, мы выявили, что цитрат марганца эффективнее, чем сульфат марганца стимулирует рост мицелия *G. lucidum* и *T. versicolor* на среде, где

источником азота является пептон. Тогда как сульфат марганца, добавленный в среду, где источником азота является аспарагин, стимулирует рост мицелия *G. lucidum* намного эффективнее цитрата марганца.

## ПОЛУЧЕНИЕ БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК ГРИБОВ В КАЧЕСТВЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Альмяшева Н.Р., Бескоровайная Д.А., Копицын Д.С., Барков А.В., Новиков А.А.  
Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина, Москва

В последние годы возрастает интерес к биодизельному топливу, как биоразлагаемому и нетоксичному альтернативному источнику энергии. Объем его мирового производства достигает 6 млрд литров в год [1]. Промышленным способом получения биодизельного топлива является переэтерификация растительных масел низкомолекулярными спиртами (преимущественно метанолом) с применением щелочных катализаторов.

Использование химических реагентов приводит к экологическим проблемам, связанным с невозможностью регенерации катализатора и необходимостью очистки щелочных сточных вод [2]. Кроме того, в качестве сырья такого процесса может быть использовано только очищенное растительное масло с низким содержанием воды и свободных жирных кислот, таким образом затраты на сырье составляют около 70% всех затрат на производство биодизельного топлива [3].

Альтернативной химическим катализаторам переэтерификации являются катализаторы на основе липолитических ферментов: липазы эффективно действуют в мягких условиях, стабильны в безводных средах, а также в процессе ферментативной переэтерификации возможно получение топлива из дешевого низкосортного сырья, отработанных масел и отходов масложировых предприятий.

На данный момент существует множество коммерчески доступных биокатализаторов, представляющих

собой липазы, иммобилизованные на твердых носителях (например, Novozym 435, Lipozyme IM 60, LS-10A), широко применяющихся в промышленности. Однако их использование в процессе получения биодизельного топлива нецелесообразно из-за высокой стоимости ферментных препаратов и быстрой деактивации в условиях реакции переэтерификации. Таким образом, для производства биодизельного топлива больший интерес представляют биокатализаторы на основе клеток липолитически активных микроорганизмов [4].

Проведен скрининг коллекции микроорганизмов лаборатории биотехнологии РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина, нацеленный на выявление штаммов с высокой липолитической активностью. Определение липолитических микроорганизмов проводили с использованием чашечного диффузионного и газохроматографического методов по отношению к модельному субстрату – трибутирину.

На основании экспериментальных данных для дальнейших исследований выбраны плесневый гриб *Aspergillus niger* DSM 823, дрожжевые грибы *Yarrowia lipolytica* DSM 8218 и базидиомицеты *Fomes fomentarius* MT-4.01 и *Trametes vesiculosus* MT-20.01. Исследовано влияние условий реакции переэтерификации на активность биокатализаторов. Показано, что наличие воды в сырье является необходимым условием для эффективного проведения синтеза

эфиров жирных кислот.

Установлено, что исследуемые биокатализаторы обладают высокой стабильностью в широком диапазоне температур (24–36 °С) с оптимумом при 28 °С.

Проведен метанолиз подсолнечного масла с использованием исследуемых микроорганизмов в качестве биокатализаторов при оптимальных условиях процесса в реакторах двух типов – проточном и реакторе смешения. Максимальный выход метиловых эфиров в проточном реакторе составил 62% масс. (*A. niger*), в реакторе смешения – 27% масс. (*Y. lipolytica*).

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Государственное задание, проект №13.74.2014/К).

### Список литературы

1. Hama S, Kondo A. Enzymatic biodiesel production: an overview of potential feedstocks and process development. *Bioresource technology*. 2013; 135: 386-95.
2. Lam MK, Lee KT, Mohamed AR. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. *Biotechnol Adv*. 2010; 28(4): 500-18.
3. Robles-Medina A et al. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol Adv*. 2009; 27(4): 398-408.
4. Du W et al. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 79(3): 331-37.

## ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Ананьева Е.П.<sup>1</sup>, Гурина С.В.<sup>1</sup>, Псурцева Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия

<sup>2</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Базидиомицеты являются продуцентами целого ряда биологически активных веществ, которые получают как из плодовых тел, так и из мицелия грибов [1]. В мицелии базидиомицетов обнаружены вещества, стимулирующие иммунную систему, обладающие противоопухолевой активностью, способные регулировать кровяное давление, понижать содержание холестерина и сахара в крови и др.

Биологически активные соединения (БАВ), полученные из грибов, представляют большой интерес, в связи с тем, что они по сравнению с продуктами химического синтеза, как правило, не токсичны. При выделении БАВ из мицелия грибов его целесообразно получать методом глубинного культивирования, так как при этом возможно создание стандартных условий для накопления биомассы гриба и образования метаболитов.

**Цель работы** – отбор культур базидиомицетов, обладающих высокой скоростью роста и способных активно накапливать биомассу мицелия при глубинном культивировании.

**Материалы и методы.** Объектами исследования являлись ранее неизученные в этом отношении штаммы грибов из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE-BIN) *Grifola frondosa* 2639, *Lariciformes officinalis* 2254, *F. velutipes* 1483, *Trametes gibbosa* 1911, *F. rossica* 2594 и *Junghuhnia nitida* 2013.

Проведен скрининг указанных культур по скорости роста и ферментативной активности на плотных питательных средах, а также по их способности накапливать биомассу при глубинном культивировании.

Для определения скорости роста штаммов использовали среды следующего состава: сусло-агар (4%), мальтекс – агар, глюкозо-пептонный агар, состав которого соответствовал составу жидкой питательной среды для глубинного культивирования. Концентра-

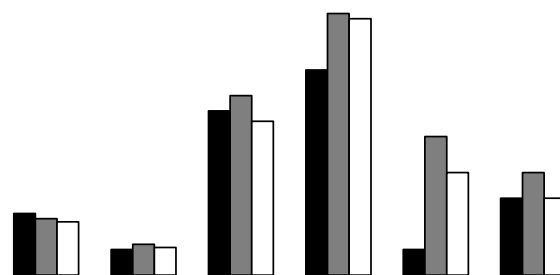


Рис. 1. Изменение ростовых коэффициентов базидиомицетов при культивировании на плотных питательных средах.  
■ глюкозо-пептонный агар; ■ сусло-агар  
□ мальтекс-агар

ция агара в средах составляла 20 г/л. На среду помещали агаровые блоки с культурой диаметром 7 мм. В процессе роста гриба определяли диаметр колонии, плотность и высоту мицелия. На 7-е сут культивирования рассчитали ростовой коэффициент (РК) [2].

**Результаты и обсуждение.** По результатам эксперимента установлено, что к медленно растущим культурам можно отнести *G. frondosa* и *L. officinalis*, РК которых составляли от 2,0 до 6,0 при культивировании на трех агаризованных средах. *F. rossica* (2,7–13,4) и (8,2–10,0) обладали средней скоростью роста. Быстрорастущими базидиомицетами явились *F. velutipes* и *T. gibbosa*, значение РК для которых 14,7–15,7 и 19,8–25,4 (рис. 1).

Ферментативную активность базидиомицетов оценивали по образованию ферментов лакказ и протеиназ. На питательные среды, содержащие соответствующие субстраты, вносили агаровые блоки диаметром 7 мм с двухнедельными культурами. Для определения активности окислительных ферментов, в



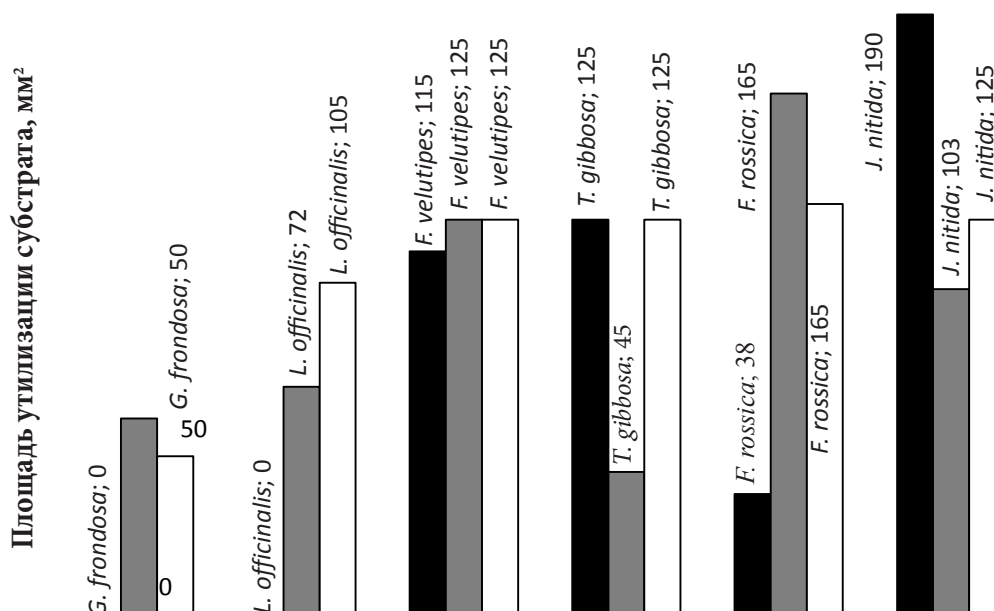


Рисунок 2. Ферментативная активность исследуемых базидиомицетов.

■ Лакказная активность; ■ Протеиназная активность 1 (казеин);  
□ Протеиназная активность 2 (желатин)

том числе лакказной в питательную среду, состоящую из сусло-агара, добавляли специальный реагент АБТС (2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоуксислота)), изменяющий цвет в присутствии оксидоредуктаз. Оценку ферментативной активности проводили по площади темно-фиолетового окрашивания –  $S_1$ , образовавшегося вокруг блока в результате катализируемого ферментами окисления АБТС.

Наибольшей активностью окислительных ферментов обладала *Junghuhnia nitida* ( $S_1$  составляет 188,4 мм<sup>2</sup>). Менее выраженной активностью обладали *F. velutipes* и *T. gibbosa* ( $S_1$  составляет 113 мм<sup>2</sup> и 122,5 мм<sup>2</sup>). Наименьшую активность имела *F. rossica* ( $S_1=38,5$  мм<sup>2</sup>). Активность оксидоредуктаз отсутствовала у штаммов *G. frondosa* и *L. officinalis*.

Для определения протеиназной активности использовали две агаризованные среды: (1) содержащую обезжиренное молоко для определения казеиназной активности и (2) с желатином для определения коллагеназной активности. Об активности ферментов судили по площади свертывания молока –  $S_2$  и площади разжижения желатина –  $S_3$ .

Наименьшей казеиназной активностью обладали грибы *G. frondosa* ( $S_2 = 63,6$  мм<sup>2</sup>), *L. officinalis* ( $S_2 = 70,7$  мм<sup>2</sup>) и *T. gibbosa* ( $S_2 = 44$  мм<sup>2</sup>). *F. velutipes* ( $S_2 = 122,5$  мм<sup>2</sup>) и *J. nitida* ( $S_2 = 103,6$  мм<sup>2</sup>) обладали средней активностью. Наибольшая казеиназная активность обнаружена у *F. rossica* ( $S_2 = 164,9$  мм<sup>2</sup>). Практически все исследуемые грибы обладали значительной коллагеназной активностью ( $S_3 = 103,6 - 130$  мм<sup>2</sup>), кроме *G. frondosa* ( $S_3 = 50,2$  мм<sup>2</sup>). Коллагеназная активность данного гриба была в ~2 раза ниже, чем у остальных культур (рис. 2).

Ферментативную активность базидиомицетов оценивали по образованию ферментов лакказ и

протеиназ. На питательные среды, содержащие соответствующие субстраты, вносили агаровые блоки диаметром 7 мм с двухнедельными культурами. Для определения активности окислительных ферментов, в том числе лакказной в питательную среду, состоящую из сусло-агара, добавляли специальный реагент АБТС (2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоуксислота)), изменяющий цвет в присутствии оксидоредуктаз. Оценку ферментативной активности проводили по площади темно-фиолетового окрашивания –  $S_1$ , образовавшегося вокруг блока в результате катализируемого ферментами окисления АБТС.

Наибольшей активностью окислительных ферментов обладала *J. nitida* ( $S_1 = 188,4$  мм<sup>2</sup>). Менее выраженной активностью обладали *F. velutipes* и *T. gibbosa* ( $S_1 = 113$  и 122,5 мм<sup>2</sup>). Наименьшую активность имела *F. rossica* ( $S_1 = 38,5$  мм<sup>2</sup>). Активность оксидоредуктаз у штаммов *G. frondosa* и *L. officinalis* отсутствовала.

Для определения протеиназной активности использовали две агаризованные среды: (1) содержащую обезжиренное молоко для определения казеиназной активности и (2) с желатином для определения коллагеназной активности. Об активности ферментов судили по площади свертывания молока –  $S_2$  и площади разжижения желатина –  $S_3$ .

Наименьшей казеиназной активностью обладали грибы *G. frondosa* ( $S_2 = 63,6$  мм<sup>2</sup>), *L. officinalis* ( $S_2 = 70,7$  мм<sup>2</sup>) и *T. gibbosa* ( $S_2=44$  мм<sup>2</sup>). *F. velutipes* ( $S_2=122,5$  мм<sup>2</sup>) и *J. nitida* ( $S_2=103,6$  мм<sup>2</sup>) обладали средней активностью. Наибольшая казеиназная активность обнаружена у *F. rossica* ( $S_2 = 164,9$  мм<sup>2</sup>). Практически все исследуемые грибы обладали значительной коллагеназной активностью ( $S_3 = 103,6-130$  мм<sup>2</sup>), кроме *G. frondosa* ( $S_3 = 50,2$  мм<sup>2</sup>). Коллагеназная активность данного гриба была в ~2 раза ниже, чем у остальных культур (рис. 2).

Биомассу исследуемых грибов получали путем глубинного культивирования на глюкозо-пептонной среде в течение 10 сут при 24 °С [3].

Культуры выращивали на лабораторной качалке при 120 об/мин (при непрерывном перемешивании), при температуре 24 °С в колбах Эйленмейера вместимостью 750 мл.

Для получения посевного материала культуры грибов выращивали на жидкой питательной среде в колбах с керамическими или стеклянными бусами в статических условиях в течение недели. Для измельчения биомассы мицелия колбы встряхивали круговыми движениями в течении 10 мин. Затем 10 мл полученного посевного заседали в качалочные колбы,

содержащие 150 мл среды. Ферментацию проводили в течение 10 сут. Мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через фильтрующий тканевый материал на воронке Бюхнера. Полученную биомассу обезживали спиртом, затем опять фильтровали и высушивали на воздухе.

Накопление биомассы изучали для базидиомицетов *T. gibbosa*, *J. nitida*, *F. rossica* и *F. velutipes*, т. к. данные культуры обладали наибольшей скоростью роста и ферментативной активностью.

Наибольший выход биомассы выявлен при глубинном культивировании *T. gibbosa* и *J. nitida*. Грибы рода *Flammulina*, обладающие достаточно высокой ферментативной активностью и скоростью роста на плотной

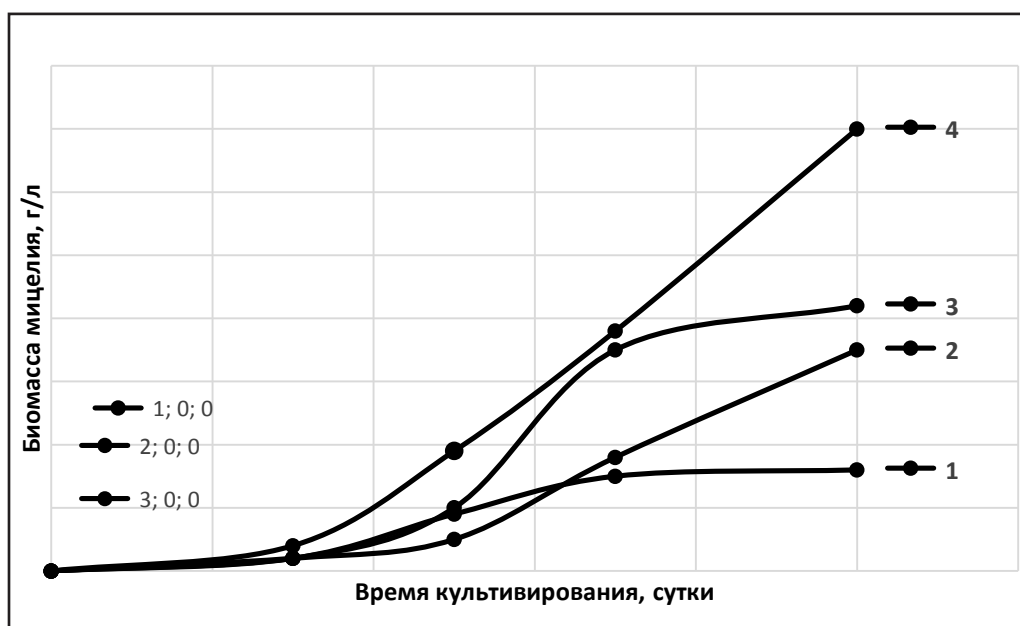


Рисунок 3. Динамика накопления биомассы базидиомицетов в процессе глубинного культивирования. 1 – *Flammulina velutipes*; 2 – *Flammulina rossica*; 3 – *Junghuhnia nitida*; 4 – *Trametes gibbosa*.

питательной среде, при глубинном культивировании накапливали меньшее количество биомассы (рис. 3.).

Наибольший выход биомассы мицелия отмечали у базидиомицета *T. gibbosa*, причем скорость его роста не уменьшалась даже на 8- –10-е сут культивирования. Таким образом, в результате скрининга были выбраны два ранее не исследованных штамма базидиомицета *T. gibbosa* 1911 и *J. nitida* 2013, показана их высокая ферментативная активность и скорость роста на плотных питательных средах.

Установлена возможность получения биомассы мицелия данных штаммов грибов методом глубинного культивирования. Далее представляется перспективным оптимизация процесса накопления биомассы и изучение биологической активности компонентов мицелия данных базидиомицетов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России».

#### Список литературы

1. Заикина Н.А., Коваленко А.Е. и др. Основы биотехнологии высших грибов. СПб.: Проспект науки. 2007: 315 с.
2. Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. Киев: Наук. думка. 1983: 312 с.
3. Кожемякина Н.В., Ананьева Е.П., Гурина С.В., Галынкин В.А. Условия культивирования, состав и биологическая активность мицелия *Flammulina velutipes* (Fr.) P. Karst. Прикл. микробиол. биохимия. 2010; 46(5): 583-6.

## ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА МОЛОДЫХ КОНЬЯЧНЫХ СПИРТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОТДЕЛЬНЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА

Арутюнян М.Ж.<sup>1,2</sup>, Нанагюлян С.Г.<sup>1</sup>, Арутюнян Ш.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ереванский государственный университет, кафедра ботаники и микологии

<sup>2</sup>Ереванский коньячно-винно-водочный комбинат Арарат, Армения

**Введение.** Тонкий букет коньяка формируется химическими веществами свежеперегнанного коньячного спирта и соединениями, образующимися при выдержке. Молодой коньячный спирт – сложная многокомпонентная система, на 99,8% состоящая из воды и этилового спирта. Вещества же, влияющие на сложение вкуса и аромата и, в значительной степени обеспечивающие качество будущего коньяка, составляют всего 0,1–0,2% [1, 2].

Влияние дрожжей на качество коньяка проявляется при брожении сула и перегонке виноматериала. Наличие дрожжей в коньячных виноматериалах способствует увеличению содержания в них высококипящих примесей, таких как энантовые эфиры, высокомолекулярные (С6–С11), терпеновые и ароматические спирты. В результате аромат коньячного спирта усложняется за счет усиления цветочных оттенков. Но главное – это появление как в аромате, так и во вкусе тонов энантового эфира, известных под названием “мыльных” [3, 4].

Большинство исследователей во Франции под понятием “энантовые эфиры” понимают сумму этиловых эфиров жирных кислот С8, С10 и С12 – этилкаприлат, этилкапринат и этиллаурат, которые обладают весьма сходными, но сильно различающимися по интенсивности запахами” [5].

Хотя эти эфиры встречаются и в эфирных маслах винограда, в коньячном спирте они представлены, главным образом, за счет дрожжей. В зависимости от исходного состава виноматериалов, содержания в них дрожжевого осадка, количества новообразующихся веществ могут колебаться в заметных пределах: прирост альдегидов может составить 3–60%, летучих эфиров – 5–30%, высших спиртов – 0–3%, летучих кислот – 0–1% [6].

По данным некоторых авторов, наличие энантового эфира в пределах 50–60 мг/дм<sup>3</sup> свойственно французским коньякам, чем они, в основном, и отличаются от коньяков, вырабатываемых в республиках СНГ [3]. Это объясняется тем, что во Франции коньячные виноматериалы перегоняются без отделения дрожжей. Щадящие условия дробления и прессования винограда и качественное осветление сула приводят к тому, что образующиеся при брожении осадки практически полностью состоят из дрожжевой биомассы. Выброженные коньячные виноматериалы с дрожжей не снимаются и перегоняются со всей образовавшейся естественным путем биомассой дрожжей.

В практике стран СНГ осадки коньячных виноматериалов более чем наполовину состоят из обрывков кожицы, мякоти, гребней и семян. Перегонка виноматериалов с такими осадками приводит, с одной стороны, к повышенному накоплению в коньячном спирте метилового спирта из-за распада пектиновых

веществ, с другой – к пригоранию осадков и появлению во вкусе спирта посторонних уваренных тонов. По этой причине содержание дрожжей в коньячных виноматериалах, направляемых на перегонку, лимитируется двумя процентами [3, 7, 8].

С учетом мирового опыта, этот показатель в Украине пересмотрен в сторону увеличения. Технологической инструкцией по производству коньячных виноматериалов допускается наличие объемной доли осадков до 5% при содержании в них не менее 90% дрожжей [3].

**Цель исследования** – изучение качественных показателей коньячных спиртов, перегнанных при наличии разного количества объемной доли дрожжевого осадка.

**Материал и методы.** Предметом исследования являлись молодые коньячные спирты, полученные перегонкой коньячных виноматериалов, содержащих 4 и 6% дрожжевого осадка. Для брожения использовались сухие активные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* FC 9, произведенные в Дании.

Перегонке подвергались коньячные виноматериалы, полученные из сортов винограда Ркацители, Кангун и Меграбуыр. Выбор сортов обоснован наличием винограда, обрабатываемым Ереванским коньячно-винно-водочным комбинатом Арарат.

Учитывая тот факт, что в бывшем СССР действующие “Основные правила производства коньяков” в коньячных виноматериалах ограничивало количество дрожжевого осадка до 2%, как контрольный образец, для сравнения использовались из тех же сортов молодые коньячные спирты, перегнанные с 2% дрожжевым осадком [3, 7, 8].

Исследования проводились в лаборатории Научно-исследовательского центра ОАО Ереванского коньячно-винно-водочного комбината Арарат. Коньячные виноматериалы в производственных объемах приготавливались в филиале Армавирского марза.

Перегонка сортовых виноматериалов производилась аппаратами шарантского типа 250 дал, по схеме двойной перегонки. Получаемый продукт после первой перегонки – спирт-сырец, впоследствии – коньячный спирт.

Лабораторные исследования коньячного виноматериала и молодых коньячных спиртов проводились согласно АСТ 271-2007, АСТ 272-2007, АСТ 341-2011, АСТ 338-2011, ГОСТ 12280-75, ГОСТ 13193-73, ГОСТ 13194-74, ГОСТ 14138-76, ГОСТ 14139-76, ГОСТ 13195-73, ГОСТ 13192-73 (ЗАО Национальный институт стандартов). Для производства коньячных виноматериалов, выбранные сорта винограда Ркацители, Кангун, Меграбуыр были обработаны по отдельности, современным высококачественным оборудованием – валковой дробилкой – гребнеотделителем и пневмати-

ческим прессом. Был отделен сусло-самотек, который подвергся брожению активной биомассой *S. cerevisiae* FC 9<sup>с</sup> сухих активных дрожжей. После выбраживания, виноматериалы подверглись лабораторному и органолептическому исследованию, результаты которых своими показателями полностью соответствовали представленным требованиям коньячных виноматериалов (АСТ-180-199).

Микроскопическим наблюдениям подвергались также дрожжевые осадки. Количество дрожжей в осадках составляло 86%, значительная часть которых находилась в состоянии автолиза: в уменьшенных размерах, частично деформированных и имеющих зернистую структуру. После брожения виноматериалы 1 мес выдерживались на дрожжевом осадке, затем производилась переливка. Отделенные чистые виноматериалы перегонялись с дрожжевыми осадками, соответственно, 2%-ным (контрольный образец), так и 4- и 6%-ным – в качестве исследуемых образцов.

Образцы молодых коньячных спиртов подверглись также химическому и органолептическому исследованию, данные которых приведены в табл. 1.

**Результаты и обсуждения.** Выявлено, что по сравнению со всеми тремя сортовными образцами количество средних эфиров значительно увеличилось: в образцах всех трех сортов, которые были получены добавлением 4% дрожжевого осадка, средние эфиры увеличились в 1,1 раз, а в случае 6% – в 1,2 раз.

В образцах с добавлением 4% дрожжевых осадков, количество альдегидов значительно увеличилось в образце из сорта Кангун, а в меньшем – в сорте Меграбуйр. В образцах, полученных из сортов Меграбуйр и Кангун, с добавлением 6% дрожжевых осадков, количество альдегидов увеличилось в 1,5 раза.

Как видно из х табл. 1, при увеличении количества дрожжевого осадка в процессе перегонки возрастает содержание метилового спирта, что не желательно, она не переходит допустимую норму.

Особое внимание привлекают образцы из сорта Меграбуйр, где количество метилового спирта относительно высокое, особенно в 6%-ном образце, который превышает контрольный образец в 1,9 раз. Повышение количества метилового спирта может быть также связано с тем, что в дрожжевых осадках

Таблица 1. Показатели химических исследований опытных коньячных спиртов и их органолептическая оценка

Наименование показателя	Образцы исследуемых спиртов по наличию добавления дрожжевого осадка, об. %								
	Ркацители			Кангун			Меграбуйр		
	2,0	4,0	6,0	2,0	4,0	6,0	2,0	4,0	6,0
Этиловый спирт, объемная доля, %	65,2	65,4	65,3	66,2	65,8	66,0	66,7	66,4	66,3
Метиловый спирт, массовая концентрация, г/дм <sup>3</sup>	0,12	0,16	0,20	0,14	0,15	0,21	0,17	0,28	0,32
Высшие спирты в пересчете на изоамиловый спирт, массовая конц., мг/100 см <sup>3</sup> безводного спирта	299,0	301,0	300,0	316,0	318,0	319,0	340,0	342,0	342,0
Альдегиды в пересчете на уксусный альдегид, массовая конц., мг/100см <sup>3</sup> безводного спирта	10,5	12,1	14,7	8,8	11,4	13,2	9,9	11,3	15,2
Средние эфиры в пересчете на уксусно-этиловый эфир, массовая конц., мг/100 см <sup>3</sup> безводного спирта	110,0	124,0	131,0	108,0	115,0	132,0	122,0	131,0	146,0
Летучие кислоты в пересчете на уксусную кислоту, массовая конц., мг/100 см <sup>3</sup> безводного спирта	24,0	24,0	25,0	22,0	24,0	24,0	26,0	28,0	28,0
Дегустационная оценка в баллах (по восьмибальной шкале)	7,5	7,6	7,9	7,6	7,7	7,9	7,0	7,1	6,9

содержатся частички гребней и кожицы винограда, которые богаты пектиновыми веществами.

Во время брожения виноматериала пектинэстераза – фермент дрожжей, может не полностью деметилировать пектин, в результате чего во время перегонки подвергается неферментативному гидролизу, и образуется метиловый спирт. Именно по этой причине более целесообразно до брожения отстаивать пресовые сусла и сусло-самотек. Это даст возможность

перегонять виноматериал без отделения дрожжевого осадка. Такой технологический прием будет способствовать получению коньячных спиртов, богатыми энантиковыми эфирами, которые придают столь ценные “мыльные” тона, обогащающие букет коньяка.

Ощутимые количественные изменения по остальным показателям не наблюдались. Образцы из сортов Ркацители и Кангун, с добавлением 4- и 6%-ных дрожжевых осадков, отличаются более сложным и гармо-

ничным букетом, с ярко выраженными цветочными и фруктовыми тонами, более ощутимыми в образцах с 6%-ным дрожжевыми осадками.

**Выводы.** Обобщая результаты проведенных исследований можно заключить, что полученные образцы исследуемых молодых коньячных спиртов, безусловно, сопровождаются накоплением ряда ценных веществ, в том числе эфиров, которые во многом зависят и от сортовых особенностей.

Полученные образцы из сорта Меграбуыр по органолептическим свойствам значительно уступают образцам из сортов Ркацителли и Кангун. Несмотря на то, что Меграбуыр является одним из допустимых сортов винограда для изготовления коньячного спирта в Армении, и на основании проведенных исследований, можно заключить, что для приготовления коньячных виноматериалов нежелательно использовать только сорт Меграбуыр.

Исследуя влияние количества дрожжевого осадка на состав молодых коньячных спиртов, приготовленных из сортов винограда Ркацителли, Кангун и Меграбуыр, можно сделать вывод, что перегонка с добавлением 6%-ного дрожжевого осадка наиболее способствует накоплению вышеперечисленных ценных веществ, которые в дальнейшем определяют вкус и букет коньяка.

### Список литературы

1. Высоцкая Л.Э., Нилов Н.И. Спирты молодого коньячного спирта. Виноделие и виноградарство СССР. М.: Пищепромиздат. 1969; 1: 15-7.
2. Арутюнян Ш.Г., Саградян С.И., Арутюнян М.Ж. Влияние территориально различающихся дубовых клепок на изменение состава летучих соединений в процессе созревания коньячного спирта. Агронаука. Ереван. 2013; 9-10: 542-6.
3. Мартыненко Э.Я. Технология коньяка. Симферополь: Таврида. 2003: 310 с.
4. Рябченко Н.М., Суручан П.Т. Влияние тепловой обработки виноматериалов и барды и содержания дрожжей на состав коньячного спирта. Виноделие и виноградарство СССР. М.: Пищепромиздат. 1977; 3: 25-9.
5. Скурихин И.М. Химия коньяка и бренди. М.: ДеЛи-Принт. 2005: 296 с.
6. Кишковский З.Н., Мерджаниан А.А. Технология вина. М.: Лег. и пищ. пром. 1984: 504 с.
7. Косюра В.Т., Донченко Л.В., Надькта В.Д. Основы виноделия. М.: ДеЛиПринт. 2004: 440 с.
8. Сборник технологических инструкций, правил и нормативных материалов по винодельческой промышленности. Под ред. Г.Г. Валушко. М.: Агропромиздат. ВНИИВиВ "Магарач". 1985: 512 с.

## ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ И МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МИЦЕЛИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛИПОРОВЫХ ГРИБОВ

Бадалян С.М., Гарибян Н.Г.

Лаборатория биологии и биотехнологии грибов, Ереванский государственный университет

В настоящее время медицина и пищевая промышленность заинтересованы в поиске природных источников протеолитических ферментов – протеаз [1–4]. Эти ферменты включены в различные физиологические процессы (пищеварение, свертывание крови, апоптоз клеток и др.). В природе протеазы встречаются у всех организмов, однако бактерии и грибы являются наиболее предпочтительными источниками протеаз благодаря их быстрому росту, условиям культивирования и доступностью генетических манипуляций. Грибы вырабатывают более разнообразные протеазы, чем бактерии. Грибные протеазы имеют широкое коммерческое применение в фармакологии, утилизации отходов, производстве моющих средств и т.д. [5]. Они активны при pH 4–13 и проявляют широкую субстратную специфичность, однако имеют низкую скорость реакции и менее устойчивы к температуре, нежели бактериальные протеазы [6].

Внеклеточные грибные протеазы в основном атакуют молочный белок казеин и плазменный фибрин. Они могут быть использованы для получения молокосвертывающих, тромболитических и фибринолитических биотехпродуктов, применяемых как в пищевой (молочная) промышленности, так и для получения терапевтических средств против сердечно-сосудистых, опухолевых и других заболеваний

[5, 6]. Видовой профиль протеаз у грибов является важным таксономическим и филогенетическим признаком [7].

Базидиальные грибы являются продуцентами аспартильных, сериновых и металлопротеаз, однако молокосвертывающая, казеинолитическая, тромболитическая и фибринолитическая активность была в основном выявлена у аспартильных протеаз [8, 9]. Протеазы, выделенные из ксилотрофных базидиальных грибов, по активности аналогичны реннину (химозин), продуцируемому микроскопическими грибами (виды *Mucor* и др.) и бактериями. Следовательно, грибные протеазы могут успешно заменить реннин в молочной, в частности сыродельной промышленности [10, 11].

Существуют литературные сведения, относящиеся к протеолитической (фибринолитической, тромболитической) и молокосвертывающей активности полипоровых видов *Heterobasidion annosum* (= *Fomitopsis annosa*), *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius* и *Ganoderma lucidum* [12–14]. Соотношение молокосвертывающей и протеолитической активности (МСА/ПЛА) принимается в качестве важного индекса при выборе грибного организма для промышленного применения [11]. Более того, штаммы *F. pinicola* с высоким соотношением МСА/ПЛА были предложены в качестве многообещающего заменителя реннина в производстве сыра чеддер. Тем не менее протеолити-

ческая активность и биотехнологический потенциал грибных протеаз являются недостаточно исследованными. С этой точки зрения, скрининг протеолитической и молокосвертывающей активности различных коллекций полипоровых грибов актуален. Нами были протестированы генетически идентифицированные коллекции 6 видов и 62 дикариотических штаммов различного географического происхождения: *Fomes fomentarius* (Армения, Россия и Иран, 13 штаммов), *Fomitopsis pinicola* (Франция и Россия, 10 штаммов), *Ganoderma adspersum* (Армения, Иран и Грузия, 14 штаммов), *G. applanatum* (Армения и Россия, 12 штаммов), *G. lucidum* (Армения, Франция и Италия, 9 штаммов) и *G. resinaceum* (Франция и Иран, 4 штамма) [15]. Среди исследованных видов *F. pinicola* вызывает бурую гниль хвойных, а остальные грибы – белую гниль лиственных деревьев.

Образцы культуральной жидкости (КЖ) были получены после выращивания мицелия в глубинной культуре (200 об/мин, *Heidolph, Unimax 1010*) в жидкой среде сусли (рН 6,0) в течение 14 сут при комнатной температуре ( $22 \pm 2$  °C). После отделения мицелиальной биомассы измерялись рН значения КЖ (*Hanna HI 8314*).

Реакция свертывания или пептонизации молока проявляется денатурацией молочного белка казеина и/или превращением исходного белка в растворимый пептон. Предварительные результаты показали, что образцы экстракта мицелия протестированных базидиальных грибов не обладали молокосвертывающей и фибринолитической активностью [1–4]. Протеолитическую активность образцов КЖ исследованных полипоровых видов тестировали с использованием в качестве субстрата обезжиренного молока (рН 6,5) [16]. На субстрат (2,5 мл) добавлялось различное количество КЖ (1:1 и 1:2) и после инкубации наблюдения проводились на 10, 30, 60 мин и каждые 24 часа в течение 5-ти суток. В качестве контроля были использованы молоко и молоко-сусли (1:1). Качественная оценка протеолитической активности проводилась по скорости (в мин/час/сут) и интенсивности проявления реакций свертывания и пептонизации. Была выявлена корреляция между количеством КЖ и скоростью реакций, тогда как тип реакции (свертывание/пептонизация) не зависел от количества КЖ. Коагулянт составил приблизительно 1/3 общего объема экспериментальной пробирки при двух тестируемых количествах КЖ. Он был дисперсно-хлопьевидным у *F. fomentarius*, твердо-резинистым у *F. pinicola* и кефироподобным у *G. resinaceum*.

На основании скорости реакций свертывания и пептонизации молока, исследованная коллекция полипоровых грибов была разделена на 3 группы. В первую, активную группу входили все штаммы *G. resinaceum*, *F. fomentarius* и *F. pinicola*, а также 2 армянских штамма *G. adspersum* (Ga-2-4, Ga-3). У этих образцов реакции начинались через 10 мин после добавления КЖ. По интенсивности и скорости свертывания и пептонизации различного уровня протеолитическая активность была отмечена спустя 48 ч после добавления образцов КЖ. У *F. fomentarius* высокая активность была проявлена только у двух армянских штаммов Ff-1 и Ff-9. 2-я группа со средней

протеолитической и молокосвертывающей активностью включала 4 армянских штамма *G. adspersum* (Ga-2-1, Ga-2-2, Ga-2-3, Ga-5), итальянский (Glu1), китайский (Glu13), французский (Gl-1-2, Gl-1-3) и армянский (Gl-5) штаммы *G. lucidum*, а также российскую коллекцию *G. applanatum*.

В этой группе протеолиз начинался в течение 24 ч и длился 72 ч. В 3-ю группу, в которой реакции свертывания и пептонизации молока были слабыми или вовсе отсутствовали, вошли иранские (Ga-4, 1016), армянские (Gad-II, Gad-III, Gad-6, Ga-1, Ga-9) и грузинские (Gad-03) штаммы *G. adspersum*, а также армянские штаммы *G. applanatum* и *G. lucidum* (Gl-4, Gl-6, Gl-7-1, Gl-7-2). Протеолитическая реакция отсутствовала у армянских штаммов *G. applanatum*, иранского (Ga-4) и армянских (Ga-6, Gad-II) штаммов *G. adspersum*, а также армянских штаммов (Gl-4, Gl-6, Gl-7-1) *G. lucidum*.

При росте мицелия в глубинной культуре была выявлена разная степень подкисления питательной среды, что потенциально может влиять на процесс протеолиза. Значения рН были низкими у образцов КЖ *F. pinicola* (рН 1,99–2,76), вызывающего бурую гниль древесины, тогда как у остальных видов/штаммов они были высокими: 3,01–4,22 (*F. fomentarius*), 3,13–4,39 (*G. adspersum*), 3,81–4,17 (*G. applanatum*), 3,51–4,38 (*G. resinaceum*) и 4,06–4,99 (*G. lucidum*). Низкие значения рН у видов бурой гнили являются результатом аккумуляции свободной щавелевой кислоты, тогда как этот процесс предотвращается у видов белой гнили благодаря биосинтезу декарбоксилаз [8,17]. Корреляция между значениями рН образцов КЖ и интенсивностью реакции свертывания наблюдалась только у штаммов вида *F. pinicola*, что подтверждает сведения о перспективности использования этого вида в молочной, в частности сыродельной промышленности [11]. У видов, вызывающих белую гниль древесины, такая корреляция не была выявлена.

Таким образом, из протестированных видов коллекции *F. pinicola*, *G. resinaceum*, *G. adspersum* и *F. fomentarius* как продуценты внеклеточных протеолитических ферментов являются перспективными для дальнейших исследований по получению новых биотехпродуктов грибного происхождения.

*Работа была выполнена при финансовой поддержке Армяно-Российского совместного проекта ГКН МОН Республики Армения № 13AR-110 и РФФИ гранта 13-04-90607.*

#### Список литературы

1. Badalyan SM. Milk-coagulating activity of mycelial cultures of several Basidiomycete mushrooms. ICCS10, 2004, Tsukuba, Japan. 2004: 589-90.
2. Badalyan SM, Melikyan LR, Navarro-González M, Kües U. Fibrinolytic activity of several Coprinoid mushrooms. ICMBMP6, 2008. Bonn, Germany. 2008: 66-7.
3. Badalyan SM, Avetisyan HK, Navarro-González M, Kües U. Coprinoid mushrooms producers of proteolytic enzymes. Biotechnol Health-2, 2008. Yerevan, Armenia. 2008: 119-20.
4. Бадалян СМ, Гарибян НГ. Протеолитическая активность некоторых базидиальных макромицетов. Усп. мед. микол. 2014; 12: 289-92.

5. Kudryavtseva OA, Dunaevsky YE, Kamzolkin OA, Belozersky MA. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylotrophic Basidiomycetes. *Microbiology*. 2008; 77: 643-53.
6. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Tanksale AM, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62: 597-635.
7. Lilly W, Stajich JE, Pukkila PJ et al. An expanded family of fungalsin extracellular metalloproteases of *Coprinus cinereus*. *Mycology*. 2008; 112: 389-98.
8. Денисова Н.П. Протеазы высших базидиомицетов. *Микол. фитопатол.* 1990; 24: 478-85.
9. Denisova NP, Mikhailov VN, Petrishchev NN. Thrombolytic activity of mushroom proteinases. *Int J Med Mushrooms* 1999; 1: 187-90.
10. Бойко СМ, Стадничук ВМ. Дереворазрушающие грибы – активные продуценты протеиназ молока свертывающего и тромболитического действия. *Усп. мед. микол.* 2003; 1: 237-8.
11. Kawai M, Mukai N. Studies on milk clotting enzymes produced by Basidiomycetes. Part I. Screening tests of Basidiomycetes for the production of milk clotting enzymes. *Agr Biol Chem*. 1970; 34: 159-63.
12. Choi HS, Sa YS. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. *Mycologia*. 2000; 92: 545-52.
13. Kumaran S, Palani P, Nishanthi R et al. Purification of an intracellular fibrinolytic protease from *Ganoderma lucidum* Vk12 and its susceptibility to different enzyme inhibitors. *Trop J Pharmaceut Res*. 2011; 10: 413-20.
14. Maijala P, Fagerstedt KV, Raudaskoski M. Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *New Phytol*. 1991; 117: 643-8.
15. Badalyan SM, Shnyreva AV, Iotti M, Zambonelli A. Genetic resources and cultural characteristics of several medicinal polypore mushrooms (Basidiomycota, Polyporales). *Int J Med Mushrooms*. 2015; 17(4): 371-84.
16. Методы экспериментальной микологии. Под ред. Билай ВИ, Киев: Наук. думка. 1982: 550 с.
17. Avtonomova AV, Krasnopol'skaya LM, Maksimov VN. Optimization of nutrient medium for submerged cultivation of *Ganoder lucidum* (Curt: Fr) P Karst. *Microbiology* 2006; 75: 148-53.

## ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА ДВУХ ПОЛИПОРОВЫХ ВИДОВ: *FOMES FOMENTARIUS* И *FOMITOPSIS PINICOLA*

Бадалян С.М., Шахбазян Т.А.

Лаборатория биологии и биотехнологии грибов, Ереванский государственный университет

Полипоровые трутовые грибы (порядок Polyporales, отдел Basidiomycota) являются активными продуцентами биоактивных соединений, обладающих различными лекарственными свойствами [1–3]. Среди них *Ganoderma lucidum*, *Fomitopsis officinalis* и другие виды имеют давнюю историю применения в традиционной медицине в северо-американских, азиатских и европейских странах [4, 5]. Полипоровые грибы *Fomes fomentarius* и *Fomitopsis pinicola* являются дереворазрушающими сапротрофными и паразитными видами, которые вызывают белую гниль листовых и бурую гниль хвойных пород деревьев соответственно.

В традиционной медицине *F. fomentarius* использовался в качестве коагулирующего и болеутоляющего средства, тогда как *F. pinicola* был известен своим противомикробным, противовоспалительным и иммуномодулирующим свойством [5, 6]. Из плодовых тел и мицелия этих грибов были выделены тритерпеновые соединения (фомитозид А-), пиниколовая и фомитопсиновая кислоты), полисахариды, стеролы (фоментарол А-Д), алкалоиды (3-фенил-этандиол), а также протеолитические ферменты медицинского значения [1, 5–9].

Сообщается об антибактериальной активности тритерпеноидов и тритерпеновых гликозидов, выделенных из плодовых тел *F. fomentarius* и *F. pinicola* [10–11]. Различные ланостаноидные (пиниколовая, траметоноловая и фомитопсиковая кислоты) и стероидные соединения с антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* и *B. cereus* были изолированы из *F. pinicola* [1,

12, 13]. Различные экстракты, полученные из плодовых тел *F. fomentarius* ингибировали рост грамположительных (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*) бактерий [4, 14].

Водорастворимый меланин-глюкановый комплекс, выделенный из *F. fomentarius* активнее ингибировал рост *Candida albicans* и *Helicobacter pylori*, чем тест антибиотика. Он обладал также высокой анти-HIV-1 активностью и низкой токсичностью по сравнению с противоретровирусным лекарством зидовудином [15].

Сообщается об антивирусной активности *F. fomentarius* против вируса табачной мозаики, а также вирусов гриппа (тип А) и герпеса (тип 2) [16, 17]. Этанольные и хлороформные экстракты, полученные из плодовых тел *F. pinicola* обладали антифунгальной активностью в отношении *F. heterosporum* и *F. inflexum* [18]. Антифунгальная активность в отношении *Aspergillus fumigatus* и *Absidia orchidis* была выявлена у экстракта плодовых тел *F. fomentarius* [19].

Полисахариды с противоопухолевым эффектом были выделены из плодовых тел *F. pinicola* [6]. Метанольный и этанольный экстракты плодовых тел *F. pinicola* активнее снижали жизнеспособность различных раковых клеток, чем водный экстракт [20]. Этанольный экстракт *F. pinicola* способствовал апоптозу клеток *in vitro* и значительно уменьшал размеры опухоли саркомы 180 у мышей *in vivo* [21]. Водный экстракт *F. fomentarius*, содержащий 16,1% полисахаридов, обладал высокой противоопухолевой

активностью против различных раковых клеток *in vitro* [22]. Этанольный экстракт *F. fomentarius* до 59,5 % ингибировал рост клеток саркомы 180 у мышей *in vivo*. Одновременно была выявлена активация трансформации лимфоцитов, формирование антител и НК-клеток [23]. Сообщается о способности метаболитов из метанольного экстракта *F. fomentarius* регулировать связывающую с ДНК активность NF- $\kappa$ B [24]. Водные экстракты, полученные из мицелия и плодовых тел *F. fomentarius* обладали антиоксидантной активностью *in vitro* и *in vivo* [25].

Водный и метанольный экстракты из плодовых тел *F. pinicola* также проявляли антиоксидантную активность [26]. Была выявлена корреляция между утилизацией свободных радикалов и концентрацией экстрактов *P. pinicola* [20]. У стрептозотоцин-индуцированных диабетических крыс сообщается о гипогликемическом эффекте водного экстракта и экзобиополимеров, полученных из глубинного мицелия *F. fomentarius* [27, 28].

Водный и щелочной экстракты *F. pinicola* проявляли значительный противогипергликемический эффект у диабетических крыс *in vivo* [29]. Водный экстракт из плодовых тел этого гриба в значительной степени снижал уровень глюкозы и липидов в крови. Более того, предлагается использование фармакологической активности *F. pinicola* в предотвращении и лечении атеросклероза [30].

В наших исследованиях выявлена антибактериальная активность *F. fomentarius* в отношении *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus haemolyticus* [31]. Исследована антифунгальная активность коллекций *F. pinicola* в отношении потенциально патогенных для человека и животных микроскопических грибов (*Chrysosporium keratinophilum*, *Penicillium griseofulvum* и *Penicillium* sp.) в совместной культуре на агаровой картофельно-декстрозной среде (КДА).

В 66,7% антагонистических взаимоотношений *F. pinicola* нарастал на колонии микромицетов, тогда как в 33,3% взаимоотношений было отмечено взаимное подавление роста контактирующих колоний. Не наблюдалось нарастания на колонии *F. pinicola* со стороны тест-микромицетов. Более того, культуральная жидкость *F. pinicola* (75 мл культуральная жидкость на 100 мл КДА) значительно ингибировала рост и споруляцию, в частности видов *Penicillium*. Фунгистатический эффект в отношении *Ch. keratinophilum* проявила культуральная жидкость штамма Ha-2 [32].

*Работа была выполнена при финансовой поддержке Армяно-Российского совместного проекта ГКН МОН Республики Армения № 13AR-110 и РФФИ гранта 13-04-90607.*

#### Список литературы

- Zjawiony JK. Biologically active compounds from Aphyllphorales (Polypore) fungi. J Nat Prod. 2004; 67: 300-10.
- Saltarelli R, Ceccaroli P, Buffalini M et al. Biochemical characterization, antioxidant and antiproliferative activities of different Ganoderma collections. J Mol Microbiol Biotechnol. 2015; 25: 16-25.
- Badalyan SM, Shnyreva AV, Iotti M, Zambonelli A. Genetic resources and cultural characteristics of several medicinal polypore mushrooms (Basidiomycota, Polyporales). Int J Med Mushrooms. 2015; 17(4): 371-84.
- Stamets P. Novel antimicrobials from mushrooms. Herbal Gram. 2002; 54: 28-33.
- Grienke U, Zöll M, Peintner U, Rollinger JM. European medicinal polypores. A modern view on traditional uses. J Ethnopharmacol. 2014; 154: 564-83.
- Cheng J-J, Lin C-Y, Lur H-S et al. Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus Fomitopsis pinicola. Process Biochem. 2008; 43: 829-34.
- Chen W, Zhao Z, Chen S-F, Li Y-Q. Optimization for the production of exopolysaccharide from Fomes fomentarius in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. Biores Technol. 2008; 99: 3187-94.
- Zang Y, J Xiong, W-Z Zhai, L Cao, S-P Zhang et al. Fomentarols A-D, sterols from the polypore macrofungus Fomes fomentarius. Phytochemistry. 2013; 92: 137-45.
- Zhao J-Y, J-H Ding, Z-H Li, Z-J Dong et al. Three new phenyl-ethanediols from the fruiting bodies of the mushroom Fomes fomentarius. J Asian Nat Prod Research. 2013; 15: 310-14.
- Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. Int J Med Mushrooms. 1999; 1: 31-62.
- León L, Beltrán B, Moujir L. Antimicrobial activity of 6-oxophenolic triterpenoids. Mode of action against Bacillus subtilis. Planta Med. 2005; 71: 313-9.
- Keller CA, Maillard MP, Hostettmann K, 1996. Antimicrobial steroids from the fungus Fomitopsis pinicola. Phytochemistry, 41: 1041-6.
- Liu X-T, Winkler AL, Schwan WR et al. Antibacterial compounds from mushrooms II: lanostane triterpenoids and an ergostane steroids with activity against Bacillus cereus isolated from Fomitopsis pinicola. Planta Med. 2010; 76: 464-6.
- Li L, Bao H-Y. Antimicrobial activity of different extracts from fruiting body of Fomes fomentarius *in vitro*. Edible Fungi of China. 2011-02.
- Seniuk OF, Gorovoj LF, Beketova GV, Savichuk HO et al. Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom Fomes fomentarius (L. : Fr.) Fr. (Aphyllphoromycetidae). Int J Med Mushrooms. 2011; 13(1): 7-18.
- Aoki M, Tan M, Fukushima A et al. Antiviral substances with systemic effects produced by basidiomycetes such as Fomes fomentarius. Biosci Biotechnol Biochem. 1993; 57: 278-82.
- Krupodorova T, Rybalko S, Barshteyn V. Antiviral activity of basidiomycete mycelia against influenza type A (serotype H1N1) and herpes simplex virus type 2 in cell culture. Virologica Sinica. 2014; 29: 284-90.
- Guler P, Akata I, Kutluer F. Antifungal activities of Fomitopsis pinicola (Sw.:Fr) Karst. and Lactarius vellereus (Pers.) Fr. Afr J Biotechnol. 2009; 8: 3811-3.
- Dresch P, D'Aguanno MN, Rosam K et al. Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores Fomes fomentarius, Fomitopsis pinicola and Piptoporus betulinus. AMB Express 2015; 5: 4.



20. Choi DB, Park S-S, Ding, J-L, Cha W-S. Effects of Fomitopsis pinicola extracts on antioxidant and antitumor activities. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2007; 12: 516-24.
21. Wu H-T, Lu F-H, Su Y-C et al. In vivo and in vitro anti-tumor effect of fungal extracts. *Molecules.* 2014; 19: 2546-56.
22. He X, Shen X, Liu Q et al. Antitumor effect in vitro of compound Fomes fomentarius. *Chinese J Exp Trad Med Formulae.* 2013-3.
23. Liu L, Zheng W, Zhou S. The anti-tumour effect of ethanol extract of Fomes fomentarius and its influence on immunological function in tumor-bearing mice. *Acta Acad Med Xuzhou.* 2007. 08.
24. Park YM, Kim IT, Park HJ et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of Fomes fomentarius. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27: 1588-93.
25. Kalyoncu F, Oskay M, Hüsnüye K. Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology* 2010; 1: 195-9.
26. Vazirian M, Dianat S, Manayi A et al. Anti-inflammatory effect, total polysaccharide, total phenolics content and antioxidant activity of the aqueous extract of three basidiomycetes. *Res J Pharmacol.* 2014; 1: 15-21.
27. Yang B-K, Kim G-N, Jeong Y-T et al. Hypoglycemic effects of exo-biopolymers produced by five different medicinal mushrooms in STZ-induced diabetic rats. *Mycobiology.* 2008; 36: 45-9.
28. Lee J-S. Effects of Fomes fomentarius supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Res.* 2005; 25: 187-95.
29. Lee SI, Kim JS, Oh SH et al. Anti-hyperglycemic effect of Fomitopsis pinicola extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food.* 2008; 11: 518-24.
30. Cha W-S, Ji-Lu Ding, H-J Shin et al. Effect of Fomitopsis pinicola extract on blood glucose and lipid metabolism in diabetic rats. *Korean J. Chem Eng.* 2009; 26: 1696-9.
31. Sakeyan CZ. Biological characteristics and biotechnological potential of several wood decaying mushrooms (Aphyllophoromycetidae). *Synopsis PhD Thesis.* Yerevan. 2010: 27 p.
32. Badalyan SM, Gharibyan NG, Shnyreva AV, Shahbazyan TA. Antifungal activity of Fomitopsis pinicola collections against potentially pathogenic for humans and animals filamentous fungi. *ICMBMP8.* New Delhi, India. 2014: 93-4.

---

## ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТИВНОСТИ СУБСТРАТОВ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ ГРИБОВ РОДА *PLEUROTUS*

*Бандура И.И.*

*Таврический государственный агротехнологический университет, Мелитополь*

Одним из показателей элективности субстратов для промышленного культивирования грибов является его микробиологический состав [1]. Наличие термофильных микроорганизмов на поверхности растительного сырья, прошедшего термообработку, по мнению многих исследователей [2, 3] способствует повышению эффективности физиологических процессов вегетативного развития культивируемых грибов. Это происходит за счет использования бактериальной микрофлоры как предшественника пищевой цепи, создающего в субстрате оптимальный биохимический баланс [4, 5].

Стабильность работы грибоводческих предприятий по культивированию вешенки напрямую зависит от микробиологического качества производимого субстрата. Термическая обработка растительного сырья сводится обычно к трем принципиально разным технологическим приемам: пастеризации паром (100–110 °C), горячей водой (65–80 °C) [6, 7] или аэробной твердофазной ферментации в высоком слое (АФ) [8]. Первые 2 метода нацелены на элиминацию микроорганизмов, находящихся на поверхности растительного сырья, последний предполагает наращивание термофильной микрофлоры [9]. Выбор способа обработки зависит от индивидуальных особенностей предприятия: объема производства, доступности источников сырьевых материалов и водных ресурсов. Режимы температурного воздействия, призванные обеспечить эффективность любого из методов термической обработки, должны учитывать исходное каче-

ство сырьевых компонентов (растительных остатков и воды), степень их микробиологической чистоты [10].

Определение состава и количества микроорганизмов в субстратных смывах проводили по ООК, поэтому этот важный показатель редко использовали для оценки качества субстратов [12,13].

**Цель исследования** – апробация методики экспресс-анализа микробиологии субстратов для возможной коррекции технологических режимов температурной обработки растительного сырья.

**Материалы и методы исследований.** Образцы субстратов для анализа микрофлоры на разных стадиях изготовления отбирали в хозяйствах Донецкой, Запорожской, Луганской, Днепропетровской и Херсонской областей по методике агрохимического исследования тепличного грунта [14]. Отбор проб из водных источников проводили в соответствии с Государственными санитарными правилами и нормами, утвержденными приказом МОЗУ от 23 декабря 1996 г. за №383.

Смывы субстратов получали следующим образом: в стерильную емкость помещали 10 г усредненной пробы и добавляли 50 мл свежей дистиллированной воды. Смыв осуществляли перемешиванием на магнитной мешалке в течение 15 мин или периодическим помешиванием стеклянной палочкой в течение 30 мин. При исследовании ферментированных субстратов, характеризующихся многочисленной микрофлорой, использовали метод стандартных разведений Коха [11].

Одну каплю полученной суспензии подпускали к притертому до радужных колец покровному стеклу на камере Горяева, достигая полного заполнения пространства между камерой и стеклом. Остатки суспензии удаляли бумажной салфеткой. Устанавливали наличие живых одноклеточных организмов, спор и мицелия плесневых грибов, состав бактериальной сукцессии, ее однородность. Микробиологические объекты изучали при увеличении от 600× до 1000× с использованием видео и фотосъемки цифровыми камерами для микроскопа Micam и D-2 (Китай).

Для подсчета микроорганизмов использовали программу ImageJ, которая позволяет не только подсчитать общее число объектов на снимках смывов, но и сгруппировать их. Титр колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли по следующей формуле:

$$X = N/(n) 4000 \times m,$$

где  $X$  – количество микроорганизмов (МКО) в одном грамме субстрата,  $г^{-1}$ .

$N$  – сумма МКО в малых квадратах камеры Горяева.

(Примечание: подсчитывали количество МКО в 80 – 84 малых или в 5 больших квадратах по диагонали), шт.;

$n$  – количество квадратов, взятых для подсчета, шт.;

$m$  – степень разведения смыва.

Определение титра КОЕ в грамме субстрата проводили одновременно как по стандартным ме-

тодикам, так и экспресс-методом в пятикратной повторности. Биологическую эффективность культивируемого штамма НК-35 (Sylvan) рассчитывали по отношению массы свежих грибов к абсолютно сухой массе субстрата. Потери субстрата определяли соотношением массы блоков с бактериальными и плесневыми поражениями к общей массе партии произведенного субстрата.

**Обсуждение результатов.** Статистическим анализом количественного состава микрофлоры субстратов доказано отсутствие различий между результатами используемых методов. Полученные данные также согласуются с известными литературными источниками, что говорит о достаточной точности предлагаемой методики (табл. 1).

Технология пастеризации растительного сырья паром базируется на стремлении к полной элиминации бактериальных форм. Однако температурные режимы данного метода не позволяют добиться уничтожения спор плесневых грибов, которые конкурируют с вешенкой за источники питания [15]. После жесткой длительной термической обработки при  $T \geq 100$  °C количество легкодоступных сахаров увеличивается, что способствует развитию дрожжевых грибов (рис. 1, а).

Особое внимание при данном способе производства субстрата уделяется микробиологическому качеству используемой воды. Бактериальная флора, привносимая с водой, которая используется для ох-

Таблица 1. Сравнение методов контроля количества колониеобразующих единиц в смывах субстратов для культивирования вешенки (Fф < F05)

Методы термической обработки	Титр КОЕ $г^{-1}$ , определенный посевом на твердую питательную среду	Титр КОЕ $г^{-1}$ , определенный подсчетом в камере Горяева	Данные литературы
ПВ	$(2,53 \pm 0,72) \times 10^5$	$(2,52 \pm 0,74) \times 10^5$	от $2,18 \times 10^5$ до $1,1 \times 10^7$ [6, 7]
ПП	$(5,30 \pm 0,82) \times 10^4$	$(5,35 \pm 0,82) \times 10^4$	-
АФ	$(5,11 \pm 1,03) \times 10^5$	$(2,01 \pm 0,28) \times 10^6$	от $6,2 \times 10^5$ до $9,06 \times 10^6$ [4]

Примечания: ПВ – пастеризация водой; ПП – пастеризация паром; АФ – аэробная ферментация.

лаждения растительного сырья после пропаривания, вызывает бактериальное поражение субстрата и приводит к значительному снижению биологической эффективности культивируемого штамма вешенки. Использование питьевой воды с низким титром КОЕ позволило сократить длительность температурного воздействия. Это дало возможность получить качественный субстрат при значительной экономии энергоресурсов (рис. 1, б).

Экспресс-анализ позволяет контролировать титр и состав микроорганизмов на любом этапе его изготовления. В субстратах, изготовленных методом пастеризации водой при условии длительного охлаждения, активно развиваются мезофильные бактерии (рис. 2, а). Наличие мезофильной микрофлоры в субстрате приводит к интенсивному разогреву субстратных блоков, что вызывает отток влаги и питательных

элементов от центра к периферии. В этом случае из перфораций выделяется жидкость с неприятным гнилостным запахом, а в центре блока вегетативный мицелий вешенки погибает из-за высоких температур.

Ускорение процесса охлаждения субстратов путем принудительной вентиляции очищенным холодным воздухом приводило к значительному снижению титра бактерий (рис. 2, б).

При обнаружении простейших одноклеточных организмов (Amoeba, Infusoria) в смывах субстратов было выделено две причины данной проблемы: (1) недостаточный уровень температуры при обработке растительного сырья и (2) существенная контаминация воды, используемой для его охлаждения.

Применение экспресс-анализа позволило добиться значительного сокращения длительности процесса аэробной ферментации. Классический метод [16, 17]

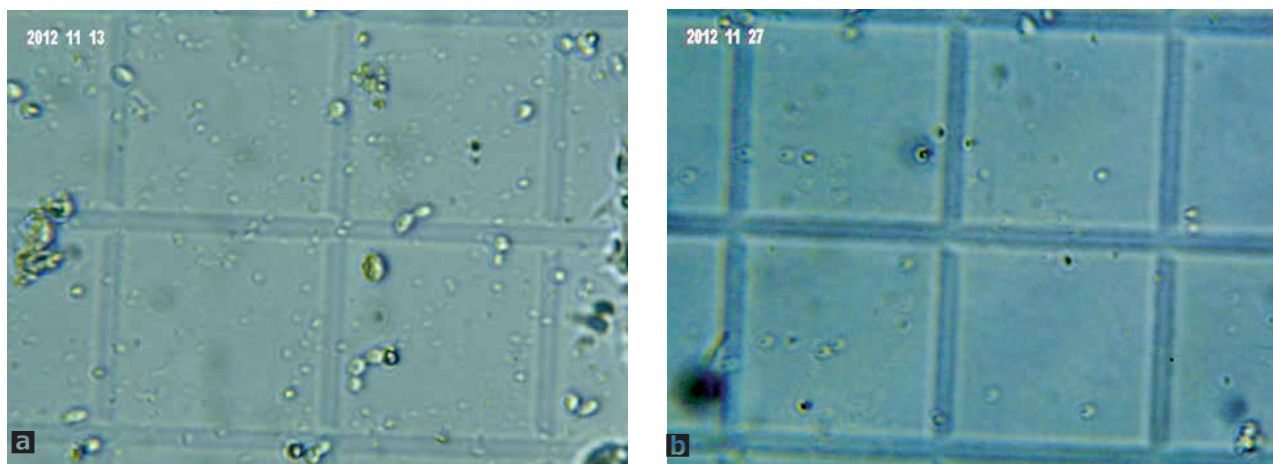


Рисунок 1. Пастеризация паром (с. Павловка, Донецкая область)

- а) Длительность термообработки 6 ч ( $T \geq 100^\circ \text{C}$ ); потери субстрата – 65%, показатель биологической эффективности (БЭ) 17%, начальный титр МКО воды –  $125 \pm 13$  КОЕ мл<sup>-1</sup>;  
 б) Длительность термообработки 2 ч ( $T \geq 100^\circ \text{C}$ ); потери субстрата – 2%, показатель БЭ – 43%, начальный титр МКО воды –  $5 \pm 3$  КОЕ мл<sup>-1</sup>.

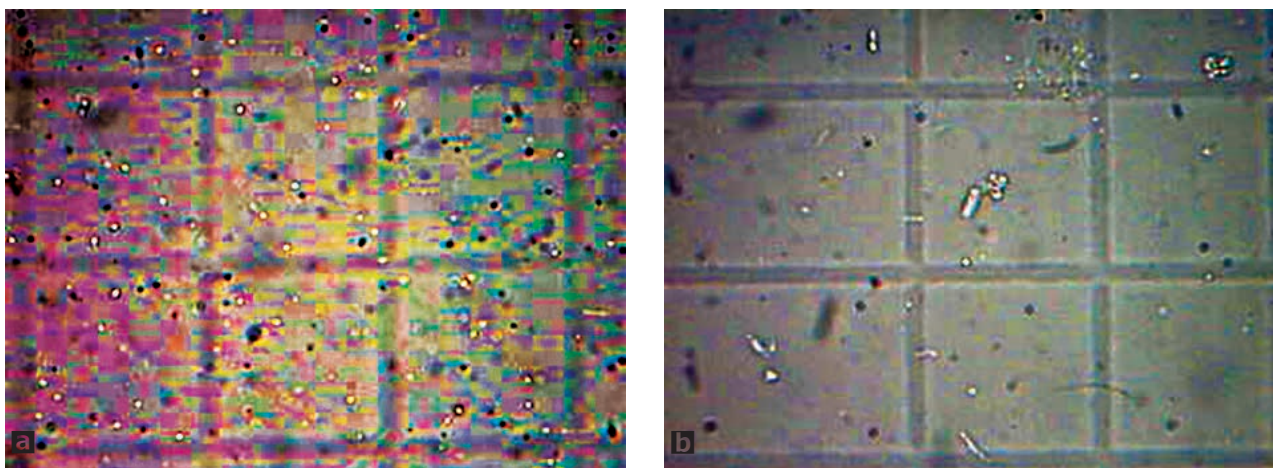


Рисунок 2. Анализ субстратов приготовленных методом пастеризации горячей водой (г. Константиновка, Донецкая область).

- а) Длительность охлаждения 18 ч ( $t < 45^\circ \text{C}$ ); брак субстрата – 35%, показатель БЭ – 26%, начальный титр МКО воды –  $2 \pm 1$  КОЕ мл<sup>-1</sup>;  
 б) Длительность охлаждения 2 ч ( $t < 45^\circ \text{C}$ ); потери субстрата – 1%, показатель БЭ – 52%, начальный титр МКО воды –  $2 \pm 1$  КОЕ мл<sup>-1</sup>.

предполагал 6-дневный этап «провокации», температурные режимы которого нацелены на инициацию вегетативного роста спор плесневых грибов и бактериальных форм, которые, инактивируются в процессе пастеризации.

Контроль скорости развития микрофлоры доказал возможность сокращения данной фазы в 3–4 раза при сохранении оптимальных биохимических и физических показателей субстрата (табл. 2).

**Заключение.** В результате проведенных исследований выявлена возможность экспресс-оценки микробиологического состава субстратов для культивирования вешенки на разных этапах его изготовления. Данный метод позволяет вносить необходимые изменения в процесс температурной обработки растительного сырья и способствует получению ка-

чественного субстрата всеми известными способами его промышленного производства.

*Выражаю искреннюю благодарность владельцам грибководческих хозяйств Украины и сотрудникам испанской фирмы «Champrienter» за оказанную поддержку и предоставленные условия для проведения исследований.*

*Особая благодарность Бисько Н.А., д.б.н., ведущему сотруднику лаборатории микологии Института ботаники им. Холодного за ее неоценимую помощь в теоретическом обосновании методики.*

#### Список литературы

1. Бисько Н.А. Влияние бактерий рода *Bacillus* на жизнедеятельность вешенки обыкновенной *Pleurotus*

Таблица 2. Сравнение технологических показателей качества субстратов, изготовленных классическим (КМ) и сокращенным (СМ) методами аэробной твердофазной ферментации в высоком слое ( $F_{\phi} < F05$ ).

Методы термической обработки	Титр КОЕ г <sup>-1</sup> , определенный посевом на твердую питательную среду	Титр КОЕ г <sup>-1</sup> , определенный подсчетом в камере Горяева	Данные литературы
ПВ	$(2,53 \pm 0,72) \times 10^5$	$(2,52 \pm 0,74) \times 10^5$	от $2,18 \times 10^5$ до $1,1 \times 10^7$ [6, 7]
ПП	$(5,30 \pm 0,82) \times 10^4$	$(5,35 \pm 0,82) \times 10^4$	-
АФ	$(5,11 \pm 1,03) \times 10^5$	$(2,01 \pm 0,28) \times 10^6$	от $6,2 \times 10^5$ до $9,06 \times 10^6$ [4]

Примечания: RH – относительная влажность, Нобщ.– содержание общего азота по Кьельдалю, C/N – отношение углерода к азоту.

- ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm. в частично замкнутой искусственной экосистеме. Микол. фитопатол. 1995; 29(5-6): 1-7.
- Бисько Н.А. Термофильные бактерии и селективность субстрата для выращивания видов рода вешенка. Киев: ООО Международная консультативно-производственная группа «ГРИБЫ». 2001: 21-30.
  - Анненков Б. Г. Использование *Bacillus cereus* в создании качественных избирательных субстратов для интенсивного культивирования вешенки. Дальневост. аграрн. вестн. 2008. 2(6): 12.
  - Бисько Н.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка. К.: Наук. думка. 1987: 148.
  - Maziero R. Effects of different heat pre-treatments of wheat straw on its microbial activity and colonization by different tropical and sub-tropical edible mushrooms. World J Microbiol & Biotechnol. 1994; 10(4): 374-80.
  - Карпов Ф. Ф. Гидротермическая обработка субстрата для выращивания вешенки. Школа грибоводства. 2002. 2: 8-10.
  - Kim Y, Hendrickson R, Mosier NS, Ladisch MR. Liquid hot water pretreatment of cellulosic biomass. Biofuels. Totowa, NJ: Humana Press. 2009: 93-102.
  - Oei P. Small-scale mushroom cultivation: Oyster, Shiitake and wood ear mushrooms. Wageningen; Wageningen: Agromisa ; СТА, 2005: 86 p.
  - Капич А.Н. Аэробная ферментация субстрата для выращивания вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. с участием бактерий рода *Bacillus*. Микол фитопатол. 1995; 32(5): 61-5.
  - Методы экспериментальной микологии: справочник под ред. В.И. Билай. К.: Наук. думка, 1982: 550 с.
  - Приготовление субстрата. Ч. 1. Киев: ООО Международная консультативно-производственная группа «ГРИБЫ». 2001: 8-9.
  - Тищенко А.Д. Повышение селективности субстрата для выращивания вешенки с помощью аэробной ферментации. Школа грибоводства. 2000; 5: 14-7.
  - Kredics L, Kocsis S, Nagy L, Komon' -Zelazowska M. Molecular identification of *Trichoderma* species associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. FML FEMS Microbiol Lett. 2009; 300(1): 58-67.
  - Павлов Ф.И., Девочкин Л.А. Выращивание грибов на промышленной основе. М.: Россельхозиздат, 1987: 47 с.

## ОБРАЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS TERREUS* В УСЛОВИЯХ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Баранова Н.А., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Пискункова Н.Ф., Звонарева Е.С.,  
Кураков А.В., Егоров Н.С.  
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Мицелиальные грибы образуют ряд вторичных метаболитов на пути поликетидного синтеза, включая антибиотики, микотоксины, статины.

Наиболее активным продуцентом статинов является микромицет *Aspergillus terreus*, образующий ловастатин (мевинолин, монаколин К, мевакор) – конкурентный ингибитор фермента гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы. Ловастатин снижает уровень мевалоната – предшественника стеролов, в том числе холестерина, и широко используется в качестве лекар-

ственного препарата, снижающего уровень холестерина и липопротеинов низкой плотности в крови [1].

Исследованы два способа получения ловастатина микромицетом *Aspergillus terreus* – глубинный способ (ГСК) и твердофазный способ культивирования (ТФК).

Процесс использования ТФК для получения вторичных метаболитов характеризуется рядом положительных факторов, а именно: низким содержанием воды, малыми энергозатратами, меньшим использова-

нием растворителей для экстракции продуктов и самое главное – высокой продуктивностью мицелия по сравнению с глубинным способом культивирования.

*A. terreus* образует в 14 раз больше ловастатина в условиях ТФК, чем при ГСК [2]. Высокая продуктивность мицелия *A. terreus* в условиях ТФК обусловлена более высокой экспрессией генов lovF (экспрессия выше более чем в два раза по сравнению с ГСК) и lovE (экспрессия в 4,7 раз выше, чем при ГСК) [3].

Кроме ловастатина на пути поликетидного синтеза *A. terreus* образует микотоксин – цитринин и антибиотики – геодин и эмодин.

Было изучено образование антибиотических веществ и ловастатина различными штаммами *A. terreus* в условиях ТФК. В работе были использованы 6 штаммов *A. terreus*, полученные из коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ от профессора А.В. Куракова. Это штаммы *A. terreus* шт. 2, шт. 4, шт. 7, шт. 14, шт. 15 и шт. 16.

Известно, что различные изоляты *A. terreus* отличаются по ряду морфологических и биохимических признаков, в частности, по продуктивности образования вторичных метаболитов.

В качестве субстрата твердой фазы для ТФК использовали пшеничные отруби. Грибы выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл. В колбу помещали 15 г пшеничных отрубей, которые смачивали 25 мл воды, и стерилизовали при 1 атм. Колбы засеивали 1 мл суспензии спор гриба. Микромицеты выращивали в течение 11 сут в термостате при 29 °С в стационарных условиях. Вторичные метаболиты экстрагировали 70 мл 80%-ного этанола. Твердый субстрат измельчали шпателем и оставляли для экстракции на сутки, периодически помешивая содержимое колб. Затем смесь центрифугировали в течение 20 мин при 6000 об/мин, и в экстрактах определяли антибиотическую активность и статины.

Антибиотическую активность определяли с тест-организмом *Staphylococcus aureus*, а количество статинов со штаммом дрожжей *Rhodotorula rubra* ВКПМ У 1337, чувствительных к ловастатину [4].

Данные таблицы показывают, что исследуемые штаммы значительно отличаются по способности образовывать антибиотические вещества. Наиболее активными оказались *A. terreus* шт. 4, шт. 14 и шт. 16. Наибольшая ингибирующая активность с тест-организмом *Rh. rubra* обнаружена у штаммов *A. terreus* шт. 2, шт. 14 и шт. 16 (табл.). Ранее нами было показано, что *A. terreus* шт. 2 не образует статинов в глубинных условиях культивирования, но активен при твердофазном выращивании на пшеничных отрубях.

В процессе роста микромицета в условиях ТФК было установлено, что антибиотическая активность проявляется на 5-е сут культивирования и сохраняется практически на одном уровне в течение следующих 5 сут, а ингибирующая активность с дрожжами *Rh. rubra* проявляется на 3-и сут культивирования, достигает максимума на 6-е сут и сохраняется в последующие четыре суток (рис.).

Табл. Образование антибиотических веществ и статинов различными штаммами микромицета *A. terreus*

Штамм <i>A. terreus</i>	<i>d</i> зон подавления роста <i>St. aureus</i> , в мм	<i>d</i> зон подавления роста <i>Rh. rubra</i> , в мм
№ 2	10,0	16,0
№ 4	18,5	11,0
№ 7	11,0	Следы
№ 14	17,5	21,5
№ 15	11,0	13,0
№ 16	20,5	25,5

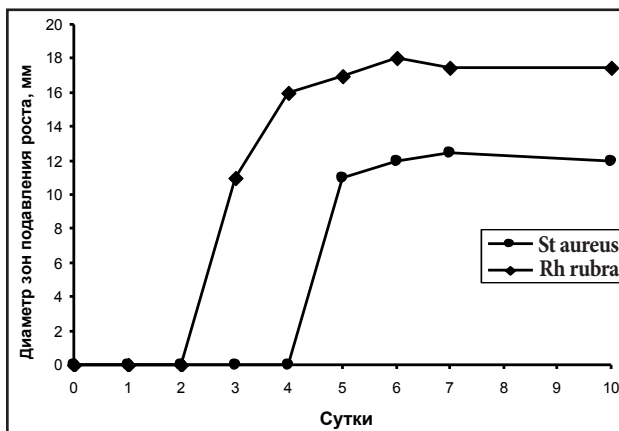


Рис. Образование антибиотиков и статинов микромицетом *A. terreus* шт. 2 в динамике развития гриба.

Таким образом, *A. terreus* шт. 2 на 11-е сут в условиях ТФК проявляет наименьшую антибиотическую активность по сравнению с другими шт. *A. terreus* и высокую ингибирующую активность по отношению к *Rh. rubra*. Кроме того, *A. terreus* шт. 2 на 4-е сут культивирования в условиях ТФК образует только вещества, ингибирующие рост *Rh. rubra*, т.е. статины, что важно для последующего выделения продукта.

#### Список литературы

1. Alberts AW, Chen J, Kurov O et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethyl-glutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci USA. 1980; 77: 3957-61.
2. Barrios-Gonzalez J, Miranda RU. Biotechnological production and applications of statins. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 85: 869-83.
3. Barrios-González J, Baños JG, Covarrubias AA, Garay-Arroyo A. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 79(2): 179-86.
4. Баранова Н.А., Крейер В.Г., Егоров Н.С. Рост дрожжей *Rhodotorula rubra* и биосинтез ими эргостерина на средах с ловастатином. Антибиот. химиотер., 1996; 41(11): 3-6.

## ОТБОР ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ – ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ ПО ПРОДУКТИВНОСТИ БИОМАССЫ

Бардашева А.В., Косогова Т.А., Теплякова Т.В.

ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово Новосибирской области

Одними из перспективных источников получения лекарственных препаратов являются высшие грибы. Исследования, проведенные в ГНЦ ВБ Вектор, позволили на сегодняшний день выделить в чистую культуру 98 штаммов 49 видов базидиальных грибов, произрастающих на юге Западной Сибири, многие из которых обладают лекарственными свойствами [1–4].

Наиболее продуктивные по накоплению биомассы штаммы базидиальных грибов отбирали среди 37

культур из коллекции лаборатории микологии. На шести агаризованных питательных средах учитывались скорость роста и ростовой коэффициент [5] грибов из разных видов (табл. 1).

Как видно из табл. 1, штаммы *Pleurotus ostreatus* предпочитали питательную среду на основе овсяного отвара и кукурузного экстракта (ОКА), а также среды, содержащие глюкозу и соевую муку (ГСА). Наибольший РК наблюдался у штаммов *Piptoporus*

Таблица 1. Трофические потребности штаммов

Вид гриба	Штамм гриба	Питательная среда, ростовой коэффициент
<i>Pleurotus ostreatus</i>	AI-13-22	КГА – 73, ОКА – 73, ГТА – 68
	KR-13-15	<b>ГСА – 93</b> , ОКА – 65
	K-09-26	МКА – 88, ОКА – 68
	Д-09-01	ГСА – 88, ОКА – 68
	K-09-27	<b>ГСА – 95</b> , ОКА – 64
	БШ-08-01	ГСА – 73, ОКА – 73, ГТА – 86
	НК-35	<b>КГА – 97</b> , ГСА – 84
	Н-09-01	КГА – 72, МКА – 72, <b>ГСА – 109</b>
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	K-08/2	<b>МКА – 85</b> , ОКА – 63
	K-96	МКА – 67, ГТА – 49
<i>Trametes gibbosa</i>	2262	МКА – 49, ГТА – 66
	K-10-01	ГТА – 53, <b>МКА – 70</b>
	K-114	ГТА – 63, <b>МКА – 73</b>
<i>Trametes pubescens</i>	C-10-01	<b>ГТА – 102</b> , МКА – 79
<i>Trametes versicolor</i>	K-817	КГА – 73, МКА – 65
	Kp-111	<b>КГА – 109</b> , МКА – 64
	Г-08/1	КГА – 72, ОКА – 72
	Г-08/2	КГА – 72, ГТА – 64
	K-09-01	КГА – 73, МКА – 73, ГТА – 65
<i>Trametes trogii</i>	K-10-05	<b>КГА – 146</b> , <b>МКА – 108</b> , ГТА – 70
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	K-13-23	КГА – 65, ГТА – 51
	B-13-25	<b>КГА – 79</b> , ГСА – 54
	2266	КГА – 48, МКА – 42
	K-13-24	КГА – 54, ОКА – 62
<i>Fomitopsis pinicola</i>	KL-2	ГСА – 83, ОКА – 45
	AN-13-05	<b>КГА – 95</b> , ГСА – 79, ГТА – 50
	Саяны-1	КГА – 51, ГСА – 77
	KR-13-14	<b>КГА – 109</b> , ГСА – 71
	TV-13-02	<b>КГА – 109</b> , ГСА – 57
	П-8	<b>КГА – 87</b> , ГТА – 48
	G-13-19	<b>КГА – 91</b> , <b>ОКА – 116</b>
<i>Ganoderma applanatum</i>	K-113	КГА – 52, <b>МКА – 66</b>
	K-09-25	КГА – 46, МКА – 49
	M-8	КГА – 57, МКА – 35
<i>Piptoporus betulinus</i>	2261	МКА – 33, <b>ГСА – 55</b>
	ОБ-10	ГТА – 46, МКА – 47
	KR-13-13	ГТА – 29, МКА – 36

Таблица 2. Количество биомассы и кислотность питательной среды при культивировании грибов на глюкозо-триптонной среде в глубинных условиях

Вид гриба	Штамм гриба	Количество биомассы, г/л	pH среды до культивирования	pH среды после культивирования
<i>Pleurotus ostreatus</i>	AI-13-03	8,83±0,57	6,0	6,1
	KR-13-15	3,80±0,16	6,0	6,1
	K-09-26	4,69±0,23	6,0	6,4
	Д-09-01	10,00±1,54	6,0	6,5
	K-09-27	4,69±0,23	6,0	6,4
	БШ-08-01	6,41±1,27	6,0	6,6
	НК-35	5,96±0,23	6,0	6,7
	Н-09-01	10,27±0,19	6,0	6,9
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	K-08/2	6,94±0,04	6,0	6,1
	К-96	8,63±1,64	6,0	6,3
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	К-13-23	10,8±0,1	6,0	5,4
	К-13-24	10,7±0,1	6,0	5,6
	В-13-25	7,7±0,1	6,0	5,7
	2266	10,5±0,7	6,0	5,0
<i>Trametes versicolor</i>	K-817	5,4±1,4	5,0	4,8
	Кр-111	4,11±1,65	5,0	4,5
	Г-08/1	8,18±0,70	5,0	3,5
	Г-08/2	6,99±0,16	5,0	4,3
	К-09-01	7,29±0,19	5,0	3,5
<i>Trametes pubescens</i>	С-10-01	9,2±0,9	5,0	4,5
<i>Trametes gibbosa</i>	К-10-01	6,27±0,52	5,0	4,5

*betulinus* и *Pleurotus pulmonarius* на среде, содержащей мелассу и кукурузный экстракт (МКА). Все штаммы *Trametes gibbosa* и *Tr. pubescens* быстро росли на средах, включающих мелассу и кукурузный экстракт (МКА), а также глюкозу и триптон (ГТА). Штаммы *Tr. versicolor*, *Tr. trogii*, *Daedaleopsis confragosa*, *Fomitopsis pinicola* и *Ganoderma applanatum* обладали наибольшим ростовым коэффициентом (РК) на картофельно-глюкозной среде (КГА).

Наибольшую продуктивность биомассы при росте на агаризованной глюкозо-триптонной среде (ГТА) в поверхностной культуре (табл. 1) по РК показали штаммы: *Pleurotus ostreatus* AI-13-03 (РК=68); *P. ostreatus* БШ-08-01 (РК=86); *P. pulmonarius* К-96 (РК=49); *Tr. gibbosa* 2262 (РК=66); *T. gibbosa* К-114 (РК=63); *Tr. versicolor* Г-08/2 (РК=64); *T. versicolor* К-09-01 (РК=65); *Tr. trogii* (РК=70); *D. confragosa* К-13-23 (РК=51); *F. pinicola* AN-13-05 (РК=50); *F. pinicola* П-8 (РК=48); *G. applanatum* М-8 (РК=32); *Piptoporus betulinus* ОБ-10 (РК=46). Самым большим ростовым коэффициентом характеризовался штамм *Tr. pubescens* С-10-01 (РК=102).

Приведенные в табл. 1 и 2 данные свидетельствуют о корреляции продуктивности биомассы исследуемых видов и штаммов грибов при культивировании их на агаризованной и жидкой глюкозо-триптонной среде в погруженной культуре. В табл. 2 приведены данные по количеству сухой биомассы, полученной при глубин-

ном культивировании грибов на глюкозо-триптонной среде (ГТС). Из табл. 2 видно, что pH среды остается неизменным для *Pleurotus* и *Daedaleopsis*. Для грибов *Trametes* кислотность питательной среды смещается в кислую сторону.

#### Список литературы

1. Косогова Т.А., Теплякова Т.В. Выделение в культуру лекарственных видов базидиальных грибов. Мат. 5 съезда Общ. биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Москва, 2–4 дек. 2008 г. Под ред. Р.Г. Василова. М.: ИАЦ, 2008: 273-75.
2. Горбунова И.А., Власенко В.А., Теплякова Т.В. и др. Ресурсы лекарственных грибов на юге Западной Сибири. Хвойные бореальной зоны. 2009; 26(1): 12-21.
3. Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Ананько Г.Г. и др. Грибы – источник функциональных продуктов питания и лечебно-профилактических препаратов. Пища. Экология. Качество: Тр. X между. н.-практ. конф (Краснообск, 1–3 июля 2013 г.). Новосибирск. 2013: 238-42.
4. Теплякова Т.В., Косогова Т.А. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск, 2014: 299 с.
5. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка. 1988: 144 с.

**ПОЛУЧЕНИЕ ОБОГАЩЕННОГО ЭНДОГЛЮКАНАЗОЙ I  
ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА С ПОМОЩЬЮ НОВОГО  
МУТАНТА *TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM* TW1-59-27 –  
ПРОДУЦЕНТА ЦЕЛЛЮЛАЗ И КСИЛАНАЗ.**

*Беккаревич А.О., Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Бубнова Т.В., Матыс В.Ю.,  
Окунев О.Н., Осипов Д.О.<sup>1</sup>, Кондратьева Е.Г.<sup>1</sup>, Сеницын А.П.<sup>1</sup>*  
*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино*  
*<sup>1</sup>Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Москва*

Ферментные препараты (ФП), получаемые на основе грибов *Trichoderma*, широко применяются в различных отраслях промышленности и в сельском хозяйстве [1].

Для биотехнологических процессов требуются ФП, обогащенные соответствующими ферментами. В результате последовательного двухэтапного мутагенеза исходного штамма *Tr. longibrachiatum* TW1 (Всемирная коллекция микроорганизмов № F-3634D) был получен новый мутант TW1-59-27, способный эффективно секретировать целлюлазы и ксиланазы.

Споры исходного штамма TW1 подвергали воздействию  $\gamma$ -излучения в дозе 1500 Гр в течение 6 ч (РНЦ «Курчатовский институт»), выживаемость – 0,001%. Селекцией на чашках с целлюлозой и культивирования в колбах (также с целлюлозой) с измерением активностей целлюлазы (по отношению к карбоксиметилцеллюлозе) и ксиланазы (по отношению к березовому ксилану), были последовательно отобраны мутанты TW1-59 и TW1-59-27. Генетическую стабильность мутантов оценивали по их способности сохранять повышенную целлюлазную активность после 7 последовательных пересевов на глюкозо-картофельном агаре – неселективной среде, не содержащей индуктора (целлюлозы). Повышенная активность мутантов после пересевов сохранялась.

Затем мутанты культивировали в 1-литровых ферментерах «КФ-108» в режиме fed-batch с непрерывной подачей подпитывающего раствора лактозы начиная с 48 ч. Параметры культивирования: pH (4,5), температуру (28 °C), парциальное давление кислорода  $pO_2$  (30%), и скорость подачи подпитки – автоматически контролировались с помощью программного комплекса «Quadrus» («Проинтех», Россия).

При fed-batch культивировании активность ферментов целлюлазного комплекса значительно возросла по сравнению с культивированием в колбах. Повышенная активность мутантов по сравнению с исходным штаммом TW1 также сохранялась. Так, активности целлюлазы и ксиланазы в культуральной жидкости у мутантного штамма TW1-59-27 были выше, чем у TW1, в 1,8 и 2 раза соответственно, а содержание белка – в 1,5 раза.

Из культуральной жидкости в конце ферментации (144 ч) были изготовлены сухие ФП путем ультраконцентрации и лиофильного высушивания на сублимационной установке КС-30 (Чехия). Активность ферментов в сухих ФП у мутантов также была выше в 1,3–1,8 раза по сравнению с ФП из исходного штамма TW1 (табл 1). Компонентный состав ФП определяли методом FPLC-хроматографии и идентификации фракций, как описано [2]. Как известно, ферментный

Табл. 1 Активность ферментов (общая в ед/г ФП и удельная в ед/мг белка) в ФП из исходного (TW1) и мутантного (TW1-59-27) штаммов

Штамм	Целлюлаза		Ксиланаза	
	общая	удельная	общая	удельная
TW1	5550	7,4	2550	3,4
TW1-59-27	9180	13,5	3060	4,5

комплекс *T. longibrachiatum* представлен двумя целлобиогидролазами (ЦБГ1 и ЦБГ2, КФ 3.2.1.74), тремя эндоглюканазами (ЭГ1, ЭГ2 и ЭГ3, КФ 3.2.1.4), тремя ксиланазами (КСИЛ1, КСИЛ2, КСИЛ3, КФ 3.2.1.8) и  $\beta$ -глюкозидазой (БГЛ1, КФ 3.2.1.21) [2]. Мы определили содержание индивидуальных ферментов в ФП. Оказалось, что мутагенез изменил их соотношение. Так, общее содержание эндоглюканаза увеличилось с 7% (у TW1) до 13,5% (у TW1-59-27), в значительной степени – за счет увеличения доли ЭГ 1 (табл. 2).

Табл. 2. Состав ФП, полученных из исходного (TW1) и мутантных (TW1-59 и TW-59-27) штаммов (% от содержания внеклеточного белка).

Ферменты	TW1	TW1-59	TW1-59-27
<b>Целлюлазы</b>			
ЦБГ I (65 кДа)	47	43	43
ЦБГ II (53 кДа)	24	23	23
ЭГ I (57 кДа)	2	4	9
ЭГ II (48 кДа)	3	3	4
ЭГ III (25 кДа)	2	4	0,5
БГЛ I (115 кДа)	0,5	0,5	0,5
<b>Ксиланазы</b>			
КСИЛ I (20 кДа)	1	1	1
КСИЛ II (21 кДа)	1	3	1
КСИЛ III (30 кДа)	0,5	0,5	0,5
<b>Другие белки</b>			
	19	19	18

Известно, что эндоглюканаза ЭГ1 *T. longibrachiatum* обладает высокой активностью по отношению к некрахмальным полисахаридам зерен пшеницы, ржи и



других злаков:  $\beta$ -глюкану, глюкоманнану, ксилану, глюконооксиану, арабинооксиану и ксилоксиану [1, 3].

Некрахмальные полисахариды сильно затрудняют переваривание и усвоение веществ животными и птицами, находящимися на кормовом рационе на основе зерновых. Эндоксианазы ЭГ1, принимая активное участие в их деструкции, значительно увеличивает питательную ценность кормов на основе злаков.

Таким образом, ФП с повышенным содержанием ЭГ1, полученный на основе нового мутанта TW1-59-27, является перспективным для использования в качестве ферментативной добавки к кормам животных и птиц в сельском хозяйстве.

#### Список литературы

1. Gusakov AV. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol.* 2011; 29(9): 419-25.
2. Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г. и др. Новый эффективный метод анализа компонентного состава ферментных комплексов *Trichoderma reesei*. *Биохимия.* 2005; 70(6): 796-804.
3. Марков А.В., Гусаков А.В., Дзедзюля Е.И. и др. Свойства гемицеллюлаз ферментного комплекса *Trichoderma longibrachiatum*. *Прикл. биохим. микробиол.* 2006; 42(6): 654-64.

## ПЛОДОНОШЕНИЕ КСИЛОТРОФНЫХ ГРИБОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

Богдаев А.А., Богдаев А.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж

На жидкой питательной среде культивировали 2 вида ксилотрофных базидиомицетов: шиитаке (*Lentinus edodes*) и вешенку (*Pleurotus ostreatus*).

В качестве основы среды использовался нефилтрованный отвар зёрен овса с добавлением сахарозы. Исходный рН – 6,5. Экспланты получали в стерильных условиях из образцов зернового мицелия, взятых при определённом физиологическом состоянии тканей, предшествующем переходу к плодоношению. Культивирование проводилось при естественном освещении, в герметичных стеклянных сосудах. Во всех вариантах соотношение объёма питательной среды к объёму воздушной фазы было 1/10 или более, что обеспечивало существование транспирации с поверхности мицелия и примордиев. В ходе длительного культивирования (6–8 нед) отмечены следующие изменения:

1) Ткани шиитаке образовывали диск поверхностного мицелия со свисающими гифами погруженного мицелия. Отдельные образцы сформировали до 10 зародышей базидиом по периметру мицелиального диска. Зародыши грибов, как правило, формирова-

лись на границе жидкость/воздух. Отмечены случаи образования крупных зародышевых структур, более 15 мм диаметром, ниже уровня жидкости в толще погруженного мицелия. На поверхности мицелиальных дисков было получено 3 миниатюрных базидиомы, способные к спороношению.

2) Вешенка образовывала диски поверхностного мицелия подобно шиитаке, но без признаков плодоношения непосредственно на диске. Формировались специфические базидиальные структуры с дихотомическим ветвлением ножек и зачаточными шляпками на существенном отдалении от поверхностного мицелия.

**Выводы:** (1) Шиитаке способны к формированию зародышевых структур и физиологически развитых базидиом на поверхности культивируемых тканях мицелия. (2) Поверхностная культура вешенки формирует физиологически лабильные плодовые тела, способные компенсировать ограниченные транспирационные условия и обеспечить спороношение в условиях минимальных перепадов влажности воздуха.

## О РОЛИ МУТАЦИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕ ШИИТАКЕ (*LENTINUS EDODES*)

Богдаев А.Г., Богдаев А.А.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Проводилось изучение влияния процессов спонтанного соматического мутагенеза, происходящего в условиях стандартных производственных процессов, на эффективность самого производства грибов шиитаке. Обследовано 2 предприятия: (1) Фирма "Bio-ur", Делемон (Швейцария) и (2) Грибной комплекс комбината «Восток», Гомельская обл. (Беларусь). На обоих предприятиях ручное производство субстратных блоков.

При исследовании процесса развития аберрантных базидиом в ходе промышленного культивирования на ферме г. Делемон было установлено, что полноценно

развитые блоки формируют урожай, содержащий 25–30% морфологически аномальных плодовых тел. Отмечено проявление единственной мутации, искажающей морфологию грибов: ножка яйцевидной формы с неразвитой шляпкой.

Очень высокая численность аберрантов способна резко снижать рентабельность производства на период использования мицелия с мутациями. Однако, в связи с тем, что смена посевного мицелия подразумевает не только смену партии мицелия, а замену используемого штамма, данная ситуация влечёт за собой возможную коррекцию технологических параметров, как по про-

изводству блоков, так и по культивированию грибов, что увеличивает затратность производства.

На комбинате «Восток» ситуация отмечалась иная. Количество грибов с каждым видом морфологических aberrаций существенно варьировало, что объясняется отсутствием групп сцепления при наследовании морфологических мутаций. Выявленный спектр мутаций включал ряд отклонений по морфогенезу шляпок, ножек, разветвления плодовых тел. Морфологические мутации различались по срокам максимальной степени проявления в общей массе плодовых тел. Спектр морфологических мутаций характеризовался определённой стабильностью в течение полутора-двух лет активного культивирования. Морфологически аномальные грибы при использовании их в переработке перестают быть фактором, стимулирующим контроль и карантинные операции в отношении образцов мицелия, имеющих груз мутаций.

Это формирует условия для постепенного накопления спектра мутаций, в том числе морфологических. Как следствие, критическим моментом в мутационном карантине становится этап инкубации субстратных блоков, когда груз генетических отклонений начинает влиять не только на качество урожая (период генеративного развития), но и на предшествующий этап.

Т. обр., при промышленном культивировании шиитаке было выявлено 2 подхода к применению карантинных мероприятий в отношении морфологических мутаций плодовых тел:

(1) Применение карантина при достижении численности aberrантов, влияющей существенно на рентабельность производства.

(2) Применение генетического карантина при нарушениях технологического процесса – искажениях в ходе инкубационного процесса субстратных блоков шиитаке.

## РОЛЬ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В БИОСИНТЕЗЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ

Богомолова Е.В., Панина Л.К.

Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН,  
Санкт-Петербургский государственный университет

В последние годы чрезвычайно возрос интерес исследователей в отношении разработки новых методов производства металлических наночастиц [1, 2] и их широкого экспериментального использования в многочисленных медико-биологических приложениях. Металлические наночастицы применяются в таких областях, как антибактериальная терапия, магнито-резонансная томография, восстановление тканей, иммунохимический анализ, детоксикация биологических жидкостей, гипертермия, доставка лекарственных средств, очистка вод от микробиологического загрязнения, безопасное применение наночастиц в задачах экологии и пр. [3, 4].

Однако физико-химические методы получения наночастиц (аэрозольные технологии, литография, лазерная абляция, ультразвуковые методы, фотохимические методы, низкотемпературная плазма и др.) являются дорогостоящими и сопряжены с использованием вредных веществ. Поэтому в последние годы в нанотехнологиях лавинообразно возрастает интерес к поиску новых экологически безопасных и дешевых подходов – “green chemistry”, которые являются альтернативой физико-химическим методам получения наночастиц.

В этой связи одной из актуальных задач являются исследования закономерностей вне- и внутриклеточного синтеза микроскопическими грибами металлических наночастиц, с целью получения частиц различного химического состава, формы, размеров и контролируемой дисперсности.

Внутриклеточный биосинтез магнетитовых наночастиц бактериями *Magnetospirillum*, которые впервые были открыты Р.П. Блэйкмором в 1975 г., к настоящему времени достаточно подробно исследован на молеку-

лярно-генетическом уровне. Известны также иные бактерии и водоросли, способные к внеклеточному синтезу наночастиц [4].

Грибы являются более перспективными продуцентами наночастиц по сравнению с другими микроорганизмами [4–9]. Показано, что к биосинтезу наночастиц способны многие мицелиальные грибы: *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum sp.*, *Coriolus versicolor*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phoma glomerata*, *Penicillium brevicompactum*, *P. fellutanum*, *Trichoderma asperellum*, *T. viride*, *Trichothecium sp.*, *Volvariella volvaceae*, а также некоторые штаммы дрожжевых грибов *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *Yarrowia lipolytica* (см. табл.).

Недавно опубликованы данные о синтезе серебряных, золотых и биметаллических наночастиц с помощью грибов *Neurospora crassa* [9]. Образующиеся в процессе биосинтеза в нормальных условиях окружающей среды наночастицы имеют разнообразную (преимущественно сферическую, гексагональную) форму, их размеры составляют 5–200 нм. Среди прочих, наибольшее разнообразие обнаружил вид *F. oxysporum*, который внеклеточно синтезировал целый спектр различных наночастиц – золотых, серебряных, биметаллических Au–Ag, кремниевых, титановых, циркониевых, квантовых точек CdSe, магнетита, титаната бария  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ .

Исследования показали [5], что молекулами-медиаторами при получении наночастиц мицелиальными грибами являлись, например,  $\alpha$ -NADPH-зависимая сульфитредуктаза (35,6 кДа), белки 66 и 10 кДа, фитохелатин, глутатион,  $\alpha$ -NADPH-зависимая нитратредуктаза (44 кДа), а при синтезе наночастиц  $\text{Sb}_2\text{O}_3$

Таблица. Биосинтез металлических наночастиц микроскопическими грибами (цит. по [5]).

Культуры грибов	Наночастицы	Форма	Размеры частиц
<i>Verticillium sp.</i>	Au Магнетит	Квазисферическая кубооктаэдрическая	20±8 нм 100–400 нм
<i>Trichothecium sp.</i>	Au	гексагональная	5–200 нм
<i>A. fumigatus</i>	Ag	Сферическая, треугольная	5–25 нм
<i>A. niger</i>	Ag	Сферическая	20 нм
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Ag	Сферическая	10–100 нм
<i>Coriolus versicolor</i>	Ag	Сферическая	25–75 нм
<i>Fusarium oxysporum</i>	Au Ag Si Ti Zr Магнетит CdSe SrCO <sub>3</sub> BaTiO <sub>3</sub>	Сферическая, треугольная Квазисферическая Сферическая Квазисферическая Квазисферическая Сферическая Игольчатая Квазисферическая --	20–40 нм 5–50 нм 5–15 нм 6–13 нм 3–11 нм 20–50 нм 9–15 нм – 4±1 нм
<i>F. solani</i>	Ag	Сферическая	16,23 нм
<i>F. semitectum</i>	Ag	Сферическая	10–60 нм
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Ag	--	58,35±17,88 нм
<i>Penicillium fellutanum</i>	Ag	Сферическая	5–25 нм
<i>Phoma glomerata</i>	Ag	Сферическая	60–80 нм
<i>Colletotrichum sp.</i>	Au	Сферическая	20–40 нм
<i>Trichoderma asperellum</i>	Ag	--	13–18 нм
<i>T. viride</i>	Ag	Сферическая, стержневая	5–40 нм

с помощью *S. cerevisiae* необходима рН-зависимая оксидоредуктаза.

В заключение следует отметить, что несмотря на многие преимущества, биологический синтез имеет свои недостатки – низкую скорость процесса и полидисперсность наночастиц. Для преодоления этих проблем в будущем необходимо детально исследовать клеточные, биохимические и молекулярные механизмы, вовлеченные в управляемый биосинтез наночастиц.

#### Список литературы

1. Rutberg PhG, Kolikov VA, Kurochkin VE et al. Electric discharges and the prolonged microbial resistance of Water. IEEE Trans Plasma Sci. 2007; 35(4): 1111-8.
2. Рутберг Ф.Г., Коликов В.А., Снетов В.Н. и др. Импульсные электрические разряды в воде как средство получения магнитных наночастиц для транспорта микроорганизмов. Журн. теор. физ. 2012; 82(12): 52-7.
3. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials 2005; 26(18): 3995-4021.
4. Schrofel A, Kratosova G, Safarik I et al. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles. A review. Acta biomaterialia. 2014; 10: 4023-42.
5. Thakkar K, Mhatre S, Parikh R. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnol Biol Med. 2010; 6: 257-62.
6. Narayanan KB, Sakhtivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Coll Interf Sci. 201; 156: 1-13.
7. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. Trends Biotechnol 2010; 28: 5808.
8. Ahmad A, Jagadale T, Dhas V et al. Fungus-based synthesis of chemically difficult-to-synthesize multi-functional nanoparticles of CuAlO<sub>2</sub>. Adv Mater. 2007; 19: 3295-9.
9. Castro-Longoria F, Vilchis-Nestor AR, Avalos-Borja M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Coll Surf B: Biointerfaces. 2011; 83: 42-8.

## ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА КАРОТИНОИДОВ: ДРОЖЖИ РОДА *RHODOTORULA*

Бондаревич Н.В., Кантерова А.В., Новик Г.И.  
Институт микробиологии НАНБ, Минск

На настоящий момент в фонде Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов депонировано 22 штамма дрожжей рода *Rhodotorula*, относящихся к видам *R. glutinis*, *R. lactosa*, *R. minuta*, *R. aurantiaca*, *R. mucilaginosa* и *R. rubra*. Это так наз. «красные» дрожжи характеризуются наземным, водным и воздушным местообитанием [1, 2]. Изоляты коллекционных штаммов получены из образцов почвы, верхового торфа (*R. glutinis*), воды (*R. minuta*), воздуха (*R. mucilaginosa*, *R. lactosa*). Морфология колоний отдельных штаммов дрожжей представлена на рисунке. Колонии штаммов из коллекции на твердой питательной среде на основе пивного сусле и агара имеют округлую форму, ровные края.

Дрожжи рода *Rhodotorula* служат объектами в различных биотехнологических процессах. Например, *R. acheniorum* синтезирует экзополисахарид, содержащий до 92,8 % применяемого в пищевой промышленности маннана [3]. Представители рода *Rhodotorula* делают их практически значимы в получении возобновляемого вида топлива – биодизеля [4]. Штаммы *Rhodotorula* используются сегодня в фармацевтике, а также в процессе очистки сточных вод [5]. Отличительной особенностью красных дрожжей является образование в стационарной фазе роста большого количества каротиноидов [5]. В перечень основных каротиноидов, синтезируемых *Rhodotorula*, входят: β-каротин, торулен и торулародин. Одна из наиболее известных функций каротиноидов – источник провитамина А, кроме того, каротиноиды могут выступать в качестве пищевых красителей, антиоксидантов и противораковых агентов [6].

Для 22 штаммов дрожжей проведен первичный скрининг способности продуцировать содержащую каротиноиды биомассу. Дрожжи выращивали на пивном сусле, в условиях периодического культивирования в 0,5-литровых колбах на качалке (200 об/мин) в течение 4 сут при 28 °С. Для инокуляции использовали 3-суточную культуру.

По результатам культивирования штаммов дрожжей, наибольшей продуктивностью обладают штаммы разных видов: *R. glutinis* БИМ Y-10 и БИМ Y-167, *R. mucilaginosa* БИМ Y-50; наименьшей продуктивностью – *R. glutinis* БИМ Y-159 и *R. lactosa* БИМ Y-116.

Как показали исследования [7], суммарное количество каротиноидов в биомассе не обладает прямой пропорциональной зависимостью от количества биомассы: штамм с высоким уровнем продукции биомассы характеризовался наименьшим содержанием каротиноидов в биомассе, и наоборот,

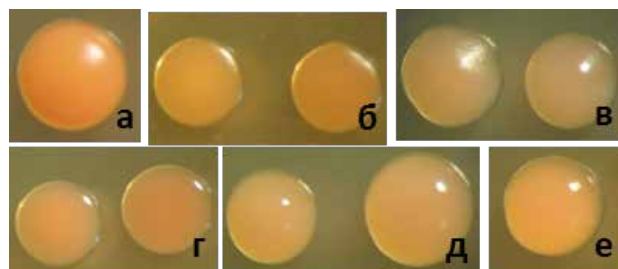


Рис. Фотографии одиночных колоний коллекционных штаммов дрожжей, полученных при помощи микроскопа МБС-10 (СССР), увеличение в 28 раз:  
а) *R. lactosa* БИМ Y-113; б) *R. glutinis* БИМ Y-157;  
в) *R. lactosa* БИМ Y-116; г) *R. mucilaginosa* БИМ Y-254;  
д) *R. glutinis* БИМ Y-33; е) *R. glutinis* БИМ Y-10.

другой штамм, с наибольшей способностью накапливать биомассу, обладал наибольшим уровнем синтеза каротиноидов.

Таким образом, коллекционные штаммы дрожжей *Rhodotorula* отличаются уровнем продуктивности биомассы; признак способности накапливать клеточную биомассу является вариабельной характеристикой группы выбранных организмов, а значит, должен учитываться при дальнейшем исследовании производительности каротиноидов штаммами.

### Список литературы

1. Walker GM. Yeast Physiology and Biotechnology. Wiley. 1998: 4.
2. Chang C-W, Wang P-H. Six *Rhodotorula* species from Taiwan. *Fung. Sci.* 2002; 17(1, 2): 23-6.
3. Satyanarayana T, Kunze G. (eds). Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Springer Sci.+Business Media B.V. 2009: 744 p.
4. Dai C, Tao J, Xie F, Dai Y, Zhao M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr J Biotechnol.* 2007; 6(18): 2130-4.
5. Hernández-Almanza A., Montaneza JC, Aguilar-González MA et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Biosci.* 2014; 5: 64-72.
6. Frengova GI, Simova ED, Beshkova DM. Improvement of carotenoid-synthesizing yeast *Rhodotorula rubra* by chemical mutagenesis. *Z Naturforsch C.* 2004; 59(1-2): 99-103.
7. Кирица Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования: Дис. ... д-ра биол. наук: Кишинев. 2005: 129.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПРИ ХРАНЕНИИ ШТАММОВ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Борисенко О.А.

ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности, Москва

Пивное производство основано на сбраживании солодового суслу специальными штаммами пивных дрожжей. В 1881 г. Э. Хансеном в Дании впервые получил чистые культуры дрожжей. Применение чистой культуры дрожжей повышает органолептические качества готового пива и его биологическую стойкость, что является совершенно необходимым условием при выпуске продукта, соответствующего ГОСТ Р 51174-2009.

В 1985 г. впервые разработана и утверждена технологическая инструкция по разведению чистых культур дрожжей для производства пива (ТИ-18-6-31-85), предписывающая строгое соблюдение правил микробиологической стерильности при подготовке дрожжевой массы к началу процесса в цехе брожения.

Для начала работ по накоплению требуемой дрожжевой биомассы предприятия могут получить исходную чистую культуру штамма пивных дрожжей из Центральной коллекции «Чистые культуры дрожжей, применяемые при производстве пива, безалкогольных напитков и вина», находящейся в Москве в ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности.

Сотрудники сектора микробиологических исследований, которым поручены работы по сохранению коллекции, постоянно осуществляют проверку чистоты и активности штаммов микроорганизмов, а также строго по графику пересевают культуры на свежие питательные среды. По запросам предприятий чистые культуры дрожжей подготавливают для транспортировки и отправляют почтовыми посылками в адреса заказчиков.

Перед нами стояла задача определить, какой срок хранения с момента посева дает возможность не по-

терять жизнеспособность культур, т.е. способность клеток расти и размножаться. Во многих случаях для оценки качества дрожжей достаточно определить количество жизнеспособных клеток в популяции.

Исследования проводили с пятью штаммами пивных дрожжей, которые наиболее часто запрашивают заводы: *Saccharomyces cerevisiae* 11, 8aM, 776, 44 и 41. Дрожжи высевали на охмеленный сусло-агар и хранили при комнатной температуре в течение 30 сут. Почти ежедневно проводили анализ на наличие в дрожжевых культурах мертвых клеток дрожжей.

С этой целью препараты окрашивали метиленовым синим и подсчитывали процент мертвых клеток. Нежизнеспособные клетки окрашиваются в синий цвет вследствие того, что клеточная стенка и мембрана мертвых клеток не препятствует проникновению краски. Одновременно проводили определение коэффициента размножения исследуемых рас дрожжей на 11%-ном охмеленном сусле, при 6–8 °С. Он определяется из отношения количества дрожжей через 3 сут к начальному количеству дрожжей.

В течение 1-й нед количество мертвых клеток дрожжей составляло ~3%. Через 2 нед количество мертвых клеток дрожжей увеличилось до 8–12%, а через месяц – до 30%. Коэффициент размножения у всех культур не изменялся в процессе хранения.

Усредненные сроки доставки почтовых отправок по России: от одной до двух недель. Во время хранения культур пивных дрожжей в течение двух недель при комнатной температуре на косом охмеленном сусло-агаре ~90% дрожжевых клеток остаются жизнеспособными, коэффициент размножения не изменяется, что вполне приемлемо для начала разведения чистой культуры дрожжей на предприятиях.

## ПОЛУЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD-10.

Чилочи А.А., Тюрина Ж.П., Клапко С.Ф., Лаблюк С.В., Дворнина Е.Г.  
Институт микробиологии и биотехнологии АН РМ, Кишинев

Микроскопические грибы *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* и др. являются активными продуцентами внеклеточных ферментов гидролитического действия. Микромицет *A. niger* CNMN FD-10 отобран как активный продуцент внеклеточного ферментного комплекса целлюлазно-ксилазанного действия [1]. В подобранных условиях, включающих глубинное культивирование штамма в течение 8 сут на среде, содержащей местные растительные материалы (жом свекловичный и отруби пшеничные), и при использовании классических режимов выделения ферментного комплекса (нормальный рН культуральной жидкости (КЖ), соотношение КЖ и этилового спирта – 1:4) продуцент обеспечивает получение сбалан-

сированного ферментного препарата, обладающего целлюбогидролазной (12–15 Ед/г), эндогликаназной (450–480 Ед/г), ксиланазной (2800–3200 Ед/г) и  $\beta$ -глюкозидазной (240–270 Ед/г) активностями.

Учитывая увеличивающийся спрос на ферментные препараты с заданными технологическими свойствами на основе вышеназванного штамма разработан способ получения ферментного препарата, содержащего в качестве основного компонента  $\beta$ -глюкозидазы, которые, как известно, осуществляют расщепление  $\beta$ -глюкозидной связи в арил  $\beta$ -D-глюкозидах и в дисахаридах растительных материалов, что дает возможность использования препарата в виноделии (для улучшения букета вин), в эфиромасличной,

фармацевтической, косметической промышленно-сти и т.д. для освобождения ароматических веществ, находящихся в первичном материале в связанном состоянии.

**Материалы и методы.** Микромицет *A. niger* CNMN FD-10 культивировали в колбах Эрленмейера объемом 0,5 л со 100 мл питательной среды, при 28–30°C, на качалках (180–200 об/мин), в течение 7, 8 и 9 сут. В качестве исходной использовалась среда следующего состава (г/л): свекловичный жом – 20,0; отруби пшеничные – 10,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{KCl}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3$  – 0,01; pH 5,5–6,0.

Определение ферментативной активности целлюбогидролаз, эндоглюканаз,  $\beta$ -глюкозидаз и ксиланаз проводилось с использованием соответствующих субстратов: ФБ Ватман №1, Na-карбоксиметилцеллюлоза, п-нитрофенил  $\beta$ -D-глюкопиранозид, ксилан овса [2, 3].

**Результаты исследований.** Для полной реализации способностей штамма *A. niger* CNMN FD-10 по биосинтезу  $\beta$ -глюкозидаз (специально для усиления ферментообразования этих ферментов) были подобраны новые условия глубинного культивирования продуцента, а для сохранения высокого уровня  $\beta$ -глюкозидазной активности выявлены оптимальные режимы выделения ферментного препарата из культуральной жидкости.

На 1-м этапе исследований из 20 различных углерод-содержащих материалов были отобраны наиболее значимо влияющие на биосинтез всех типов ферментов, синтезируемых штаммом: отруби пшеничные, жом свекловичный и  $\text{NaNO}_3$  – как источник неорганического азота. Далее была проведена целенаправленная оптимизация питательных сред для повышения биосинтеза  $\beta$ -глюкозидаз с использованием метода математического планирования эксперимента (метод латинских квадратов) [4].

В работе варьировали 4 фактора (т.е. 4 отобранных компонента) в 4 уровнях концентраций, что позволило получить 16 вариантов питательных сред (V1; V2; V3...V16). Полученные варианты представлены ниже (табл.).

	Жом свекловичный					NaNO <sub>3</sub>
	1,0	1,5	2,0	2,5		
Отруби пшеничные	1,0	0,2V <sub>1</sub>	0,25V <sub>2</sub>	0,30V <sub>3</sub>	0,35V <sub>4</sub>	
	1,5	0,25V <sub>5</sub>	0,30V <sub>6</sub>	0,35V <sub>7</sub>	0,20V <sub>8</sub>	
	2,0	0,30V <sub>9</sub>	0,35V <sub>10</sub>	0,20V <sub>11</sub>	0,25V <sub>12</sub>	
	2,5	0,35V <sub>13</sub>	0,20V <sub>14</sub>	0,25V <sub>15</sub>	0,30V <sub>16</sub>	

В культуральных жидкостях, полученных при выращивании продуцента на этих питательных средах с разным соотношением компонентов, была определена активность  $\beta$ -глюкозидаз и по соответствующим формулам рассчитана величина эффекта, получаемая при использовании каждого уровня концентраций тестируемых компонентов.

Максимальный уровень ферментативной активности  $\beta$ -глюкозидаз получен на питательной среде следующего состава (г/л): свекловичный жом – 25; отруби пшеничные – 20;  $\text{NaNO}_3$  – 3,0 и соли Чапека.  $\beta$ -Глюкозидазная активность, полученная на оптимизированной среде, более чем на 50% выше активности, полученной на исходной среде.

Выявленные закономерности развития продуцента и биосинтеза ферментов в динамике культивирования штамма позволили при получении нового ферментного препарата  $\beta$ -глюкозидазного действия сократить продолжительность культивирования штамма на 24 ч: 7 сут по сравнению с 8 сут, необходимыми для получения сбалансированного ферментного препарата.

Для сохранения достигнутого уровня  $\beta$ -глюкозидазной активности и значительной очистки от сопутствующих ферментов были проведены исследования по выявлению специально подобранных условий выделения  $\beta$ -глюкозидаз из КЖ продуцента. Известно, что, меняя условия выделения, можно получать ферментные препараты с разным выходом и разной ферментативной активностью составляющих компонентов.

Осаждение ферментных препаратов проводили в разных условиях: при разных соотношениях КЖ и этилового спирта, в качестве осадителя (1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5) и при разных pH КЖ (от 2,0 до 9,0). Из представленного графика (рис. 1) видно, что для выделения  $\beta$ -глюкозидаз оптимальным является соотношение КЖ и этилового спирта 1 : 2 и подкисление КЖ до pH 3,0.

Сочетание оптимально подобранных условий глубинного культивирования штамма *A. niger* CNMN FD-10 и режимов выделения ферментов из его культуральной жидкости позволяет получить ферментный препарат с высоким уровнем  $\beta$ -глюкозидазной активности: не менее 1525 ед/г (что в 5,6–6,3 раза выше, чем в сбалансированном ферментном препарате) при снижении уровня активности остальных компонентов ферментного комплекса: эндоглюканаз – до 64,0 ед/г; целлюбогидролаз – до 4,1 ед/г; ксиланаз – до 1022,0 ед/г.

Присутствие в малых количествах других компонентов ферментного комплекса не снижает практическую ценность препарата, так как обеспечивает гидролиз структурных полисахаридов клеточной стенки растительных материалов, тем самым увеличивая выход целевого продукта и способствуя деятельности  $\beta$ -глюкозидаз основного компонента.

Этапы получения нового ферментного препарата отражены на схеме, представленные на рис. 2. Установлены температурный и pH-оптимумы действия нового ферментного препарата  $\beta$ -глюкозидазного действия и показано, что они лежат в довольно широких пределах: температурный оптимум – 40–70 °C; pH-оптимум находится в кислой области pH (в интервале pH – от 2,0 до 6,0), что наиболее важно при использовании препарата в виноделии.

Результаты свидетельствуют о том, что ферментный препарат, содержащий в качестве основного компонента  $\beta$ -глюкозидазы из микромицета *A. niger* CNMN FD-10, можно отнести к числу высокотехнологичных.

#### Список литературы

1. Ciloci A, Tiurina J, Clapco S et all. Tulpină de fungi *Aspergillus niger* – producătoare de enzyme cu activitate celulozolică și xilanazică. Brevet de invenție MD 4072. 2010-03-12.
2. Исмаилова Д.Ю., Логинова Л.Г. Влияние некоторых веществ на биосинтез целлюлаз термотолерантного

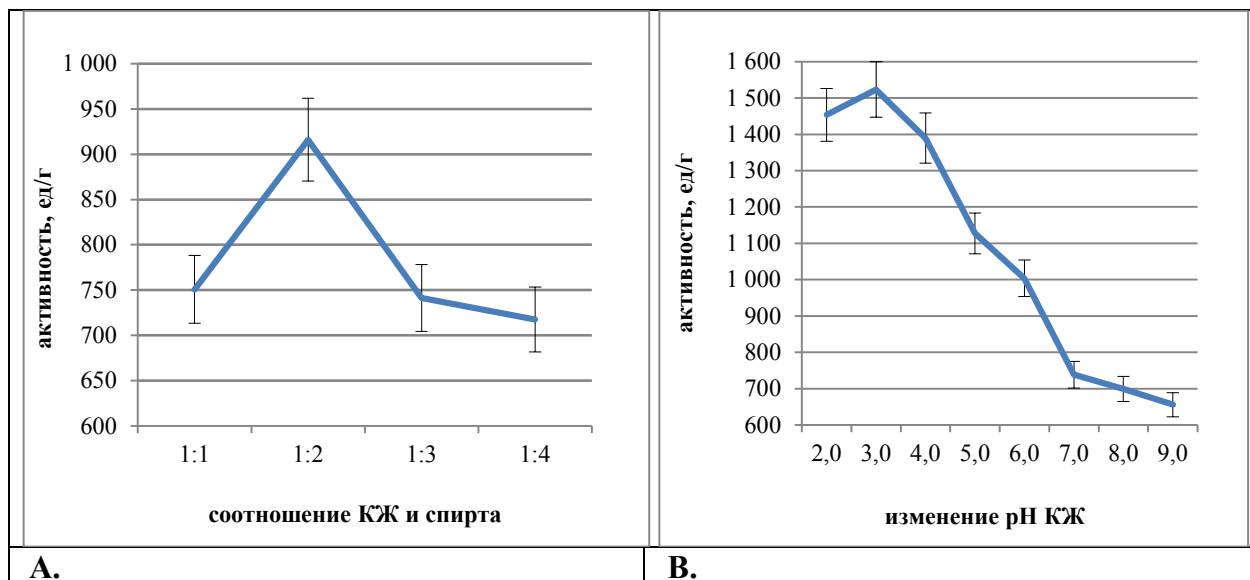


Рисунок 1. Влияние параметров выделения ферментного препарата на активность β-глюкозидаз: А – соотношение культуральной жидкости и спирта; В – pH культуральной жидкости



Рисунок 2. Этапы получения нового ферментного препарата

- гриба *Aspergillus terreus* 17p. Прикл. биохим. микробиол. 1975, 10(5): 676-7.
3. Родионова Н.А., Тиунова Н.А., Фениксова Г.Ф. Методы определения целлюлазной активности. Прикл. биохим. микробиол. 1966; 2(2): 197-205.
4. Ioniță A, Jurcoane Ș, Horiță S. Cercetări privind optimizarea mediului de biosinteză a amidazelor prin metoda pătratului latin. Lucrările celui de-al VI-lea Simpozion de Microbiologie Industrială și Biotenologie. România, Iaș. 1987: 169-75.

## АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ – ЭНДОБИОНТОВ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Васильева Б.Ф., Ефременкова О.В.  
НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

По оценке Всемирной организации здравоохранения, резистентность бактерий к антибиотикам является главным вызовом, с которым столкнулась современная медицина. Особенно масштабную опасность представляют госпитальные инфекции, вызванные резистентными формами бактерий, в связи с их быстрым распространением среди людей с ослабленным иммунитетом (в больницах, домах престарелых, тюрьмах).

Остро стоит вопрос о неподдающихся лечению инфекциях, вызываемых золотистым стафилококком, синегнойной палочкой, акинетобактером, туберкулезной палочкой. Широко распространены штаммы метициллинрезистентного золотистого стафилококка, устойчивые к бета-лактамам антибиотикам (meticillin-resistant *S. aureus* – MRSA). Продолжают распространяться формы болезнетворных бактерий, устойчивые к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина, которые еще недавно представляли единственное эффективное лекарственное средство в отношении MRSA [1].

Важной задачей является поиск новых природных антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость болезнетворных бактерий. Однако в XXI веке, несмотря на предпринимаемые усилия научных коллективов и поддержку правительств многих стран, для проведения клинических испытаний было представлено всего 2 новых природных антибиотика [2]. Для решения этой задачи в качестве потенциальных продуцентов целесообразно исследовать организмы, выделенные из ранее мало изученных в этом аспекте биоценозов – морские организмы, редкие виды почвенного сообщества, эндобионты животных и растений [3, 4].

В ходе проводимых нами изысканий новых антибиотиков природного происхождения объектами исследования были не только высшие грибы, но и микроорганизмы, выделяемые из плодовых тел грибов, преимущественно бактерии [5–11]. Согласно принципу конкурентного исключения (закону Гаузе), антибиотики являются эволюционно выработанными специфическими средствами борьбы за существование, обеспечивающими популяции положение в биоценозе. В данном случае своеобразным биоценозом является плодовое тело гриба – существующий обычно от нескольких часов до нескольких суток объект, который колонизируют бактерии, конкурирующие между собой за среду обитания.

**Материалы и методы.** Бактерии культивировали в глубинных условиях при постоянном аэрировании. В культуральной жидкости антимикробную активность определяли методом диффузии в агар. В качестве тест-культур для определения антимикробной активности использовали следующие микроорганизмы: грамположительные бактерии – *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. mycoides* 537, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ

В-4177 (штамм, устойчивый к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина, VRLM), *Staphylococcus aureus* FDA 209P (MSSA), *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA), грамотрицательные бактерии – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, и грибы – *Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259.

Видовую идентификацию штаммов-продуцентов до вида проводили путем анализа варибельных участков ДНК гена 16S рРНК. Бактерии рассеивали на агаровую среду, культивировали в течение суток и отбирали отдельные клоны для выделения ДНК, проводившегося известным методом [12]. Использовали следующие консервативные праймеры для наработки ДНК гена 16S рРНК методом ПЦР: 27f (aga gtt tga tcc tgg ctc ag), 341f (cct acg gga ggc agc ag), 785f (ggm tta gat acc tgg tag tcc), 519r (gta tta ccg cgg ctg ctg), 907r (ccg tca att cct ttg agt tt), 1492r (tac ggy tac ctt gtt acg act t).

Выбраны следующие режимы проведения реакции: (1) 94 °С – 5 мин; (2) 30 циклов с чередованием 94 °С – 1 мин; 51 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин; (3) 72 °С – 7 мин. Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 5 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР осуществляли методом прямого пересаживания ДНК в мягких условиях с использованием 0,125М ацетата аммония в 70% -ном этиловом спирте. Секвенирование варибельных участков ДНК гена 16S рРНК проводили на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500. Для анализа последовательностей и построения дерева родства использовали базы данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) и Ribosomal Database Project (<http://www.cme.msu.edu>).

**Результаты.** В большинстве случаев из одного плодового тела гриба отсеивали 1 штамм бактерии, в единичных случаях – 2 или 3. В общей сложности выделено 88 бактериальных штаммов, из которых 68 (77%) в условиях глубинного культивирования образуют антибиотики. У 31 штамма выявлена антибиотическая активность в отношении MRSA, у 5 штаммов – в отношении штамма VRLM. Анализ ДНК гена 16S рРНК 19 бактериальных штаммов показал, что они относятся к 6 семействам бактерий: Bacillaceae, Micrococcaceae, Pseudomonadaceae, Caulobacteraceae, Xanthomonadaceae, Enterobacteriaceae.

Для изучения образуемых антибиотиков были выбраны два штамма *Bacillus subtilis*, ИНА 01085 и ИНА 01086, выделенные из базидиального гриба чешуйчатка обыкновенной (*Pholiota squarrosa*). Установлено, что они образуют полиеновые антибиотики (гексаен и пентаен), проявляющие противогрибковую активность в отношении *Aspergillus niger* ИНА 00760 и грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. aureus* ИНА 0076 (MRSA). Помимо полиенов были выделены пептидные антибиотики, в состав которых входят аминокислоты Asp, Gly, Leu, Pro, Tyr, Thr, Trp, Phe. Антибиотик штамма ИНА 01085 помимо пере-



Табл. Сравнение частоты встречаемости продуцентов антибиотиков среди разных групп организмов.

Группы организмов	Изученных штаммов		Продуцентов		Продуценты, эффективные в отношении MRSA	
	число	%	число	%	число	%
Актиномицеты	10894	100	5650	51,8	428	3,9
Базидиальные грибы	346	100	316	91,3	148	42,7
Бактерии из почвы	186	100	19	10,2	8	4,3
Бактерии-эндобионты грибов	88	100	68	77,2	31	35,2

численных аминокислот содержит дополнительно 2 неидентифицированные небелковые аминокислоты. Оба антибиотика эффективны в отношении всех применявшихся грамположительных тест-бактерий, включая тест-штаммы MRSA и VRLM. Обнаруженные антибиотики отличаются от известных пептидных антибиотиков, и соответственно, относятся к новым природным соединениям, эффективным в отношении грамположительных бактерий, в том числе MRSA.

**Заключение.** Плодовые тела базидиальных грибов могут быть источником бактерий-эндобионтов – перспективных продуцентов антибиотиков, в том числе антибиотиков, эффективных в отношении устойчивых к антибиотикам тест-бактерий. Описаны новые пептидные антибиотики, образуемые штаммами *B. subtilis* и отличающиеся наличием у антибиотика штамма INA 01085 двух дополнительных не входящих в состав белковых аминокислот.

Таким образом, популяция *B. subtilis* демонстрирует вариабельность данного признака и высокую приспособляемость вида.

### Список литературы

1. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013;12: 22
2. Butler MS. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot.* 2013; 66: 571-91.
3. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 2005; 58(1): 1-26.
4. Alves MJ, Ferreira IC, Dias J et al. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Med.* 2012; 78(16): 1707-18.
5. Дьяков М.Ю., Камзолкина О.В., Шгаер О.В. и др. Морфологические признаки природных штаммов некоторых видов базидиомицетов и биологический анализ антимикробной активности в условиях глубоководного культивирования. *Микол. фитопатол.* 2010; 44(3): 225-39.
6. Ветрова М.А., Дьяков М.Ю., Камзолкина О.В. и др. Антибиотическая активность ряда видов базидиальных макромицетов. *Усп. мед. микол.* 2013; 11: 383-85.
7. Маланичева И.А., Козлов Д.Г., Ефименко Т.А. и др. Плодовые тела высших грибов как экологическая ниша для микроорганизмов – продуцентов антибиотиков. *Совр. микол. в России.* 2012; 3: 414.
8. Malanicheva IA, Efimenko TA, Zenkova VA et al. New antibiotics produced by strains of *Bacillus subtilis* effective against MRSA and vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides*. 5-й Конгресс европейских микробиологов («FEMS 2013»), Лейпциг, Германия 21-25 июля 2013.
9. Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Зенкова В.А. и др. Изыскание новых антибиотиков среди бактерий, выделенных из плодовых тел базидиальных грибов. *Бюлл. Оренбургского научного центра Уро РАН* 2014; 3; 1-11 (электронный журнал). <http://www.elmag.uran.ru>.
10. Маланичева И.А., Козлов Д.Г., Ефименко Т.А. и др. Новые антибиотики, образуемые штаммами *Bacillus subtilis*. *Микробиология* 2014; 83(4): 445-50.
11. PCR protocols: a guide to methods and applications. Eds Innis MA et al. *Acad Press. San Diego, CA.* 1990.

## ТЕХНИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПОЛУЧЕНИЕ БИОДИЗЕЛЯ

Феофилова Е.П.<sup>1</sup>, Ивашечкин А.А.<sup>1</sup>, Мысякина И.С.<sup>1</sup>, Бокарева Д.А.<sup>1</sup>, Лунин В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

<sup>2</sup>Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

С позиций современной химии лигнин можно определить как компонент древесины, редокс-полимер, построенный из арил-пропановых структурных звеньев. Лигнобиомасса – это наиболее обильный, возобновляемый ресурс, который очень мало вовлекается в технологические процессы – всего 1 млн тонн в год, при этом основную массу (почти 95%) составляет лигносульфонат. Однако в перспективе, благодаря своей биоактивности, лигнин может широко использоваться в медицине и животноводстве (в гидролизных производствах по получению из лиг-

нобиомассы кормового белка – фурфурола, служит субстратом для получения лизина).

В последние годы лигнин привлек особое внимание, так как может служить еще и источником возобновляемой энергии, в частности, биодизеля. Кроме того, в природных условиях накапливаются колоссальные запасы лигнина, который медленно разлагается, выделяя оксид азота, углеводороды и другие вредные продукты, вредящие нормальной экологии. Помимо этого, гидролизные производства, использующие растительное сырье, не всегда обеспе-

чивают чистую экологию и могут оставлять около 35 % неиспользованного лигнина.

Между тем еще в начале прошлого столетия встал вопрос о создании биотехнологического метода конверсии лигнина. Многие грибы (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Penicillium*, *Phanerochaete*) и бактерии (*Streptomyces*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Clostridium*, *Cellulomonas*), способны эффективно конвертировать лигнин. Тем не менее хотя имеется в избытке субстрат и есть продуценты, пока нет способа биотехнологической переработки лигноцеллюлозной растительной биомассы.

Вероятно, как минимум существуют 3 причины, затрудняющие создание био конверсии лигнина:

1. Недостаточность наших знаний о видовом составе природных со-сообществ, участвующих в разложении лигнина, и роли каждого вида (*suproxylic species*) в этом процессе. Согласно последним данным, кроме микроорганизмов в био конверсии лигнина участвуют насекомые (комары и клещи), тропические

рыбы рода *Panaque*, потребляющие древесину, жуки, беспозвоночные – *Pseudoscorpionide* и нематоды, причем роль членов этого сообщества остается пока не выясненной.

2. Сложность химического строения лигнина и отсутствие методов его выделения, обеспечивающих сохранение его нативного строения. Это приводит к тому, что изучение ферментов его деградации проводится не на природном лигнине, а на его гидролизатах, либо на искусственных моделях.

3. Остаются мало исследованными первые этапы биодеградации лигнина и роль в этих процессах  $H_2O$ -пероксидаз и свободно-радикального окисления, направленные на разрыв C—C и C—O—C-связей, приводящие к интенсивному разрушению нативной структуры лигнина.

Решение этих вопросов, связанных с глобальной экологией и биоэнергетикой, представляется в настоящее время как одна из основных проблем биотехнологии.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *PLEUROTUS ERYNGII* (DC) Quel. – МАКРОМИЦЕТА, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В ПИЩЕВЫХ И МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЯХ

Гарибова Л.В., Завьялова Л.А., Инсарова И.Д., Джавахян Б.Р.  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Вешенка степная или королевская *Pleurotus eryngii* (Pleurotaceae, Agaricomycetes, Basidiomycota) в настоящее время культивируется в пищевых целях. Популярность ее растет благодаря исключительным товарным качествам: аромату, вкусу, привлекательному габитусу плотных плодовых тел, значительным срокам хранения, превосходя по этим показателям вешенку устричную *P. ostreatus*.

Из Европейских стран ее выращивают в основном в Италии и более широко – в азиатских странах. В большинстве случаев используют стерильную технологию культивирования. Однако гриб недостаточно устойчив к болезням и вредителям, чувствителен к условиям выращивания, требует высоких норм посевного мицелия и имеет относительно низкую урожайность, что сдерживает его промышленное культивирование.

Особенности биологии вида изучены относительно мало, а данные о наличии биологически активных веществ отсутствуют, хотя наличие последних можно ожидать, учитывая присутствие их у других видов рода (например, у вешенки устричной) и специфику самого вида *P. eryngii*. Более глубокое знание особенностей биологии вешенки степной может способствовать интенсификации процесса ее выращивания, уточнению и модернизации технологии культивирования этого гриба.

В естественных условиях этот вид широко распространен на юге Европы, в Северной Африке и Центральной Азии. В России часто встречается в степной зоне. В отличие от других видов рода *Pleurotus*, не является ксилотрофом. *P. eryngii* s. l. растет в ассоциации

с живыми растениями и включает разновидности, а, возможно, и самостоятельные виды, растущие, предположительно паразитирующие, на ряде зонтичных (сем. Apiaceae, роды *Eryngium*, *Ferula*, *Ferulago*, *Cachrys*, *Laserpitium*, *Diplotaenia* и *Elaeoselinum*). Обычно базидиомы образуются у основания стеблей или на корнях перечисленных растений. В последнем случае они появляются на поверхности почвы.

Мицелий в основном распространен в отмершей части стебля, но может проникать и в живую ткань. Таким образом, его трофическая принадлежность остается под вопросом. В настоящее время его рассматривают как комплексный сложный вид *P. eryngii* s. l., включающий 2 подвида и 11 разновидностей (<http://www.indexfungorum.org/names/Names>). Для двух разновидностей таксономический статус повышен до вида. Это *P. nebrodensis* (Insenga) Quel. и *P. caespitosoterrestris* (Henn.) Pilat. *P. nebrodensis* растет только в ассоциации с гладышем широколистным *Laserpitium latifolium*. Его культивируют в ряде Европейских стран (Великобритания, Бельгия, Нидерланды, Норвегия, Швеция), где ежегодно производят около 500 тыс. тонн этого гриба. Вопросы биологии и систематики *P. eryngii* s. l., перспективного для производства, остаются открытыми и требуют изучения вида в чистой культуре на уровне штаммов разного происхождения.

В наших экспериментах проведен анализ морфолого-культуральных признаков, микроморфологии 6 штаммов *P. eryngii*. Из их числа 4 штамма, отселекционированные и находящиеся в производстве, а 2 штамма выделены из дикорастущих плодовых тел.

Один дикорастущий штамм получен из Института ботаники НАН Азербайджана, второй выделен из плодовых тел, собранных с *Ferula* sp. на Кипре и был определен как *P. eryngii* var. *ferula*. Исследована линейная скорость роста штаммов на сусло-агаре в диапазоне температур 15°, 20°, 25° и 30 °С. Для всех штаммов оптимальная температура для вегетативного роста мицелия составила 25 °С. При этом у штамма *P. eryngii* var. *ferula* отмечен самый медленный рост. По характеру роста на сусло-агаре отселекционированные штаммы и дикорастущий штамм из Азербайджана сходны при различных температурах культивирования и относятся к одному морфологическому типу колоний. Это белая, незональная, ватообразная или войлочная колония. Дикариотичный мицелий всех штаммов несет характерные пряжки.

У штамма *P. eryngii* var. *ferula* колония кремовая, зональная, со слабо развитым воздушным мицелием и многочисленными склероциями, не наблюдаемыми у других штаммов и отмеченные в литературе для вида *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, растущего в Африке, Азии и Австралии. Следует отметить, что у этих двух видов мицелий может сохраняться в почве, в то время как грибница других видов рода *Pleurotus* сохраняется только в древесине, с чем может быть связано формирование склероциев.

Виды рода *Pleurotus* в культуре образуют базидиомы на большом наборе лигно-целлюлозных субстратов. Проведено исследование условий для плодобразования изучаемых штаммов вешенки степной на растительных субстратах, традиционно используемых в грибоводстве для культивирования псилотрофов и подстилочных сапротрофов (подсолнечная лузга и пшеничная солома, обогащенная отрубями зерновых культур). Поскольку дикорастущий кипрский

штамм был собран непосредственно с зонтичного растения рода *Ferula*, для него были добавлены варианты субстрата на основе дикорастущих зонтичных: съесть *Aegopodium podagraria* и борщевик сосновского *Heracleum sosnowskyi*.

Вегетационный период составил 15–20 сут. За это время мицелий 4-х отселекционированных штаммов и дикорастущего из Азербайджана полностью обрастал субстрат и через определенный период формировались нормальные базидиомы. Мицелий дикорастущего штамма *P. eryngii* var. *ferula* (Кипр) не развивался ни на одном из испытанных субстратов.

Изучение изоферментного спектра малатдегидрогеназы и неспецифической эстеразы указанных штаммов также выявляют значительное отличие дикорастущего кипрского штамма.

Наши исследования носят предварительный характер. Но они подтверждают появившийся в последнее время взгляд на *P. eryngii* как на сложный комплексный вид, из которого, возможно, при более детальном изучении значительного набора штаммов разного происхождения (из разных географических точек, с разных растений ассоциантов) может быть выделен ряд самостоятельных видов с разной биологией. В данный момент мы можем говорить о комплексе видов и разновидностей, слагающих ассоциацию (или группу) *P. eryngii* (DC) Quel.

Учитывая характерный для видов рода *Pleurotus* тетраполярный гетероталлизм, при работе с чистыми культурами вешенки степной разного происхождения открываются перспективы селекционной работы с этим видом, позволяющие получить более урожайные и устойчивые к климатическим факторам сорта, что способствовало бы распространению в производстве высококачественного вида вешенок.

## ЭКЗОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОМИЦЕТА *PENICILLIUM CITRINUM* – ПРОДУЦЕНТА КЕРАТИНАЗЫ

Гордонова И.К., Никитина З.К.

ВНИИ лекарственных и ароматических растений, Москва

Кератиказы являются перспективными препаратами и применяются для конверсии кератинсодержащих отходов, в производстве кормовых гидролизатов, в кожевенной и текстильной промышленности, для очистки сточных вод.

Кроме того, эти ферменты могут применяться в биомедицинской, фармацевтической и косметической индустрии для гидролиза прионов, приготования вакцин при лечении дерматофитозов, производства биоактивных пептидов, удаления кератина при лечении псориаза и акне, деградации кератинизированной кожи и депиляции.

Ранее нами было показано, что *P. citrinum* PC-54-91 ВИЛАР, как и некоторые другие изученные дейтеромицеты, секретирует в культуральную жидкость ферменты, расщепляющие α-кератин волос [1, 2]. Разработан способ выделения высокоочищенного ферментного препарата кератиказы указанного

микромикета и дана характеристика её свойств [3]. Однако продуктивность микроорганизма была не достаточно высокой даже при длительном времени культивирования, что ограничивало возможность практического применения данного штамма. Целью работы являлась оптимизация способа получения кератиказы *P. citrinum* PC-54-91 ВИЛАР путем направленной адаптации культуры и экзогенной регуляции биосинтеза фермента.

Штамм *P. citrinum* PC-54-91 ВИЛАР культивировали на скошенной поверхности агаризованной среды Чапека в течение семи сут. в термостате при 26 °С. Для направленной адаптации дейтеромицета выращенную культуру пересевали несколько раз на агаризованную среду Чапека с заменой сахарозы на кератин волос. Культивирование в глубинных условиях осуществляли на модифицированной среде Чапека с частичной заменой сахарозы на кератин во-

лос. Количество посевного материала при глубинном культивировании составляло от  $5 \times 10^7$  –  $6 \times 10^8$  спор на 100 мл среды. В фильтрах культуральной жидкости проводили определение кератинозной активности модифицированным методом Anbu et al. [4]. Удельную кератинозную активность рассчитывали в пересчете на мг внеклеточного белка, определенному по Лоури.

На 1-м этапе работы была исследована зависимость кератинозной активности *P. citrinum* от количества пересевов на модифицированной среде, содержащей кератин (табл. 1).

Табл. 1. Зависимость кератинозной активности *P. citrinum* РС-54-91ВИЛАР от количества пересевов на модифицированной среде\*

№ пассажа на модифицированной среде	Содержание кератина в среде при глубинном культивировании, %	Время культивирования, сут.	Кератинозная активность, кЕд/мл
0	1,5	10	1,08±0,08
1	1,5	8	1,47±0,10
2	1,5	7	2,15±0,15
3	1,5	6	2,60±0,16
4	1,5	6	2,43±0,12

Примечание: \* – количество спор при засеве –  $10^8$  на 100 мл среды с 0,5%-ной сахарозой.

Установлено, что еще до проведения пассивирования культуры на модифицированной среде ее глубинное культивирование в присутствии кератина приводило к синтезу кератинозы и ее секреции в культуральную жидкость. При возрастании числа пересевов на агаризованной среде с кератином от 1 до 3 происходило снижение времени культивирования с 10 до 6 сут, а также увеличение накопления фермента в 2,4 раза. Увеличение количества пассажей не вызывало дальнейшей адаптации *P. citrinum*.

Показано, что изменение количества засеваемых спор в интервале  $5 \times 10^7$  –  $6 \times 10^8$  спор на 100 мл питательной среды не приводило к статистически достоверным изменениям максимальной суммарной кератинолитической активности культуральной жидкости. При отсутствии кератина в среде даже при длительном времени культивирования (до 14 сут) кератинозная активность не обнаруживалась, что свидетельствует об индуцибельном синтезе фермента. Изменение соотношения сахара : кератин от 1 : 19 до 1 : 3 приводило к увеличению максимальной суммарной кератинозной активности в 1,6 раза при сокращении времени культивирования до ее достижения с 8 до 6 сут.

Дальнейшее повышение концентрации сахарозы до соотношения 1 : 1 и 3 : 1 вызывало постепенное понижение кератинозной активности в 1,1 и 3,1 раза и повышение времени культивирования до 8 и 10 сут соответственно. На основании полученных результатов на данном этапе работы была выбрана питательная среда, содержащая 0,5% сахарозы и 1,5% кератина, при

культивировании, на которой на 6-е сут кератинозная активность составляла 2,6 кЕд/мл.

Поскольку различные виды кератиновых субстратов могут быть гидролизованы в зависимости от вида микроорганизма только на 5–50%, а используемый в данном исследовании кератиновый субстрат (волосы человека) наиболее трудно поддаются протеолизу, целесообразным представлялось изучение влияния концентрации кератина в среде на накопление кератинозы (табл. 2).

Табл. 2. Зависимость кератинозной активности *Penicillium citrinum* РС-54-91 ВИЛАР от содержания кератина в среде\*

№ пассажа на модиф. среде	Содержание кератина в среде при глуб. культив, %	Время культивирования, сут.	Кератинозная активность, кЕд/мл
3	1,5	6	2,60±0,16
3	5	6	4,73±0,32
3	7,5	6	5,4±0,30
3	10	6	6,26±0,38
3	12,5	6	6,21±0,30
3	15	6	6,15±0,33

Примечание: \* количество спор при засеве –  $10^8$  на 100 мл среды с 0,5%-ной сахарозой.

При увеличении концентрации субстрата от 1,5 до 10% наблюдалось увеличение максимальной кератинозной активности на 141% при том же времени культивирования. Дальнейшее увеличение кератина волос в среде не приводило к статистически достоверному изменению ферментативной активности.

Для выделения и очистки кератинозы из фильтра культуральной жидкости последовательно применяли гель-фильтрацию и аффинную хроматографию (табл. 3). Фракция, соответствующая внешнему объему колонки и материалу с молекулярной массой выше 15 кДа, полученная после проведения гель-фильтрации, обладала значительной кератинозной активностью, превышающей удельную кератинозную активность исходного препарата в 3,03 раза, и составляла 11,8 кЕд/мл. После проведения аффинной хроматографии ферментативная активность полученного препарата возросла до 231,1 кЕд/мл, то есть увеличивалась в 59,3 раза.

Таким образом, проведенные исследования позволили увеличить продукцию кератинозы культурой *P. citrinum* РС-54-91 ВИЛАР в 5,8 раза, сократить время культивирования с 10 до 6 сут по сравнению с неадаптированным штаммом и получить в двухстадийном хроматографическом процессе препарат кератинозы, расщепляющий  $\alpha$ -кератин волос, с продуктивностью 18 мг/л культуральной жидкости и активностью 231 кЕд/мл, выходом 70% и степенью очистки 59,3 раза.

**Выводы.** (1). При 3-кратном пересеве *P. citrinum* на модифицированной агаризованной среде с кератином

Таблица 3. Схема очистки кератиназы из культуральной жидкости *Penicillium citrinum* РС-54-91 ВИЛАР (на 100 мл питательной среды)

Процедура	Общий белок, мг	Общая кератиназная активность, Ед	Кератиназная активность, кЕд/мл	Удельная кератиназная активность, кЕд/мг	Степень очистки	Выход по активности, %
Фильтрат КЖ	152	595	6,26	3,9	1	100
Гель-фильтрация	41	482	1,69	11,8	3,03	81
Аффинная хроматография	1,8	416	1,30	231,1	59,3	70

удалось снизить время культивирования с 10 до 6 сут, а также увеличить накопление фермента 2,4 раза.

(2). Установлена оптимальная концентрация сахарозы в среде, обеспечивающая рост микроорганизма и синтез кератиназы в присутствии кератина.

(3). При увеличении концентрации субстрата от 1,5 до 10% наблюдалось увеличение максимальной кератиназной активности на 141% при том же времени культивирования.

(4). Проведенные исследования позволили увеличить выход фермента в 5,8 раза.

#### Список литературы

1. Гордонова И.К., Дмитриев Г.В., Никитина З.К. Поиск микроорганизмов – продуцентов кератиназ. *Вопр. биол., мед. и фарм. хим.* 2007; 4: 11-5.

2. Гордонова И.К., Никитина З.К., Зон Х.Ч. и др. Изучение протеолитических свойств дейтеромицетов при росте на модифицированных и немодифицированных кератинсодержащих субстратах. *Вопр. биол., мед. и фарм. хим.* 2009; 1: 19-24.

3. Никитина З.К., Гордонова И.К. Выделение, очистка и биохимические свойства кератинолитического фермента, секретируемого *Penicillium citrinum*. *Вопр. биол. мед. и фарм. хим.* 2013; 1: 36-41.

4. Anbu P, Gopinath SCB, Hilda A et al. Secretion of keratinolytic enzymes and keratinolysis by *Scopulariopsis brevicaulis* and *Trichophyton mentagrophytes*: regression analysis. *Can J Microbiol.* 2006; 52: 1060-9.

## ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА ОКСИДАЗНЫЙ КОМПЛЕКС *TRAMETES HIRSUTA* CF-28 – ПРОДУЦЕНТА ВЫСОКОПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЛАККАЗЫ

Горшина Е.С., Русинова Т.В., Анисимова Е.О., Бирюков В.В.

НТЦ «Промышленная биотехнология»,  
Московский государственный машиностроительный университет

Особые свойства базидиальных лакказ (широкая субстратная специфичность, высокая стабильность, высокий окислительный потенциал), а также возможность расширить окислительные способности фермента с помощью медиаторов определяет возможность её применения в тонком органическом синтезе, текстильной, пищевой, косметической и фармацевтической отраслях промышленности и в др. областях.

Лакказа секретируется многими живыми организмами. Однако наибольший интерес в качестве продуцентов лакказ представляют базидиальные, в особенности лигнолитические грибы, лакказа которых обладает высоким окислительно-восстановительным потенциалом, необходимым для ее применения в большинстве областей.

Дереворазрушающие базидиомицеты отличаются высоким содержанием окислительно-восстановительных ферментов, в первую очередь пероксидазы, Мп-пероксидазы, тирозиназы и лакказы. Разнообразное сочетание этих ферментов в комплексах лигнинразрушающих грибов связано, в первую очередь, с экологическими особенностями грибов и трофи-

ческой специализацией [1]. Известно, что одним из важнейших факторов, регулирующих синтез оксидаз, является природа источника углерода [2].

Было показано, что внеклеточный оксидазный комплекс *T. hirsuta* (Wulfen) Pilát CF-28 – промышленного продуцента лакказы [3], на среде с глюкозой на 80% представлен именно этим ферментом. В результате оптимизации питательной среды по общей оксидазной активности в качестве критерия была получена среда, источником углерода в которой служит мука. Далее представлялось необходимым изучить влияние источника углерода на оксидазную активность штамма-продуцента *T. hirsuta* CF-28 и показать возможность использования среды с мукой для производства ферментного препарата лакказы.

Получение культуральной жидкости с ферментативной активностью проводили методом глубинного культивирования штамма-продуцента в колбах с объемом 150 мл на круговой качалке при 200 об/мин в условиях термостата и исходном рН среды 5,8.

Культивирование проводили на среде следующего состава, г/л: глюкоза – 29,0; кукурузный экстракт –

6,4;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 2,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,3;  $\text{CuSO}_4$  – 0,05; вода водопроводная. Другие источники углерода (сахароза, мальтоза, фруктоза, лактоза, галактоза, глицерин, крахмал, мука) вносили в эквивалентном по содержанию углерода количестве.

Коэффициент выхода фермента рассчитывали по формуле  $y_{\text{рх}} = \text{ОА} / \text{ВСМ}$ , где ОА – общая оксидазная активность или активность фермента в единицах оксидазной активности (ЕОА), ВСМ – количество воздушно сухой биомассы в мг/мл культуральной среды.

Экстрацеллюлярную оксидазную активность в глубинной культуре (ОА) определяли в фильтрате культуральной жидкости спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Shimadzu Uvmini1240 (Япония) при 410 нм с использованием пирокатехина ( $10^{-2}$  М) в качестве субстрата в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере (рН 4,5).

Определение активности МпР осуществляли спектрофотометрически, по методу, описанному в работе [4]. Контроль активности LiP осуществляли по скорости окисления вератрового спирта до вератрового альдегида [2]. Контроль активности тирозиназы осуществляли спектрофотометрически, используя в качестве субстрата тирозин [5]. Значение активности лакказы получали путем вычитания из общей оксидазной активности значений активности других оксидаз, присутствующих во внеклеточном лигнолитическом комплексе. Диапазон ОА на средах с разными источниками углерода составил 0,27 – 7,76 ЕОА. Наиболее высокой оксидазной активности штамм достигал на средах с крахмалом и мукой.

Показано, что хорошее накопление биомассы не является признаком, соответствующим высокой ОА культуральной жидкости, однако, слабый рост биомассы приводит к низкой ОА. Расчет коэффициента выхода фермента на единицу биомассы показал, что существуют значительные различия этого показателя при росте культуры на разных источниках углерода. Наиболее эффективно клетки гриба синтезируют оксидазы на крахмале и муке, наименее эффективно на фруктозе, мальтозе и галактозе.

Диапазон активности Мп-пероксидазы составил от 0,0 до 0,16 ЕОА. Наибольшей активности Мп-пероксидазы достигает на средах с мальтозой, фруктозой и глюкозой на 4 сутки культивирования. Максимальный коэффициент выхода Мп-пероксидазы на средах с мальтозой, фруктозой и глюкозой наблюдается при снижающейся концентрации биомассы, т.е. соответствует фазе отмирания гриба.

Диапазон активности лигнинпероксидазы составил от 0,0 до 0,68 ЕОА, причем лигнинпероксидаза в определяемых количествах синтезировалась только на трех средах: с глицерином, лактозой и глюкозой. Максимальный коэффициент выхода фермента наблюдается на среде с глюкозой на 3-и сут культивирования, что соответствует максимуму биомассы. На среде с лактозой и глицерином максимум синтеза лигнинпероксидазы соответствует фазе роста культуры. Максимальное значение активности тирозиназы – 0,04 ЕОА, наблюдается на среде с глицерином.

Динамика активности лакказы в процессе культивирования практически повторяет динамику общей оксидазной активности. Это свидетельствует о том,

что оксидазный комплекс штамма *T. hirsuta* CF-28 представлен преимущественно лакказой.

Максимальная активность лакказы наблюдается на среде с крахмалом (7,69 ЕОА) на 4-е сут культивирования. На среде с мукой максимум выхода фермента приходится на 3-и сут культивирования. На средах с другими источниками углерода активность лакказы имела средние значения. В ходе эксперимента состав оксидазного комплекса менялся в зависимости от источника углерода и стадии культивирования.

На 1-е сут культивирования оксидазный комплекс полностью составляла лакказа. На 2-е сут состав оксидазного комплекса изменялся на средах с глицерином, лактозой и крахмалом. В составе ферментного комплекса появлялись лигнинпероксидаза и Мп-пероксидаза. Отмечен относительно высокий процент лигнинпероксидазы на среде с лактозой. На 3-и сут на среде с глюкозой наблюдался максимальный выход лигнинпероксидазы за всё время культивирования штамма. Отмечено появление тирозиназы на среде с крахмалом и марганецпероксидазы на среде с мукой.

На 4-е сут зафиксирован самый высокий процент выхода марганецпероксидазы. На средах с сахарозой и галактозой тирозиназа составляла 2% оксидазного комплекса, на глицерине и крахмале – 1%.

Результаты, полученные на среде с глюкозой в максимуме оксидазной активности активности (78% лакказы и 22% лигнинпероксидазы), соответствуют данным [3]. Среда с мукой в качестве источника углерода позволяет получить практически 100% лакказы в составе оксидазного комплекса, что подтверждает преимущества выбранного штамма и технологии.

Таким образом, показано, что источники углерода существенно влияют на ферментативную активность и состав оксидазного комплекса штамма *T. hirsuta* CF-28. Наиболее эффективными для синтеза оксидаз в качестве источника углерода являются крахмал и мука. Оксидазный комплекс штамма *T. hirsuta* CF-28 в основном представлен лакказой (от 78 до 100% в зависимости от источника углерода и стадии роста гриба).

### Список литературы

1. Решетникова И.А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. М. 1997: 197 с.
2. Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique  $\text{H}_2\text{O}_2$ -requiring oxygenase. Proc Natl Acad Sci USA. 1984; 81: 2228-84.
3. Штамм базидиального гриба *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát – продуцент голубой лакказы Горшина Е.С., Бирюков В.В., Русинова Т.В. и др. Патент РФ № 2345135, С 12 N 9/58, С12 N 1/14, С 12 R 1/645.; патентообладатель: Мос. гос. унив. инж. экол. Опубл. 27.01.2009/ Бюл. №3, 6 с.
4. Paszczynski A, Grawford RL, Huynh V-B. Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification. In: Methods Enzymol. Ed. Wood WA, Kellogg ST. AP: New York. 1988; 161: 264-71.
5. Masterman D, Redding K, Melville J, Randall J. Adv Biol with Vernier. Vernier Software & Technol. 2010; 2: 132 p.

## МУЛЬТИЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ДИКОРАСТУЩИХ МАКРОМИЦЕТОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Гродзинская А.А.<sup>1</sup>, Самчук А.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАНУ, Киев

<sup>2</sup>Институт геологии, минералогии и рудообразования им. Н.П. Семеновко НАНУ, Киев

Дикорастущие и культивируемые грибы являются не только традиционным деликатесом, но и неисчерпаемым источником биологически активных веществ с широким спектром действия: противораковым, антиоксидантным, иммуномодулирующим, гепатопротекторным, противовирусным, антибактериальным и пр. [1].

Сведения о накоплении макромицетами тяжелых металлов, радионуклидов природного и техногенного происхождения достаточно хорошо представлены в специальной литературе. Определенный интерес представляет исследование особенностей сорбции минеральных элементов макромицетами различных систематических и экологических групп, и фармакологической роли отдельных элементов при использовании грибов и грибных БАДов.

**Цель работы** – изучение минерального состава некоторых видов макромицетов, широко распространенных на территории Украинского Полесья.

Методом масс-спектрометрии с индукционно связанной плазмой (ICP-MS, анализатор «Element-2», Германия) исследовали содержание 26 минеральных элементов (Fe, Mn, Ni, Ti, V, Mo, Zr, Nb, Cu, Pb, Se, Ag, Bi, Zn, Ga, Be, Ce, La, P, Sr, Ba, Cr, Hg, Cd, Au и As) в плодовых телах 19 видов дикорастущих макромицетов, собранных в Киевской, Житомирской, Волынской,

Ровенской и Черниговской областях Украины (2010–2013 гг.), на участках лесных экосистем с сохраненным растительным покровом и слабо выраженной антропогенной нагрузкой. Для анализов использовали средние пробы из 3–5 плодовых тел, предварительно тщательно очищенных, высушенных при 100°C и измельченных до мелкодисперсного состояния.

Среди исследованных видов особое внимание было уделено болетальным грибам (как своеобразному эталону). В списке лекарственных грибов, используемых китайской народной медициной, указаны 540 видов, сорок из которых принадлежат к порядку Boletales [2].

Известно, что биогенные элементы N, P, K и др., являясь неотъемлемой составляющей метаболических процессов и компонентов грибных клеток, в общем минеральном составе представлены макроколичествами. Содержание P в исследованных образцах находилось в пределах 4000–8000 мг/кг с.м. (максимальное значение обнаружено у *Boletus chrysenteron*, Вышгородский р-н, Киевской обл.).

Проведенные исследования минерального состава макромицетов разных экологических групп показало высокое содержание физиологически важных, незаменимых для человека металлов – Fe, Zn, Cu, Mn и Mo (рис. 1).

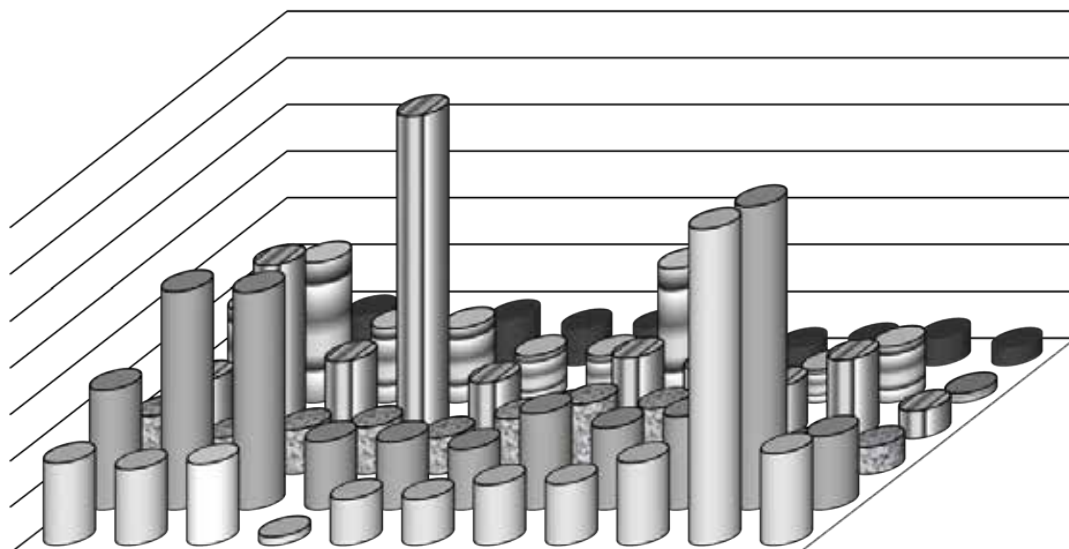


Рисунок 1. Содержание металлов в плодовых телах видов порядка Boletales (мг/кг с. м.).

Среди исследованных образцов содержание Fe находилось в пределах от 50 до 500 мг/кг с.м. В среднем, содержание Fe было несколько ниже у сапротрофов и лигнотрофов – от 50 (*Tricholomopsis rutilans*) до 110 мг/кг с. м. (*Armillariella mellea*), у микосимбиотрофов наблюдалось повышение уровня этого элемента в последовательности от видов рода *Amanita* (80–100)

до *Leccinum* (70–140), *Boletus* (52–400) и *Suillus* spp. (72–500 мг/кг с. м.).

Максимальное содержание Zn – 200 мг/кг с. м. обнаружено у *T. rutilans* (Ивановский р-н, Киевской обл.). Среднее содержание цинка в большинстве исследованных образцов находилось в пределах 30–100 мг/кг с.м. Повышенные уровни цинка зафиксированы

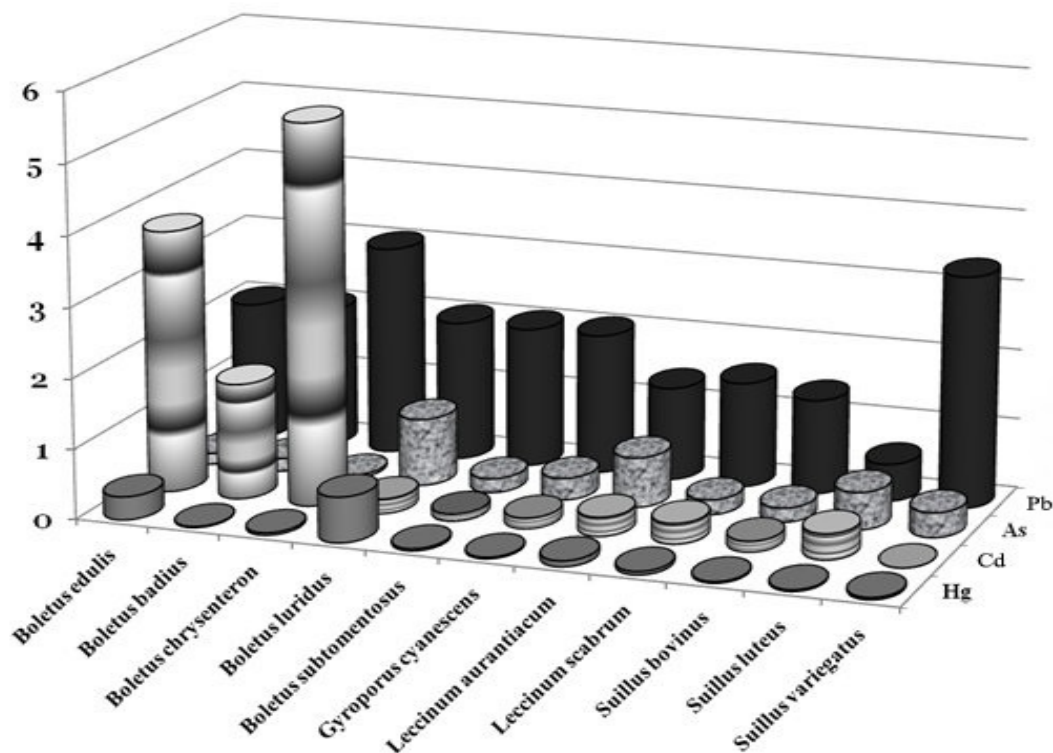


Рис. 2. Среднее содержание токсичных минеральных элементов (мг/кг с. м.) в плодовых телах видов порядка Boletales.

в плодовых телах некоторых болетальных грибов: *B. badius* – до 560 и *B. luridus* – 346 мг/кг с. м.

Минимальное содержание Cu обнаружено у *T. rutilans* – всего 4 мг/кг с. м., максимальное – до 100 мг/кг с.м. у некоторых образцов *B. edulis*, *Macrolepiota rhacodes* и *L. aurantiacum*. Содержание Mn в плодовых телах макромицетов колебалось в значительных пределах, в частности, у *B. edulis* из разных местообитаний – от 9,9 до 300, у *B. badius* – от 22,85 до 200 мг/кг с. м.

В достаточно значимых концентрациях в плодовых телах обнаружен Ti (в среднем 30–100 мг/кг), максимальные уровни которого обнаружены у *L. aurantiacum* (Бородянский р-н Киевской обл.) – 300 и у *B. badius* – 200 мг/кг с. м. (Иванковский р-н). Среднее содержание Se и Ba было в пределах 100–200 мг/кг с. м., а Zr – от минимума (6 мг/кг с. м.) у *T. rutilans* и *Grifola frondosa*, до максимума (80 мг/кг) у *B. edulis* и *B. badius*.

Следует отметить достаточно высокий уровень содержания La – от 30 у *T. rutilans* до 50–80 мг/кг у *Boletus*, *Leccinum*, *Suillus* и *Amanita* spp. Биологическая роль Ti, Zr, La, Ga для грибов до настоящего времени не ясна и нуждается в специальном исследовании. Среди необычных, абсорбированных макромицетами элементов, есть также Nb (в среднем от 0 до 2,0 мг/кг) и токсичные элементы – Ni (0 – 2,0 мг/кг) у *B. edulis* (Вышгородский р-н), V – от 1–3 мг/кг у болетальных видов до 40–50 у *Amanita* spp., средний уровень Cr и Bi в исследованных образцах был соответственно 2–3 и 1–3 мг/кг с. м.

Повышенное содержание физиологически важных элементов, в частности, металлов в плодовых телах

макромицетов, по-видимому, является одним из необходимых условий, определяющих их питательную и терапевтическую ценность данных биологических объектов. В то же время, анализ литературы свидетельствует о том, что некоторые виды макромицетов, произрастаая на техногенно загрязненных территориях, способны накапливать токсические вещества в значительных концентрациях, тем самым создавая потенциальную опасность для здоровья человека в случае включения этих соединений в трофические цепи. Поэтому особое внимание было уделено содержанию высокотоксичных элементов в плодовых телах (рис. 2).

Проведенные исследования показали, что максимальная концентрация Pb – 3,3 мг/кг с. м. была обнаружена у *Suillus variegatus* (Шацкий национальный природный парк, Волынская обл.), минимальная – 0,6 у *S. bovinus* (Ровенский природный заповедник, Ровенская обл.). Среднее содержание Pb в исследованных грибных пробах было в пределах 1–3 мг/кг, As – от 0,17 у *B. badius* (Козелецкий р-н, Черниговская обл.) до – 0,96 у *B. luridus* (Киев, Феофания), Cd – от 0,1 у *S. bovinus* и *B. subtomentosus* (Шацкий НПП) до максимальных величин у *B. edulis* – 6,12 и *B. chrysenteron* – 5,43 (Малинский р-н, Житомирська обл.), *B. badius* – 3,09 (Бориспольский р-н, Киевской обл.).

Полученные данные о содержании в плодовых телах микроэлементов, обладающих установленным антиоксидантным, противораковым (Se и Mo) и бактерицидным (Ag) действием, свидетельствуют о потенциальном фармакологическом значении видов-сорбентов данных элементов (табл.; см. след. стр.).



Таблица. Содержание Se, Mo и Ag в плодовых телах дикорастущих макромицетов (мг/кг с.м.).

Вид, экологическая группа	Se	Mo	Ag
Микосим-биотрофы			
<i>Boletus edulis</i>	17,95-32,49	2,78-15,48	3,5-23,93
<i>B. badius</i>	0,0505-0,268	0,657-19,78	0,24-2,0
<i>B. chrysenteron</i>	0,093	0,21-5,0	0,96-2,0
<i>B. luridus</i>	15,88	0,49	10,9
<i>B. subtomentosus</i>	13,0	1,0	2,1
<i>Gyroporus cyanescens</i>	10,1	1,0	0,8
<i>Leccinum aurantiacum</i>	1,24-24,0	0,6-30,16	2,0-40,0
<i>L. scabrum</i>	0,53-14,0	0,63-2,0	0,36-1,1
<i>Suillus bovinus</i>	4,0-12,0	0,6-2,0	0,8-1,5
<i>S. luteus</i>	1,37	1,0-6,27	0,49-1,0
<i>S. variegatus</i>	2,0	0,6	1,0
<i>Amanita muscaria</i>	3,21-7,38	1,0-2,0	4,0
<i>A. rubescens</i>	16,0	0,4	1,5
Сапротрофы			
<i>Macrolepiota procera</i>	26,0	1,6	1,0
<i>M. rhacodes</i>	10,0-22,0	1,0-2,0	3,6-5
Лигнотрофы			
<i>Armillariella mellea</i>	24,0	1,0	10,0
<i>Grifola frondosa</i>	10,0	1,0	4,0
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	10,0	1,0-2,0	1,04
<i>Pleurotus ostreatus</i>	3,0	0,8	2,0

Известно, что самые высокие уровни селена определяются в плодовых телах *B. edulis*. Полученные данные свидетельствуют о высокой концентрации Se не только в образцах *B. edulis* (до 32 мг/кг с.м.) и *L. aurantiacum* (до 24) из разных местообитаний, но и в плодовых телах *Macrolepiota* spp. – (до 26) и *A. mellea* (до 24,0 мг/кг с.м.).

В то же время, следует отметить, что максимальные уровни Mo установлены только у микоризообразователей – *L. aurantiacum* (до 30,16), *B. badius* (до 19,78), *B. edulis* (до 15,48 мг/кг с.м.), у представителей других экологических групп концентрация Mo была в пределах – 0,8 – 2,0 мг/кг с.м.

Максимальные уровни Ag были обнаружены у *B. edulis* (до 23,93 мг/кг с.м.), *L. aurantiacum*, *B. luridus* и *A. mellea*. В отдельных образцах было обнаружено Au: у *S. bovinus* и *M. rhacodes* (до 0,3), *A. rubescens* (0,26) и *A. mellea* (0,2 мг/кг с.м.).

Обширные литературные и полученные нами данные свидетельствуют о видоспецифичности накопления. Все исследованные виды являются коллективными сорбентами Fe, Cu, Zn и Mn, а для *B. edulis* и *B. luridus* установлена видоспецифичность накопления Se, Ag и Hg.

Съедобные и лекарственные виды макромицетов являются источником жизненно важных минеральных элементов, что свидетельствует о дополнительной ценности этих видов в качестве здоровой еды и лечебных пищевых добавок.

#### Список литературы

1. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. Int J Med Mushrooms. 2010; 12: 1-16.
2. Dai YC, Yang ZL, Ui BK, Yu CH, Zhou LW. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review). Int J Med Mushrooms. 2009; 11: 287-302

## ВЛИЯНИЕ КОГЕРЕНТНОГО СВЕТА НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА МИЦЕЛИЯ ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.) MURILL, *FOMITOPSIS OFFICINALIS* (VILL.: FR.) BOND. ET SING., *FOMITOPSIS PINICOLA* (SW.: FR.) P. KARST. И *TRAMETES VERSICOLOR* (L.: FR.) LLOYD

Громовых Т.И.<sup>1</sup>, Жилинская Н.В.<sup>2</sup>, Иванов А. В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

<sup>2</sup>Московский государственный университет пищевых производств

<sup>3</sup>Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва

Мицелий и базидиомы представителей *Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor* являются источником биологически активных соединений и уже успешно используются в биотехнологии [1–4]. Основными проблемами при культивировании мицелия этих базидиомицетов является медленный рост мицелия. Интенсификация ростовых процессов с одновременным сохранением или увеличением биологической активности позволит более эффективно использовать такие ценные продукты – источники биологически активных веществ

и пищевых добавок. Для увеличения скорости роста используют различные физико-химические и химические методы. В последнее время стали проводиться исследования по использованию лазерного облучения в биотехнологии базидиомицетов. Разработка приемов регуляции ростовых и синтетических процессов у базидиомицетов в культуре с учетом их экологического статуса в природе является перспективным направлением исследований [5–6].

Действие лазеров нацелено на специфические хромофоры, которые являются биологическими

структурами, обладающими строго определенным спектром поглощения. Одно из самых коварных свойств лазерного облучения – резкая зависимость величины и даже знака эффекта от дозы облучения и функционального состояния биологического объекта.

Позитивное, стимулирующее действие излучения проявляется, как правило, в узком интервале интенсивностей, а затем исчезает или даже сменяется угнетающим действием. Это связано с различными механизмами действия лазера. Использование лазера ускорило рост мицелия и образование базидиом у макромицетов *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Hericium erinaecus*, *Pleurotus ostreatus* [7–9].

Исследования, проводимые в последние годы, посвящены использованию света для ускорения роста мицелия съедобных базидиомицетов и показывают эффективность этого фактора, как для выхода плодовых тел, так и стимуляции прорастания базидиоспор (*Coriolus versicolor*) [9–10]. Работы по влиянию света на ростовые показатели мицелия представителей макромицетов *Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor* отсутствуют.

При выполнении работы объектами исследования служили штаммы базидиомицетов *Laetiporus sulphureus* Ls 1-06 (ВКПМ F-982), *Fomitopsis officinalis* (ВКПМ F-961), *F. pinicola* Fr-04/99 и *T. versicolor* B 08/06 (ВКПМ F-1024).

Облучение штаммов проводили лазером с экспозиционной дозой 0,36 и 1,8 Дж на опытной установке, разработанной в лаборатории лазерных методов диагностики и лечения опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина, однократно или многократно через 1, 2 и 3 сут культивирования штаммов на твердой питательной среде Мальтакс-10 и в условиях стационарного жидкофазного культивирования.

Учет действия когерентного света на рост мицелия штаммов оценивали по ростовым показателям скорости роста, ростовому коэффициенту и выходу биомассы мицелия.

Установлено, что при облучении когерентным светом с экспозиционной дозой 0,36 и 1,8 Дж у штаммов *L. sulphureus* Ls 1-06, *F. officinalis* Туv-2006 и *F. pinicola* Fr-04/99 не наблюдается достоверных отличий скорости роста и ростовых коэффициентов. Для штамма *T. versicolor* B 08/06 скорость роста увеличивается на 3,5–4,4 мм/сут, а ростовой коэффициент при двукратном облучении экспозиционной дозой в 0,36 Дж равен 193,9, что ~2,5 раза больше, чем в контроле без облучения.

Табл. 1. Рост штаммов при воздействии когерентного света с различной экспозиционной дозой

Экспозиционная доза	Скорость роста (мм/сут)			
	Ростовой коэффициент			
	<i>F. officinalis</i>	<i>F. pinicola</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>L. sulphureus</i>
1,8 Дж×1	$1,9 \pm 0,0$ 11,7**	$9,2 \pm 0,2$ 36,8*	$18,4 \pm 0,2$ 154,6*	$11,6^{**}$ 49,3
1,8 Дж×2	$2,0 \pm 0,1$ 12,2**	$10,1 \pm 0,1$ 40,6*	$18,4 \pm 0,6$ 143,5*	$11,3^{**}$ 52,5
0,36 Дж×1	$1,7 \pm 0,1$ 10,5**	$9,9 \pm 0,2$ 39,6**	$17,2 \pm 0,2$ 103,2*	$9,5^{**}$ 48,2
0,36 Дж×2	$1,7 \pm 0,0$ 10,0**	$9,6 \pm 0,1$ 38,0*	$17,9 \pm 0,3$ 193,9*	$12,4^{**}$ 50,7
Контроль	$1,6 \pm 0,1$ 9,5**	$8,5 \pm 0,2$ 33,8*	$13,9 \pm 0,1$ 74,8*	$10,4^{**}$ 48,3

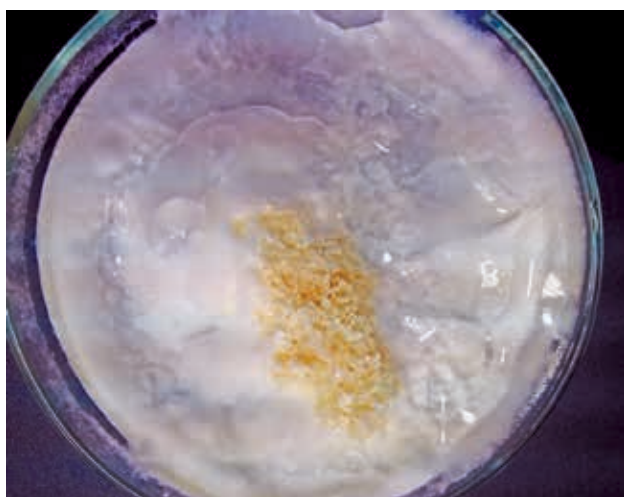


Рисунок 1 – Рост колоний штамма *T. versicolor* на 30-е сут культивирования: А – с облучением когерентным светом (экспозиционная доза 1,8 Дж×3); Б – контроль без облучения.

Сравнительная оценка показателей роста штаммов при облучении когерентным светом с экспозиционной дозой 1,8 и 0,36 Дж представлена в табл. 1.

Установлено, что у штаммов *F. pinicola* и *T. versicolor* на 45 и 30 сут культивирования, наблюдалось формирование примордий в отличие от контрольных образцов без облучения (рис. 1).

При жидкофазном стационарном культивировании однократное облучение когерентным светом с экспозиционной дозой 0,36 Дж увеличивает выход биомассы мицелия штаммов *F. officinalis* Туv-2006 на 7%, *F. pinicola* Fr-04/99 – на 8,5%, *T. versicolor* B 08/06 – на 11%. Для штамма *L. sulphureus* Ls 1-06 стимулирующий эффект не выявлен.

## Список литературы

1. Turkoglu A, Duru ME, Mercan N et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chem.* 2007; 101(1): 267-73.
2. Mishyn L, Gvozdkova T. Steroid compounds from the fungus *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr) Murr.: recovery and quantitation. *Мат. межд. науч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии».* Минск, 26–28 мая 2004. Минск. 2004: 265-7.
3. Гвоздкова Т.С., Сорока О.Н., Черноок Т.В., Залашко М.В. Эффективность антиоксидантного действия различных концентраций спиртового экстракта из мицелия каротинсинтезирующего гриба *Laetiporus sulphureus*. *Микробиология и биотехнология XXI столетия: Мат. Междунар. конф., посвя. 100-летию со дня рожд. С.А. Самцевича.* Минск. 22–24 мая 2002 г. Минск. 2002: 24-5.
4. Поединок Н.Л., Ефременкова О.В., Михайлова О.Б., Негрейко А.М. Биосинтетическая активность некоторых высших лекарственных грибов после световых воздействий. *Усп. мед. микол.* 2007; 9: 176-8.
5. Бухало А.С., Бабицкая В.Г., Бисько Н.А. и др. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. *Сб. научн. тр. в 2 тт.* Киев: Альтпресс. 2011; 1: 212 с.
6. Сухомлин М.М. Комплекс морфологічних ознак при схрещуванні сумісних та несумісних монокаріотів гриба *Coriolus versicolor* (L.: Fr.) Quel. *Укр. бот. журн.* 1998; 55(1): 75-82.
7. Poyedinok NL, Potemkina JV, Buchalo AS. Stimulation with low-intensity laser light of basidiospore germination and growth of monokaryotic isolates in medicinal mushroom *Herichium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllophoromycetidae) *Int J Med Mushrooms.* 2000; 2(4): 339-42.
8. Poyedinok NL, Negrijko AM, Potemkina JV. Influence of low-intensity laser radiation on the growth and development of *Herichium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. *Int J Med Mushrooms.* 2001; 3(2-3): 199.
9. Poyedinok NL. Prospects of application low-intensity laser light in biotechnologies of cultivation of edible mushrooms. *Int J Med Mushrooms.* 2005; 7(5): 448-52.
10. Purschwitz J, Muller S, Kastner Ch, Fischer R. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9: 566-71.

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *PENICILLIUM TARDUM*

Гудзенко Е.В.

Институт микробиологии и вирусологии НАНУ, Киев

В последние годы биокаталитические технологии становятся все более востребованными, так как количество ферментов, эффективно используемых в различных областях промышленности, растет очень быстро. Наиболее перспективными продуцентами  $\alpha$ -L-рамнозидаз являются микромицеты, а именно представители родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Fusarium*.

Одной из широко изучаемых групп ферментов являются гликозидазы, катализирующие расщепление гликозидных связей в олиго-, полисахаридах и различных гликоконъюгатах. Представитель гликозидаз –  $\alpha$ -L-рамнозидаза ( $\alpha$ -L-рамнозид-рамногидролаза – КФ 3.2.1.40), которая гидролитически отщепляет концевые невосстановленные  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,4 и  $\alpha$ -1,6- связанные остатки L-рамнозы в  $\alpha$ -L-рамнозидах.

В настоящее время разработаны технологии применения  $\alpha$ -L-рамнозидаз микромицетов в пищевой промышленности: в производстве соков из цитрусовых.  $\alpha$ -L-Рамнозидазы применяют в виноделии для усиления аромата вин в результате ферментативного гидролиза терпеновых гликозидов, содержащихся в винограде. Однако, несмотря на значительный промышленный интерес, в настоящее время только ряд неочищенных препаратов  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Aspergillus* и *Penicillium* (гесперидиназа и нарингиназа соответственно) выпускаются (“Sigma”, USA).

Отсутствие отечественных препаратов  $\alpha$ -L-рамнозидазы поставило перед нами задачу поиска продуцентов данного фермента. В результате скрининга, прове-

денного среди музейных культур отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины, был отобран перспективный штамм *Penicillium tardum*.

Одним из путей увеличения активности ферментов есть оптимизация условий культивирования штамма-продуцента. Поэтому целью нашей работы была оптимизация условий культивирования *P. tardum* для повышения синтеза внеклеточной  $\alpha$ -L-рамнозидазы.

При изучении влияния интенсивности аэрации на продукцию  $\alpha$ -L-рамнозидазы показано, что большие объемы питательной среды в колбах, которые снижают скорость растворения кислорода, вызывают незначительное уменьшение активности  $\alpha$ -L-рамнозидазы. Максимальный уровень  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности наблюдали при значениях сульфитного числа 0,44. Таким образом, для достижения максимальной  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности необходима эффективная аэрация.

Результаты исследования влияния оптимальных параметров культивирования свидетельствуют, что наиболее эффективным для синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы *P. tardum* было использование среды с изначальным значением pH 5,0, в то время как при начальных значениях pH 3,0 он существенно снижался. Исследование влияния температуры показало, что оптимальной для синтеза фермента было 25 °С.

Изучение влияния некоторых технологических параметров культивирования на процесс биосинтеза внеклеточной  $\alpha$ -L-рамнозидазы *P. tardum* показало, что для максимального биосинтеза оптимальными

источниками углерода и азота были рамноза (8 г/л), дрожжевой автолизат (2 г/л), температура 25 °С, исходное рН среды 5,0. Установлено, что максимальный уровень  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности достигается на 4-е сутки культивирования при значении сульфитного числа 0,44. При выращивании в подобранных условиях синтез  $\alpha$ -L-рамнозидазы повысился в 4 раза.

Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизированы условия культивирования продуцента, а именно состав питательной среды (в

г/л): рамноза – 8, дрожжевой автолизат– 2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015 и отработаны параметры культивирования, а именно выращивание инокулюма на протяжении 3–4 сут; 10% посевного материала, начальный рН среды 5,0; температура выращивания 25°С на протяжении 4 сут.

Выращивание культуры *P. tardum* в подобранных условиях привело к увеличению синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы в 4 раза. Активность фермента в культуральной жидкости составила 1,6 Ед/мг белка.

## ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГРИБОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Гунар О.В., Сахно Н.Г.  
НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва

Грибы являются активными биодеструкторами, вызывая повреждения разнообразных материалов и изделий, в том числе и фармацевтической продукции. Нормативные требования к качеству лекарственных средств (ЛС), в том числе по микробиологическим показателям, а также методология исследования регламентированы фармакопеями различных стран мира. Определение микробиологической чистоты и стерильности лекарственных препаратов проводят с использованием широкого набора жидких и плотных питательных сред общего и специального назначения, перечень которых приведен в соответствующих статьях нормативной документации.

Особую роль играют бактериологические свойства питательных сред: стерильность, стабильность основных биологических свойств микроорганизмов, эффективность (для накопительных сред), селективные, ингибирующие и нейтрализующие свойства, а также чувствительность питательной среды. Именно чувствительность (предел обнаружения) играет ключевую роль при определении стерильности ЛС, так как теоретически присутствие единичных клеток микроорганизма должно быть достаточным для их определения. Методология выделения грибов аналогична технике изучения бактерий, однако морфолого-физиологические особенности грибов обуславливают некоторые отличия.

**Цель работы** – сравнительное изучение питательных сред и условий инкубации посевов, используемых для выделения дрожжевых и плесневых грибов при определении стерильности ЛС.

**Материалы и методы.** В работе использованы готовые питательные среды (тиогликолевая среда, соево-казеиновый бульон) зарубежного производства, а также среды, приготовленные в лаборатории из компонентов (жидкая среда Сабуро, модифицированная среда Мартина). Исследования проводили с применением тест-штаммов дрожжевых и плесневых грибов (*Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404).

Для установления предела обнаружения питательные среды контаминировали взвесями целевых тест-штаммов микроорганизмов, так чтобы содер-

жание жизнеспособных клеток в конечном объеме среды составляло 10, 5 и 1 КОЕ. Посевы инкубировали при температурах  $(32,5 \pm 2,5)$  и  $(22,5 \pm 2,5)$  °С. Учет результатов производили ежедневно в течение 14 сут, определяя долю пробирок, контаминированных одинаковым количеством клеток, в которых был обнаружен видимый рост микроорганизма. В ходе статистической обработки результатов с использованием обобщенной формулы Спирмена–Кербера [1] определяли 50%-ный предел обнаружения ( $\text{LOD}_{50}$ ). Это значение характеризует количество клеток микроорганизма, которое возможно выделить в 50% случаев. Наряду с этим был проведен расчет доверительных интервалов (CI) для установленных значений  $\text{LOD}_{50}$ .

**Результаты и их обсуждение.** Из анализа ряда фармакопей (Государственной фармакопеи РФ XII изд., Европейской, Японской, Международной, Индийской, Китайской фармакопей, фармакопей США, Украины, Республики Беларусь, Казахстана) видно, что для выявления дрожжевых и плесневых грибов приведены различные среды, но в большинстве случаев используется соево-казеиновый бульон. Исключения составляют ГФ XII изд., Фармакопея Республики Беларусь, в которых предусмотрена возможность выделения грибов на жидкой среде Сабуро, а также Китайская фармакопея, регламентирующая использование модифицированной среды Мартина.

Условия инкубации посевов достаточно стандартны и в основном составляют 14 суток при температуре 20–25 (23–28 °С в случае Китайской фармакопей).

В табл. 1 приведены данные о чувствительности питательных сред, использованных для выделения дрожжевых и плесневых грибов (соево-казеиновый бульон, жидкая среда Сабуро, модифицированная среда Мартина), при различных условиях инкубации.

Как видно из приведенных значений, возможность выделения дрожжевых грибов *S. albicans* не ограничена составом питательной среды и температурным режимом инкубации, однако можно отметить более высокую чувствительность исследованных питательных сред в отношении данного микроорганизма при  $(22,5 \pm 2,5)$  °С. Для выделения плесневых грибов *A. brasiliensis* наиболее подходящими являются жидкая

Таблица 1. Предел обнаружения дрожжевых и плесневых грибов на различных питательных средах

Питательная среда	Температура инкубации посевов	Тест-штамм микроорганизма			
		<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	
		LOD <sub>50</sub>	CI	LOD50	CI
Соево-казеиновый бульон	(32,5 ± 2,5) °C	1,46	1,45-1,46	4,49	4,49-4,49
	(22,5 ± 2,5) °C	1,50	1,49-1,51	5,10	5,10-5,10
Жидкая среда Сабуро	(32,5 ± 2,5) °C	1,56	1,56-1,57	1,40	1,39-1,41
	(22,5 ± 2,5) °C	1,49	1,47-1,51	1,35	1,33-1,37
Модифицированная среда Мартина	(32,5 ± 2,5) °C	1,55	1,55-1,55	1,44	1,44-1,44
	(22,5 ± 2,5) °C	1,61	1,61-1,61	1,19	1,19-1,19

среда Сабуро и модифицированная среда Мартина, которые позволяют определять единичные клетки микроорганизма.

Из литературных данных известно, что для роста грибов наиболее благоприятна слабокислая реакция среды (5,0–6,0) и менее высокая температура инкубации [2]. Действительно, жидкая среда Сабуро и модифицированная среда Мартина имеют рН 5,6±0,2 и 6,4±0,2, в отличие от жидкой тиогликолевой среды и соево-казеинового бульона, рН которых составляет 7,1±0,2 и 7,3±0,2 соответственно. При этом, установленные в настоящей работе пределы обнаружения дрожжевых и плесневых грибов на данных средах при температуре (22,5 ± 2,5) °C несколько ниже, чем LOD<sub>50</sub> при (32,5 ± 2,5) °C.

**Вывод.** В ходе проведенного сравнительного изучения питательных сред, используемых для определения дрожжевых и плесневых грибов при испытании ЛС

по показателю «Стерильность», установлено, что для выделения плесневых грибов наиболее оптимальными являются жидкая среда Сабуро и модифицированная среда Мартина. Возможность определения дрожжевых грибов *C. albicans* не зависит от состава применяемой питательной среды. Наиболее высокая чувствительность питательных сред в отношении дрожжевых и плесневых грибов проявляется при температуре инкубации (22,5 ± 2,5) °C.

#### Список литературы

1. Final report and executive summaries from the AOAC International Presidential task force on best practices in microbiological methodology. AOAC International. 2006. 201 p.
2. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской микробиологии. С.-Пб. НИЦФ. 2003. 148 с.

## РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ РЕШЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИЕНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ПОЧВЕННЫМИ АКТИНОМИЦЕТАМИ

Ибрагимова В.Х.

Бакинский государственный университет, Азербайджан

Загрязнение окружающей среды отрицательно влияет на человеческую деятельность и продуктивность растений. Экологические проблемы неразрывно связаны с состоянием почвенного покрова. Важной задачей является разработка методов защиты человека и животных от патогенных инфекций, а также интегрированной системы защиты растений с использованием безопасных, экологически чистых и экономически эффективных биологических средств нового поколения. Социальный аспект сохранения здоровья человека в значительной степени зависит от обеспечения необходимыми лечебными препаратами, эффективные в борьбе с патогенными микроорганизмами. Для разработки эффективно действующих лекарственных соединений необходимо проведение исследований на молекулярном уровне с использованием мембраноактивных антибиотиков.

Для получения биологически активных соединений используются почвенные актиномицеты, способные синтезировать антибиотические вещества. Используя современные биотехнологические методы, был получен новый класс мембраноактивных полиеновых антибиотиков (ПА). В основе механизма действия ПА лежит формирование ими в клеточных мембранах каналов молекулярных размеров, избирательно проницаемых для ионов и органических соединений. В результате формирования каналов в мембране происходит утечка основных метаболитов из клеток, что сопровождается их лизисом. Целью настоящей работы является разработка современных методов защиты окружающей среды от патогенных инфекций с использованием мембраноактивных ПА. Исследуя физико-химические свойства ПА и их алкильных производных на липидных мембранах, можно выявить

новые вещества, способные избирательно поражать вирусные, стафилококковые и грибковые инфекции.

Проведен скрининг биологической активности ПА с помощью метода регистрации электрических характеристик липидных мембран в режиме фиксации потенциала. Самыми эффективными из изученных ПА оказались амфотерицин В и леворин А2, продуцируемые соответственно почвенными актиномицетами *Actinomyces nodosus* и *Actinomyces levoris*. Показана роль амфотерицина В и леворина А2 в решении экологических задач.

Представлен теоретический анализ практических аспектов использования амфотерицина В и леворина А2 с целью разработки экологической модели защиты окружающей среды от носителей инфекции. Установлена связь между структурой антибиотиков и их функцией в мембранах. Впервые изучены физико-химические свойства и биологическая роль диметилсульфоксида (ДМСО) в комплексе с ПА. Обнаружено, что использование амфотерицина В и леворина А2 в комплексе с ДМСО резко усиливает биологическую активность исходных антибиотиков.

Впервые были изучены физико-химические свойства амфотерицина В и леворина А2 в комплексе с ДМСО и их смешанные растворы в различных соотношениях. Исследована зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В и леворина А2. Амфотерицин В резко увеличивает проницаемость мембран для ионов, воды, неэлектролитов и органических соединений. Зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В растет пропорционально 8–10-й степени и эта степень зависит от структуры молекул ПА (Ibragimova et al., 2006). Резкая зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В позволила предположить, что ионная проницаемость связана с образованием в мембранах полиеновых каналов олигомерной структуры. Думается, что система, ответственная за избирательную проницаемость мембран, локализована в гидрофильной цепи молекулы амфотерицина В.

Показано, что после формирования в мембранах проводящего олигомерного комплекса полиеновый канал имеет тенденцию к автономной разборке внутри мембраны и перехода его в непроводящее состояние. Собранный проводящий канал может разбираться пономерно или димерно. При увеличении концентрации ДМСО увеличивается эффективность сборки полиеновых каналов и стабилизируется работа канала в проводящем состоянии в течении длительного времени.

Модификация аминной или карбоксильной группы молекул амфотерицина В (алкилирование или блокирование зарядов), находящихся у входа в канал, существенно уменьшает среднее время жизни канала в проводящем состоянии. Амфотерицин В при концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$  М в  $10^5$ – $10^6$  раз понижает исходное удельное сопротивление мембран ( $1$ – $5 \cdot 10^{-8}$  Ом·см<sup>2</sup>), приготовленных из общих фосфолипидов.

На рис. 1. показана зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В при различных концентрациях холестерина в мембранах, кривые 1 и 2.

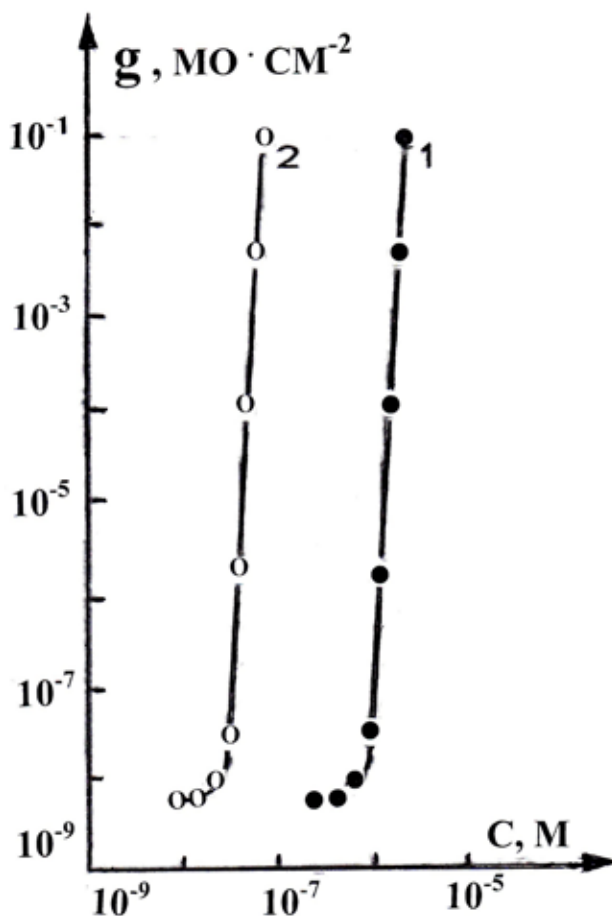


Рис. 1. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В. Кривая 1 получена на мембранах из фосфолипидов с холестерином в весовом соотношении 20 : 1, кривая 2 – при 2 : 1. Мембраны образовывались в растворе 10 мМ КСl, рН 6,5,  $t=22$  °С.

Добавка холестерина к фосфолипидам понижает сопротивление мембран, увеличивая эффективность действия антибиотика. Мембраны в присутствии амфотерицина В избирательно проницаемы для одновалентных анионов. Однако при исследовании ароматических антибиотиков было обнаружено, что в отличие от амфотерицина В, леворин А2 вызывает избирательную проницаемость не для анионов, а для катионов щелочных металлов.

Этот антибиотик отличается от нистатина, амфотерицина В и микогептина наличием в молекулах дополнительной ароматической группировки—*n*-аминоацетофенона, в которой содержится положительно заряженный азот. Поэтому трудно думать, что избирательная проницаемость для катионов связана с образованием в мембранах, содержащих холестерин, отрицательно заряженных пор. Скорее перенос катионов через границу мембраны осуществляется с помощью комплекса “ион–антибиотик–холестерин”.

На рис. 2 приведены зависимости проводимости мембран от концентрации леворина А2 при введении в водные солевые растворы. Леворин А2 увеличивает проводимость только тех мембран, в составе которых содержатся стеринины определенной структуры.

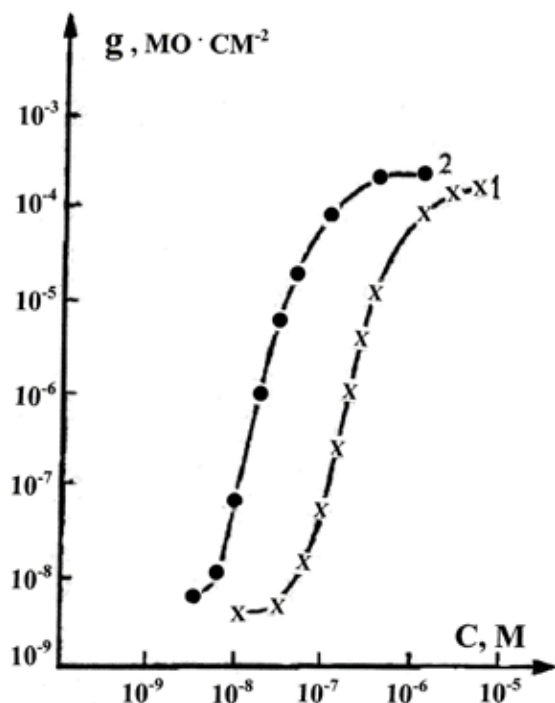


Рис. 2. Зависимость проводимости липидных мембран от концентрации леворина A2, кривые 1 и 2, в растворах 10 мМ KCl, pH 6,5,  $t = 22^{\circ}\text{C}$ . Кривая 1 получена на мембранах из фосфолипидов с холестерином в весовом соотношении 20 : 1, а кривая 2 – 2:1.

Увеличение концентрации холестерина в мембране повышает эффективность леворина A2. Как в случае амфотерицина B, увеличение концентрации холестерина в мембранном растворе сдвигает кривую влево, т.е. в сторону более эффективных концентраций антибиотика, как показано на рис. 2, кривые 1 и 2.

При увеличении концентрации антибиотика проводимость мембран растет пропорционально 4-й степени концентрации леворина. Исследования зависимости проводимости мембран от концентрации ароматического антибиотика и холестерина привели к предположению о наличии в мембранах многомолекулярных комплексов антибиотик – холестерин, индуцирующих ионную проницаемость.

Существенную информацию о механизме проницаемости мембран в присутствии ароматических антибиотиков можно извлечь из данных о переносе через мембрану малых ионов, таких как гуанидин и гидразин. В присутствии леворина A2 эти ионы проникают через мембрану значительно лучше, чем ионы  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ .

Установлено, что изученные антибиотики обладают крутой зависимостью проводимости от их концентрации, что позволило выявить эффективно действующие концентрации каждого из них в формировании ионных каналов. Необходимо отметить,

что в направлении получения эффективных ПА путем химического синтеза и биосинтеза ведутся интенсивные исследования (Zotchev, 2008; Caffrey et al, 2008; Baginski, 2009; Preobrazhenskaya et al, 2009; Palacios et al, 2011). Проведенные с нашей стороны исследования позволили теоретически обосновать и представить практические рекомендации к целенаправленному синтезу ПА и их производных с заданными свойствами. Так, например, алкилирование полярной части молекул ПА способствует повышению биологической активности и избирательности их действия на клеточные мембраны. Впервые удалось выявить новые соединения (условное название Резорбин и Инфанвир – состав этих соединений не раскрывается из-за патентных соображений) способные эффективно и избирательно подавлять рост патогенных вирусных, стафилококковых и грибковых инфекций в животных клетках, а также вирусных и грибковых инфекций в растительных клетках (Ибрагимова и др., 2010; Ибрагимова и др., 2012). На разработанные препараты получены Евразийские патенты.

#### Список литературы

1. Ibragimova V., Alieva I., Kasumov Kh., Khutorsky V. Transient permeability induced by alkyl derivatives of amphotericin B in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1758(1): 29-37.
2. Zotchev S.B. Biosynthesis of natural products applied to drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8: 616-17.
3. Caffrey P, Aparicio JF, Malpartida F, Zotchev SB. Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents. *Curr Topic Med Chem*. 2008; 8: 639-53.
4. Baginski M, Czub J. Amphotericin B and its new derivatives – mode of action. *Curr Drug Metab*. 2009; 10: 459-69.
5. Preobrazhenskaya MN, Olsufyeva EN, Solovieva SE et al. Chemical modification and biological evaluation of new semisynthetic derivatives of 28,29-Didehydronystatin A1 (S44HP), a genetically engineered antifungal polyene macrolide antibiotic. *J Med Chem*. 2009; 52: 189-96.
6. Palacios DS, Dailey I, Siebert DM et al. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 6733-8.
7. Ибрагимова В.Х., Садыгова Л.Н., Касумов Х.М. Эффект мембраноактивного соединения «Резорбин» природного происхождения на возбудителей патогенных инфекций. *Мат. межд. н.-практ. конф. «Ботанические сады в 21 веке: сохранение биоразнообразия, стратегия развития и инновационные решения»*. Белгород. 2009: 365-7.
8. Ибрагимова В.Х., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Касумов Х.М. Антивирусное и антигрибковое действие антибиотика инфанвир при заболевании овощных культур. *Изв. НАНА, Сер. биол.* н. 2012; 67(2): 34-7.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПИТАТЕЛЬНОГО СУБСТРАТА В ИНТЕНСИВНОЙ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS) P. KARST

Ильина Г.В.<sup>1</sup>, Ильин Д.Ю.<sup>1</sup>, Гарибова Л.В.<sup>2</sup>, Лихачев А.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пензенская государственная сельскохозяйственная академия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

В различных отраслях современного производства все большую актуальность приобретают соответствующие биотехнологии. Это связано с экономией энергоресурсов, возможностью за относительно короткий период времени получать уникальные продукты из дешевого сырья, а также со стремлением снизить антропогенную нагрузку на окружающую среду. Ключевую роль в биотехнологиях играют микроорганизмы, а также культуры клеток, выращиваемые в условиях *in vitro*. Важным условием в создании эффективных биотехнологий является детальное изучение физиолого-биохимических параметров и эколого-трофических потребностей предполагаемых к использованию культур.

Это обусловлено тем, что биологическая переработка какого-либо сырья с одновременным биосинтезом метаболитов клетками культуры осуществляется в ходе многоступенчатых обменных процессов, направленных, в первую очередь, на удовлетворение собственных энергетических и материальных потребностей. И только после детального изучения этих процессов можно определить ключевые этапы метаболических путей, вмешательство в которые позволяют получать целевые продукты без нарушения общего физиолого-биохимического статуса клеток продуцента.

Учитывая, что скорость и направленность метаболических превращений может регулироваться многими факторами, в том числе и трофическими, для достижения максимального практического эффекта нельзя не учитывать как качественные, так и количественные параметры питательных сред.

Высшие грибы, в частности, ксилотрофные базидиомицеты, рассматриваются в последние десятилетия как одни из наиболее перспективных в биотехнологии организмов, скрывающих значительный продуктивный потенциал. Признанным мировым лидером среди таких грибов является *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., интерес исследователей к которому обусловлен уникальными свойствами этого вида. Принимая во внимание эколого-биологические особенности, а именно принадлежность к ксилотрофам, можно предполагать важность лигноцеллюлозных компонентов в питании этого гриба.

Очень часто, при разработке регламентов на составление питательных сред возникает вопрос о выборе источника различных биогенных элементов, в частности, углерода. Кроме этого, следует учитывать и степень разрушения лигноцеллюлозного материала, поскольку это также может влиять на интенсивность обменных процессов, осуществляемых этим организмом. При использовании природных, частично деструктурированных лигноцеллюлозных материалов неизбежно могут возникнуть сложности, связанные с невозпроизводимостью получаемых результатов [1].

Оказать влияние на ход деструкции лигноцеллюлозного материала может концентрация метоксильных групп лигнина, которая зависит от состояния субстрата. Роль метоксильных групп в активации ферментов грибов белой гнили, а также динамика их концентрации на разных этапах процесса деструкции, описана в ряде работ [2, 3, 4]. Кроме того, в нативной древесине лигноцеллюлозные комплексы характеризуются высокой плотностью структуры, приближающейся к кристаллической. Это обуславливает низкую степень доступности обоим источникам углерода, что, в свою очередь, может быть серьезным препятствием для включения таких материалов без предварительной обработки (путем гидролиза и метанолиза) в качестве компонентов субстратов в производственных масштабах.

Нами были проведены эксперименты с использованием искусственно модифицированных лигноцеллюлозных субстратов, направленные на подбор оптимальных трофических параметров для твердофазного культивирования *G. lucidum*. В ходе настоящих исследований использовались основные приемы интенсивной технологии выгонки плодовых тел на органических субстратах [5, 6]. Разработанные нами субстраты были основаны на ржаной соломе. Масса измельченного субстрата для эксперимента подвергалась кислотному гидролизу, об эффективности которого судили по убыли массы и совокупной концентрации сахаров в перколяте. Затем соломистая масса запаривалась и помещалась в термоустойчивые пластиковые пакеты, которые закупоривались ватно-марлевыми пробками и подвергались стерилизации.

В опытах были изучены в качестве субстратов следующие композиции: запаренная ржаная солома – контроль; гидролизованная солома; гидролизованная солома в смеси с экстрагированными опилками древесины дуба (80%:20%); гидролизованная солома в смеси с экстрагированными опилками дуба, обогащенными метоксильными группами путем проведения процедуры метанолиза (80 : 20%). Первыми были освоены субстраты, содержащие гидролизованную солому (на ~25 сут с момента инокуляции). Полное освоение объема субстрата в контроле происходило в среднем за 30–35 сут. После полного обрастания субстратов из пакетов были извлечены пробки, и пакеты были открыты при комнатной температуре. Появление зачатков плодовых тел наблюдалось в разные сроки, но было отмечено во всех вариантах и в контроле.

В контрольных вариантах и варианте с гидролизованной соломой без добавления опилок дальнейшего развития базидиом не происходило. Образовывались кожистые уплотнения, которые со временем приобретали бурю окраску. Мицелиальная корка высыхала и отторгалась от субстрата. В опытных ва-



риантах примерно на 40 сут культивирования были отмечены тенденции к формированию плодовых тел. В частности, в варианте с гидролизованной соломой и нативными опилками на 42–45 сут отмечено начало морфогенеза типичных базидиом. Развитие кожистых примордиев сливочного цвета происходило медленно, вскоре появилась типичная пигментация, на 55-сут стало заметно образование гименофора, а на 60-е – началось высывание зрелых базидиоспор.

В вариантах с использованием метанолизных опилок все эти процессы протекали более интенсивно. Примордии, появившиеся на 38-е–40-е сут, характеризовались более выраженной пигментацией. Формирование типичных базидиом со зрелыми гименофорами во всех повторениях наблюдали к 55-м сут. Базидиомы имели разные размеры, отличались по массе и ряду органолептических признаков (степень пигментации, интенсивность аромата, форма). Максимальная зафиксированная масса воздушно-сухой базидиомы составила 12,4 г, минимальная – 4,3 г.

Таким образом, установлено позитивное влияние со стороны источников целлюлозы и лигнина (нативных и метанолизных опилок), включенных в состав субстрата на формирование телеоморфы *G. lucidum* в искусственных условиях. Отмечена достоверная стимуляция протекающих морфогенетических процессов. Присутствие опилок, обогащенных метоксильными группами, оказало наиболее заметное влияние. Гидролиз соломистого субстрата также является целесообразным, поскольку способствует частичной деградации целлюлозных цепей с образованием свободных концов – затравок, необходимых для инициации деятельности целлюлаз.

На основании полученных данных была разработана и запатентована рецептура субстрата, которая используется нами для получения плодовых тел

*G. lucidum*. Безусловно, на процесс плодообразования в искусственной культуре влияет целый ряд внешних факторов, прежде всего микроклимат, однако определение оптимального субстрата представляется нам существенным моментом.

Можно рекомендовать использование процесса метанолиза экстрагированных дубовых опилок, для обогащения последних метоксильными группами и гидролиза соломистого субстрата для увеличения биодоступности целлюлозы. Использование таких материалов в качестве компонентов субстрата перспективно при интенсивной технологии культивирования *G. lucidum*.

#### Список литературы

1. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Лыков Ю.С. Роль специфики лигноцеллюлозных субстратов при культивировании ксилотрофных грибов *in vitro*. Микол. фитопатол. 2009; 43(2): 123-8.
2. Фенгел Д. Древесина (химия, ультраструктура, реакция): Пер. с англ. М.: Лесная промышленность, 1988: 512 с.
3. Решетникова И.А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. М. 1997: 197 с.
4. Ильина Г.В. Эколого-физиологический потенциал природных изолятов ксилотрофных базидиомицетов. Дисс. ... докт. биол. наук. СГУ. 2011: 432 с.
5. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Иванов А.И., Гарибова Л.В. Способ выращивания грибов. Патент РФ. RUS 2424648: 8 с.
6. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Иванов А.И., Гарибова Л.В. Субстрат для выращивания плодовых тел гриба *Ganoderma lucidum*. Патент РФ. RUS 2453105: 6 с.

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОЦЕССА СТУПЕНЧАТОЙ БИОКОНВЕРСИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СУБСТРАТА ГРИБАМИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКИХ ГРУПП

Ильин Д.Ю.<sup>1</sup>, Ильина Г.В.<sup>1</sup>, Гарибова Л.В.<sup>2</sup>, Лихачев А.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пензенская государственная сельскохозяйственная академия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Основы перспективных экологически обоснованных биотехнологий опираются на принципы естественных процессов, протекающих в биосфере. Такие подходы позволяют интегрироваться в природные процессы массо- и энергопереносов и обеспечивать потребности человека в соответствующих продуктах и ресурсах с минимальным негативным влиянием на окружающую среду.

Одним из главных вопросов, возникающих при создании соответствующих биотехнологий, является выбор определенных видов-продуцентов, а также типа ресурсов, подлежащих переработке этими видами. Наиболее актуальными, из имеющихся в природе, являются растительные ресурсы, имеющие повсеместную распространенность и обладающие высоким по-

тенциалом возобновления. При этом основную долю растительных материалов составляют полимерные лигноцеллюлозные комплексы, характеризующиеся достаточно высокой стабильностью. Биологическое разложение природных лигноцеллюлозных субстратов (древесины и прочей растительной органики) является мультиферментным процессом, который характеризуется сменой видового состава микроорганизмов – деструкторов, то есть гетеротрофными сукцессиями.

Ведущую роль в организации ступенчатого процесса деградации играют грибы – представители различных таксономических групп. На первых этапах разложения субстратов на них поселяются аско- и дейтеромицеты, утилизирующие легкодоступные

сахара клеточных стенок. Биодеструкция наиболее устойчивых соединений: клетчатки и лигнина осуществляется базидиальными грибами. В то же время состояние субстрата напрямую зависит от результатов действия предшествующего звена ферментативного конвейера. Последовательное взаимодействие определенных групп ферментов, выделяемых грибами, приводит к изменению биополимеров субстрата, в результате чего образуются низкомолекулярные олигомеры и мономеры. Эти трансформированные легкоусвояемые вещества используются грибами для восполнения энергетических потребностей, а также в многочисленных процессах метаболизма. Направленность смены видов-деструкторов определяется состоянием субстрата, в свою очередь, определенного воздействием предыдущей серии видов, осуществлявших его ферментативную деградацию.

**Цель исследования** – установление экологических закономерностей функционирования мультиферментного процесса биодеструкции лигноцеллюлозных субстратов, сопровождающегося сменой видов грибов-деструкторов и возможность реализации полученных закономерностей в биотехнологическом контексте.

Для работы использовали представителей разных систематических, эколого-трофических групп и стратегий: *Mortierella alpina* Peyronel, *Aspergillus terreus* Thom и базидиомицет-ксилотроф *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. Интерес представлял поиск путей получения в ходе последовательного культивирования серии целевых продуктов. На 1-м этапе деструкция предварительно проанализированного на предмет количественного соотношения компонентов (холоцеллюлозы и лигнина) лигноцеллюлозного субстрата (измельченных экстрагированных дубовых опилок, обогащенных элементами минерального питания) проводилась в ходе культивирования штамма *A. terreus*. Предварительно при обрастании целлюлозных дисков установлена выраженная целлюлазная активность мицелия данного штамма.

Контролем служили экстрагированные дубовые опилки, а опытный вариант предполагал предварительный кислотный гидролиз опилочного субстрата. Навески увлажненного до 75% влажности опилочного субстрата массой 10 г (в пересчете на сухое вещество) помещались в чашки Петри. Об интенсивности ферментативной деструкции опилочного материала судили по убыли массы и динамике редуцирующих сахаров в субстрате. В ходе 14-сут процесса деструкции убыль массы составила порядка 12% в контрольном варианте и 16% – в опытном.

Динамика редуцирующих сахаров в обоих вариантах имела несколько пиков концентраций: на 4-е – 5-е, 8-е–9-е и небольшой пик на 12-е сутки культивирования, однако в опытном варианте выраженность пиков была более значительной. Параллельно проводилась оценка содержания липидов в мицелиально-субстратном комплексе. Экстракция липидов проводилась петролейным эфиром [1]. Установлено накопление липидов по истечению срока культивирования в количестве 0,7–0,9% (в контрольном варианте) до 1,1–1,2% (опытный вариант) от массы мицелиально-субстратного комплекса, что коррелирует с показателями

убыли массы субстрата. Интерес к полученному продукту может быть обусловлен возможностью его переработки в биотопливо [2].

Аналогичные эксперименты с *M. alpina* позволили установить, что культивирование возможно лишь на предварительно гидролизованном опилочном субстрате, поскольку изученный штамм практически не проявлял целлюлазной активности. Доступные сахара, высвобожденные в результате гидролиза, обеспечивали трофические потребности мицелия и делали возможным его развитие.

По ходу процесса культивирования отмечали уменьшение концентрации редуцирующих сахаров в субстрате на фоне накопления свободных жиров. При этом концентрация последних была значительной и достигала на последних этапах культивирования значений 1,8–2,1% от массы мицелиально-субстратного комплекса. На следующем этапе исследований, после экстракции жиров, частично деградированный субстрат подвергался количественному анализу на предмет содержания остаточных количеств холоцеллюлозы.

По результатам анализов косвенно установлено изменение пропорций составляющих в пользу лигнина субстрата. Затем увлажненные до 75% влажности субстраты были подвергнуты стерилизации и инокуляции мицелием одного из штаммов *G. lucidum*. В качестве контроля использованы гидролизованные экстрагированные опилки дуба, не прошедшие этапа биодеструкции ферментами мицелия указанных выше видов. Первый вариант опыта был основан на использовании субстрата, предварительно ферментированного штаммом *A. terreus*, во 2-м варианте опыта был использован субстрат, на котором прежде культивировали штамм *M. alpina*. В первом варианте опыта наблюдалась достоверная задержка развития мицелия, скорость роста отставала от контрольных значений на 20–25%, отмечалось снижение общей лакказной и дегидрогеназной активности мицелия, образования примордиев не наблюдалось.

Возможно, это связано с нарушением процесса стимуляции лакказной активности дефицитом продуктов расщепления целлюлозы, в частности, целлобиозы [2]. С другой стороны, причиной могут служить остаточные количества токсичных метаболитов *A. terreus*, присутствующие в субстрате. Подтверждение или опровержение этих предположений требует проведения дополнительных исследований.

Наиболее интенсивно обрастание субстрата мицелием *G. lucidum* происходило во втором варианте опыта. Стимуляция развития мицелия может объясняться относительно большей доступностью свободных сахаров субстрата, что облегчает процесс адаптации мицелия и сокращение лаг-фазы. Ранее нами было показано, что некоторые модификации нативных субстратов способны интенсифицировать развитие мицелия ксилотрофов [3].

В настоящем эксперименте установлено увеличение общей лакказной (на 10–15%) и дегидрогеназной (на 9–12%) активности мицелия по сравнению с контролем. Субстрат был освоен в относительно короткие сроки (на 5-е сут культивирования), а к 10–12 сут в 1-м варианте опыта отмечено образование примордиев. В

контроле освоение субстрата происходило медленнее, а тенденция к образованию зачатков плодовых тел была отмечена ближе к 20–22 сут культивирования.

Таким образом, целесообразно использование видов грибов, потенциально обладающих определенным биотехнологическим потенциалом и способных последовательно перерабатывать компоненты лигноцеллюлозных материалов и конвертировать их в практически значимые продукты.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ДЛЯ ПРЯМОЙ КОНВЕРСИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ В БИОЭТАНОЛ

Кожевникова Е.Ю., Барков А.В., Бескороваяная Д.А., Винокуров В.А.  
РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина, Москва

В последние десятилетия одним из приоритетных направлений развития биоэнергетической отрасли является поиск новых производственных микроорганизмов, эффективно перерабатывающих растительную биомассу в жидкое высокоэнергетическое топливо. К настоящему времени накоплено достаточно большое количество информации об эффективном использовании базидиальных грибов в качестве деструкторов лигноцеллюлозного субстрата, но исследования данных грибов в качестве продуцентов этанола активно проводятся только в последние несколько лет [1, 2].

В связи с этим актуальной является разработка технологии прямой конверсии лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол с использованием базидиальных грибов.

На 1-м этапе работы получено 66 новых штаммов базидиальных грибов, выделенных из плодовых тел, произрастающих на древесине и древесных остатках, и создана коллекция базидиальных грибов.

На 2-м этапе работы проведена оценка способности штаммов к синтезу ферментов, деструктурирующих лигноцеллюлозное сырьё в диапазоне температур 24 – 36 °С. Чашечный метод оценки с использованием в качестве единственного источника углерода натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы позволил выявить 16 штаммов, обладающих высокой целлюлазной активностью в указанном выше диапазоне, наибольшей активностью среди которых обладали штаммы *Trametes versicolor* МТ-20.01 и *Ganoderma lucidum* МТ-6.01 с температурными оптимумами синтеза целлюлаз в 26 °С и 32 °С соответственно.

Параллельно был проведен скрининг выделенных базидиомицетов на способность продуцировать не менее 4,0 г/л этанола с выходом по субстрату от 45 до 98%, в результате которого было выбрано 10 штаммов, способных сбраживать глюкозу (начальная концентрация – 20 г/л) в этанол на неоптимизиро-

### Список литературы

1. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир. 1975: 322 с.
2. Фенгел Д. Древесина (химия, ультраструктура, реакции): Пер. с англ. М.: Лесная промышленность, 1988: 512 с.
3. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Лыков Ю.С. Роль специфики лигноцеллюлозных субстратов при культивировании ксилотрофных грибов *in vitro*. Микол. фитопатол. 2009; 43(2): 123-8.

ванной среде с максимумом концентрации спирта на 5- – 7-е сут. Было отмечено, что при увеличении концентрации исходного субстрата (глюкозы) с 20 до 200 г/л значение концентрации спирта возрастало и достигало 33 г/л, однако наблюдалось снижение выхода спирта по субстрату.

В дальнейшем была исследована способность перспективных штаммов-продуцентов этанола с высокой целлюлазной активностью напрямую сбраживать лигноцеллюлозный субстрат в биоэтанол. Показано, что к концу времени брожения (7-е сут) образуется до 1 г/л биоэтанола на неоптимизированном субстрате.

Было установлено, что концентрация целевого продукта зависит от количества биомассы, в связи с чем была проведена оптимизация состава питательной среды для перспективных продуцентов биоэтанола, что позволило увеличить количество биомассы с 5–7 до 25–30 г/л.

Таких образом, была показана перспективность использования базидиальных грибов в качестве эффективных деструкторов лигноцеллюлозного сырья и продуцентов биоэтанола.

*Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект 14.577.21.0070, идентификатор RFMEFI57714X0070).*

### Список литературы

1. Okamoto K, Imashiro K, Akizawa Y et al. Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*. *Biotechnol Lett.* 2010; 32(7): 909-13
2. Kamei I, Hirota Y, Mori T et al. Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Biores Technol.* 2012; 112:137-42

## ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА ПОВЕРХНОСТНУЮ И ПОГРУЖЕННУЮ КУЛЬТУРУ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *GANODERMA LUCIDUM*

Краснопольская Л.М., Ярина М.С., Шипилов Я.С.

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

Стрессы, вызываемые абиотическими и биотическими факторами, приводят к существенным изменениям метаболизма грибов. Это позволяет рассматривать их в качестве регуляторов биосинтетических процессов, перспективных для использования в биотехнологиях получения биологически активных соединений грибов. Целесообразность такого использования стресс-фактора должна зависеть от установленных закономерностей биохимического ответа гриба на его наличие и от обеспечения экономической эффективности получения целевого продукта.

Одним из возможных путей изменения состава биологически активных соединений лекарственных базидиальных грибов является использование солевого стресса.

Цель работы состояла в оценке влияния повышенных концентраций хлорида натрия на рост *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. в условиях поверхностного и погруженного культивирования.

В работе использовали штамм *G. lucidum* – продуцент биологически активных полисахаридов [1] из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА». Источниками углерода и азота в плотной и жидкой питательных средах служили глюкоза и дрожжевой экстракт (Seriva). Условия культивирования описаны ранее [2, 3].

Исследование было начато с изучения роста *G. lucidum* на плотных питательных средах, содержащих 5, 7, 9 или 10 г/л хлорида натрия. В условиях эксперимента уменьшение радиальной скорости роста колонии гриба отмечали на средах с 9 и 10 г/л хлорида натрия. На 6-е сут роста диаметр колоний на средах с этими концентрациями хлорида натрия был на 15–18 % меньше диаметра контрольных колоний. Внесение хлорида натрия в концентрации 9 и 10 г/л приводило также к образованию коричневого пигмента. Хлорид натрия в концентрациях 5 и 7 г/л не вызывал ни уменьшения скорости радиального роста колонии, ни образования пигмента. Текстура колоний в опытных и контрольном вариантах опыта была одинакова.

На следующем этапе исследования хлорид натрия вносили в среды для погруженного культивирования *G. lucidum*. Учитывая, что максимальные из изученных концентраций хлорида натрия лишь незначительно снижали скорость радиального роста гриба, в последующих опытах шкалу концентраций увеличили до 20 г/л. Шаг варьирования составил 2,5 г/л. Культивирование на средах, содержащих 7,5 г/л хлорида

натрия и выше, приводило к постепенному снижению накопления биомассы *G. lucidum*.

На среде с 7,5 г/л хлорида натрия содержание биомассы составило 88,8% от контрольных показателей, на среде с 20 г/л – 22,3 %. Концентрация хлорида натрия, вызывающая 50%-ное снижение содержания биомассы, находилась в диапазоне между 12,5 и 15 г/л. На средах, содержащих 12,5 г/л хлорида натрия и выше, было отмечено образование коричневого пигмента. Изучение микроморфологических признаков погруженного мицелия *G. lucidum* показало наличие пружек на гифах как в контрольном варианте, так и во всех опытных. Содержание хлорида натрия в среде приводило к образованию на гифах кристаллов, количество которых возрастало по мере увеличения концентрации соли. Мицелий *G. lucidum*, подвергнутый воздействию изучаемого стресс-фактора образовывал хламидоспоры, которые ранее не были отмечены нами при погруженном культивировании данного штамма. Увеличение концентрации хлорида натрия повышало интенсивность процесса образования хламидоспор.

Следует отметить, что проведенное исследование позволило установить концентрации хлорида натрия, не оказывающие влияния на показатели роста и морфологические признаки *G. lucidum* – 7 г/л при выращивании на плотных средах и 5 г/л при погруженном культивировании. Снижение накопления погруженной биомассы *G. lucidum* на 50 % вызывала концентрация хлорида натрия, находящаяся в диапазоне 12,5 – 15 г/л. Реакция *G. lucidum* на неблагоприятное действие стресс-фактора включала образование пигмента и формирование хламидоспор.

### Список литературы

1. Автономова А.В., Белицкий И.В., Исакова Е.Б., и др. Водорастворимые полисахариды мицелия *Ganoderma lucidum*: биотехнология получения и противоопухолевые свойства. Усп. мед. микол. 2006; 7: 217-9.
2. Краснопольская Л.М., Белицкий И.В., Федорова Г.Б., Катруха Г.С. *Ploutotus djamor*: способы культивирования и антимикробные свойства. Микол. фитопатол. 2001; 35(1): 62-7.
3. Автономова А.В., Краснопольская Л.М., Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды для погруженного культивирования *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Микробиология. 2006; 75(2): 186-92.

## СОЗДАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОМАССЫ ВЫСШИХ ГРИБОВ

Круподёрва Т.А.<sup>1</sup>, Барштейн В.Ю.<sup>1</sup>, Пешук Л.В.<sup>2</sup>, Гашук А.И.<sup>2</sup>, Москалюк О.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт пищевой биотехнологии и геномики НАНУ, Киев

<sup>2</sup>Национальный университет пищевых технологий, Киев

Последние десятилетия характеризуются динамичным ростом индустрии здорового питания. Ежегодно мировой рынок функциональных продуктов увеличивается на 10–15%. К таким продуктам относится более четверти пищевых продуктов, производимых в ЕС.

Поиск сырья, в первую очередь, натурального происхождения, для обогащения биологически активными веществами (БАВ) традиционных продуктов, побудил исследователей обратить свое внимание на такой перспективный источник БАВ, как высшие грибы. Их высокая пищевая и биологическая ценность способны увеличивать функциональные ресурсы организма человека, его работоспособность, качество жизни, устойчивость к факторам внешней среды.

Немногочисленные публикации свидетельствуют о возможности и целесообразности создания продуктов питания функционального назначения с использованием плодовых тел, вегетативного мицелия, культуральной жидкости высших грибов (съедобных и лекарственных) из отделов Basidiomycota и Ascomycota.

Использование добавок на основе грибов может быть перспективным направлением в производстве различных групп продуктов, нуждающихся в обогащении БАВ. Оценена возможность использования мицелия грибов *Antrodia camphorata*, *Agaricus blazei*, *Hericiium erinaceus* и *Phellinus linteus* в рецептуре хлеба, его влияние на физико-химические и органолептические показатели, установлено значительное содержание в готовой продукции гамма-аминомасляной кислоты и эргостерина [1]. Различные биологически активные полисахариды, выделенные из гриба *Lentinus edodes*, апробированы для улучшения качественных показателей разных продуктов питания: тортов [2] риса и лапши [3], йогурта [4].

На основе гриба *Laetiporus sulphureus* разработана биологически активная добавка «Летисульфурин», проведена серия экспериментов по обогащению витаминами А и Е пшеничного хлеба, макаронных изделий, майонеза [5]. Исследована возможность применения гриба при производстве желтого рисового вина [6], соевого соуса [7]. Порошок из гриба *Ganoderma lucidum* вносили в качестве отличного источника диетических волокон в состав высококачественных продуктов быстрого приготовления с использованием тапиоки и пшеничной муки [8]. Способность макромицетов *Pleurotus ostreatus*, *Tricholoma matsutake* и *A. blazei* синтезировать алкогольдегидрогеназы была использована в экспериментах по изготовлению вина, пива и саке [9].

Создание обогащенного кальцием соевого молока осуществлено с помощью мицелия *Flammulina velutipes*, богатого протеазой [10]. Запатентовано использование грибов для создания ряда функциональных продуктов: мицелий *P. ostreatus* вносили после брожения опары при замесе теста (патент № 2116730

РФ); придание антиоксидантных свойств Вустерширскому соусу осуществляли с помощью добавок из плодовых тел *Grifola frondosa*, *P. ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor* (патент № 2012044932, Япония); добавление биомассы *G. lucidum* и/или *L. edodes*, обладающей иммуномодулирующим действием, рекомендовано для производства мясо-растительных консервов (патенты на полезную модель № 5116, № 5423, Украина) творожного десерта (патент на полезную модель № 4928, Украина), лечебно-профилактического напитка (патент на полезную модель № 5115, Украина).

Таким образом, создание функциональных продуктов питания или диетических продуктов специального назначения с использованием добавок из высших грибов, является перспективным и актуальным.

**Цель работы** – оценить возможность использования биомассы *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc., *Auriporia aurea* (Peck) Ryvarden, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Trametes versicolor* (L.) Lloyd в рецептурах функциональных продуктов питания.

Для создания ряда функциональных продуктов достаточно было заменить грибной ингредиент, содержащийся в рецептуре традиционного продукта. Так, замена плодовых тел белого гриба (*Boletus edulis* Bull.) или подберезовика (*Leccinum scabrum* (Bull.) Gray) на добавку из мицелия и культуральной жидкости *C. sinensis* (ТУ У 15.89.20.050-02128514-01-2010) позволила уменьшить себестоимость конечного продукта, улучшив одновременно пищевую ценность, в частности, аминокислотный состав, содержание витаминов в двух пищевых концентратах: «Соус грибной» и «Суп грибной» (РЦ У 15.89.11-02128514-003:2011) [11]. Сопоставление аминокислотного состава показало, что предложенная добавка по содержанию отдельных аминокислот, в первую очередь незаменимых, превышает прототип.

Более сложной является процедура замены ингредиентов разного происхождения, например, мясного на грибной. Важным этапом при разработке мясных продуктов является соблюдение совместимости ингредиентов рецептуры, технологических параметров производства и соответствие органолептических свойств продукта. исследованиями использовали высушенную биомассу (мицелиальную массу) *A. aurea*, *P. ostreatus*, *T. versicolor* (в количестве от 2 до 5%), полученную на жидком субстрате с CO<sub>2</sub>-шротом амаранта (60 г/л) в статических условиях культивирования в течение 14 сут при температуре 26±2 °С.

Согласно результатам органолептических исследований модельных комбинированных систем, только биомасса *P. ostreatus* может быть использована для создания мясных продуктов. Высокие общие оценки получили образцы с количеством биомассы *P. ostreatus* – 3%. Модельные мясные изделия с добавлением

биомассы *A. aurea* и *T. versicolor* из-за горьковатого вкуса получили низкие дегустационные оценки и в дальнейшем не были задействованы в работе.

Среди изученных вариантов модельных объектов (сосисок, колбас, котлет, паштетов) наилучшие органолептические показатели получены для паштетов. В дальнейшем, апробация биомассы *P. ostreatus* была проведена согласно новой разработанной рецептуре паштета функциональной направленности (геродиетической) «Особенный» в сравнении с рецептурой паштетов для детского питания (ТУ У 15.1-30183690.014-2003), содержащих пищевые добавки фирмы «Виберг» (Австрия).

Исследование состава нового паштета на содержание белка, жира и влажность показало соответствие требованиям данной ассортиментной группы. Определение аминокислотного состава паштетов показало как значительно большее содержание аминокислот (более качественный аминокислотный профиль в паштете «Особенный» с биомассой *P. ostreatus*), так и более высокий уровень незаменимых аминокислот.

Установлено, что важные показатели (пластичность, водосвязывающая и водоудерживающая способности) разработанного паштета соответствовали контрольным значениям. Во время проведения термической обработки полуфабрикатов происходило максимальное поглощение содержания водной фазы полимерами составных частей продукта, что приводило к незначительным потерям массы готового продукта. Безопасность разработанного паштета подтверждена микробиологическими исследованиями (общее микробное число: МАФАМ, КОЕ/г было в пределах нормы ( $< 1 \times 10^3$  на 1 г), БГКП/г – не обнаружено).

Исследование антивирусной активности мицелия *A. aurea*, *P. ostreatus*, *T. versicolor* против вируса гриппа А (H1N1) и вируса простого герпеса 2 типа показало очень высокие значения терапевтического индекса исследуемого мицелия [12]. Важной характерной чертой мицелия всех трех грибов является низкая токсичность.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность и перспективность использования добавок из высших грибов для создания функциональных продуктов либо диетических продуктов специального назначения разных ассортиментных групп (пищеконцентратная, мясная продукция) и разной функциональной направленности (геродиетической, антивирусной).

Высокая оценка органолептических показателей и удовлетворительные функционально-технологические характеристики нового разработанного паштета «Особенный» с использованием биомассы *P. ostreatus* соответствуют основным требованиям при разработке технологии нового продукта.

Внедрение в производство функциональных продуктов на основе биомассы *P. ostreatus*, обладающей антивирусным действием, может способствовать решению проблемы профилактики населения в борьбе с опасными вирусными заболеваниями, повышению сопротивляемости организма человека к неблагоприятным условиям среды, способствовать улучшению состояния здоровья населения.

#### Список литературы

1. Ulzijjargal E, Yang J-H, Lin L-Y et al. Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. *Food Chem.* 2013; 138: 70-6.
2. Kim J, Lee SM, Bae IY et al. (1,3)(1,6)- $\beta$ -Glucan-enriched materials from *Lentinus edodes* mushroom as a high-fibre and low-calorie flour substitute for baked foods. *J Sci Food Agric.* 2011; 91: 1915-59.
3. Heo S, Jeon S, Lee S. Utilization of *Lentinus edodes* mushroom  $\beta$ -glucan to enhance the functional properties of gluten-free rice noodles. *LWT – Food Sci Technol.* 2014; 55(2): 627-31.
4. Hozová B, Kuniak L, Kelemenová B. Application of  $\beta$ -D-Glucans isolated from mushrooms *Pleurotus ostreatus* (Pleuran) and *Lentinus edodes* (Lentinan) for increasing the bioactivity of yoghurts. *Czech J Food Sci.* 2012; 22(6): 204-14.
5. Билялова А.С. Разработка технологии и товароведная оценка биологически активной добавки к пище на основе высшего базидиального гриба. Дис. ... канд. техн. н. Москва. 2014: 185 с.
6. Chun Y, Qiao Z, Fang H et al. Study on *Cordyceps militaris* health yellow rice wine. *Liquor-Marketing Sci. Technol.* 2006; 10: 70-2.
7. Yue Chun, Ji E-yu, Huang Da-wei, Zhai Liao-yuan, Yang Li-yang. Study on using *Cordyceps militaris* culture medium to produce health soy sauce. *China Condiment.* 2007; 3: 34-37, 46.
8. Wei Yu-F, Li-sheng W, Qin F-Z. Development of *Ganoderma lucidum*-fermented instant food with high-quality dietary fiber. *Food Sci.* 2009; 30(2): 275-8.
9. Okamura-Matsui T, Tomoda T, Fukuda S, Ohsugi M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. *J Mol Catal B: Enzymatic.* 2003; 23(2-6): 133-44.
10. Kang D-C, Fang R-L, Wang S-M, Lu X-Q. Preparation of calcium-enriched soybean milk with golden mushroom mycelium in liquid culture. *Food Sci.* 2005; 26(2): 273-5.
11. Барштейн В.Ю., Круподьорова Т.А., Сабибін О.В. Харчовий концентрат функціонального призначення – суп грибний. Патент № 69510 на корисну модель. Бюл. № 8 від 24.04.2012 р.
12. Krupodorova T, Rybalko S, Barshteyn V. Antiviral activity of Basidiomycete mycelia against influenza type A (serotype H1N1) and herpes simplex virus type 2 in cell culture. *Virol Sin.* 2014; 29(5): 284-90.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *HYPsizYGUS MARMOREUS*Кудрявец Е.В.<sup>1</sup>, Красинько В.О.<sup>1</sup>, Ломберг М.Л.<sup>2</sup><sup>1</sup>Национальный университет пищевых технологий, Киев<sup>2</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАНУ, Киев

Общеизвестно, что базидиальные грибы являются ценным источником биологически активных веществ, в том числе ферментов. У букового гриба *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow, который растет как сапротроф или факультативный паразит преимущественно высоко на стволах бука, дуба, вяза, ивы и других твердых пород деревьев, большой интерес представляют ферменты, с помощью которых грибы разлагают и усваивают лигнин и клетчатку.

Мы провели тестирование наличия ферментов, отвечающих за обмен углеводов (амилаза, целлюлаза),

липидов (липаза), азотистых соединений (казеиназа) и окислительно-восстановительные процессы (лакказа), у 16 штаммов *H. marmoreus* разного географического происхождения из Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины (ИВК): 1610, 1611, 1612, 1656, 1867, 1868, 1869, 1870, 1975, 1979, 2006, 2270, 2273, 2297, 2300, 2377 [1]. Наличие ферментативной активности проводили с помощью качественных цветовых реакций. Результаты проведенных цветовых реакций приведены в таблице.

Таблица. Качественные цветовые реакции на наличие ферментов у штаммов *H. marmoreus*.

Ферменты \ Штаммы	1610	1611	1612	1656	1867	1868	1869	1870	1975	1979	2006	2270	2273	2294	2300	2377
Амилаза	1	3	4	4	2	2	4	1	3	2	4	2	4	2	2	2
Казеиназа	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Лакказа	3	4	3	4	3	2	3	3	3	2	2	3	3	2	4	2
Целлюлаза	2	2	2	3	2	3	3	2	4	3	3	3	4	2	1	1
Липаза	3	2	3	3	3	2	3	3	1	3	2	3	2	3	2	2

Примечание: 0 – активность отсутствует, 1 – очень слабая активность, 2 – слабая активность, 3 – умеренная активность, 4 – высокая активность.

Так, у всех исследованных штаммов букового гриба отмечено отсутствие положительной реакции на наличие казеиназы, но обнаружены положительные реакции различной интенсивности на наличие амилазы, лакказы, целлюлазы и липазы. В отдельных случаях наблюдались различия в скорости окрашивания колоний или его интенсивности, однако характер реакций при всех испытанных условиях, как правило, был постоянен. Наиболее активными культурами, которые проявили положительную реакцию с высоким

уровнем активности целлюлазы – штаммы 1975 и 2273, лакказы – 1611, 1656, 2300, амилазы – 1612, 1656, 1869, 2006. Именно эти штаммы являются перспективными для дальнейшего более подробного изучения.

## Список литературы

1. Molitoris H.P., Schaumann K. Physiology of marine fungi. A screening program for marine fungi. The biology of marine fungi. Ed. Moss ST, Cambridge Univ. Press. 1986: 35-7.

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ РОДА *PLEUROTUS*

Кузнецова О.В.

Украинский государственный химико-технологический университет, Днепрпетровск

Исследования по установлению наличия и характера влияния стимуляторов роста на развитие высших базидиальных грибов интересны, в первую очередь, с целью увеличения мицелиальной биомассы, повышения урожайности съедобных грибов и качества грибной продукции. Проводились такие исследования и в отношении грибов рода *Pleurotus*.

Так, было показано, что индолилуксусная кислота в низких концентрациях – 0,01–100 мг/л стимулировала рост *P. ostreatus*, уменьшала продолжительность лаг-фазы роста [1, 2], а в концентрациях >100 мг/л – угнетала рост [3]. Стимуляторы группы гиббереллинов (ГКЗ) в концентрациях от 0,001 до 50 мг/л стимулировали рост и плодоношение *P. ostreatus* [4].

Отмечено позитивное влияние фитогормонов на рост и урожайность *P. eryngii* var. *nebrodensis* (Inzenga) Quel. [5]. Однако сведений о влиянии стимуляторов роста на морфологические показатели мицелия высших грибов недостаточно. Показано, что состав питательного субстрата непосредственно влияет на толщину и длину гиф *P. ostreatus* [1] и *P. pulmonarius* [6].

**Цель исследования** – изучение характера влияния биостимуляторов на показатели мицелиального роста грибов *Pleurotus*.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были промышленные штаммы *P. ostreatus* (штам IBK-551) и *P. pulmonarius* (штам IBK-230), полученные из коллекции шляпочных грибов Института ботаники.

Поверхностное культивирование проводили на чашках Петри в термостате при 25–26 °С. Использо-

вали синтетическую глюкозо-аммонийную агаризованную среду, в которую добавляли биогумат, фумар, гетероауксин и гиббереллин в концентрации 1, 10, 50, 100 мг/л. Инокуляцию осуществляли дисками мицелия диаметром 8 мм. Однослойный мицелий получали путем наложения на агаризованную среду покровных стекол по методу М. Семерджиевой (1984). Затем мицелий окрашивали генциановым фиолетовым и микроскопировали при увеличении  $\times 800$ . Толщину гиф и расстояние между пряжками измеряли с помощью микроскопической линейки.

**Результаты и их обсуждение.** Микроморфологические признаки вегетативного мицелия исследованных грибов *Pleurotus* представлены в табл. 1 и 2.

Анализ данных таблицы 1 показал, что под влиянием таких стимуляторов роста как биогумат и фумар

Таблица 1. Влияние биогумата и фумара на морфологические признаки мицелия *P. ostreatus* IBK-551 и *P. pulmonarius* IBK-230 при культивировании на агаризованной питательной среде

Питательная среда со стимулятором	<i>Pleurotus ostreatus</i> IBK-551 (4-е сутки культивирования)		<i>Pleurotus pulmonarius</i> IBK-230 (6-е сутки культивирования)	
	Толщина генеративных гиф ( $M \pm m$ ), мкм	Расстояние между пряжками ( $M \pm m$ ), мкм	Толщина генеративных гиф ( $M \pm m$ ), мкм	Расстояние между пряжками ( $M \pm m$ ), мкм
Контроль	3,75 $\pm$ 0,35	32,67 $\pm$ 1,16	3,25 $\pm$ 0,35	50,0 $\pm$ 1,08
Биогумат 100 мг/л	3,25 $\pm$ 0,31	28,0 $\pm$ 1,62	4,75 $\pm$ 0,35	39,5 $\pm$ 0,71
Биогумат 50 мг/л	3,45 $\pm$ 0,3	30 $\pm$ 1,35	2,75 $\pm$ 0,1	42,5 $\pm$ 1,75
Биогумат 10 мг/л	3,5 $\pm$ 0,31	26,0 $\pm$ 1,64	2,75 $\pm$ 0,35	44,5 $\pm$ 2,12
Биогумат 1 мг/л	4,25 $\pm$ 0,35	29,5 $\pm$ 1,54	4,5 $\pm$ 0,11	38,0 $\pm$ 1,91
Фумар 100 мг/л	2,5 $\pm$ 0,35	36,33 $\pm$ 1,86	4,25 $\pm$ 0,35	43,33 $\pm$ 1,32
Фумар 50 мг/л	2,75 $\pm$ 0,3	29,5 $\pm$ 1,6	3,5 $\pm$ 0,3	42,5 $\pm$ 1,5
Фумар 10 мг/л	2,75 $\pm$ 0,35	25,0 $\pm$ 1,95	2,75 $\pm$ 0,35	39,0 $\pm$ 1,24
Фумар 1 мг/л	3,5 $\pm$ 0,35	24,50 $\pm$ 1,54	4,75 $\pm$ 0,35	45,67 $\pm$ 1,26

в действующих концентрациях по сравнению с контролем у всех культур уменьшается расстояние между пряжками, что свидетельствует о более интенсивном делении клеток генеративных гиф. Для штамма *P. ostreatus* отмечено уменьшение расстояния между пряжками на питательной среде с биогуматом от 8,2 % (концентрация 1 и 50 мг/л) до 20,4 % (10 мг/л) по сравнению с контролем. При этом уменьшение толщины генеративных гиф было незначительным (на 3,8 %).

У штамма *P. pulmonarius* уменьшение расстояния между пряжками составило от 11 % (концентрация стимулятора 10 мг/л) до 24 % (50 мг/л). Также показано для данного штамма достоверное уменьшение среднего гифального диаметра при концентрациях биогумата 10 и 50 мг/л – в среднем на 15,4 %. Биогумат – органическое удобрение нового поколения –

концентрированный водный экстракт из продуктов переработки красным калифорнийским червяком подсолнечной лузги.

Биогумат содержит комплекс фитогормонов, макро- и микроэлементы: повышает урожайность овощных и плодово-ягодных культур, ускоряет прорастание семян. Как показано, биогумат оказывает определенное воздействие и на грибной мицелий, интенсифицирует процесс деления клеток.

Фумар – синтетический фитогормон нового поколения, аналог производной природной аминокислоты (диметилловый эфир аминифумаровой кислоты): повышает всхожесть и энергию прорастания семян, стимулирует корне- и каллусообразование, ускоряет развитие растений, повышает урожайность сельскохозяйственной культуры. При обсуждении результатов влияния



Таблица 2. Влияние гиббереллина и гетероауксина на морфологические признаки мицелия *P. ostreatus* IBK-551 и *P. pulmonarius* IBK-230 при культивировании на агаризованной питательной среде.

Питательная среда со стимулятором	<i>Pleurotus ostreatus</i> IBK-551 (4-е сутки культивирования)		<i>Pleurotus pulmonarius</i> IBK-230 (6-е сутки культивирования)	
	Толщина генеративных гиф ( $M \pm m$ ), мкм	Расстояние между пружками ( $M \pm m$ ), мкм	Толщина генеративных гиф ( $M \pm m$ ), мкм	Расстояние между пружками ( $M \pm m$ ), мкм
Контроль	3,75±0,35	32,67±1,16	3,25±0,35	50,0±1,08
Гиббереллин 100 мг/л	3,0±0,05	42,0±1,83	3,0±0,09	48,0±1,83
Гиббереллин 50 мг/л	3,0±0,1	38,75±1,25	3,0±0,1	47,2±1,39
Гиббереллин 10 мг/л	3,0±0,07	36,0±1,41	2,75±0,35	56,0±1,60
Гиббереллин 1 мг/л	3,0±0,09	32,20±2,03	2,75±0,35	49,33±0,82
Гетероауксин 100 мг/л	2,5±0,03	30,67±1,16	3,5±0,04	51,0±1,49
Гетероауксин 50 мг/л	3,1±0,09	37,5±1,45	3,5±0,08	52,5±1,75
Гетероауксин 10 мг/л	3,25±0,09	36,50±1,12	3,25±0,06	53,33±1,73
Гетероауксин 1 мг/л	2,5±0,1	34,50±1,54	3,0±0,05	49,0±1,24

фумара на морфологические показатели исследуемых штаммов выявлено, что фумар способствует уменьшению расстояния между пружками у обоих штаммов: на 9,7–25,0% у *P. ostreatus* и на 8,7–22,1% – у *P. pulmonarius*. Однако действие стимулятора на толщину генеративных гиф не так однозначно: у *P. ostreatus* отмечено уменьшение среднего гифального диаметра на 23,4%, а у *P. pulmonarius* – увеличение на 16,9%.

Анализ данных табл. 2 показал, что такие регуляторы роста, как гиббереллин и гетероауксин, наоборот, способствуют увеличению расстояния между пружками, что свидетельствует о растяжении клеток мицелия. При этом отмечено образование более разветвленного мицелия с большим количеством пружек и связующих гиф складчатой формы.

Гиббереллин и гетероауксин способствуют ускорению роста растений, а также растяжению клеток. Подобное действие отмечено и для грибного мицелия. Установлено, что на питательной среде с гиббереллином (концентрации 10, 50 и 100 мг/л) расстояния между пружками гиф штамма *Pleurotus ostreatus* увеличились в среднем от 10,2 до 28,6%. Для штамма *P. pulmonarius* данный показатель составил 12,0% только для концентрации 10 мг/л. Отмечено уменьшение толщины генеративных гиф на всех вариантах опыта: для *P. ostreatus* – на 20%, для *P. pulmonarius* – на 11,5%.

Влияние гетероауксина на морфологические показатели гифального роста не столь значительно. Зафиксировано увеличение расстояния между пружками под

действием гетероауксина в среднем от 5,6 до 14,8% для *P. ostreatus* и от 2,0 до 6,7% для *P. pulmonarius*.

Таким образом, стимуляторы роста: биогумат, фумар, гиббереллин, гетероауксин, – оказывают влияние на морфологические показатели мицелиального роста *P. ostreatus* IBK-551 и *P. pulmonarius* IBK-230. При этом биогумат и фумар проявляют больше цитокининовую активность, способствуя более интенсивному делению клеток. Действие гиббереллина и гетероауксина направлено на растяжение гиф, то есть действие аналогично влиянию данных стимуляторов на растения. Наиболее эффективными концентрациями исследуемых рост-регуляторов являются 10 и 50 мг/л.

Результаты исследования могут быть использованы в грибных технологиях для ускорения роста и развития высших грибов.

#### Список литературы

1. Vinklarkova K, Sladky Z. Exogenous regulators in the mycelium of *Pleurotus ostreatus* after exogenous application. *Folia Microbiol.* 1978; 23(1): 55-9.
2. Hong JS. Studies on the physico-chemical properties and the cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J Korean Agr Chem Soc.* 1978; 21: 1-40.
3. Li G-X, Shao S-G, Li Y-J. Effect of hormone on the growth and yield of *Pleurotus eryngii* var. *nebrodensis*. *Chin Edible Fungi.* 2004; 23: 37-8.
4. Sanchez C. Influence of substrate on the ultrastructure of *Pleurotus pulmonarius* fruit body primordial. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 64(5): 691-4.

## ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИЦЕЛИЯ ДОЖДЕВИКА ГИГАНТСКОГО НА РАЗЛИЧНЫХ ПО СОСТАВУ ТВЕРДЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Лавлинский А.В., Богдаев А.Г., Гамаюнова М.А.  
Воронежский государственный университет, Воронеж

Дождевик гигантский (синонимы – Лангермания гигантская, Кальвазия) кроме пищевого применения используется в медицине для лечения различных заболеваний, в том числе и тяжелых.

Плодовые тела этого вида грибов используется в народной медицине для остановки кровотечения при ранениях, некоторых заболеваниях почек. На их основе уже получены противоопухолевые антибиотики, например, кальвацин.

Для успешного выращивания данных ценных грибов необходимо получение их мицелия из плодовых тел или музейных культур, с последующим его размножением. Размножение мицелия, как правило, начинается с маточных культур на твердой питательной среде. Состав используемых при культивации питательных сред может нужным образом ускорять или, наоборот замедлять рост и развитие на них мицелия.

Для введения в культуру дождевика гигантского были использованы его споры из зрелого плодового тела, помещенные на твердую питательную среду с добавлением отвара картофеля, риса, овса и кукурузы. Нами была частично изменена стандартная методика выращивания мицелия грибов из спор, из которой был исключен этап обработки спорового порошка перекисью водорода. Данная модификация была связана с возможностью ингибирующего влияния  $H_2O_2$  на последующий рост колоний мицелия.

Результаты предварительного опыта по проращиванию мицелия дождевика гигантского из спор на различных питательных средах показали, что наибольшее количество развившихся колоний в чашках Петри было при использовании питательной среды с добавлением отвара картофеля. С использованием данных сред нами был успешно получен дикариотический мицелий дождевика гигантского для дальнейшей работы с ним.

Проводилось измерение площади колоний мицелия ( $S$ ), периметра ( $P$ ) и расчет их коэффициента сферичности ( $F$ ) по формуле:  $F=4\pi S/2P$ . Результаты измерений обрабатывались статистически по стандартной методике. Значения признаков площади и коэффициента формы колоний мицелия дождевика гигантского на твердой питательной среде с добавлением отвара кукурузы представлены в табл. 1

В процессе исследований нами были изучены особенности морфологического строения колоний мицелия изучаемого объекта на поверхности твердой питательной среды со всеми типами органических добавок. Колонии мицелия Дождевика гигантского характерный внешний вид, свойственный для высших базидиальных грибов. В начальной точке роста (1 день) колонии мицелия приобретали форму носи-

Табл. 1. Площадь и коэффициент формы колоний мицелия у дождевика гигантского в дни наблюдений на средах с добавлением различных ингредиентов.

Дни наблюдений	Площадь колонии, см <sup>2</sup>		
	Коэффициент формы колонии, $F$		
	Отвар кукурузы $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Отвар картофеля $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Отвар овса $\bar{X} \pm S\bar{x}$
1	0,83±0,12 0,62±0,08	1,19±0,18 0,57±0,05	1,18±0,08 0,52±0,05
3	0,86 ±0,13 0,62±0,07	1,44±0,36 0,56±0,08	1,20±0,07 0,54±0,06
7	1,16±0,14 0,62±0,07	1,88±0,50 0,57±0,07	1,30±0,70 0,55±0,05
10	2,50±0,61 0,66±0,10	3,80±0,44 0,87±0,21	1,76±0,08 0,56±0,08
13	2,80±0,71 0,67±0,11	6,03±0,27 0,66±0,11	2,01±0,20 0,56±0,06

теля (зернового инокулюма), с которого начинался их рост. В ходе дальнейшего роста колонии мицелия на данных питательных средах приобрели свои морфологические особенности: скорость роста, плотное расположение гифов в колонии, размеры к концу сроков наблюдения, степень сферичности. Полученные нами данные показали, что наилучший рост колоний мицелия Дождевика гигантского проходил на среде с добавлением отвара картофеля. Существенно медленнее рост колоний мицелия проходил на средах с добавлением отвара овса и кукурузы. Измерения коэффициента сферичности колоний показало, что наиболее близкой к сферичной были колонии мицелия на среде с добавлением отвара картофеля и кукурузы, наименее сферичной – на среде с добавлением овса. Полученные нами результаты наблюдений свидетельствуют о неодинаковой реакции Дождевика гигантского на использованные нами составы питательных сред. Вероятно, это связано с его генотипическими особенностями по выработке необходимых ферментов для усвоения питательных компонентов взятых нами в опыте твердых сред. Таким образом, нами показана перспективность использования твердых питательных сред с добавлением отвара картофеля как питательного ингредиента при введении в культуру Дождевика гигантского.

## СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА, СЕРЕБРА, СЕЛЕНА, КРЕМНИЯ И ГЕРМАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ РАЗНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

Ветчинкина Е.П., Лоцинина Е.А., Курский В.Ф., Буров А.М., Никитина В.Е.  
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Разработка надежных методик получения монодисперсных наночастиц различного химического состава, размера и формы – первоочередная задача современной нанотехнологии. Наночастицы золота, серебра, селена, кремния и других соединений успешно используют в наномедицине, иммунологии, в информационных и биотехнологиях [1].

Используемые в настоящее время физико-химические методы синтеза наночастиц являются дорогостоящими, трудоемкими, экологически небезопасными, требуют использования высоких температур, pH и давления [2]. Поэтому в нанотехнологии приобретает все большее значение применение различных биологических объектов, включая растения, водоросли, грибы, бактерии, актиномицеты, а также их экстракты.

При этом грибы обладают преимуществом перед другими организмами благодаря способности продуцировать большие количества белка и переводить ионы металлов в менее токсичные формы под действием ферментов [2, 3]. Кроме того, широко известна особенность грибов накапливать в мицелии тяжелые металлы и другие микроэлементы [4].

Однако способность базидиальных грибов к синтезу нанообразований, механизмы этого синтеза, особенности морфологии и локализации наночастиц до сих пор изучены недостаточно по сравнению с низшими грибами и бактериями. Использование лекарственных базидиомицетов для биотехнологического получения наночастиц позволит синтезировать их в больших количествах без образования токсичных отходов.

**Цель и задачи исследования** – изучение способности лекарственных ксилотрофных базидиомицетов разных систематических групп – *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* – в погруженной культуре к биологическому синтезу наночастиц золота, серебра, кремния, селена и германия; выделить и дать характеристику наночастиц: показать размер, форму, локализацию нанообразований относительно мицелиальных гиф и однородность коллоидных частиц.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали четыре вида лекарственных культивируемых ксилотрофных базидиомицетов разных систематических групп *L. edodes* (Berk.) Sing (шиитаке), *G. frondosa* (Fr.) S.F. Gray (маитаке), *G. lucidum* Curtis: Fr. (трутовик лакированный) и *P. ostreatus* (Fr.) Kumm. (вешенка устричная). Грибы выращивали при 26 °С на синтетической среде в условиях погруженного культивирования. Дополнительно в колбы выращивания вносили  $\text{HAuCl}_4$  (1–500 мкМ),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ,  $\text{GeO}_2$  или  $\text{AgNO}_3$  в концентрации от 0,0005 до 5 мМ.

Образцы мицелия и культуральной жидкости исследовали при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) и метода негативного контрастирования. Для этого материал наносили на

никелевые сеточки с подложкой (1%-ный раствор формвара в дихлорэтаноле). После высыхания образца клетки контрастировали 1%-ным водным раствором уранилацетата [5].

Для исследования наночастиц, синтезирующихся внутри грибных клеток, мицелий, выращенный в присутствии выше перечисленных соединений, отмывали от среды культивирования водой, собирали центрифугированием и подвергали лиофилизации, затем гифы механически разрушали и отделяли от элементных частиц через фильтр “Millipore” (диаметр пор 0,4 мкм). Далее наночастицы ресуспендировали в минимальном объеме воды и наносили на никелевые сеточки с подложкой. Микрофотографии получали на электронном микроскопе Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия) при 120 кэВ.

Данная часть работы выполнялась на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Для детектирования определенных элементов, содержащихся в мицелии грибов, проводили рентген-флуоресцентное исследование, с помощью энергодисперсионного спектрометра модели ED 2000 (“Oxford Instruments”, Великобритания). Условия проведения измерения были следующие: диапазон определяемых элементов от Na до U, рентгеновская трубка с серебряным анодом, напряжение на трубке 35 кВ (Medium Elements), фильтр первичного рентгеновского излучения – тонкий серебряный (Thin Ag), экспозиция 600 с, среда – воздух. Содержание определяемого элемента оценивали при помощи метода “фундаментальных параметров”, заложенного в программном обеспечении прибора.

Для измерения спектров поглощения наночастиц металлов использовали UV-vis спектрофотометр Specord 250 (“Analytik Jena”, Германия, 190–1100 нм). Оценку размера, формы и относительного количества электронно-плотных нанообразований проводили с помощью изображения просвечивающего электронного микроскопа, полученных Libra 120 (“Carl Zeiss”, Germany). Для измерения дзета-потенциала, среднего размера и распределения синтезированных частиц Au<sup>0</sup> и Ag<sup>0</sup> по размеру методом динамического светорассеяния использовали прибор Zetasizer Nano ZS (“Malvern”, Великобритания).

Эксперименты были проведены не менее чем в пяти повторностях в пяти независимых экспериментах. Статистическую обработку результатов проводили общепринятым методом при помощи ПК с использованием статистического пакета анализа данных программы Excel.

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований было установлено, что при глубинном культивировании с добавлением селенита натрия мицелий всех базидиомицетов, кроме *G. lucidum*,

приобретал оранжево-красное окрашивание. Среда культивирования при этом оставалась прозрачной, однако наблюдалось выпадение красного осадка. Появление красной окраски у колоний микроорганизмов, растущих на селенсодержащих средах, свидетельствует о накоплении культурами элементного селена в аморфной красной модификации [6, 7].

У *P. ostreatus* покраснение мицелиальных гиф появлялось уже на 3 сут, у остальных видов – после 10–12-суточного культивирования. В контрольных, не инокулированных, колбах, содержащих синтетическую среду и селенит натрия, окрашивания и выпадения осадка не происходило. У трутовика лакированного среда выращивания приобретала слабо желтоватый оттенок. Разница в цвете может говорить о накоплении частиц разного размера: чем больше диаметр, тем интенсивнее и краснее становится цвет [8].

Желтый цвет обычно характерен для частиц диаметром от 20 до 40 нм. Это интересно, так как при твердофазном выращивании *G. lucidum* с добавлением к среде  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  субстрат на участках роста мицелия окрашивался в интенсивный оранжево-красный цвет. Это говорит о восстановлении  $\text{Se}^{4+}$  до  $\text{Se}^0$  и накоплении аморфной формы элементного селена красной модификации с размером частиц диаметром от 100 до 300 нм. Низкие концентрации селена стимулировали рост всех видов грибов и накопление биомассы, в то время как более высокие обладали ярко выраженным ингибирующим эффектом.

Добавление в среду культивирования золотохлористоводородной кислоты уже на 2-е сут *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. frondosa* и *G. lucidum* приводило к сиреневому или красному окрашиванию грибных гиф, а также культуральной жидкости разной степени интенсивности. Разница в цвете зависит от размера и формы синтезированных частиц. Наиболее сильную окраску приобретали шиитаке и вешенка, что говорит о хорошей способности данных культур к биоредукции золотосодержащего соединения  $\text{HAuCl}_4$  с последующим накоплением коллоидного золота  $\text{Au}^0$  в среде и мицелии [9].

При внесении в среду ионов серебра цвет культуральной жидкости, а также мицелиальных гиф грибов, заметно темнел начиная со 2-сут выращивания, а к 14-сут возрасту приобретал рыжевато-бурую окраску, наиболее интенсивную у грифолы курчавой. У трутовика лакированного наблюдалось, кроме того, выпадение бурого осадка. Признаком появления наночастиц серебра, по литературным источникам, является желтовато-коричневое окрашивание биомассы микроорганизмов [10].

Контрольные культуры, выращенные при аналогичных условиях, но без добавления в среду соединений золота и серебра имели белый цвет на протяжении всего эксперимента. При культивировании с добавлением  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{HAuCl}_4$  для всех базидиомицетов рост мицелия ухудшался по мере возрастания концентраций ионов металлов в среде выращивания.

Соединения германия и кремния в глубинной культуре стимулировали рост мицелия и накопление биомассы у всех макромицетов, однако окрашивания среды культивирования и гиф не наблюдалось, что

не позволяет на данном этапе эксперимента сделать вывод о восстановлении и накоплении наночастиц.

Для обнаружения электронно-плотных наночастиц разной химической природы было проведено исследование грибных гиф и культуральной жидкости базидиомицетов *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum* и *P. ostreatus*, выращенных в присутствии вышеперечисленных ионсодержащих соединений, методом негативного контрастирования. Элементное золото синтезировали все базидиомицеты, без заметных различий в форме и размере, преимущественно на поверхности клеток и в среде выращивания. Основная масса наночастиц правильной сферической формы размером от 5 до 15 нм, однако встречалось небольшое количество частиц 30–50 нм (рис. 1, 2).

К синтезу наночастиц серебра были способны также все культуры, без заметных видовых различий. Большое количество сфер неправильной формы, с преобладающим диаметром 5–20 нм, накапливалось в среде выращивания. Причем, как видно на представленных фотографиях (рис. 3, 4), основная масса наночастиц слипалась в конгломераты и лежала на белковой основе. По-всей видимости в синтезе  $\text{Ag}^0$  принимают участие белки, продуцируемые грибными клетками и находящиеся в культуральной среде.

Наночастицы селена грибные культуры синтезировали по-разному *L. edodes* и *G. frondosa* накапливали элементный селен в основном внутри клеток мицелия или (небольшое количество) на поверхности, диаметр биологически синтезированного  $\text{Se}^0$  составлял от 50 до 150 нм, редко до 250 нм, все частицы представлены правильными сферами (рис. 5). Базидиомицеты *G. lucidum* и *P. ostreatus*, в отличие от предыдущих культур, синтезировали наночастицы в основном в культуральной среде, у вешенки – немного на поверхности мицелия. Кроме того, отличался размер наносфер, диаметр составлял от 20 – 50 нм (рис. 6), отсюда и различие в цвете среды выращивания, описанное ранее.

Наночастицы кремния каждая культура синтезировала по-разному. Наименьшую способность к синтезу данного элемента имела культура *G. frondosa*, в среде выращивания встречается небольшое количество частиц неправильной формы. На поверхности гиф базидиомицета *L. edodes* формировались частицы сферической формы размером 50–250 нм. Локализация электронно-плотных образований, синтезированных трутовиком лакированным, была сходна с шиитаке, но разброс в размере наносфер был другим – от 5 до 200 нм (рис. 7).

Грибы *P. ostreatus* синтезировали большое количество частиц кремния неправильной формы в культуральной среде, размер данных наночастиц был небольшим, порядка 5–10 нм (рис. 8). Наночастицы германия нам удалось обнаружить только у грифолы курчавой и вешенки, небольшое количество наносфер диаметром ~100 нм располагалось на поверхности или рядом с мицелиальными гифами данных культур (рис. 9).

В контрольных культурах, выращенных при глубинном культивировании без добавления к среде ионсодержащих элементов, никаких электронно-плотных образований обнаружено не было, компоненты среды

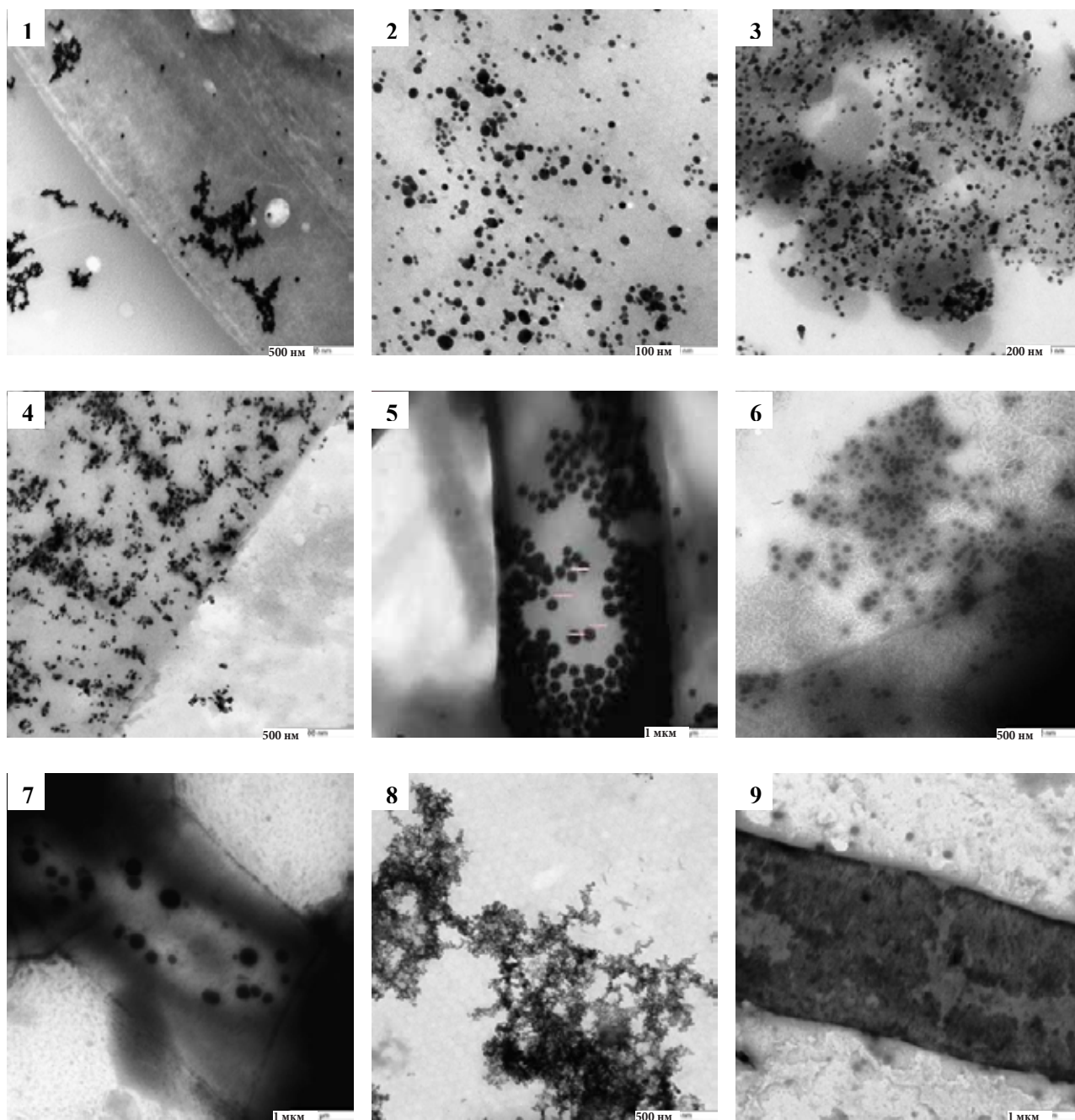


Рисунок. Электронномикроскопические изображения мицелиальных гиф базидиомицетов и биологически накопленных наночастиц. 1. *L. edodes* (Au0), 2. *P. ostreatus* (Au0), 3. *G. frondosa* (Ag0), 4. *L. edodes* (Ag0), 5. *L. edodes* (Se0), 6. *G. lucidum* (Se0), 7. *G. lucidum* (наночастицы Si), 8. *P. ostreatus* (наночастицы Si), 9. *G. frondosa* (наночастицы Ge).

выращивания также к восстановлению наночастиц не были способны. Таким образом, способностью к восстановлению наночастиц обладают именно грибные гифы и экскретируемые в процессе жизнедеятельности грибных клеток низко- и высокомолекулярные соединения, в том числе и различные экстраклеточные ферменты.

Размер биологически синтезированных частиц металлов был также оценен методом динамического светорассеяния. Полученные результаты по размеру наночастиц подтвердили данные электронной микроскопии. Дзета-потенциал коллоидного золота, синтезированного с помощью разных видов макро-

мицетов, составлял от  $-18$  до  $-25$  мВ, наночастиц серебра от  $10$  до  $-20$  мВ. Дзета-потенциал определяет степень и характер взаимодействия между частицами дисперсной системы.

Чем больше электрокинетический потенциал, тем устойчивее коллоид. Если данная величина (положительная или отрицательная)  $\geq 30$  мВ, то дисперсия будет устойчива по отношению к агрегации. В нашем случае дзета-потенциал золотых коллоидных растворов был близок к  $30$  мВ, что говорит об их электростатической стабилизированности и несклонности к коагуляции или флокуляции. Для дополнительного подтверждения того, что данные наночастицы пред-

ставляют собой именно восстановленное золото, селен, серебро, кремний и германий они были исследованы методом рентгеновской флуоресценции. Для отделенных фильтрованием и отмытых электронно-плотных нанообразований были получены спектры, в которых отмечено появление интенсивных эмиссионных линий, характерных для вышеперечисленных элементов.

Наличие золота было определено по линиям при  $\text{La}1 - 9,713$ ;  $\text{L}\beta 1 - 11,443$ ;  $\text{L}\beta 2 - 11,585$ ;  $\text{L}\alpha - 10,308$ ;  $\text{Ly}1 - 13,382$  кэВ; наличие серебра – по 2-м линиям при  $\text{La}1 - 22$  и  $\text{L}\beta 1 - 25$  кэВ; наличие селена было отражено в спектре в появлении интенсивных эмиссионных линий  $\text{La}1 - 11,22$  и  $\text{L}\beta 1 - 12,49$  кэВ; кремнию соответствовала линия при  $\text{La}1 - 1,75$  кэВ. Данные элементы детектировались у всех видов базидиомицетов. При этом спектры, снятые для контрольных культур, выращенных на средах без добавления ионсодержащих соединений, показали отсутствие вышеобозначенных линий.

Таким образом, в результате наших исследований с применением методов рентгеновской флуоресценции, просвечивающей электронной микроскопии и динамического светорассеяния, установлена способность глубинных культур лекарственных базидиомицетов *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum* и *G. frondosa* к восстановлению ионов Au, Ag, Se, Si и Ge до элементного состояния с биосинтезом наночастиц в среде выращивания, на поверхности и внутри мицелиальных гиф. Биологический синтез наночастиц при помощи макромицетов имеет особую актуальность в связи с простотой, доступностью и экологической безопасностью данного метода.

### Список литературы

1. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012; 41: 2740-79.
2. Dhillon GS, Brar SK, Kaur S, Verma M. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2012; 32(1): 49-73.
3. Kitching M, Ramani M, Marsili Enrico. Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. *Micr Biotechnol*. 2014. doi: 10.1111/1751-7915.12151.
4. Gade A, Ingle A, Whiteley C, Rai M. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. *Biotechnol Lett*. 2010; 32(5): 593-600.
5. Tandler B. Improved uranyl acetate staining for electron microscopy. *J Electr Microscop Tech*. 1990; 16(1): 81-2.
6. Hunter WJ, Manter DK. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Pseudomonas* sp. Strain CA5. *Curr Microbiol*. 2009; 58(5): 493-8.
7. Turło J, Gutkowska B, Herold F. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(4): 1085-91.
8. Lin ZH, Wang CRVh. Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Mater Chem Phys*. 2005; 92(2): 591-4.
9. Mourato A, Gadanho M, Lino AR, Tenreiro R. Biosynthesis of crystalline silver and gold nanoparticles by extremophilic yeasts. *Bioinorg Chem Appl*. 2011. doi: 10.1155/2011/546074.
10. Hemath NKS, Gaurav K, Karthik L, Bhaskara R KV. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Arch Appl Sci Res*. 2010; 2(6): 161-7.

## ПОДБОР СТАБИЛИЗАТОРОВ И КОНСЕРВАНТОВ ПРЕПАРАТА КАТАЛАЗЫ *PENICILLIUM PICEUM* БИМ F-371 Д

Мороз И.В., Михайлова Р.В.

Институт микробиологии НАНБ, Минск. Республика Беларусь

Каталаза ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) – антиоксидантный металлофермент, характеризующийся высокой каталитической активностью. Каталаза (КАТ) почти не требует энергии активации, в ее присутствии скорость реакции разложения пероксида водорода до молекулярного кислорода и воды определяется только скоростью диффузии субстрата к активному центру фермента [1].

КАТ применяется для детоксикации остаточных количеств  $\text{H}_2\text{O}_2$ , используемого в технологиях легкой, химической и пищевой промышленности [2–4]. В медицине фермент используется в составе полиферментных антиоксидантных препаратов, предназначенных для клинического применения с целью очистки биологических жидкостей от супероксидного радикала и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , образующихся при многих заболеваниях, а также при радиотерапии больных с различными патологиями [5, 6]. Промышленно КАТ получают из печени млекопитающих и путем микробиологического синтеза с использованием в качестве продуцентов

грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Практическая значимость обуславливает необходимость разработки отечественной технологии получения препарата КАТ.

Ранее нами получен продуцент внеклеточной КАТ *Penicillium piceum* БИМ F-371 Д, определены состав питательной среды и параметры культивирования гриба [7, 8]. При изучении влияния одно- и многоатомных спиртов на рост *P. piceum* БИМ F-371 Д и образование КАТ в качестве стимулятора синтеза фермента отобран этанол, повышающий продуцирующую способность мицелия гриба и уровень образования КАТ в 7,6 и 4,5 раза соответственно [9].

Определяющим критерием успешного практического использования ферментных препаратов является их стабильность, обусловленная устойчивостью каталитически активных белковых структур к неблагоприятным физическим, химическим и биологическим воздействиям. Наиболее распространенный и простой метод стабилизации ферментов – добавление в раствор белка стабилизирующих веществ.

Лимитирующим фактором применения этого метода является природа стабилизатора и его концентрация. Для предотвращения инактивации и контаминации микроорганизмами в ферментные препараты добавляют соли, полиолы, полиэлектролиты, сахара, сахароспирты, субстраты ферментов и т.д., а также химические консерванты.

Цель данной работы – подбор стабилизаторов и консервантов для длительного сохранения ферментативной активности препарата КАТ *P. roseum* БИМ F-371 Д.

В опытах использовали образцы препарата КАТ, полученного из культуральной жидкости *P. roseum* БИМ F-371 Д методом ультрафильтрационного концентрирования на мембранном элементе с радиальным перемешиванием с использованием мембраны ПА-20 (МИФИЛ, Беларусь). Для наработки культуральной жидкости гриб культивировали глубинным способом в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на круговой качалке (180–200 об/мин) при 26–27 °С в течение 4 сут. Питательная среда содержала (%): глюкозу – 6,0,  $\text{KNO}_3$  – 0,8,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05,  $\text{KCl}$  – 0,05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001, экстракт солодовых ростков – 2,0, этанол – 4 об.%. Хранение образцов препарата осуществляли при + 4°С. В качестве стабилизаторов КАТ применяли сорбит (15–30%), глицерин (15–30%), растворы полиэтиленгликолей с молекулярной массой 6000 и 20000 (5–20%) и сульфат аммония (1–3 М). В качестве консервантов использовали хлорид натрия (0,02–0,2 М), мертиолят натрия (0,001–0,002%), метил и пропилпарабены, глутаровый альдегид, алкилдиметилбензиламмоний хлорид (ЧАС) и додецилпропилен триамин (0,01–0,08%). Активность КАТ измеряли спектрофотометрическим методом [10].

Оценка ферментативной активности опытного образца препарата сразу после введения стабилизаторов выявила различный эффект их действия. Так, сульфат аммония (0,5–3,0 М) активировал КАТ *P. roseum* БИМ F-371 Д, максимальная активность (повышение на 19%) установлена при введении 1 М данного соединения. Полиэтиленгликоль 20 000 ингибировал ферментативную активность на 27–30%, а полиэтиленгликоль 6000, глицерин и сорбит практически не влияли на активность КАТ *P. roseum* БИМ F-371 Д. Следует отметить, что константа ингибирования фермента была минимальной при применении глицерина и сульфата аммония и составила  $0,63\text{--}1,48 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ , что в 1,2–17,3 ниже, чем при применении других веществ.

Характеристика препарата после 45 сут хранения показала, что при использовании таких стабилизаторов, как глицерин (30%), сульфат аммония (1,5–3,0 М) и сорбит (15%) в образцах остается 94–98% ферментативной активности. При использовании полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 отмечено сохранение 84–87% активности, а при применении полиэтиленгликоля 20000 наблюдалось снижение каталазной активности на 40–68% в зависимости от используемой концентрации. Анализ стабильности образцов препарата КАТ *P. roseum* БИМ F-371 Д показал, что через 3 мес максимальный стабилизирующий эффект оказывали глицерин (30%), сорбит (15%) и 1,5 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , при этом потери активности не на-

блюдалось. После 6-месячного хранения активность КАТ в данных образцах препарата уменьшалась на 2–3%. Через 9 мес хранения каталазная активность в образцах препарата резко снижалась. Минимальные потери ферментативной активности (12%) отмечены при использовании в качестве стабилизатора глицерина (30%).

Как известно, ферментные препараты подвержены контаминации микроорганизмами, что является причиной изменения их активности и в значительной степени затрудняет использование. Для предотвращения развития микроорганизмов и обеспечения гарантийного срока хранения препаратов применяют химические консерванты.

Установлено, что добавление в исследуемый ферментный препарат фенола приводит к ингибированию активности КАТ на 22–100%, глутарового альдегида, парабенов, ЧАС и третичного амина – на 3–27%. Мертиолят натрия (в концентрации 0,001%) и  $\text{NaCl}$  (во всех испытанных концентрациях) практически не влияли на активность КАТ *P. roseum* БИМ F-371 Д. После 45 сут хранения препарата при использовании мертиолята натрия (0,001%) и  $\text{NaCl}$  (0,02 М) в образцах сохранялось 97–100% ферментативной активности, а через 3 мес хранения каталазная активность в образцах препарата снижалась на 4–18%. После 6 мес минимальные потери ферментативной активности (5%) отмечены при использовании 0,001% мертиолята  $\text{Na}$ .

Исследование бактерицидного действия мертиолята натрия проводили на агаризованных средах сусло и МПА. Образцы препаратов (100 мкл), содержащие КАТ и консервант, наносили на поверхность агаризованной среды в чашках Петри и растирали шпателем. Проверка инфицированности препарата КАТ *P. roseum* БИМ F-371 Д показала наличие в контрольном варианте бактерий ( $2,1 \times 10^2$  КОЕ/мл). При добавлении мертиолята (0,001%) контаминация препарата микроорганизмами не выявлена.

Таким образом, в результате выполненных исследований изучено влияние стабилизаторов (глицерина, сорбита, полиэтиленгликолей, сульфата аммония) и консервантов (хлорид и мертиолят натрия, фенол; метил- и пропилпарабены, глутаровый альдегид, алкилдиметилбензиламмоний хлорид (ЧАС) и додецилпропилен триамин) на активность и стабильность КАТ *P. roseum* БИМ F-371 Д. Полученные данные свидетельствуют об эффективности использования глицерина (30%) и мертиолята натрия (0,001%) для стабилизации ферментного препарата и его хранения в течение 6 месяцев при 4 °С и могут быть использованы при создании биотехнологии получения препарата КАТ.

#### Список литературы

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymology*. 1984;105: 121–6.
2. Amorim AM, Gasques MDG, Andreus J, Scharf M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics. *Ann Brasil Acad Sci*. 2002; 74(3): 433–6.
3. Parpinello GP, Chinnici F, Versari A, Riponi C. Preliminary study on glucose oxidase-catalase enzyme system to control the browning of apple and pear purees. *Food Sci Technol*. 2002; 35(3): 239–43.

4. Akyilmaz E, Dinckaya E. Development of a catalase based biosensor for alcohol determination in beer samples. *Talanta*. 2003; 61(2): 113-8.
5. Максименко А.В. Модифицированные препараты супероксиддисмутазы и каталазы для защиты сердечно-сосудистой системы и легких. *Усп. совр. биол.* 1993; 113(3): 351-65.
6. Диел К., Коляденко Е.В., Кравченко А.В. Витилиго: современное состояние проблемы. Новые этиологически обоснованные подходы к терапии. *Укр. ж. дерматол., венерол., косметол.* 2005; 3: 25-32.
7. Мороз И.В., Михайлова Р.В., Павловская Ж.И., Лобанок А.Г. Получение и морфолого-биохимическая характеристика продуцента каталазы – *Penicillium piceum* F-648 АЗ. В сб.: Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Минск: Белорусская наука. 2011; 3: 63-76.
8. Мороз И.В., Михайлова Р.В., Павловская Ж.И., Лобанок А.Г. Влияние компонентов питательной среды и условий культивирования *Penicillium piceum* F-648 АЗ на образование каталазы. Межд. конф. «Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биотехнологический потенциал ICOMID 2008». Пермь – Н. Новгород. Пермь 2008: 73-4.
9. Мороз И.В., Еремин А.Н., Михайлова Р.В., Лобанок А.Г. Сравнительная характеристика каталаз, синтезируемых *Penicillium piceum* F-648 АЗ в различных условиях культивирования. Докл. НАН Беларуси. 2009; 53(4): 77-81.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-54

## РАЗНООБРАЗИЕ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

*Мурадов П.З., Бунятова Л.Н., Гасанова В.Я., Гасанова А.Р.  
Институт микробиологии НАНАз, Баку, Азербайджан*

Продуцируемые микробными клетками различные ферменты находят широкое применение в биотехнологии [1]. Успешное развитие молекулярной биологии, геной инженерии в прикладных направлениях позитивно влияет на этот процесс. Однако, несмотря на это, потенциал природных штаммов микроорганизмов, в том числе грибов, до конца не раскрыт.

**Цель работы** – выделение и создание коллекции грибов, способных продуцировать биологически активные вещества с широким диапазоном действия.

Для получения штаммов-продуцентов с целевыми свойствами основное внимание уделялось грибам, из особо охраняемых территорий, т. е. тем местам, где антропогенные воздействия минимизированы. Так как антропогенное воздействие является одним из факторов, способствующих обеднению видового разнообразия живых существ, в том числе грибов [2].

В результате анализа образцов взятых из почв, воды и древесных материалов различных территорий (Гирканский и Ширванский заповедники) создана базовая коллекция, насчитывающая около 150 штаммов грибов. Выделенные штаммы, согласно классификации Международной Микологической Ассоциации, относились к 3 отделам (*Zygomycota*, *Ascomycota* и *Bazidiomycota*), 5 классам (*Mucoromycotina*, *Eurotiomycetes*, *Sordariomycetes*, *Dothideomycetes* и *Agaricomycetes*), 9 порядкам (*Mucorales*, *Eurotiales*, *Hypocreales*, *Capnodiales*, *Pleosporales*, *Polyporales*, *Hymenochaetales*, *Agaricales* и *Russulales*), 16 семействам (*Mucoraceae*, *Trichosomaceae*, *Nectriaceae*, *Hypocreaceae*, *Davidiellaceae*, *Pleosporaceae*, *Polyporaceae*, *Meruliaceae*, *Fomitopsidaceae*, *Ga-nodermataceae*, *Hymenochaetaceae*, *Pleurotaceae*, *Schizophyllaceae*, *Physalacriaceae* и *Stereaceae*), 23 родам: *Mucor* (2 вида/4 штамма), *Aspergillus* (5/10), *Penicillium* (6/12), *Fusarium* (2/5), *Trichoderma* (4/10), *Gliocladium* (1/2), *Cladosporium* (3/5), *Ascochyta* (2/4), *Alternaria* (2/5), *Fomes* (1/2),

*Fomitopsis* (3/7), *Panus* (1/2), *Polyporus* (2/3), *Cerrena* (1/2), *Lentinus* (1/1), *Trametes* (4/15), *Lenzites*(1/2), *Pycnoporus* (1/1), *Hirschioporus* (1/2), *Pseudotrametes* (1/2), *Bjerkandera*(1/5), *Heteroporus* (1/2), *Laetiporus* (1/3), *Ganoderma* (2/10), *Phellinus* (4/8), *Inonotus* (3/7), *Pleurotus* (2/7), *Schizophyllum* (1/7), *Armillaria* (1/2), *Flammulina* (1/1), *Stereum*(1/2)].

Выделенные штаммы исследованы на наличие ферментов гидролитического (целлюлаза, ксиланаза, амилаза, пектиназа и протеаза) и окислительно-восстановительного (лакказа, пероксидаза и лигниназа) типов действия.

Выбор для скрининга вышеназванных ферментов обусловлен, еще и тем, что именно они катализируют деградацию сложных полимеров, входящих в состав растительных, особенно древесных материалов. Хотя всего 10% этих материалов используются для нужд населения, в процессе жизнедеятельности образуются отходы, количество которых уже достигает миллиардов тонн. Они в основном выбрасываются в окружающую среду и являются одним из важнейших источников загрязнения среды.

Поэтому рациональная утилизация этих материалов уже на протяжении нескольких десятков лет является актуальной задачей, хотя и широкого внедрения в практику ферментативной утилизации пока не видно. Это связано с разными причинами, одним из которых является недостаток штаммов-продуцентов, обладающих высоким биологическим потенциалом.

В результате скрининга всех выделенных штаммов на наличие гидролитических ферментов установлено, что все они обладают активностями гидролаз и при этом отличаются только по уровню активности. Некоторые штаммы проявляли высокую неспецифическую гидролазную активность, а некоторые – активностью конкретного фермента. Поэтому как результат скрининга мы отобрали либо тот штамм, ко-



торый обладает высокой активностью определенного фермента (*Aspergillus niger* M-7 – как активный продуцент пектиназы, *Trametes versicolor* B-5 – амилазы, *Trichoderma lignorum* G-3 – целлюлазы, *Schizophyllum commune* I-15 – ксиланазы), либо те грибы (*Bjerkandera adusta* P-40, *Cerrena unicolor* M-3, *Pleurotus ostreatus* F-118 и *Polyporus agariceus* F-18), которые проявляли неспецифическую гидролазную активность, т.е. обладали сбалансированной гидролитической системой, необходимой для деградации таких полимеров, как целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин, крахмал и др., входящих в состав растительных материалов.

При выборе активных продуцентов окислительно-восстановительных ферментов использовали только те грибы, которые в природных условиях вызывают белую гниль и в отличие от микромицетов и макромицетов (вызывающие в природных условиях бурую гниль), способны разлагать лигниновый компонент растительных субстратов [3]. Результаты показали, что хотя все отобранные штаммы грибов в той или иной степени проявляли окислительную активность, но штаммы *Cerrena unicolor* M-3, *Pleurotus ostreatus* F-118, *T. hirsuta* D-5 и *T. versicolor* D-13 оказались более перспективными продуцентами окислительно-восстановительных ферментов.

В результате обеих скринингов в качестве активных продуцентов выбраны грибы, которые представляют и интерес как продуценты конкретного фермента (*A. niger* M-7, *T. hirsuta* D-5, *T. versicolor* B-17, *T. versicolor* D-13, *T. lignorum* G-3 и *Sch. commune* I-15) или ферментных систем (*B. adusta* P-40, *C. unicolor* M-3, *P. ostreatus* F-118 и *P. agariceus* F-18).

В дальнейшем были подобраны условия, позволяющие штаммам-продуцентам максимально проявлять свою ферментативную активность. Подобрана среда, позволяющая отобранным грибам проявлять максимальную ферментативную активность как в условиях ЖФФ (жидкофазной ферментации), так и ТФФ (твердофазной ферментации). Преимущество отобранных сред заключалось в том, что основным источником углерода в них явились отходы аграрного сектора.

Надо отметить, что при подборе оптимальных условий (выбор оптимального источника углерода и азота, температура выращивания, исходное значение pH, способ приготовления и возраст посевного материала, продолжительность культивирования) для синтеза ферментов выяснилось, что ксилотрофные макромицеты проявляют определенную специфичность в отличие от микромицетов.

Специфичность ксилотрофных макромицетов заключалась в том, что, во первых, у этих грибов целлюлазы, ксиланазы, амилазы и пектиназы синтезируются индуцибельно и базальный уровень этих ферментов, в отличие от классических индуцибельных ферментов [4], является довольно заметным. Во вторых, количество секретируемых наружу целлюлолитических и амилотических ферментов изменяется в зависимости от степени полимеризации (СП) растительных субстратов, т.е. по мере увеличения СП растительных субстратов, количество ферментов, секретируемых в среду, увеличивается. На наш взгляд, эти обе особенности являются признаком адаптации к обитанию на сложных субстратах, приобретенных в результате эволюции.

Таким образом, создана коллекция грибов, среди которых есть активные продуценты различных ферментов или ферментных систем.

#### Список литературы

1. Брагинцева Л.М. Грибы источник биологически активных веществ. Усп. мед. микол. 2001; 1: 242-5.
2. Мурадов П.З., Гахраманова Ф.Х. и др. Мониторинг видового состава ксилотрофных макромицетов, распространенных в лесах Азербайджана. Мат. межд. конференции «Экология биосистем: проблемы изучения индикации и прогнозирования». Астрахань: Изд. дом «Астраханский университет». 2009: 252-5.
3. Мурадов П.З. Основы биоконверсии растительных субстратов. Баку: Из-во «Элм». 2003: 114 с.
4. Фогарти В.М. Микробные ферменты и биотехнология. М.: Агропромиздат. 1986: 318с.

## АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СТАТИН-СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА ИЗ *ASPERGILLUS TERREUS*

Насметова С.М., Расулова Г.А., Каримова Ф.А., Гулямова Т.Т.  
Институт микробиологии АНРУз, Ташкент. Узбекистан

Статины, ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент-А-редуктазы, относятся к классу наиболее сильных лекарств, снижающих уровень холестерина в крови. В клинике они используются для первичного и вторичного предотвращения коронарных сердечных заболеваний. Однако за последние годы помимо их способности снижения липидов, обнаружен целый ряд других защитных эффектов для сердечно-сосудистой системы. Исследования лечения статинами показали, что их использование может быть гораздо более широким, поскольку они обладают плеiotропностью действия, включающей

улучшение функции эндотелия, стабильность атеросклеротических бляшек, снижение окислительного стресса и ингибирование тромбогенеза. Особый интерес представляет обнаружение их антимикробной и противовирусной активности, поскольку эти свойства статинов могут расширить спектр их применения как для васкулярных, так и других критических воспалительных явлений.

В этой связи изучение антибиотического потенциала природных соединений с гиполипидемическими свойствами является перспективным направлением в медицинской биотехнологии

Ранее нами из биомассы местного штамма-продуцента *Aspergillus terreus* 20 был получен статин-содержащий экстракт, в условиях *in vivo* снижающий уровень холестерина на уровне коммерческого препарата ловастатина.

**Цель работы** – исследование антибактериальной и антифунгальной активностей статин-содержащего препарата *A. terreus* 20. Определение антибиотической активности препарата проводили методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-культур *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. Показано, что рост всех тест-культур подавляется в присутствии статинов,

но чувствительность грамотрицательных культур *P. aeruginosa* и *E. coli* существенно выше, чем грамположительных *S. aureus* и *C. albicans*.

Так, ингибирование роста *P. aeruginosa* и *E. coli* наблюдается уже при концентрации препарата 20 мкг/мл, в то время как видимая зона подавления роста *S. aureus* и *C. albicans* отмечается при концентрации 80 и 60 мкг/мл соответственно.

Данные позволяют предполагать, что полученный нами статин-содержащий препарат из местного штамма *A. terreus* 20 является перспективным для разработки терапевтических средств гипохолестеринемического и антибактериального назначения.

## ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО (*HELICHRYSUM ARENARIUM*) НА РОСТ ШТАММОВ *Mycobacterium* *TUBERCULOSIS* МЛУ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

Наволокин Н.А.<sup>1</sup>, Скворцова В.В.<sup>1</sup>, Полуконова Н.В.<sup>1</sup>, Манаенкова Е.В.<sup>2</sup>, Панкратова Л.Э.<sup>1</sup>,

Курчатова М.А.<sup>1</sup>, Маслякова Г.Н.<sup>1</sup>, Бучарская А.Б.<sup>2</sup>, Дурнова Н.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского. Саратов

<sup>2</sup>Тамбовский областной клинический противотуберкулезный диспансер. Тамбов

**Введение.** Борьба с туберкулезом является одним из наиболее приоритетных направлений современной медицины [1]. Значимость этой проблемы возросла в последние десятилетия, когда после периода длительного благополучия, связанного с открытием и широким использованием противотуберкулезных препаратов, вновь стал отмечаться рост заболеваемости туберкулезом во всех странах мира [2].

В основном, встречались пациенты с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза и особенно с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) к 2 основным препаратам: изониазиду и рифампицину [3]. Все это обуславливает необходимость поиска новых антимикробных средств с противотуберкулезным действием, нетоксичных и не обладающих выраженным мутагенным эффектом [4]. Одним из источников таких средств стали экстракты из лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Перспективной группой противомикробного действия являются биофлавоноиды, представляющие собой растительные фенольные соединения [5, 6].

Для проведения данного исследования нами выбрано богатые биофлавоноидами цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench). Официальные лекарственные препараты из цветков бессмертника обладают желчегонным, гепатопротекторным и антимикробным действием [4, 7].

В отношении *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) ранее исследовалась активность смеси отдельно полученных извлечений из сырья *H. arenarium* – водного извлечения и спиртового экстракта (патент РФ № 2362577, 2007 г.).

**Цель исследования** – изучение динамики роста музейного штамма *M. tuberculosis* под действием водного раствора сухого спиртового экстракта бессмертника песчаного и исследовать активность

разных его концентраций в отношении музейного и резистентных клинических штаммов, отличающихся нуклеотидными заменами.

**Материалы и методы.** Работа проведена базе бактериологической лаборатории ГБУЗ «Тамбовский областной клинический противотуберкулезный диспансер». Использован водный раствор сухого спиртового экстракта цветков бессмертника песчаного *H. arenarium*, приготовленного определенным способом [8–11]. Для экстракции использованы цветки, собранные нами на территории Саратовской области; содержание флавоноидов в которых, рассчитанных по методике В.П. Георгиевского [12], в среднем в пересчете на нарингенин составляло 5,05±0,51% [13].

Штаммы микобактерий туберкулеза (МБТ) с различной степенью лекарственной устойчивости были получены при посеве респираторного материала (мокрота) от больных, проходящих лечение в диспансер, с использованием стандартной методики оценки лекарственной устойчивости микобактерий на плотной яичной питательной, не содержащей крахмала (HiMedia, Индия) среде Левенштейна–Йенсена методом абсолютных концентраций [14].

Анализ проводили на шести штаммах: музейном – H37Rv, не имеющем антибактериальной резистентности, а также штаммах, имеющих резистентность, для которых нами была предварительно установлена бактериологическим исследованием степень устойчивости к противотуберкулезным препаратам первого ряда. Культуру МБТ расценивали как устойчивую к экстракту только при наличии роста 20 колоний и более, и как чувствительную – при росте не более 20 колоний.

Молекулярно-генетическое исследование анализируемых штаммов с МЛУ проводили с помощью метода гибридизации на биочипах «ТБ-БИОЧИП»

(ООО «Биочип-ИМБ», Россия). При исследовании активной бактериостатической/бактерицидной концентрации было заложено 8 линий культур: первая линия представляла собой положительный контроль (ряд из четырех пробирок с каждым штаммом без воздействия), вторая линия – ряд из четырех пробирок без засева штаммами для исключения случайного роста МБТ (отрицательный контроль).

Шесть линий (культуры с одним музейным и пятью клиническими штаммами) были экспериментальными и содержали по 6 пробирок с разными разведениями экстракта.

Установление минимальной подавляющей концентрации (МПК) для экстракта бессмертника проводили по методу серийных разведений на среде Левенштейна–Йенсена [14]. Водный раствор сухого спиртового экстракта добавляли к среде во время ее приготовления при 20–25 °С, равномерно распределяя его. МБТ засекали стандартного титра (содержание клеток, соответствующее  $1 \times 10^7$  микробных тел/мл. Контроль

роста колоний возбудителя туберкулеза проводили в течение 28 сут [14]. При исследовании динамики роста музейного штамма концентрация экстракта бессмертника составляла 7 мг/мл. Наблюдения также проводили в течение 28 сут, но засекали на питательную среду 2 титра МБТ с содержанием клеток, соответствующее  $50 \times 10^7$  и  $500 \times 10^7$  микробных тел в 1 мл.

**Результаты и обсуждение.** При изучении динамики роста музейного штамма *M. tuberculosis* под действием экстракта бессмертника в обеих повторностях наблюдали более позднее появление колоний МБТ на среде с добавлением экстракта на 17-е сутки после посева, в то время как в контрольных группах рост колоний отмечали с 7 и 10 сут (табл. 1). В первой серии бактерицидный эффект экстракта продолжался до 20-х сут наблюдения, и то рост был отмечен лишь при титре МБТ  $500 \times 10^7$ . При титре МБТ  $50 \times 10^7$  колонии появлялись только на 23-и сут наблюдения, при этом рост колоний на среде с экстрактом был выражен меньше, чем в контроле (+ и +++ соответственно).

Таблица 1. Динамика роста музейного штамма *M. tuberculosis* под действием экстракта бессмертника.

Повторность	Сутки наблюдения	7		10		17		с 23 по 28	
		Титр микробных тел		Титр микробных тел		Титр микробных тел		Титр микробных тел	
		$50 \times 10^7$	$500 \times 10^7$	$50 \times 10^7$	$500 \times 10^7$	$50 \times 10^7$	$500 \times 10^7$	$50 \times 10^7$	$500 \times 10^7$
1	Контроль	-	-	+	++	++	+++	+++	+++
	Экстракт	-	-	-	-	-	-	+	+
2	Контроль	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	Экстракт	-	-	-	-	++	++	++	++

*Примечание:* КОЕ-колонию образующая единица; (+) – 1–20 КОЕ – скудный рост МБТ; (++) – 21–100 КОЕ – умеренный рост МБТ; (+++) – более 100 КОЕ – обильный рост МБТ.

Таблица 2. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *M. tuberculosis* с МЛУ.

№ тестируемой культуры	Устойчивость к рифампицину			Устойчивость к изониазиду		
	Ген	Кодон	Аминокислотная замена	Ген	Кодон	Аминокислотная замена
2	rpoB	531	Ser→Leu	katG inhA	315 15	Ser→Thr(1)
3	rpoB	531	Ser→Leu	katG	315	Ser→Thr(1)
6	rpoB	531	Ser→Leu	katG	315	Ser→Thr(1)

Исследование активности разных концентраций экстракта бессмертника в отношении музейного и резистентных клинических штаммов *M. tuberculosis*, отличающихся нуклеотидными заменами.

Так как музейный штамм, согласно стандартам, чувствителен ко всем противотуберкулезным химиопрепаратам, он был рассмотрен нами в качестве группы сравнения. Клинические штаммы №2, №3 и №6 оказались резистентными к препаратам 1-го ряда

противотуберкулезных препаратов (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу), поэтому они обозначены как МЛУ; 4-й и 5-й клинические штаммы оказались чувствительными к основным химиопрепаратам.

Установлено, что экстракт бессмертника в отношении музейного штамма обладает бактериостатической активностью в концентрации раствора в среде 25 мг/мл; а бактерицидным – 50 мг/мл и выше (табл. 1).

В отношении штаммов *M. tuberculosis* с МЛУ – экстракты №2, №3 и №6 обладает бактериостатической активностью в концентрации раствора в среде 50 мг/мл, а бактерицидной – при 100 мг/мл и выше (табл. 1). В отношении штамма №4, чувствительного к основным химиопрепаратам, концентрации экстракта с бактериостатическим действием нами не выявлено; в отношении штамма 5 – концентрация экстракта с бактериостатическим действием равна 25 мг/мл. Концентрации экстракта бактерицидного действия для обоих штаммов – 50 мг/мл и выше (табл. 1).

В результате экстракт бессмертника оказался эффективен против штаммов, характеризующихся следующими аминокислотными заменами: Ser→Leu, определяющей изменения в структуре β-субъединицы РНК-полимеразы МБТ, и Ser→Thr, инактивирующей фермент каталазу–пероксидазу микобактерий.

**Выводы.** Доказана противотуберкулезная бактериостатическая и бактерицидная активность экстракта бессмертника песчаного, исследуемая *in vitro*. При этом механизм действия явно отличается от препаратов 1-го ряда, так как штаммы устойчивые к ним, чувствительны к экстракту бессмертника. Данный экстракт может быть рекомендован и рассмотрен для проведения доклинических и клинических исследований лечения туберкулеза, поиску новых механизмов воздействия на *M. tuberculosis*, а также может стать перспективным препаратом для лечения туберкулеза с МЛУ как самостоятельное лекарственное средство или в составе комплексной терапии с другими противотуберкулезными препаратами.

#### Список литературы

1. Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 г. N 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
2. Vuyiswa G.S. Phytochemical studies of *Helichrysum patulum*. Dept of Chemistry; Univ of the Western Cape. 2006: 62 p.

3. Туберкулез – национальное руководство. Под ред. М.И. Перельмана. М.: ГЭОТАР. 2007: 752 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие по фармакотерапии для врачей: [В 2-х т.]; 11-е изд., стер.; М.; ч.1.: 621 с.
5. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для фармацевтических вузов (факультетов); 2 – е изд., перераб. и доп. Самара. 2007: 1239 с.
6. Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Райкова С.В. и др. Противовоспалительная, жаропонижающая и антимикробная активность флавоноид-содержащего экстракт аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). Эксперим. клин. фармакол. 2015; 78(1): 34-8
7. Мелкумян И.С. Бактерицидные свойства растений из флоры Армении. Изв. Акад. наук Арм. ССР. Сер. биол. 1958; 11(1): 27-35.
8. Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н. и др. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.). Хим. раст. сырья. 2013; 4: 165-73.
9. Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Дурнова Н.А. и др. Патент РФ №2482863 (2013).
10. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н. и др. Противоопухольевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды. Рос биотерап. журн. 2013; 12(2): 59-59а.
11. Скворцова В.В., Наволокин Н.А. Патоморфоз саркомы S45 при внутримышечном введении флавоноидсодержащего экстракта лабораторным крысам. Бюлл. мед. интернет-конф. 2013; 3(2): 258-8.
12. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений, Новосибирск: Наука. 1990: 333 с.
13. Машурчак Н.В., Кашин А.С., Игнатов В.В. Зависимость состава флавоноидного комплекса *Helichrysum arenarium* (L.) Moench от условий произрастания в Саратовской области. Поволжский экол. журн. 2009; 1: 54-61.

## ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА УГЛЕРОДНОГО СУБСТРАТА НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ *FUSARIUM SAMBUCINUM* ШТ. D-104 – ПРОДУЦЕНТОМ МИКОПРОТЕИНА

Неманова Е.О., Горшина Е.С., Русинова Т.В., Бирюков В.В.  
НТЦ «Промышленная биотехнология»

(Московский государственный машиностроительный университет), Москва

Одним из биотехнологических продуктов продуктов является микопротеин (пищевая белковая биомасса мицелиальных грибов, получаемая методом жидкофазного глубинного культивирования) на основе нетоксичного и непатогенного штамма *Fusarium sambucinum* шт. D-104 (ВКПМ F-1161) (патент РФ №2511427).

Штамм *F. sambucinum* D-104 является близкородственным штамму *F. sambucinum* var. *ossicolum* ВСБ-917. Совокупность функциональных свойств пищевой грибной биомассы на основе *F. sambucinum* ВСБ-917 (способствует восстановлению нормальной

микрофлоры при дисбактериозах, улучшает состояние при пищевых аллергиях, нормализует липидный обмен в организме и др.) и отсутствие токсичности, канцерогенного, аллергенного и других негативных воздействий на организм человека способствовали получению в 1988 г. разрешения Минздрава России на использование микопротеина на основе *F. sambucinum* ВСБ-917 в качестве БАД.

Штамм *F. sambucinum* D-104 отличается высокой скоростью роста на крахмалосодержащих средах, высоким содержанием белка (истинный белок от 40 до 51% АСМ) и повышенным количеством ценных нена-

сыщенных жирных кислот (83–87% по сумме жирных кислот), а также пониженным содержанием нуклеиновых кислот. Сочетание благоприятного химического состава и высокой скорости роста *F. sambucinum* шт. D-104 делает разработку технологии получения микопротеина на его основе перспективной задачей.

Важным этапом разработки технологии является определение состава питательной среды, обеспечивающей требуемый состав конечного продукта, в частности, выбор основного углеродного субстрата. Предыдущими исследованиями показано, что наиболее эффективными источниками углеродного питания для *F. sambucinum* шт. D-104 – продуцента пищевой биомассы, обеспечивающими максимальное накопление биомассы с высоким содержанием белка в условиях жидкофазного глубинного культивирования, являются глюкоза и мальтоза.

На основании полученных данных подобрано содержащее их возобновляемое промышленное сырье – крахмал. Возможность штамма утилизировать крахмал обусловлена, очевидно, способностью продуцента вырабатывать комплекс амилалитических ферментов, позволяющих гидролизовать сложный углевод до простых сахаров. С целью увеличения продуктивности штамма на крахмалсодержащих средах наиболее интересным являлось рассмотрение возможности применения предварительного ферментативного гидролиза крахмала.

Влияние степени предварительного ферментативного гидролиза углеродного субстрата на накопление биомассы и синтез белковых веществ в глубинных условиях изучали в конических колбах объемом 250 мл с объемом среды 100 мл следующего состава (г·л<sup>-1</sup>): углеродный субстрат – 3% (РВ); NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 2,8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; кукурузный экстракт – 10; pH 5,6 – 5,8.

В качестве углеродного субстрата в опыте сравнивали: крахмал, декстрины, декстрины + моносахара, моносахара. Декстрины получали путем предвари-

тельного гидролиза крахмала ферментным препаратом Termamyl SC DS (Novozymes) в концентрации 0,002 мл/л. Моносахара получали путем двухступенчатого гидролиза крахмала: 1-я ступень – гидролиз препаратом Termamyl SC DS (Novozymes) в концентрации 0,004 мл/л; 2-я ступень – гидролиз полученной смеси препаратом Saczyme (Novozymes) в концентрации 0,006 мл/л. Количество посевного материала составляло 10% (об/об). Культивирование проводили при температуре 28 °С на круговой качалке (170 об·мин<sup>-1</sup>).

Влияние степени предварительного гидролиза углеродного субстрата на рост штамма-продуцента оценивали по накоплению биомассы и содержанию в биомассе сырого протеина на 24 и 48 ч эксперимента.

Накопление биомассы определяли весовым способом в пересчете на абсолютно сухую массу (АСМ). Массовую долю сырого протеина в биомассе определяли методом Кьельдаля по ГОСТ 28178-89. Пробы фиксировали 70%-ным этиловым спиртом и подвергали микроскопическому контролю с помощью микроскопа Olympus BX 41 с объективами ×10, ×20, ×40, ×100 и фотографировали цифровой камерой.

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее эффективно синтез биомассы *F. sambucinum* шт. D-104 идет в присутствии крахмала (накопление биомассы 17,6 г·л<sup>-1</sup> АСМ) и декстринов (накопление биомассы 15,7 г·л<sup>-1</sup> АСМ). Менее перспективными углеродными субстратами оказались моносахара и смесь моносахаров и декстринов. Накопление биомассы на данных субстратах составило 13,2 и 11,6 г·л<sup>-1</sup> АСМ соответственно (рис. 1).

Показано, что характер синтеза белковых веществ на данных субстратах существенно отличался от накопления биомассы штаммом-продуцентом. Выявлено, что наиболее эффективно синтез белковых веществ идет в присутствии декстринов, моносахаров и смеси моносахаров и декстринов. Содержание сырого белка на данных субстратах составило 50,0–53,0% на АСМ.

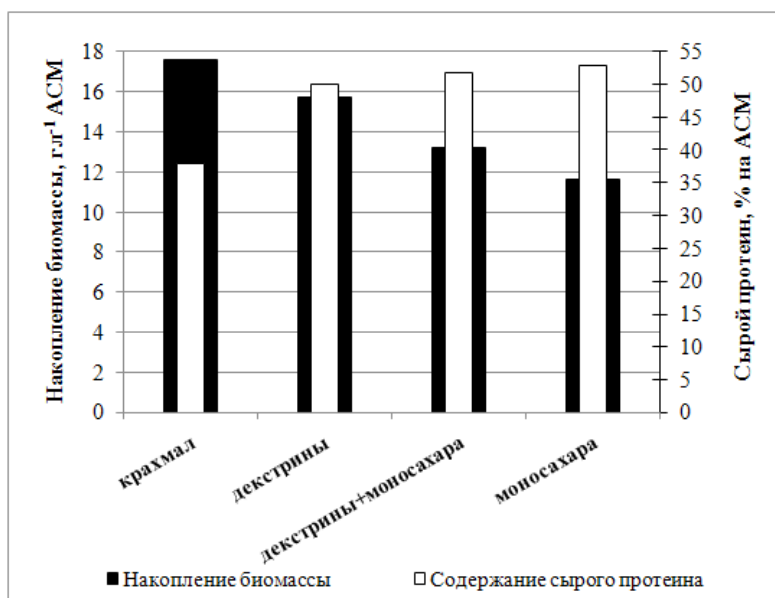


Рисунок 1. Влияние степени предварительного гидролиза крахмала (3% по РВ) на накопление биомассы (г·л<sup>-1</sup> АСМ) и содержание сырого белка (% на АСМ) в биомассе штамма-продуцента на 48 ч роста культуры

Значительно меньшее содержание сырого белка выявлено на среде с крахмалом 38,0% на АСМ.

Анализ морфолого-цитологического состояния культуры продуцента показал, что на всех изученных субстратах гриб растет отдельными гифами и скоплениями. Выявлено, что в присутствии моносахаров и смеси моносахаров и декстринов многие гифы имеют вздутия и перетяжки, в них присутствует большое количество крупных вакуолей, встречаются блестящие включения, похожие на липидные. На среде с

декстринами культура имеет наиболее предпочтительное морфолого-цитологическое состояние: гифы гриба ровные с гомогенным содержимым, количество крупных вакуолей незначительно.

Таким образом, полученные данные позволили определить наиболее предпочтительную степень предварительного ферментативного гидролиза углеродного субстрата для синтеза высокобелковой биомассы *F. sambucinum* шт. D-104 – гидролиз крахмала до декстринов.

## ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНОГО ЦЕЛЛЮЛАЗНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НОВОГО ГРИБНОГО ШТАММА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* B1-221-61

Немашкалов В.А., Беккаревич А.О., Бубнова Т.В., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н.  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пущино

В настоящее время, наряду с грибами *Trichoderma* и *Aspergillus*, грибы рода *Penicillium* по праву занимают одно из главных мест в списке промышленно важных продуцентов [1], поскольку способны синтезировать ферментные комплексы целлюлаз и гемицеллюлаз (эндоглюканаз, целлобиогидролаз, ксиланаз и  $\beta$ -глюкозидаз) более сбалансированного состава и эффективнее расщеплять целлюлозные субстраты [2, 3]; кроме того, индивидуальные ферменты комплекса *Penicillium* обладают более высокой удельной активностью и операционной стабильностью [4]. Поэтому создание с помощью методов генной инженерии новых высокопродуктивных штаммов, способных секретировать ферментные комплексы с заданными свойствами, а также получение ферментных препаратов на их основе, является весьма актуальной задачей.

**Цель работы** – создание нового высокоактивного ферментного препарата, обогащенного гомологичной эндоглюканазой II (Cel5A), на основе рекомбинантного штамма *P. verruculosum* для использования его в процессах биоконверсии целлюлозосодержащего сырья.

В результате трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (*niaD*-), дефектного по гену нитратредуктазы, экспрессионной векторной плазмидой pEGII-36 был получен ряд трансформантов с повышенной уровнем синтеза целевого белка эндоглюканазы II.

Затем полученные трансформанты культивировали в 1,5-литровых ферментерах (рабочий объем 0,8 л) на ферментационной среде следующего состава, л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 7,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5,0;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,23;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3; микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – 40,0; пшеничные отруби – 10,0; дрожжевой экстракт – 10,0; вода дистиллированная. После 144 ч культивирования в КЖ измеряли активности ферментов и общее содержание внеклеточного белка [5–7]. Результаты измерений представлены на рис. 1. Как видно из рис. 1, все трансформанты обладают повышенным уровнем синтеза целевой эндоглюканазы по сравнению с исходным штаммом *P. verruculosum* B1-537. Среди них штамм *P. verruculosum* B1-221-61 показал максимальную активность по КМЦ (1806 Ед/мл), что в 3 раза выше по сравнению с исходным штаммом.

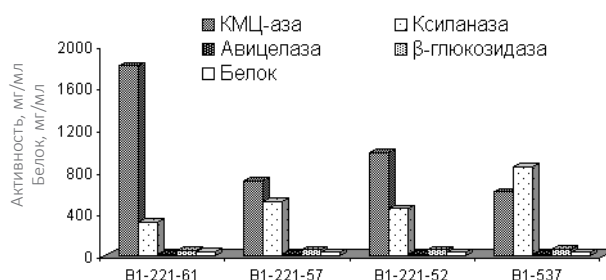


Рис. 1 Активность ферментов и общее содержание белка в КЖ при культивировании в ферментере (fed-batch). Условия: 32 °С, pH 5,0, DO 30%.

Далее, с помощью ультраконцентрации на полых волокнах (с пределом отсечения 15 кДа) и последующей лиофильной сушки был получен ферментный препарат B1-221-61.

Для оценки осахаривающей способности нового ферментного препарата *P. verruculosum* B1-221-61 проводили гидролиз природных субстратов (осины и сосны), предварительно измельченных на шаровой мельнице. В качестве препаратов сравнения были взяты коммерческие ферментные препараты зарубежных производителей: Spesyme CP, Celluclast 1.5 L, Accelerase 1000, а также препарат, полученный на основе исходного штамма *P. verruculosum* B1-537 (табл.1).

Объем реакционной смеси 50 мл, продолжительность гидролиза составляла 48 ч. Пробы отбирали на 3, 24 и 48 ч и измеряли концентрацию восстанавливающих сахаров (ВС) [6, 7]. Результаты измерений представлены на рис. 2. Как видно из полученных данных, при гидролизе измельченной осины новый эндоглюканазный препарат B1-221-61 по осахаривающей способности существенно превосходит как коммерческие аналоги (на 20–35%), так и препарат, полученный на основе исходного штамма (на 15%). При гидролизе измельченной сосны преимущества нового препарата не наблюдается, практически все препараты показали сходные результаты.

На следующем этапе работы совместно с коллегами из группы структурных исследований Института

Таблица 1. Удельные активности ферментных препаратов

Ферментные препараты	Белок, мг-мл	КМЦ-аза	Ксиланаза	$\beta$ -глюкозидаза
<i>P. verruculosum</i> B1-537 (К)	795	13,9	15,1	1,24
<i>P. verruculosum</i> ЭГП-40	780	35,1	6,0	1,10
Spesyme CP	118	27,7	7,5	0,57
Celluclast 1.5 L	184	17,5	2,9	0,15
Accelerase 1000	103	30,7	3,3	2,94

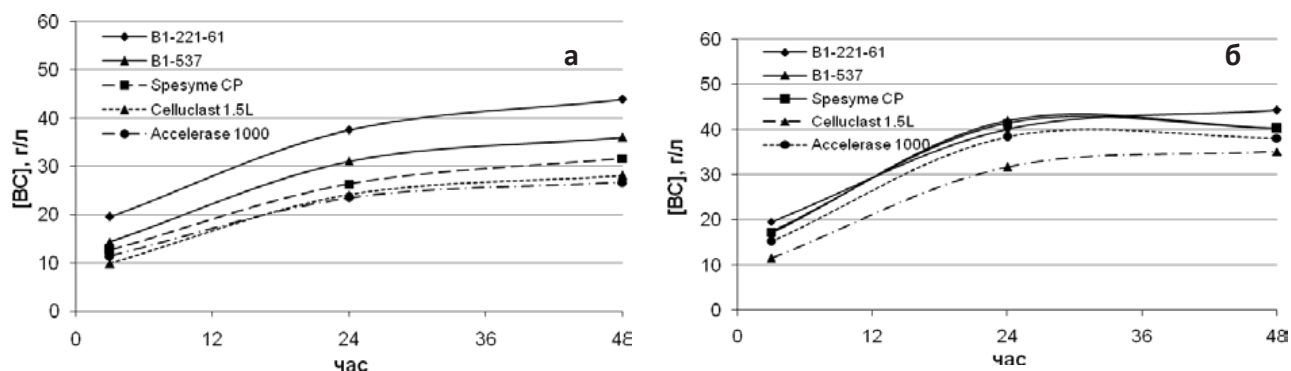


Рис. 2. Выход ВС при гидролизе различными ферментными препаратами осины измельченной (а) и сосны измельченной (б). Условия: [S] = 100 г/л, [E] = 5 мг/г, 50 °С, рН 5,0.

белка РАН (г. Пущино) проведена работа по кристаллизации и определению структуры эндоглюканазы II с целью изучения характера взаимодействия данного белка с сахарами.

В ходе этой работы определен активный центр эндоглюканазы II из *P. verruculosum*. Выявлены ключевые аминокислотные остатки (Trp-288, Phe-25, Phe-104 и Tyr-179), которые участвуют в стекинг-взаимодействиях с остовом субстрата.

#### Выводы:

- С помощью методов генной инженерии получен новый рекомбинантный штамм *P. verruculosum* B1-221-61, у которого уровень синтеза эндоглюканазы II увеличен в 3 раза по сравнению с исходным штаммом;
- Подобраны условия и состав питательной среды для культивирования нового продуцента в 1,5-литровых ферментерах.
- Исследована гидролитическая (осахаривающая) способность сухого препарата B1-221-61 по отношению к измельченным осине и сосне в сравнении с коммерческими целлюлазными препаратами.
- Показано, что ферментный препарат по осахаривающей способности существенно превосходит как коммерческие аналоги (на 20–35%), так и препарат, полученный на основе исходного штамма (на 15%).

- Определена структура белка эндоглюканазы II как в изолированном состоянии (2,1 Å), так и в комплексе с целлобиозой (1,8 Å).

#### Список литературы

1. Сеницын А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М. и соавт. Получение высокоэффективных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз для гидролиза растительного сырья на основе штамма *Penicillium verruculosum*. Биотехнология. 2013; 5: 40-53.
2. Morozova VV, Gusakov AV, Andrianov RM et al. Cellulases of *Penicillium verruculosum*. Biotechnol J. 2010; 5(8): 871-80.
3. Соловьева И.В., Окунев О.Н., Вельков В.В. и др. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* – суперпродуцентов целлюлаз и ксиланаз. Микробиология. 2005; 74(2): 172-8.
4. Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*. Дисс. ... канд. хим. наук. МГУ. 2006:170 с.
5. Сеницын А.П., Черноглазов В. М., Гусаков А.В. Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ. 1990; 25: 30-7.
6. Nelson NJ. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars. J Biol Chem. 1944; 153(2): 375-9.
7. Somogy M. A new reagent for the determination of sugars. J Biol Chem. 1952; 195(1): 19-23.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕИМУЩЕСТВ РАЗНОСТОРОННЕГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПОЧВЕННЫХ ДЕЙТЕРОМИЦЕТОВ РОДА ТРИХОДЕРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МНОГОЦЕЛЕВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Никитина М.Б.

НТЦ «Лекбиотех», Москва

Почвенные дейтеромицеты *Trichoderma* в настоящее время используются в качестве продуцентов промышленного производства гидролитических ферментов [1]. Штаммы, питательные среды и в целом технологические процессы оптимизированы под эту задачу. В то же время грибы этого рода хорошо известны как агенты биологической защиты растений от вредителей и болезней [2, 3].

Кроме того, показано, что грибы, принадлежащие различным видам *Trichoderma*, способны синтезировать большое число биологически активных веществ. Среди них медиаторы процессов проницаемости мембран, противоопухолевые и иные вещества [4, 5], интересные для создания фармацевтических производств – в качестве субстанций, либо их составляющих.

Наконец, биомасса *Trichoderma* – также ценный продукт, который можно использовать в агросекторе в нескольких направлениях [1, 6], причем, все они лежат в русле экологизации и системных подходов, на что необходимо обращать самое пристальное внимание.

В настоящее время актуально создание новых отечественных грибных биотехнологий. Этому, как представляется, может способствовать большой опыт в сфере промышленного культивирования грибных продуцентов, накопленный к настоящему моменту биотехнологическими предприятиями, а также высокая пластичность самого объекта и способность его штаммов к культивированию как в глубинных, так и в поверхностных условиях, которыми, в свою очередь, возможно влиять как на онтогенез гриба в широком смысле, так и на продукцию целевых метаболитов.

Эксперименты показывают, что все изоляты грибов рода *Trichoderma* хорошо откликаются на изменения в питательных средах и условиях культивирования, сохраняя способность к синтезу целевых метаболитов.

Таким образом, существуют возможности для создания универсальных технологических циклов на основе культивирования грибов *Trichoderma* с целью получения нескольких биоактивных продуктов, и усилия специалистов в этом направлении стоит объединять для выработки эффективных решений.

### Список литературы

1. Шулаев Г.М., Бетин А.Н., Плохов А.Ю. Влияние отходов ферментного производства на продуктивность свиней и качество продукции. Свиноводство. 2012; 7: 40-1.
2. Александрова А.В., Великанов Л.Л., Сидорова И.И., Сизова Т.П. Влияние гриба *Trichoderma harzianum* на почвенные микромицеты. Микол. фитопатол. 2000; 34(3): 68-77.
3. Шнейдер Ю.А., Хомик А.С., Кишмахова Л.М. и др. Культивирование сапрофитного гриба триходерма и биосинтез L-лизин-альфа-оксидазы. Вестн. РУДН. 2010; 4: 49-55.
4. Феофилова Е.П. Мицелиальные грибы как источники получения новых лекарственных препаратов с иммуномодулирующей, антираковой и ранозаживляющей активностями. Пробл. микол. фитопатол. в XXI веке. 2013: 278-9.
5. Mule P, Melis P. Methods for remediation of metal-contaminated soils: preliminary results *Trichoderma viride*. Comm Soil Sci Plant Anal. 2000; 31(19/20): 3193-204.

## ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КИТАЙСКОГО ШТАММА *GANODERMA LUCIDUM* НА ЕСТЕСТВЕННОМ СУБСТРАТЕ

Новикова Л.В., Устюжанин И.А.  
НИИСХ Северо-Востока, Киров

*Ganoderma lucidum* (ганодерма блестящая, трутовик лакированный и др.) – дереворазрушающий гриб с однолетними плодовыми телами от желтого до красно-коричневого цвета с блестящей кутикулой. Предпочитает листовые породы деревьев (дуб, клен, вяз, ива, тополь). В природе чаще встречается в субтропическом климате [1]. Также его находят в некоторых областях России, занесен в Красную Книгу РФ [2].

Уже на протяжении двух тысяч лет на Юго-Востоке Азии трутовик лакированный признан как действенное лекарственное средство при многих заболеваниях. Исследования последних десятилетий показали, что гриб обладает иммуностимулирующим, противовирусным, противоопухолевым, гепатопротекторным,

противоаллергенным и другими свойствами, которые обеспечиваются наличием в его химическом составе большого количества различных биологически активных веществ [3].

Учитывая богатый микроэлементный состав и содержание большого количества биологически активных веществ, потенциально данный гриб может использоваться для получения лекарственных препаратов и биопестицидов из плодовых тел, вегетативно-го мицелия и отработанного субстрата. [2]

Цель исследований – изучить технологию культивирования китайского штамма гриба *G. lucidum* (получен из Института биотехнологии провинции Цзилинь, КНР) на естественном субстрате.



Культивирование трутовика лакированного осуществляли в несколько этапов по методике описанной Стейметом. Сначала размножили мицелиальную культуру на питательной среде «сусло-агар». Затем заселили этим мицелием субстрат на основе опила тополя черного (*Populus nigra*). Через 1 мес опил с мицелием перенесли на отрезки тополиных веток (диаметр – 10 см, высота – 15 см) и так культивировали в течение 2 месяцев. Далее конгломераты были пересажены в вегетационные сосуды с почвой. Через 3 недели началось формирование плодовых тел [1].

В результате культивирования мы не смогли получить плодовое тело со спороносным слоем. Молодые плодовые тела вырастали до определенных размеров и останавливались в росте, не образуя гименофор. Некоторые остановившиеся в росте плодовые тела поражались почвенными микромицетами и погибали. Масса не пораженных грибов (в сухом весе) составляла от 1,8 до 16,7 г. Средняя масса плодового тела – 6,9 г. Длина их составила от 7 до 25 см.

По данным Стеймета, для стимуляции формирования гименофора необходимо резкое уменьшение содержания диоксида углерода в воздухе. Также Стеймет указывает и на температурные колебания, необходимые для правильного развития плодовых

тел трутовика. На 1-м этапе (создание мицелиальной культуры) – он предлагает температуру 21–27 °С, для формирования молодых грибов – 18–24 °С, для их развития и формирования гимения – снова 21–27 °С [1]. Уменьшение концентрации диоксида углерода и соблюдение температурной динамики не обеспечило формирование зрелых плодовых тел.

Таким образом, необходимо продолжить отработку технологии культивирования и поиск факторов, препятствующих получению плодовых тел *G. lucidum*. Тем не менее полученные незрелые плодовые тела также могут использоваться как источник биологически активных веществ.

#### Список литературы

1. Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. 1993: 554 p.
2. Переведенцева Л.Г. Микология. Грибы и грибоподобные организмы. Учебник. 2-е изд., испр. и доп. СПб.: Изд-во «Лань», 2012: 272 с.
3. Ли Юй Тулигуэл, Бао Хайин и др. Лекарственные грибы в традиционной китайской медицине и современных биотехнологиях. Под ред. В.А. Сысуева; НИИ сельского хозяйства Северо-Востока. Киров: О-Краткое. 2009: 320 с.

## МИКРОМИЦЕТЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ

Пархоменко Ю.М.<sup>1</sup>, Супрун С.М.<sup>1</sup>, Донченко Г.В.<sup>1</sup>, Степаненко С.П.<sup>1</sup>, Чеховская Л.И.<sup>1</sup>, Харкевич Е.С.<sup>2</sup>, Нечитайло Г.С.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, Киев

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ, Киев

<sup>3</sup>Институт биохимической физики РАН, Москва

Микромицеты широко распространены в природе, являясь составной частью практически любой экосистемы. Обладая высокими адаптационными способностями, эти организмы неприхотливы к условиям обитания, выживают даже в условиях, характеризующихся ограничением питательных веществ, дефицитом влаги, воздействием высокой солнечной радиации [1]. Представители царства микромицетов являются неисчерпаемым источником разнообразных биологически активных соединений, начиная от токсинов и заканчивая витаминами [1–3].

Указанные выше свойства микромицетов делают их необыкновенно привлекательными для использования в биотехнологии получения различных биологически активных соединений, таких как ферменты, органические кислоты, аминокислоты, витамины и др. Именно поэтому учеными различных стран постоянно ведется поиск среди почвенных микромицетов перспективных продуцентов для использования в промышленности [1–4]. Сегодня микроорганизмы, в частности и микромицеты, используются для промышленного производства ферментов, антибиотиков, органических кислот и аминокислот, отдельных витаминов (В-2, В-12). И все же производство большинства витаминов основано на химическом синтезе, хотя

биотехнологии с использованием микробиологического синтеза могут быть более экологичными и более рентабельными. Именно поэтому поиск активных продуцентов витаминов не теряет своей актуальности.

Данная работа является сжатым изложением результатов многолетних исследований, проводившихся украинскими учеными по поиску среди штаммов почвенных микромицетов перспективных продуцентов витаминов и коферментов, частичной селекции наиболее перспективных из них и подбору условий для повышения выхода биологически активных продуктов. Объектом исследования служили микромицеты, выделенные из различных источников, и коллекционные штаммы Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Скрининг штаммов-продуцентов проводили среди различных таксономических групп, принадлежащих к 9 родам: *Actinomyces*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Cladosporium*. При скрининге способности штаммов синтезировать тот или иной витамин микромицеты выращивали на синтетической питательной среде Чапека в колбах Эрленмейера при 220 об/мин и 28 °С. Содержание витаминов определяли известными биохимическими или микробиологическими

методами [5]. Содержание витаминов и некоторых коферментов в динамике культивирования (с интервалом 24 ч) определяли в культуральной жидкости и в мицелии. Максимальное накопление в мицелии большинства витаминов наблюдалось в стационарной фазе роста – на 3-4-е сут. В табл. приведены результаты анализа содержания основных витаминов в 3-дневном мицелии некоторых отобранных штаммов. Следует отметить, что далеко не все витамины, синтезируемые в процессе культивирования гриба, аккумулируются в мицелии, часть их, иногда довольно значительная, как в случае витамина В<sub>1</sub>, высвобождается в культуральную жидкость. Последнее обстоятельство учитывалось нами при разработке технологий получения кормовых добавок на основе культуры грибов [6].

Табл. Содержание отдельных витаминов и коферментов (мкг/г с. в., среднее из 3 ферментаций) в мицелии 3-дневной культуры некоторых отобранных штаммов.

Витамин	Штаммы			
	<i>Fusarium sambucinum</i>		<i>Mycelia sterilia</i> F-100014	<i>Penicillium sclerotiorum</i> F-100015
	F-850	F-100011		
Тиамин (В <sub>1</sub> )	4,5	4,2	9,8	3,5
Никотиновая кислота	350	360	190	172,5
Пантотеновая кислота	500	580	220	250
Биотин	5,3	6,2	1,6	5,3
Цианкобаламин	0,30	0,15	0,25	0,03
α-Токоферол	8,9	27	23	17,5
Каротиноиды	30,5	17,4	16,0	2250
NAD	1500	2100	800	600
Убихинон Q <sub>10</sub>	17,4	11,9	15,0	17,1

С целью повысить синтез отдельных витаминов отобранными штаммами нами была проведена работа по частичной селекции некоторых из них с последующей оптимизацией условий культивирования (состав среды, добавление предшественников, условия аэрации, время ферментации). Таким образом, нам удалось получить достаточно активные продуценты витамина В<sub>1</sub> (тиамина), СоА – кофермента А (активная форма пантотеновой кислоты), витамина РР (никотиновая кислота) и NAD (коферментная форма витамина РР – никотинамидаденин-динуклеотид). Остановимся немного подробнее на этих разработках.

Тиамин. Повышения синтеза тиамин штаммом *F. moniliforme* нам удалось добиться, используя метод провокационной селекции. А именно, культивирование этого штамма мы проводили в среде с добавлением антагониста витамина В<sub>1</sub> – окситиамина. Пересяевая культуру на среду с постепенно возрастающей

концентрацией окситиамина в пределах 1–50 мкМ, мы добились значительного повышения способности гриба синтезировать тиамин. В оптимальных условиях выход витамина В<sub>1</sub> достигал 2 мг на 1л культуры (суммарное содержание в мицелии и в культуральной жидкости). Далее мы попытались повысить выход тиамин отдельными штаммами, добавляя в инкубационную среду в качестве предшественника пиримидиновый компонент тиамин.

Как известно, синтез тиамин в клетках микроорганизмов начинается с синтеза его составляющих компонентов – пиримидинового и тиазолового с дальнейшей их конденсацией, при этом далеко не всегда синтез обоих фрагментов сбалансирован. Для выявления способности отобранных штаммов синтезировать в избыточном количестве тиазоловый компонент тиамин, химический синтез которого является проблематичным, мы вводили в среду культивирования пиримидиновый компонент в количестве 10 мг/л.

Некоторые испытанные штаммы не реагировали на внесение в среду пиримидинового компонента тиамин, в то же время отмечено значительное повышение синтеза тиамин штаммами *Penicillium vitale*, *F. sambucinum*, *F. moniliforme*, *Cladosporium herbarum* (рис.). Результаты этого исследования были использованы нами в дальнейшем при составлении ассоциативной культуры атоксичных штаммов микромицетов для получения грибной биомассы, обогащенной витаминами.

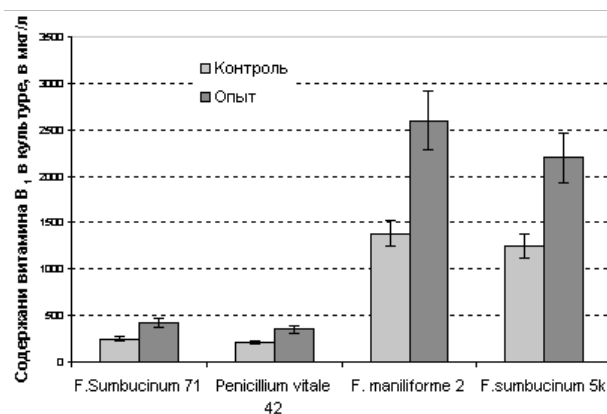


Рис. Содержание витамина В<sub>1</sub> (мкг/л) в культуре некоторых отобранных штаммов, культивируемых без добавления в среду пиримидинового фрагмента тиамин (контроль) и с его добавлением (опыт)

Получение кофермента А (СоА) путем химического синтеза в промышленном масштабе довольно сложно и не эффективно. Альтернативой ему является биотехнологический способ, более рентабельный в промышленных масштабах [7]. Сейчас для получения СоА используют штаммы *Brevibacterium*, тем не менее поиск новых продуцентов сверхсинтетиков пантотеновой кислоты и СоА остается актуальным. Нами был проведен скрининг продуцентов СоА и его предшественников среди коллекционных культур, принадлежащих к различным таксономическим группам. Способность к синтезу СоА была изучена у штаммов, отобранных ранее в качестве активных продуцентов пантотеновой кислоты.

Среди представителей митоспоровых грибов, принадлежащих к роду *Fusarium* и *Penicillium*, отобран и селекционирован активный продуцент – *F. sambucinum* F-199 с повышенным синтезом CoA. Биосинтез CoA повышался при внесении в среду 1% пептона и зернового или дрожжевого экстракта. Первоначальное содержание CoA в мицелии *F. sambucinum* при культивировании его на среде Чапека составляло 120 мкг/г с.в. Мы попытались повысить выход CoA в культуре *F. sambucinum*, подсеяв культуру *Corynebacterium ammoniagenes* с последующим культивированием до 48 ч. Выход CoA значительно увеличивался, его можно еще повысить, если внести в среду инкубации предшественника кофермента.

**Никотиновая кислота и NAD.** Среди штаммов *F. sambucinum* найдены также активные продуценты витамина PP и NAD, например штамм F-100011, дающий в оптимальных условиях максимальный выход NAD 3–5 мг/г с.в. Введение в культуральную среду триптофана или аденозина – одного из предшественников синтеза NAD – повышало выход никотиновой кислоты, а введение самой никотиновой кислоты – выход ее коферментной формы – никотинамидадениндинуклеотида (NAD).

Результаты проведенной нами многолетней работы по поиску среди микромицетов эффективных проду-

центов витаминов являются основой для разработки биотехнологий получения очищенных препаратов отдельных витаминов и коферментов (в дальнейшем) и для получения уже сейчас кормовых и пищевых белково-витаминных добавок.

#### Список литературы

1. Jaouani A, Neifar M, Prigione V et al. Diversity and enzymatic profiling of halotolerant Micromycetes from Sebkhah El Melah, a Saharan salt flat in Southern Tunisia. *BioMed Res Intern* 2014. Article ID 439197. 11 p.
2. Kutateladze LY, Zakariashvili NG, Khokhashvili IA et al. Biomass of *Porotrichum plverulentum* S7 – a food additive rich in protein and biologically active compounds. *Ann Agrar. Sci.* 2014; 12(3): 55-8.
3. Sharma V, Sumbali G. Diversity of cellulose active micromycetes in the Ant-Hill soil environment of park and gardenes of Jammu city (India). *Int J Pharm BioSci (B)*. 2013; 4(2): 541-8.
4. Bučková M, Vizárová G, Šimonovičová A, Chalanyová M. The possibility of soil Micromycetes produced the abscisic acid. *Acta Physiol Plantar.* 2000; 22(2): 179-84.
5. Экспериментальная витаминология. Ред. Ю.М. Островский. Минск: Наука и техника. 1979: 550 с;
6. Копелевич В.М, Гунар В.И. Хим. прир. соед. 1988; 4: 477-92.

## ЛИГНОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *PORODAEDALEA NIEMELAEI* M. FISCHER ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТАХ

Павлов И.Н.<sup>1</sup>, Литовка Ю.А.<sup>2</sup>, Литвинова Е.А.<sup>2</sup>, Рязанова Т.В.<sup>2</sup>, Чупрова Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск

<sup>2</sup>Сибирский государственный технологический университет, Красноярск

Эффективное разложение лигноцеллюлозных материалов базидиальными грибами открывает возможность их использования в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов. Ведущим механизмом биоконверсии является действие сложного мультиферментного комплекса, синтез которого зависит от ростового субстрата, физиолого-биохимических особенностей штамма-продуцента и его генетических особенностей. Ферментативная деградация осуществляется преимущественно с участием оксидоредуктаз и гидролаз, что и предопределяет значимость этих ферментов в процессах биоразрушения трудногидролизующих полимеров и ксенобиотиков [1].

Объектом данного исследования – штамм PnB, выделенный из плодового тела *Porodaedalea niemelaei* M. Fischer, обнаруженного на ветровальном дереве *Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen. в лиственничное редколесье, в нижнем течении р. Хета (Таймыр) (N 710 41,97' E 1000 34,54'). Для насаждения было характерно образование куртин усыхающих деревьев, а также большое количество ветровальных лиственниц с наличием корневой и стволовой гнили. Плодовые тела *P. niemelaei* обнаружены только на поваленных деревьях (в том числе и продолжающих оставаться жизнеспособными за счет неповрежденных корней), часто сплошь охватывая снизу ствол на протяжении 0,3–1 м (иногда до 3 м). Отсутствие больших масс

мёртвой древесины, лежащих длительное время без разложения, свидетельствовало о высокой скорости микробиологических процессов.

Грибы *Porodaedalea* являются не только одними из наиболее важных фитопатогенов, вызывающих стволовую гниль хвойных деревьев, но также играют фундаментальную роль в лесных экосистемах, обеспечивая формирование структуры древостоя, оптимальных сукцессионных серий, а также осуществляя минерализацию древесины, способствуя формированию лесных почв [2–3].

Общую фенолоксидазную активность штамма оценивали на мальт-экстракт агаре с добавлением 0,5% танина. Твердофазное культивирование осуществляли на опилках *Larix sibirica* Ledeb., *Pinus sylvestris* L., *Populus tremula* L., *Betula pendula* Roth и вегетативной части *Helianthus tuberosus* L. при влажности субстратов 70% и температуре 20±2 °C в течение 25 сут.

Биохимические характеристики растительных субстратов до и после биодеструкции изучали стандартными методами химии древесины [4]. Активность полифенолоксидазы определяли фотоколориметрически модифицированным методом Бояркина [5] в системе пирокатехин – п-фенилендиамин.

Проведенные исследования показали, что штамм PnB *P. niemelaei* характеризуется низкими ростовыми показателями на искусственных агаризованных средах

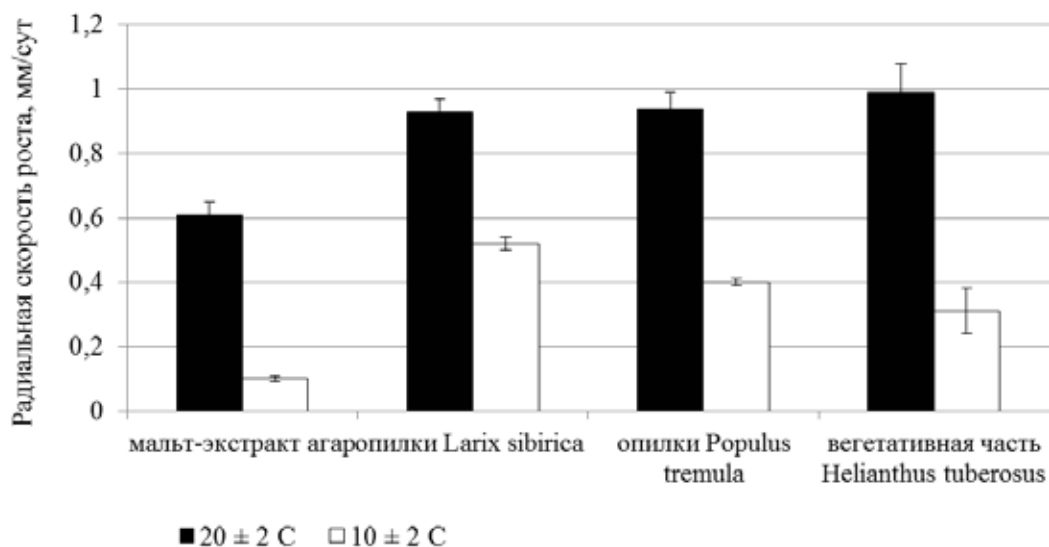


Рисунок 1. Радиальная скорость штамма PnB *P. niemelaei* на различных субстратах

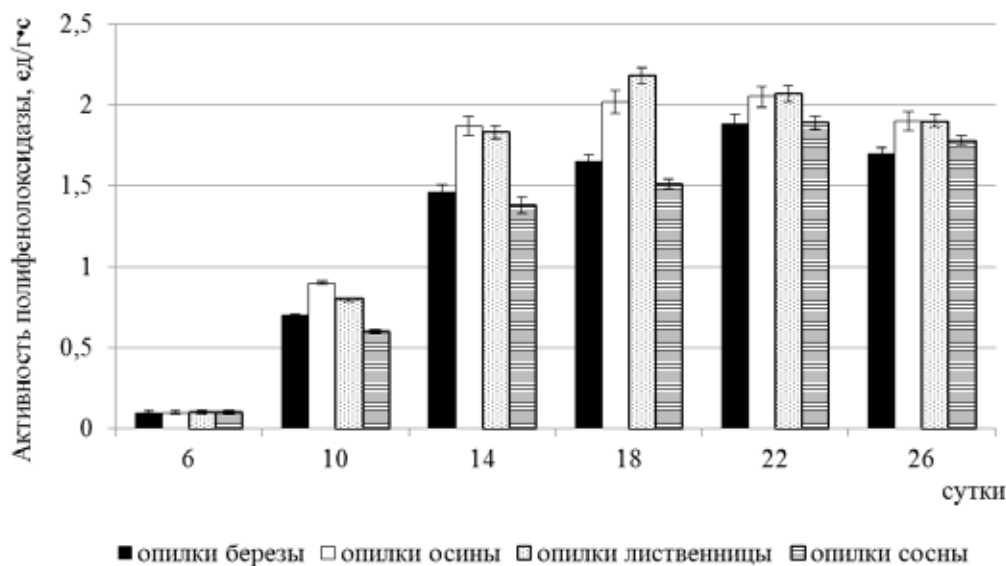


Рисунок 2. Динамика полифенолоксидазной активности штамма PnB *P. niemelaei* на растительных субстратах

– при температуре 20 °C средняя радиальная скорость роста составляет 0,6 мм/сут; при 10 °C – 0,1 мм/сут; при 6 и 28 °C рост останавливается. Колонизация лиственных и хвойных растительных субстратов наиболее активно происходит также при температуре 20 °C и составляет 1,0 мм/сут, что в среднем превышает аналогичный показатель на агаризованной среде в 1,6 раза. При снижении температуры до 10 °C отмечено закономерное снижение ростовых показателей, однако в меньшей степени скорость роста замедляется на опилках *L. sibirica* (рис. 1).

Штамм характеризуется положительной реакцией по Бавендаму на наличие экстрацеллюлярных оксидаз лигнолитического комплекса – на среде с танином образуется пигментированная зона темно-коричневого цвета, диаметр которой значительно превышает размер колонии. Количественное определение полифенолоксидазной активности показало, что существенное увеличение ферментативной активности на

различных растительных субстратах приходится на 14–22 сут культивирования и находится в диапазоне 1,4–2,2 Ед/г·с. Максимальные значения отмечены при культивировании *P. niemelaei* на опилках осины и лиственницы – 2,0 – 2,2 Ед/г·с (рис. 2).

В ходе биодеструкции растительных субстратов максимальные изменения в компонентном составе наблюдаются в древесине осины: количество легкогидролизуемых полисахаридов снижается в 3,2 раза; трудногидролизуемых – в 2,5 раза; лигнина – в 2,1 раза на фоне существенного увеличения содержания водорастворимых веществ и убыли массы субстрата более чем на 50% (табл. 1). При биоконверсии вегетативной части топинамбура воздействию в равной степени подвергаются трудногидролизуемые полисахариды и лигноподобные вещества, содержание которых уменьшается в 1,6 и 1,5 раза соответственно.

В древесине лиственницы под действием штамма *P. niemelaei* отмечено снижение содержания поли-

Таблица 1. Химический состав растительных субстратов до и после воздействия штамма PnB *P. niemelaei*, % а. с. с. с учетом убыли массы

Наименование показателя	Вегетативная часть <i>Helianthus tuberosus</i>		Древесина <i>Larix sibirica</i>		Древесина <i>Populus tremula</i>	
	Биодеструкция					
	до	после	до	после	до	после
Вещества, экстрагируемые горячей водой	25,7	24,7	12,2	17,9	2,8	5,7
Легкогидролизуемые полисахариды	13,9	13,4	24,1	15,6	23,3	7,2
Трудногидролизуемые полисахариды	38,3	23,3	37,2	26,9	45,1	17,8
Сумма полисахаридов	52,2	36,2	61,3	42,5	68,4	25,0
Вещества лигниновой природы	17,9	11,6	24,3	22,3	23,8	11,4
Убыль массы		23,2		15,2		53,8

сахаридов в 1,5 раза при не существенном количественном изменении веществ лигниновой природы. Учитывая наличие полифенолоксидазной активности гриба на этом субстрате, можно предположить, что биоконверсия листовничных опилок в большей степени сопровождается качественными изменениями лигноподобных веществ, в ходе которых образуется конденсированный лигнин с устойчивыми к действию грибных лигниназ дифенильными связями [6].

В целом, штамм PnB *P. niemelaei* проявляет максимальную полифенолоксидазную активность и осуществляет более глубокую деструкцию растительного субстрата при его твердофазном культивировании на опилках *P. tremula*.

#### Список литературы

- Куликова Н.А., Кляйн О. И., Степанова Е.В., Королева О.В. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор). Прикл. биохим. микробиол. 2011; 47(6): 619-64.
- Brazeo NJ, Lindner DL. Unraveling the *Phellinus pini* s.l. complex in North America: a multilocus phylogeny and differentiation analysis of *Porodaedalea*. Forest Pathol. 2013; 43: 132-43.
- Worrall JJ, Lee TD, Harrington TC. Forest dynamics and agents that initiate and expand canopy gaps in *Picea-Abies* forests of Crawford Notch, New Hampshire, USA. J Ecol. 2005; 93:178-90.
- Riazanova TV, Chuprova NA, Isaeva EV. Wood Chemistry. LAP LAMBERT Acad. Publish. 2012: 428 p.
- Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности полифенолоксидазы (модифицированный). Тр. Инст. физиол. раст. АН СССР. 1954; 8(2): 398-403.
- Dalimova GN, Arhmedova ZR. Biodestruction of lignins by the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Chem Nat Comp. 2001; 37(1): 83-5.

## ОБРАЗОВАНИЕ ПРОТЕИНАЗ С КОЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОЙ И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ МИКРОМИЦЕТАМИ *ASPERGILLUS OCHRACEUS*, *ASPERGILLUS TERREUS* И *ASPERGILLUS USTUS* В УСЛОВИЯХ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Попова Е.А., Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Егоров Н.С.  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Препараты протеиназ с коллагенолитическим и фибринолитическим действием широко востребованы на рынке фармацевтической промышленности. В различных формах (порошки, растворы, мази и гели) их используют в составе комплексной терапии ожоговых травм для гидролиза некротических тканей; в косметологии и эстетической медицине – для удаления нежелательных рубцов и шрамов; в терапевтической медицине обсуждается их применение в качестве перспективных средств для лизиса

поверхностных тромбов [1]. В то же время, коллагенолитические ферменты необходимы в кожевенной и пищевой промышленности для обработки шкур и мяса. Такое разнообразие сфер применения рождает интерес к новым, более эффективным способам получения коллагенолитических и фибринолитических протеиназ. В настоящее время в России наибольший объем подобных препаратов получают путем выделения ферментов из панкреаса крабов и с помощью бактериальных продуцентов [2].

Таблица. Общая протеолитическая, коллагенолитическая и фибринолитическая активность внеклеточных протеиназ микромицетов *A. ochraceus* L-1, *A. terreus* 2 и *A. ustus* 1.

Микромицет	Общая протеолитическая активность (мкМ Туг/мл/мин)	Коллагенолитическая активность (мкМ азоколл/мл/мин)	Фибринолитическая активность (мкМ Туг/мл/мин)
<i>A. ochraceus</i> L-1	1015,4	2,5	481,5
<i>A. terreus</i> 2	501,1	2,9	79,9
<i>A. ustus</i> 1	1059,2	6,0	954,2

Такие способы требуют больших затрат на всех этапах производства при одновременно невысоком выходе конечного продукта. Наиболее перспективным путем оптимизации получения коллагенолитических и фибринолитических препаратов на сегодняшний день представляется использование таких групп микроорганизмов, как микромицеты [3].

Условия их культивирования не требуют сложного специализированного оборудования, что в сочетании с высоким выходом продукта позволяет считать использование грибных продуцентов конкурентно-способной альтернативой современным способам получения коллагенолитических и фибринолитических ферментов [3].

Наиболее подходящими условиями для культивирования микромицетов считают твердофазные условия, в которых наличие капельной формы жидкости, равномерно распределенной между частицами сыпучего носителя, воспроизводит естественную среду обитания для большинства микроскопических грибов – почву [4]. Выход конечных метаболитов и ферментов в подобной системе, как правило, существенно выше, чем в классических глубинных условиях культивирования [4].

Изучено образование протеолитических ферментов микромицетами *A. ochraceus* L-1, *A. terreus* 2, *A. ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования на вермикулите с добавлением питательной среды в соотношении вермикулит-среда 1:4,5 по объему [5]. В качестве питательной среды использовали среду следующего состава (в %): крахмал – 0,125; гидролизат рыбной муки – 0,75; пептон – 0,2; NaCl – 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,05;  $\text{MgSO}_4$  – 0,05. Время культивирования варьировалось от 4 до 5 сут. Температура культивирования 28 °С.

Изучаемые активности – общую протеолитическую, коллагенолитическую и фибринолитическую определяли в элюатах культуральной жидкости (45 мл 0,05 М Трис-НСl буфер, pH 8,2) после инкубации с соответствующими субстратами – 1%-ным раствором казеина, 1%-ным раствором бычьего фибрина и 0,25%-ным раствором азоколл, приготовленных на 0,05 М Трис-НСl буфере, pH 8,2.

Максимальные значения активности внеклеточных протеаз у *A. ustus* и *A. terreus* 2 приходились на 4-е сут, а у *A. ochraceus* L-1 – на 5-е. Общая протеолитическая активность *A. ustus* 1 составила 1059,15 мкМ Туг/мл/мин, что на 43,8 мкМ Туг/мл/мин больше, чем у *A. ochraceus* L-1 и в 2 раза больше, чем у *A. terreus* 2. Фибринолитическая активность у *A. ustus* 1 – 954,2 мкМ Туг/мл/мин была также значительно выше, чем у двух других культур. Максимальную коллагенолитическую активность также проявил *A. ustus* 1. Значение коллагенолитической активности *A. ustus* 1 составило 6,0 мкМ азоколл/мл/мин, что более чем в 2 раза превышает значения протеиназ *A. ochraceus* L-1 и *A. terreus* 2.

Таким образом, среди изученных культур *A. ustus* 1 является наиболее перспективным продуцентом протеиназ с коллагенолитической и фибринолитической активностью. Этот микромицет может быть рекомендован для получения протеиназ медицинского назначения.

#### Список литературы

1. Сухосырова Е.А., Никитина З.К., Яковлева М.Б. и др. Характеристика коллагенолитических ферментов, секретируемых дейтеромицетом *Aspergillus flavus*. Бюлл. эксп. биол. и мед. 2003; 135(5): 526-31.
2. Демина Н.С., Лысенко С.В. Коллагенолитические ферменты, синтезируемые микроорганизмами. Микробиология. 1996; 65(3): 293-304.
3. Sun T, Li P, Liu B et al. Solid state fermentation of rice chaff for fibrinolytic enzyme production by *Fusarium oxysporum*. Biotechnol Lett. 1997; 19(5): 465-7.
4. Осмоловский А.А., Баранова Н.А., Крейер В.Г. и др. Твердофазное и поверхностно-мембранное жидкостное культивирование микромицетов, особенности их развития и образования ферментов. Прикл. биохим. микробиол. 2014; 50(3): 245-55.
5. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А. и др. Образование микромицетом *Aspergillus ochraceus* внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови при глубинном и твердофазном культивировании. Прикл. биохим. микробиол. 2013; 49(6): 580-6.

## ВЛИЯНИЕ СВЕТА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ МАКРОМИЦЕТОВ

Поединок Н.Л.<sup>1</sup>, Михайлова О.Б.<sup>2</sup>, Негрейко А.М.<sup>3</sup>, Дудка И.А.<sup>2</sup>, Васильева Б.Ф.<sup>4</sup>, Ефременкова О.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт пищевых биотехнологий и геномики НАНУ, Киев

<sup>2</sup>Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАНУ, Киев

<sup>3</sup>Институт физики НАНУ, Киев

<sup>4</sup>Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва

В настоящее время антибиотики описаны у широкого круга прокариот и эукариот, причем в последнее десятилетие грибы, в том числе высшие, опять стали наиболее многочисленной группой организмов в данной области исследований [1–4].

Для достижения большей продуктивности процессов получения целевого продукта основные усилия исследователей направлены на определение оптимальных параметров культивирования. Исследования факторов, регулирующих антимикробную активность макромицетов, ограничено подбором состава питательных сред. Несмотря на большое количество исследований в этом направлении поиск новых экологически чистых регуляторов роста и биологической активности грибов остается актуальным. Одним из таких природных регуляторов жизнедеятельности этих организмов является свет [5–7].

**Целью работы** – изучение индукции антимикробной активности низкоинтенсивного света разной когерентности и длин волн на антимикробную активность макромицетов, имеющих практическое значение, как продуценты пищевой биомассы и биологически активных субстанций.

Объектами исследования были 4 штамма 4 видов базидиальных грибов из Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины (ИВК): *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer 3923, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. 531, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1908 и *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1552, у которых ранее нами была выявлена антимикробная активность [1,2].

В работе использовали следующие 12 тест-культур из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ): грамположительные бактерии (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *B. pumilis* NCTC 8241, *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Staphylococcus aureus* FDA 209P (MSSA), ИНА 00761 (MRSA, клинический изолят), грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ВКПМ В-7571 (=ATCC 8461), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, грибы (*Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259

Посевной мицелий, выращенный на поверхности агаризованной среды, подвергали световым воздействиям. В качестве контроля использовали культуры, не подвергавшиеся световой обработке.

В качестве источника когерентного видимого света использовали газовые лазеры: He–Ne-лазер с излучением  $\lambda$  632,8 нм и аргоновый лазер, с  $\lambda$  514,5 нм и 488,0 нм. В качестве источников некогерентного света использовали светодиоды ( $\lambda$  490,0 нм – синий, 520,0 нм – зеленый и 634,0 нм – красный). Благодаря

довольно широкой вариации выходной мощности используемых источников света экспозиция выбиралась в соответствии с заданной дозой 230 мДж/см<sup>2</sup> и варьировала от 1 до 30 мин, в зависимости от схемы опыта. Это значение выбрано на основании результатов наших предыдущих исследований [8] и анализе результатов, полученных другими исследователями [9]. Как хорошо известно, фоторецепторная система грибов адаптирована к видимому свету в диапазоне  $\lambda$  350 – 730 нм [5, 9], и этот спектральный ряд хорошо представляют выбранные нами длины волн.

Кратковременное облучение посевного материала низкоинтенсивным светом в красном и синем диапазонах длин волн позволило увеличить антимикробную активность макромицетов практически ко всем перечисленным выше тест-культурам. Зеленый свет либо не вызывал изменения уровня активности, либо подавлял её.

Облучение, как лазерным (когерентным) светом, так и светодиодами (некогерентный), в том же волновом диапазоне, вызывало сокращение периода до появления антимикробной активности у *P. ostreatus* против *B. mycoides*, *B. pumilis*, *L. mesenteroides* и *C. terrigena*. Повышение её уровня более чем на 100% отмечалось в отношении *B. pumilis*, *L. mesenteroides*, *C. terrigena*, MRSA, MSSA, и *E. coli*. Зона подавления роста *B. mycoides* культуральной жидкостью *P. ostreatus* после облучения красным лазерным светом через 14 сут культивирования увеличивалась в 3,8 раза. Облучение синим лазерным светом увеличивало зону подавления роста этой тест-культуры почти в 3 раза. Низкоинтенсивное лазерное излучение вызывало на 10–40% больший стимулирующий эффект по сравнению с излучением светодиодов. После облучения *P. ostreatus* зеленым светом наблюдалось снижение активности культуральной жидкости в отношении *B. mycoides*, MRSA, *M. luteus* и *P. aeruginosa*. Однако облучение в этом диапазоне, как когерентным, так и некогерентным светом, повышало синтез антимикробных компонентов, подавляющих рост *E. coli*. На основании этого можно предположить, что зеленый свет стимулирует синтез узкоспецифических соединений этим штаммом, активных только против *E. coli*.

Облучение посевного мицелия этого *F. velutipes*, синим и красным когерентным светом, стимулирует их синтез антибиотических компонентов и соответственно увеличивает активность в отношении всех вышеуказанных микроорганизмов, включая макромицет *A. niger*, на 60–150%. Стимуляция ингибирующей активности *F. velutipes* некогерентным светом в том же режиме составляла 20–100%. Так же, как и у *P. ostreatus*, у *F. velutipes* появление антимикробной активности отмечалось на неделю раньше, чем в

контроле. Облучение зеленым светом ингибировало активность этого штамма.

Аналогичные изменения антимикробной активности мы наблюдали, после облучения, и у штаммов *G. lucidum* и *G. applanatum*, у которых ранее была выявлена антимикробная активность в отношении метициллинстойкого и метициллин-чувствительного штаммов *S. aureus*, а также *B. subtilis* ATCC 6633 [2]. Однако, в отличие от ранее рассмотренных видов, эти штаммы проявляли активность в довольно узком промежутке времени. Кратковременные низкоинтенсивные световые воздействия, опять же в синем и красном диапазоне длин волн, не только повышали антимикробную активность *G. lucidum* и *G. applanatum*, но и увеличивали длительность их биосинтетической активности.

Возможно, эти изменения следует рассматривать как позитивные, поскольку некоторые исследователи считают, что для образования антибиотиков необходимо длительное поверхностное или глубинное культивирование [20]. Максимальное повышение антимикробной активности *G. applanatum* в отношении *B. subtilis* наблюдалось при облучении когерентным красным и синим светом (82 и 87% соответственно). У *G. lucidum* фотообработка в тех же режимах в большей степени увеличивала ингибирующую активность культуральной жидкости против MSSA (50% – красный и 75% – синий). Зеленый свет не оказывал достоверного влияния ни на длительность биосинтеза, ни на уровень активности антимикробных компонентов этих штаммов. Изученные макромицеты во всех вариантах опытов, проявляли более высокую чувствительность к низкоинтенсивному лазерному излучению (когерентному).

Некоторые исследователи установили, что клетки различных организмов более чувствительны к низкоинтенсивному импульсному свету, чем к непрерывному той же интенсивности [10]. Однако, до сих пор нет единого мнения о возможных преимуществах импульсного или прерывистого света и его параметрах, способствующих биостимуляции. Поэтому нами был проведен сравнительный анализ фоточувствительности к световым воздействиям низкой интенсивности в непрерывном и импульсном режимах процесса синтеза антимикробных компонентов вышеуказанными макромицетами.

Анализ антимикробной активности *P. ostreatus* на 14-е сут культивирования при использовании посевного мицелия, облученного красным лазерным светом в непрерывном и импульсном режимах, показал, что импульсный свет более эффективен для

повышения активности практически по отношению ко всем используемым в работе тест-культурам кроме *B. mycooides* и *S. aureus* FDA 209P (MSSA), чем непрерывный. Импульсный свет был эффективнее непрерывного при активации антимикробной активности у *G. applanatum* по отношению к *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. aureus* FDA 209P (MSSA) и увеличение диаметров зон подавления их роста составляло 34,1 и 23,0% соответственно. *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA) проявлял одинаковую чувствительность к облучению в обоих режимах.

Полученные результаты демонстрируют перспективность использования низкоинтенсивного света в качестве экологически чистого стимулятора антимикробной активности в биотехнологиях глубинного культивирования макромицетов.

### Список литературы

1. Дьяков М.Ю., Камзолкина О.В., Поединок Н.Л. и др. Морфологические признаки природных штаммов некоторых видов макромицетов и биологический анализ антимикробной активности в условиях глубинного культивирования. Микол. фитопатол. 2010; 44(3): 225-40.
2. Круподьорова Т.А., Бисько Н.А., Поединок Н.Л. и др. Антимікробна активність штамів *Ganoderma applanatum* (Pers.:Wallr.) PAT та *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. в умовах глибинного культивування. Укр. Бот. журн. 2008; 6: 590-4.
3. Alves MJ, Ferreira IC, Dias J et al. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Med.* 2012; 78(16):1707-8.
4. Ranadive KR, Belsare MH, Deokule SS et al. Glimpses of antimicrobial activity of fungi from World. *Journal on New Biol Repts.* 2013; 2(2): 142-62.
5. Corrochano L.M. Fungal photobiology: a synopsis. *IMA Fungus.* 2011; 2(1): 25-8.
6. Herrera-Estrella A, Horwitz BA. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol Microbiol.* 200; 64(1): 5-15.
7. Purschwitz J, Muller S, Kastner Ch, Fischer R. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(6):566-71.
8. Поединок Н.Л. Перспективы использования искусственного света в биотехнологиях культивирования грибов. *Biotechnol Acta.* 2013; 6(6): 58-70.
9. Tisch D, Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 85(5): 1259-77.
10. Посудин Ю.И. Лазерная фотобиология. Киев: Выща школа. 1989: 245 с.



## ФОТОАКТИВАЦИЯ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МАКРОМИЦЕТОВ

Поединок Н.Л.<sup>1</sup>, Михайлова О.Б.<sup>2</sup>, Ходаковский В.М.<sup>3</sup>, Дудка И.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт пищевых биотехнологий и геномики НАНУ, Киев

<sup>2</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАНУ, Киев

<sup>3</sup>Институт физики НАНУ, Киев

Анализ работ, направленных на изучение механизмов фоторецепции у грибов, позволяет научно обосновано утверждать, что свет может продуктивно использоваться для целенаправленной регуляции их морфогенеза и биологической активности и это, несомненно, может лечь в основу создания новых экологически чистых интенсивных технологий их культивирования.

В настоящее время в биотехнологии, как одной из наиболее динамично развивающейся области человеческой деятельности, большое применение нашли лазерные технологии [1]. Преимуществом лазерного излучения является возможность создания высокой спектральной яркости излучения, не достигаемой при использовании обычных некогерентных источников света. Такие свойства позволяют говорить о возможности реализации высокоэффективных биотехнологий для получения культур с высокой биологической активностью, повышенным внутри- и внеклеточным содержанием ценных биологических продуктов. Однако сведения об использовании лазерной стимуляции в биотехнологиях культивирования грибов очень ограничены [2].

**Цель работы** – изучение возможности использования низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в видимом диапазоне длин волн для стимуляции ростовых процессов спор и мицелия культивируемых макромицетов и разработка методов их активации для последующего использования в качестве посевного материала.

В работе использовали чистые культуры базидиальных грибов *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer 1974, *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1899, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1887, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. 963, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 520 и *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. 531 из Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники НАН Украины. Споры собирали из плодовых тел полученных в процессе интенсивного культивирования [3] на следующих субстратах: *F. velutipes*, *G. applanatum* и *G. lucidum* – осиновые опилки (60%) и пшеничные отруби (40%); *H. erinaceus* и *L. edodes* – буковые опилки (60%) и кукурузная крупа (40%); *P. ostreatus* – солома пшеничная 40%, опилки ольхи 40%, пшеничные отруби 20%.

Поскольку известно, что у большинства грибов отношение к свету меняется в процессе их онтогенеза [4], проводили определение фоточувствительности макромицетов на разных стадиях получения посевного материала (споры, мицелий в экспоненциальной и стационарной фазах роста) и устанавливали фазы их развития на которой световое воздействие вызовет наибольший стимулирующий эффект.

Световую обработку посевного материала проводили при полном отсутствии других источников

света с помощью He-Ne-лазера с излучением на длине волны 632,8 нм и аргонового ионного лазера, излучение  $\lambda$  514,5 нм и 488,0 нм: сухих споровых отпечатков – непосредственно в чашках Петри, а мицелий, полученный из необлученных спор, на разных фазах глубинного культивирования (экспоненциальная и стационарная) – в колбах с широким и плоским дном (толщина слоя 1 см). Энергетическая доза облучения (световая энергия, падающая на единицу площади) определялась как произведение плотности мощности на времени облучения. Благодаря довольно широкой вариации выходной мощности используемых источников света (от 10 мВт для He-Ne лазера до 300 мВт для Ar<sup>+</sup>-лазера), экспозиция выбиралась в соответствии с заданной дозой 230 мДж/см<sup>2</sup> и варьировала от 1 до 30 мин, в зависимости от схемы опыта.

Во всех вариантах опытов были выбраны условия равных энергетических доз световых воздействий на споры и мицелий, так что для всех видов источников света плотность энергии на поверхности образца была одинаковой. При выборе одинаковых энергетических условий облучения образцов светом мы исходили из того, что при отсутствии установленных и общепринятых механизмов действия низкоинтенсивного лазерного излучения на мицелий и споры грибов представлялось обоснованным сосредоточиться на определении качественных различий воздействия на них равных доз энергии излучения различного спектрального состава и временных характеристик. Полученный таким образом активированный мицелий (первого засева) использовали для вторичного засева. За показатель активности посевного материала принимали накопление биомассы.

Полученные нами результаты продемонстрировали различную активность посевного мицелия макромицетов облученного в разных диапазонах длин волн на разных фазах онтогенеза. Так, облучение *G. applanatum* и *P. ostreatus* зеленым светом ( $\lambda$  514 нм) на стадии прорастания спор не вызывает активации полученного из них посевного мицелия, а у *F. velutipes*, *G. lucidum* и *H. erinaceus* активность снижается.

Однако в процессе формирования вегетативного мицелия чувствительность *G. lucidum*, *H. erinaceus* и *P. ostreatus* к свету этого диапазона длин волн кардинально меняется и использование посевного мицелия облученного в стационарной фазе роста увеличивает выход биомассы этих макромицетов на 34,8, 43,1 и 46,1% соответственно. Споры *G. applanatum* не проявляют чувствительности к синему свету ( $\lambda$  488,0 нм) и полученный из них мицелий не отличался своей активностью от контроля. Тогда как облучение как красным ( $\lambda$  632,8 нм) и синим светом на всех указанных фазах развития изученных видов (споры и мицелий) приводит к значительному повышению активности посевного мицелия.

Анализ ростовых показателей активированного посевного материала позволил определить параметры облучения для каждого штамма, позволяющие получить максимальный стимулирующий эффект. Так, активацию посевного мицелия *F. velutipes*, *G. applanatum* и *P. ostreatus* целесообразно проводить на экспоненциальной и стационарной фазах роста, а *G. lucidum* – в стационарной. Облучение спор *H. erinaceus* лазерным светом с  $\lambda$  488,0 нм приводит к максимальной стимуляции последующих ростовых процессов, и накопление биомассы увеличивается почти в 3 раза по сравнению с контролем. Фотостимуляция красным и синим светом одинаково эффективна на всех изученных стадиях онтогенеза *L. edodes*.

Поскольку в вегетативном мицелии, сформированном из модифицированных под действием света спор, также сохраняется способность к ускоренному росту, то можно утверждать, что изменения, вызванные светом, имеют пролонгированное действие и могут передаваться на дальнейшую онтогенетическую стадию от спор к мицелию. Такие реакции связывают с изменениями в параметрах клеточного гомеостаза и они вписываются в теорию об универсальных механизмах лазерной биостимуляции [5]. Согласно этой теории, основные физические и/или химические изменения, вызванные НИЛИ в фотоакцепторных молекулах (например, в терминальных ферментах дыхательных цепей), сопровождается каскадом биохимических реакций в клетках, которые не требуют дальнейшей активизации светом (цепи передачи и усиления фотосигнала или клеточная сигнализация).

Одним из важных моментов, которые определяют экономическую эффективность биотехнологического процесса, является количество инокулюма, который вносят в ферментационную среду. Исследования зависимости накопления биомассы изученными макромицетами от количества посевного материала показали, что проведенная нами фотоактивация позволяет снизить количество его внесения в субстрат в 4 раза (1,2%). При этом накопление биомассы *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus* достоверно выше, чем при внесении 5% необлученного посевного материала.

Следует отметить, что уменьшение количества вносимого активизированного инокулюма, способствует увеличению стимулирующего эффекта. При 1,2% инокуляции субстрата накопление биомассы *P. ostreatus* увеличивается более чем на 240%, в сравнении с контролем, тогда как при внесении 5% активиро-

ванного посевного материала – на 80%. Аналогичная тенденция наблюдается у *G. applanatum*, *G. lucidum* и *H. erinaceus*. Это согласуется с данными других исследователей, которые считают, что фоторегуляция в позитивном смысле (стимуляция) может происходить только тогда, когда условия для роста культуры не являются оптимальными [5].

Таким образом, проведенные исследования позволили впервые определить наиболее эффективные режимы стимуляции ростовых процессов культивируемых макромицетов на стадиях прорастания спор и роста вегетативного мицелия с помощью использования низкоинтенсивного лазерного света и разработать экологически чистые методы получения высокоактивного посевного материала. Новые подходы, позволяющие целенаправленно регулировать биологическую активность макромицетов, открывают большие перспективы для модификации существующих технологий их культивирования и интенсификации технологических этапов получения биомассы и нутрицевтиков, что позволит повысить экономическую эффективность биотехнологического процесса.

Полученные нами новые для макромицетов данные о возможности передачи изменений, вызванных светом, от спор на следующие онтогенетические стадии развития вегетативного мицелия, являются логическим основанием для проведения дальнейших исследований о длительности сохранения фотоиндуцированных изменений при масштабировании активированного посевного материала.

#### Список литературы

1. Лазерные технологии в сельском хозяйстве. М.: Техносфера. 2008: 270 с.
2. Поединок Н.Л. Перспективы использования искусственного света в биотехнологиях культивирования грибов. Обзор. *Biotechnol Acta*. 2013; 6(6): 58-70.
3. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации. Под ред. А.С. Бухало. Киев: Чернобыльинтеринформ, 2004: 127 с.
4. Corrochano L.M. Fungal photobiology: a synopsis. *IMA Fungus*. 2011; 2(1):25-8.
5. Кару Т.И. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохромоксидазы. Голография: фундаментальные исследования, инновационные проекты и нанотехнологии. XXVI школа по когерентной оптике и голографии. Иркутск: «Папирус», 2008:156-5.

## РОСТОВЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ *GALERINA MARGINATA* (BATSCH) KÜNNER, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ, В УСЛОВИЯХ ПОВЕРХНОСТНОГО И ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Псурцева Н.В., Шахова Н.В.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Смертельно ядовитые грибы из родов *Amanita*, *Conocybe*, *Galerina* и ряда других синтезируют циклические пептиды, наиболее токсичными из которых являются аманитины [1]. В организме человека токсин вызывает существенные повреждения почек и печени, как правило, приводящие к летальному исходу. Диагноз отравления аманитином и лечение затруднены [2]. Поэтому аманитины широко используются в научных исследованиях как с целью выяснения механизмов их токсического действия, так и при попытках создания тест-систем для выявления циклических пептидов в биологических жидкостях.

Однако получение аманитинов осложнено тем, что виды грибов, продуцирующие эти токсины, плохо поддаются культивированию, и получить искомые вещества, в настоящее время, можно лишь путем их экстракции и последующей очистки из природных плодовых тел. Наиболее известным видом, синтезирующим аманитины, является *A. phalloides*. Трудности выделения этого эктомикоризного вида в чистую культуру и крайне медленный рост в искусственных условиях заставляют искать другие возможные виды-продуценты аманитинов.

С этой целью китайскими исследователями была предпринята успешная попытка культивирования недавно описанного вида *Amanita exitialis*, обитающего исключительно в южных провинциях Китая [3]. Более целесообразным представляется получение аманитинов при культивировании представителей рода *Galerina*, также синтезирующих циклические пептиды, но являющихся сапротрофными грибами поддающимися культивированию на искусственных питательных средах. Еще в 60-е годы прошлого века американскими исследователями была показана возможность выращивания *G. marginata* на жидких питательных средах как поверхностным, так и глубинным методами, однако рост штамма на всех примененных в работе средах был оценен как сравнительно медленный [4]. Было выявлено, что токсин накапливался внутриклеточно, поэтому интерес для исследования представляла биомасса мицелия.

Впоследствии было показано, что мицелиальные культуры *Galerina* – *G. beinrothii*, *G. fasciculata*, *G. helvoliceps*, *G. marginata* и *G. unicolor*, продуцировали внутриклеточные амаксины также как и природные организмы, при этом состав среды и условия культивирования существенным образом влияли не только на накопление биомассы, но и на биосинтез токсичных метаболитов [5, 6, 7]. Однако ростовые и морфологические особенности культур *Galerina*, обладающих токсичными свойствами, изучены недостаточно. В Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института РАН сохраняется 10 штаммов *G. marginata*.

Цель работы – верификация этих штаммов, получение культуральной характеристики при выращивании на стандартных агаризованных средах, а также изучение возможности их культивирования на жидкой полусинтетической среде.

Верификацию исследуемых штаммов проводили на основе нуклеотидной последовательности генов рДНК (ITS1-5.8S-ITS2). Анализ этих последовательностей в программе MEGA 6 с использованием выравнивания показал хорошую гомологию всех полученных сиквентов, позволяющую отнести исследуемые штаммы к одному виду. Для поиска близкородственных последовательностей был использован эвристический алгоритм на сервере BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), позволяющий найти наиболее гомологичную последовательность в доступной международной базе данных нуклеиновых кислот GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

В результате поиска в генбанке, депонированные там последовательности образцов *G. marginata* или ее синонимов (*G. unicolor*, *G. autumnalis*) показали 98–99% идентичности (Max identity) с полученными нами сиквенсами, подтвердив, тем самым, видовую принадлежность исследованных штаммов.

Для изучения линейной скорости роста штаммы выращивали в чашках Петри d 90 мм на стандартных агаризованных средах MEA и PDA (Biokar Diagnostics). Изучение скорости роста проводили в течение 5 недель, измеряя раз в неделю диаметр колонии в двух взаимно перпендикулярных плоскостях. Выращивание проводили на каждой среде как минимум в 3 повторностях. Для статистической обработки данных использовали компьютерную программу OriginPro 7.5. Макро- и микроморфологические особенности колоний изучали после 5 нед роста используя общепринятые методы культуральных исследований [8].

Полученные данные свидетельствуют об относительно медленной скорости роста всех штаммов на обеих стандартных средах. Даже при инокуляции мицелия в центр чашки, полное освоение колонией поверхности чашки Петри наступало, в лучшем случае, через 5 нед роста, а у некоторых штаммов было отмечено формирование колоний ограниченного роста и зарастания всей поверхности чашки так и не наступало. Для большинства штаммов скорость роста на PDA была выше, чем на MEA. Исключение составили штаммы 2479 и 2504, у которых скорость роста на MEA была выше, чем на PDA. Штамм 2477 на обеих средах рос примерно одинаково. Наилучшей скоростью роста обладали штаммы 2837 и 2545.

Морфологические особенности десяти штаммов также варьировали в зависимости от среды культивирования. Несмотря на некоторую вариабельность морфологических признаков у изученных штаммов,

культуры *G. marginata* обладали следующими характерными особенностями.

МЕА – рост относительно медленный, колонии достигали диаметра 20–70 мм за 5 нед, рост мог остановиться после 4 нед. Макроморфологические признаки: мицелий шерстистый, воздушный мицелий преимущественно в центральной зоне, плохо развит, к краю колонии – погруженный, цвет от беловатого до серовато-кремовато-охряного, более выражен в центре, краевые гифы бесцветные, край бахромчатый, погруженный, внешняя линия ровная или слегка волнистая, реверзум не изменен или золотистый, запах легкий неопределенный. Микроморфологические признаки: генеративные гифы воздушного мицелия  $d=1,5-2,5$  (3,5) мкм, иногда ветвящиеся, субстратные гифы, такого же диаметра, ветвящиеся, иногда монилиоидные и/или со вздутиями до 3–4,5  $\mu\text{m}$ , переплетаясь могут образовывать узлы и косы; образуют кристаллы, иногда крупные – до 10 мкм. Пряжки на гифах – наиболее нестабильный признак для этого вида. У части штаммов – на всех участках колонии на гифах присутствовали регулярные пряжки, простые и медальонные. У ряда штаммов пряжки отсутствовали в краевой зоне колонии. У некоторых штаммов – пряжки не были обнаружены.

PDA – рост также медленный, но выше, чем на МЕА. Колонии достигали 40–75 мм за 5 нед. Макроморфологические признаки: мицелий шерстистый более плотный, по сравнению с МЕА, образовывал плотный слой гиф на поверхности среды, хрупкий при механическом повреждении. Колония более пигментирована, чем на МЕА – серовато-бежево-охряная; край бахромчатый, погруженный, периферийные гифы бесцветные, внешняя линия ровная или волнистая, реверзум не изменен или золотисто-охряный, запах часто неприятный, неопределенный.

Микроморфологические признаки: генеративные гифы воздушного мицелия плотные, хрупкие  $d=1,5-3,5$  мкм, много фрагментов, гифы иногда волнистые, встречались вздутия до 8 мкм; субстратный мицелий образован длинными  $d=1,0-2,0$  мкм ветвящимися гифами, краевые (растущие) гифы ветвящиеся  $d=2,5-3,5$  (4) мкм, иногда волнистые или часто септированные, иногда монилиоидные или с вздутиями до 9 мкм; отмечены кристаллы.

Пряжки на гифах также нестабильны, встречались реже, чем на МЕА – у ряда штаммов, образующих пряжки на МЕА, на PDA пряжек не было обнаружено. Экспресс анализ на продукцию окислительных ферментов по синингалдазину и гваяколу показал слабо позитивную реакцию. Присутствие в мицелии циклических пептидов оценивали качественным методом Виеланда с использованием газетной бумаги и 6 н. HCl [9]. Положительная реакция была отмечена у штаммов 2479, 2545 и 2837. На основании комплексной культурально-морфологической и молекулярной характеристики проведена ДНК-паспортизация штаммов *G. marginata* из коллекционного фонда LE-BIN.

Для культивирования штаммов на жидкой питательной среде и подбора оптимальных условий культивирования, обеспечивающего максимальный прирост биомассы, было отобрано 2 штамма с наибольшей скоростью роста на МЕА и PDA, показавшие

положительную реакцию на наличие циклических пептидов – 2545 и 2837. Культивирование проводили на стандартной глюкозо-пептонной среде (G-P) [10], разработанной в лаборатории биохимии грибов БИН РАН для выращивания базидиальных грибов из различных таксономических и экологических групп, стационарным и глубинным способами при температуре 27 °С. Как известно из литературных источников, биосинтез циклических пептидов более активен на среде культивирования, лимитированной по глюкозе [7]. Поэтому при подборе условий культивирования нами была использована G-P-среда с различным содержанием глюкозы (среда №1 – 5 г/л; среда №2 – 10 г/л).

В процессе культивирования было изучено: динамика накопления биомассы, изменение pH и содержания глюкозы в культуральном фильтрате (КФ). Количественное определение содержания глюкозы в КФ осуществляли спектрометрически при  $\lambda 500$  нм глюкозо-оксидазным методом. В результате исследования было показано, что наибольший выход биомассы у обоих штаммов достигался при глубинном культивировании на среде № 1 на 14 сут роста (2545 – 3,5 г/л, 2837 – 3,8 г/л).

В этот момент, в среде оставалось значительное количество неизрасходованной глюкозы (54 % у штамма 2545 и 26% у штамма 2837). При этом наблюдалось понижение pH в КФ до 4,2 у 2545 и 5,1 у 2837. Автолиз у обоих исследованных штаммов наступал к 28-м суткам роста на среде № 1, и к 42-м на среде № 2. При поверхностном культивировании штаммов на обеих средах наибольший выход биомассы показан на 28-е сут роста (2545 – 3,9 г/л; 2837 – 4,6 г/л) при полной утилизации глюкозы на среде № 1, тогда как на среде №2 оставалось до 25% глюкозы у штамма 2545 и до 12 % у штамма 2837. При этом также наблюдалось подкисление КФ. Автолиз у обоих штаммов наступал к 42-м сут независимо от исходной концентрации глюкозы в среде.

Таким образом, в результате исследования была получена комплексная культуральная характеристика коллекционных штаммов *G. marginata* и отобраны штаммы – возможные продуценты циклических пептидов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-06211 и Программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России».*

#### Список литературы

1. Wieland T., Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita mushrooms in G.D.Fasmand (ed.) C.R.C. Crit Rev Biochem. 1978; 5(3): 185-260.
2. Мусселиус С.Г., Рык А.А. Отравления грибами. М. 2002: 324 с.
3. Zhang P, Chen Z-H, Hu J-S et all. Production and characterization of Amanitin toxins from a pure culture of Amanita exitialis. FEMS Microbiol Lett. 2005; 252: 223-8.
4. Benedict R. G., Tyler V. E., Brady L. R., Weber L. J. Fermentative production of Amanita toxins by strain of *Galerina marginata*. J Bacteriol. 1966; 91: 1380-1.

5. Besl H, Mack P, Schmid-Heckel H. Giftpilze in den Gattungen *Galerina* und *Lepiota*. Zeitschrift für Mykologie. 1984; 50(2): 183-92.
6. Muraoka S, Fukamachi N, Mizumoto K, Shinozawa T. Detection and identification of amanitins in the wood-rotting fungi, *Galerina fasciculata* and *Galerina helvoliceps*. Appl Environ Microb. 1999; 65: 4207-10.
7. Muraoka S, Shinozawa T. Effective production of amanitins by two-step cultivation of the basidiomycetes, *Galerina fasciculata* GF-060. J Biosci Bioeng. 2000; 89(1): 73-6.
8. Stalpers JA. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. Stud Mycol. 1978; 16: 248.
9. Wieland T. Peptides of poisonous *Amanita* mushrooms. Springer series in molecular biology. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo. 1986: 256 p.
10. Shakhova NV, Psurtseva NV, Golenkina SA et al. Effect of submerged cultivation condition and inducers on biosynthesis of extracellular laccase by *Trametes versicolor* 1666 strain. Applied Biochem Microbiol. 2011; 47(9): 808-16.

## ЛЕКАРСТВЕННЫЕ МАКРОМИЦЕТЫ В КОЛЛЕКЦИЯХ КУЛЬТУР КАК НАДЕЖНЫЕ БИОРЕСУРСЫ ДЛЯ НАУЧНОГО И ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Псурицева Н.В.<sup>1</sup>, Озерская С.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Путино

С давних времен высшие грибы находят применение в традиционной медицине многих стран мира для лечения различных недугов [1]. Однако научные исследования лечебных свойств макромицетов, так называемых «медицинских грибов» (ММs), были начаты в разных странах мира лишь 1960-х гг. С тех пор было выявлено более 700 видов ММs, продуцирующих полисахариды, органические кислоты, липиды, стероиды, тритерпены и другие вещества, проявляющие противоопухолевую, иммуностимулирующую, антибиотическую, противовирусную, антиаллергенную и др. активности [2–4].

Большинство ММs принадлежит к высшим базидиомицетам (class Agaricomycetes), многие из которых могут быть выделены в чистую культуру и сохраняться *ex situ* на вегетативной стадии. В последние годы сохранению базидиомицетов *ex situ* в мире уделяется все больше внимания как одному из подходов к проблеме сохранения биоразнообразия [5, 6, 7].

Преимущество такого подхода состоит в возможности не только сохранять, но и использовать, а также приумножать генетические ресурсы макромицетов для научных и практических целей – фундаментальных микологических исследований, биотехнологии и медицины. Ключевую роль в этом играют коллекции культур (CCs) и биологические ресурсные центры (BRCs) [8–10]. Целью сохранения в любой коллекции является поддержание чистоты, жизнеспособности и генетической стабильности штаммов, что обеспечивает более надежное сохранение биологического материала.

Основной функцией CCs и BRCs является сохранение *ex situ* разнообразия микроорганизмов и грибов, пополнение и изучение генетических ресурсов, предоставление высококачественного биологического материала сторонним организациям для научных исследований и практических целей, в том числе производственных. Коллекции исполняют роль депозитариев штаммов при патентных разработках и штаммов-объектов исследования в научных пу-

бликациях, для возможности воспроизведения уже полученных результатов и продолжения исследований. По определению Организации экономического сотрудничества и развития (OECD), инициатива BRC состоит в том, чтобы действовать в соответствии с международными критериями качества, повышать ценность и использование штаммов и предоставлять полноценную информацию о поддерживаемых биологических ресурсах.

Основными международными координаторами работы с чистыми культурами микроорганизмов являются Всемирная федерация коллекций культур (WFCC) и Европейская организация коллекций культур (ECCO). Они объединяют коллекции и пользавателей, координируют работу коллекционных фондов, и ведут обмен информацией и технологиями.

Объем сохраняемого в коллекциях биологического материала неуклонно растет. В настоящее время (на февраль 2015 г.) WFCC объединяет 683 зарегистрированные коллекции из 71 страны, которые суммарно поддерживают 2461720 штаммов микроорганизмов, из которых грибов – 725517 штаммов 25611 видов и внутривидовых таксонов (<http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/>). Однако число видов, поддерживаемых в коллекционных фондах, нуждается в ревизии, т.к. в постоянно обновляющейся базе данных не учитываются синонимы, дубликаты, ошибки в написании латинских имен и т.д.

Крупнейшей коллекцией культур грибов в мире является CBS в Нидерландах (72000 штаммов, 13603 видов), которая играет лидирующую роль и по численности сохраняемых штаммов, и по их таксономическому разнообразию. Среди крупных коллекций также следует отметить ATCC в США (32000 штаммов, 7600 видов) и IMI в Великобритании (38755 штаммов, 3985 видов). В Европе крупной коллекцией, сохраняющей грибной генофонд является MUCI в Бельгии (15700 штаммов, 5948 видов). Из российских коллекций культур в WFCC зарегистрировано 22 коллекции, суммарно поддерживающие свыше 60 000 культур

Таблица. Сохранение грибов, обладающих лекарственными свойствами, в коллекциях культур.

Коллекция культур, страна	Общее число видов	Число видов Agaricomycetes	Число видов MMs
USDA ARS Culture Collection (NRRL), США	1013	43	4
American Type Culture Collection (ATCC), США	7600	1143	50
Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Голландия	13603	2031	52
Culture Collection of Basidiomycetes of the Institute of Microbiology AS CR (CCBAS), Чехия	300	292	33
All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Россия	2029	164	39
Komarov Botanical Institute Basidiomycetes Culture Collection (LE-BIN), Россия	650	633	54

водорослей, микроорганизмов и грибов. Крупнейшей из них, сохраняющей разнообразие грибов *ex situ*, является VKM (ИБФМ) в Москве (7442 штамма, 1724 вида), однако разнообразие агарикомицетов в ней представлено недостаточно широко (388 штаммов, 164 вида). Специализированная Коллекция культур базидиомицетов LE-BIN (Санкт-Петербург, БИН РАН) является примером небольшой по меркам WFCC, но уникальной коллекции. Это единственная в России коллекция высших грибов, целью которой является сохранение видового и штаммового разнообразия макромицетов. Разнообразие грибов, сохраняемое в LE-BIN (свыше 2000 штаммов, около 650 видов) соизмеримо с мировым уровнем сохранения агарикомицетов в коллекционных фондах, а по ряду таксономических групп и превосходит его.

Выбор способа сохранения для грибов зависит от сохраняемого организма, времени, доступности материалов и оборудования в каждой коллекции. Для базидиальных макромицетов возможно использование нескольких методов сохранения: суб-культура (+4 °C), хранение под H<sub>2</sub>O и маслом (комн. t или +4 °C) и криоконсервация при -80 °C или в жидком азоте (-196 °C) [9].

С каждым годом растет видовое и штаммовое разнообразие грибов, сохраняемых в коллекционных фондах мира, параллельно с этим появляются новые данные о биологической активности агарикомицетов. Становится очевидным, что эти грибы могут быть неограниченным источником фармацевтических препаратов. Однако, несмотря на то, что биологическая активность была выявлена у нескольких сотен видов грибов, большинство исследований в области их фармацевтического использования проводится на ограниченном числе видов. На основании анализа мировых достижений по изучению и использованию MMs был составлен список, включающий 60 видов макромицетов, являющихся объектами таких исследований. Эти виды были взяты за основу при выявлении наличия и доступности штаммов MMs в мировых CCs.

Следует отметить, что даже в хорошо оснащенных крупных коллекциях видовое разнообразие грибов представлено крайне неравномерно, большинство

видов представляют лишь несколько изолятов, что не отражает их генетическую вариабельность, а многие таксономические группы не представлены совсем. К сожалению, практически ни одна из крупных коллекций мира в настоящее время не дает на своих Web-сайтах полного списка поддерживаемых видов, предоставляя возможность пользователю искать нужные культуры по отдельным запросам на каждое требуемое наименование.

Поиск необходимого наименования на сайте WDCM (World Data Centre for Microorganisms) по спискам отдельных коллекций требует крайне длительного времени, поскольку там возможен просмотр только отдельных страниц, каждая из которых содержит ограниченное число видовых наименований. Кроме этого до сих пор полностью отсутствуют сведения о разнообразии коллекций культур грибов по таксонам в ранге выше вида и рода – от семейства до царства. И лишь специализированная база данных FungalDC (на сайте VKM: <http://www.vkm.ru>), работающая в системе открытого доступа (online) способна стать справочной системой о поддерживаемых в различных коллекциях мира видах мицелиальных грибов и дрожжей [11].

Анализ коллекционных фондов мира при помощи FungalDC показал, что все коллекции мира вместе поддерживают 5672 вида (704 рода) Agaricomycetes. Как минимум один из основных видов MMs сохраняется в 105 CCs. Наиболее полно представлены следующие виды MMs: *Pleurotus ostreatus* (в 62 CCs), *Schizophyllum commune* (в 52 CCs), *Lentinula edodes* (в 40 CCs), *Flammulina velutipes* (в 38 CCs), *Agaricus bisporus* и *Ganoderma lucidum* (в 36 CCs), *Laetiporus sulphureus* (в 34 CCs) и *Trametes versicolor* (в 31 CCs). Поиск MMs в ряде крупнейших мировых коллекциях и в специализированных коллекциях культур базидиомицетов показал результаты, частично представленные в таблице.

Как показал анализ наличия MMs в мировых коллекционных фондах, коллекция LE-BIN поддерживает 54 вида и занимает лидирующее место по поддержанию видового разнообразия т.н. «медицинских грибов» [12]. Штаммы этих грибов являются, в основном, оригинальными изолятами, полученными сотрудниками коллекции во время экспедиционных

работ в различных регионах России и за рубежом (Европейская часть России, Кавказ, Урал, Сибирь, Дальний восток, Вьетнам и др.). Видовое и штаммовое разнообразие коллекции неуклонно растет, и в настоящее время она является крупнейшей специализированной коллекцией России, сохраняющей приблизительно 10% известного видового разнообразия агарикомицетов России.

Дальнейшее развитие коллекций культур и прогресс в деле сохранения *ex situ* разнообразия агарикомицетов будет способствовать увеличению в коллекциях числа видов грибов, представляющих интерес для медицины, что неизбежно приведет к выявлению новых видов грибов, обладающих лекарственными свойствами, и открытию новых биологически активных метаболитов. Наличие профессиональных микологов в большинстве специализированных ССs и BRCs уменьшает риск ошибочной идентификации исходных образцов грибов и контаминации сохраняемого в коллекции материала.

Кроме того, в коллекциях есть возможность для создания специальных условий хранения штаммов в соответствии с международными стандартами, что обеспечивает лучшее сохранение их жизнеспособности и биологической активности. Таким образом, использование штаммов из официальных ССs and BRCs для исследования их фармакологических свойств поможет избежать многих проблем, связанных с идентификацией, стабильностью, продуктивностью и сохранностью штаммов-продуцентов при последующем вовлечении их в производственный процесс.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-06211 и Программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России».*

### Список литературы

1. Денисова Н.П. Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк. СПб: Изд. СПбГМУ. 1998: 59 с.
2. Chang ST, Wasser SP. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *Int J Med Mushrooms*. 2012; 14: 95-134.
3. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *Intern J Med Mushrooms*. 2010; 12: 1-16.
4. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Julich W-D. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Compl Altern Med*. 2005; 2: 263-65.
5. Hawksworth DL. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Stud Mycol*. 2004; 50: 9-18.
6. Белова Н.В., Псурцева Н.В., Гачкова Е.Ю., Озерская С.М. Сохранение разнообразия базидиомицетов *ex situ* в специализированной Коллекции культур ЛЕ (БИН). *Микол. фитопатол*. 2005; 39(2): 1-10.
7. Psurtseva NV. *Ex situ* fungal conservation: the role of culture collections. *Mycol Balcan*. 2010; 7(1): 29-35.
8. Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res*. 1991; 95: 641-55.
9. Ryan MJ, Smith D. Fungal genetic resource centers and the genomic challenge. *Mycol Res*. 2004; 108: 1351-62.
10. Samson RA, van der Aa HA, de Hoog GS. Centraalbureau voor Schimmelcultures: hundred years microbial resource centre. *Stud Mycol*. 2004; 50: 1-8.
11. Ozerskaya SM, Vasilenko AN, Verslyppe B, Dawyndt P. FungalDC: a database on fungal diversity in culture collections of the world. *Inoculum (Suppl Mycol)*. 2010; 61(3): 1-5.
12. Psurtseva NV. Conservation of medicinal mushrooms in the LE (BIN) culture collection. *Intern J Med Mushrooms*. 2010; 12(2): 193-9.

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА ГРИБА *PHALLUS IMPUDICUS* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Пучкова Т.А.<sup>1</sup>, Осадчая О.В.<sup>1</sup>, Костеневич А.А.<sup>1</sup>, Буко В.У.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАНБ, Минск

<sup>2</sup>Институт биохимии биологически активных соединений НАНБ, Гродно

Гриб веселка обыкновенная (*Phallus impudicus*) довольно редко встречается в природе, но очень высоко ценится в народной медицине стран Восточной и Северной Европы. Настои из свежих или высушенных плодовых тел веселки традиционно используются как вспомогательное средство при онкологических заболеваниях, при лечении ревматизма, подагры, заболеваний кожи [1].

В то же время как объект биотехнологии гриб остается до сих пор малоизученным, хотя может стать перспективным источником для получения препаратов для лечения ряда заболеваний. На лабораторных животных показано, что применение водного экстракта веселки оказывало противоопухолевое и радиопротекторное действие [2]. Установлено гипогликемическое, иммуностимулирующее и

гепатопротекторное действие *P. impudicus*. Мазь на основе гриба оказывала выраженное репаративное действие при ожогах [3,4]. Поскольку ресурсы гриба веселка в природе ограничены, актуальной задачей является получение биомассы мицелия с помощью биотехнологических методов.

**Цель работы** – исследование роста новых штаммов гриба *P. impudicus* при различных способах культивирования.

**Материалы и методы.** В работе использовали штаммы гриба *P. impudicus*, выделенные из плодовых тел, собранных в лесах Гродненской и Минской областей, и хранящиеся в коллекции культур лаборатории экспериментальной микологии и биоповреждений Института микробиологии НАН Беларуси. Изучение культурально-морфологических свойств штаммов

гриба проводили на агаризованных питательных средах. Поверхностный мицелий получали при выращивании гриба на жидких питательных средах в колбах Эрленмейера в стационарных условиях, глубинный мицелий – в условиях перемешивания на качалке (120 об/мин).

**Результаты и обсуждение.** Исследован рост штаммов *P. impudicus* на трех вариантах агаризованных сред (сусло-агар, глюкозо-пептонный агар, картофельно-декстрозный агар). На агаризованных питательных средах штаммы образовывали колонии белого цвета с концентрическими кругами. Край колоний неровный, поднимающийся, бахромчатый. Воздушный мицелий высокий, ватообразный, пушистый. Реверзум колоний не окрашен. Мицелий обладал слабым грибным запахом. Рост колоний медленный.

Несмотря на то, что колонии были высокие и плотные, дорастание их до края чашки Петри наблюдалось только после 50 сут культивирования. Линейная скорость роста составила 0,46–1,2 мм/сут, ростовой коэффициент (РК) – 6,0–10,8. Колонии исследуемых штаммов *P. impudicus* росли быстрее на глюкозо-пептонном агаре, чем на пивном сусле 8° Б. Наиболее активным ростом отличались штаммы 4 и 5, максимальная линейная скорость роста у которых при 24 °С составила 1,15–1,2 мм/сут, ростовой коэффициент – 10,8.

При микроскопировании вегетативного мицелия штаммов *P. impudicus* наблюдались септированные, разветвленные, переплетающиеся в разных направлениях гифы, а также слияния гиф, осуществляющиеся с помощью анастомозов. Встречались крупные, вздутые, часто неправильной формы клетки, в которых находились сферические кристаллы. На мицелии присутствовали пряжки, представляющие собой небольшие, дугообразной формы выросты, расположенные против поперечной перегородки гифы. В условиях твердофазного культивирования полное обрастание зернового субстрата вегетативным мицелием *P. impudicus* наблюдалось в течение 6–8 нед. Через 8–10 нед наблюдалось образование примордиев.

Исследование влияния температуры культивирования показало, что оптимальная температура для роста исследуемых штаммов *P. impudicus* – 22–24°С. Низкая температура культивирования (18–20 °С) оказалась более предпочтительной для этих грибов, чем более высокая (26–28 °С). При +4±1°С вегетативный мицелий рос очень слабо. При 30 °С и выше мицелиальный рост практически прекратился.

С целью отбора штаммов-продуцентов полисахаридов исследован рост штаммов гриба *P. impudicus* на пивном сусле 8° Б в колбах Эрленмейера при 23–25 °С. На 30-е сут культивирования выход сухой биомассы грибов составил 2,6–5,0 г/л. В биомассе содержалось 5,5–9,4% эндополисахаридов. При глубинном культивировании грибов *P. impudicus* наблюдалось

накопление полисахаридов в культуральной жидкости. Количество образуемых внеклеточных полисахаридов – 1,4–3,0 г/л. Наиболее активнорастущие штаммы *P. impudicus* образовывали 4,8–5,0 г/л биомассы, содержащей 8,6–9,4% эндополисахаридов. В культуральной жидкости присутствовало 2,8–3,0 г/л экзополисахаридов.

Проведено исследование роста штаммов *P. impudicus* на жидкой глюкозо-пептонной питательной среде при поверхностном (в стационарных условиях) и глубинном (на качалке с перемешиванием) культивировании. При поверхностном культивировании в колбах в стационарных условиях мицелий гриба *P. impudicus* рос в виде отдельных опущенных кусочков, а затем образовывалась сплошная толстая пленка, а прилегающая к пленке культуральная жидкость становилась желеобразной из-за экзополисахаридов. Для получения 10–15 г/л биомассы требовалось около 60 сут культивирования. В фильтрате культуральной жидкости содержалось 3,4–5,3 г/л экзополисахаридов.

При глубинном культивировании в колбах на качалке в условиях перемешивания мицелий *P. impudicus* рос в виде пеллет различного диаметра (1–5 мм). Иногда наблюдался рост в виде комков мицелия. Для получения 5,0–5,6 г/л биомассы длительность культивирования составила 30 сут.

В поверхностном мицелии содержалось 65–66% общих углеводов, 14,9–17,7% эндополисахаридов, 6,2–9,7% истинного белка, 1,8–2,0% липидов. Высокое содержание углеводов соединений в поверхностном мицелии, вероятно, можно объяснить прикреплением экзополисахаридов к поверхностной пленке. В глубинном мицелии содержалось 52–55% общих углеводов, 8,5–9,0% эндополисахаридов, 9,5–10,2% истинного белка, 2,3–2,5% липидов. В культуральной жидкости присутствовало до 3,0 г/л внеклеточных полисахаридов.

#### Список литературы

1. Бабаянц О.В., Бушулян М.А., Залогина М.А. *Phallus impudicus* L.: Pers. – перспективы использования в медицине. Усп. мед. микол. 2005; 5: 240-2.
2. Кандукова Е.М., Терпинская Т.И., Сушко С.Н., Маленченко А.Ф. Использование экстракта веселки обыкновенной в комплексной терапии онкозаболеваний в эксперименте. Сиб. онкол. журн. 2010; 4(40): 25-9.
3. Воронов П.П. и др. Исследование репаративного действия веселки обыкновенной при ожогах III Б степени у крыс. Нов. мед.-биол. н. 2013; 7(2): 116-21.
4. Воронов П.П. и др. Исследование превентивного противовоспалительного потенциала *Phallus impudicus* при конкавалин А – индуцированном гепатите у крыс. Фундам. науки – медицине: мат. межд. науч. конф. Минск, 17 мая 2013 г. В 2 ч. Ч 1. Минск: Белорусская наука. 2013:155-8.



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУБСТРАТА ПОСЛЕ ПЛОДОНОШЕНИЯ ГРИБА ВЕШЕНКА ОБЫКНОВЕННАЯ (*PLEUROTUS OSTREATUS*) В КАЧЕСТВЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

Пучкова Т.А.<sup>1</sup>, Осадчая О.В.<sup>1</sup>, Костеневич А.А.<sup>1</sup>, Козинец А.И.<sup>2</sup>, Надаринская М.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАНБ, Минск

<sup>2</sup>Научно-практический центр НАНБ по животноводству, Жодино, Белоруссия

Гриб вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) культивируется в промышленных масштабах во многих странах мира. Плодовые тела вешенки в условиях умеренных широт чаще всего культивируют на субстратах на основе соломы злаковых культур. На каждую тонну выращенных грибов приходится не менее 2–3 тонн отработанного субстрата, который в настоящее время не используется и его утилизация представляет определенную проблему. В связи с расширением производства грибов количество отработанного субстрата увеличивается, важной задачей является его рациональное применение [1, 2]. Широкое использование сельскохозяйственных отходов, в частности соломы злаков, в качестве корма для животных ограничивается содержанием в ней лигноцеллюлозного комплекса [3]. Гриб *P. ostreatus* относится к числу дереворазрушающих грибов, способных образовывать экстрацеллюлярные целлюлолитические и лигнинолитические ферменты. При выращивании *P. ostreatus* на лигноцеллюлозных субстратах, происходит их предварительная биоделигнификация и увеличение содержания в них белка. Отработанный субстрат после плодоношения вешенки представляет собой ценный продукт, обогащенный грибным белком и биологически активными соединениями.

**Цель работы** – изучение биохимического состава и ферментативной активности образцов соломенно-го субстрата после твердофазного культивирования *P. ostreatus*, а также изучение возможности его использования в качестве кормовой добавки для молодняка крупного рогатого скота.

**Результаты.** Показано, что в процессе твердофазного культивирования *P. ostreatus* на соломе злаковых после 1–3 волн плодоношения содержание сырого протеина в субстрате повышалось по сравнению с исходной соломой в 1,5–1,8 раз, а истинного белка – в 1,8–2,3 раз. При этом за счет целлюлолитической и лигнинолитической активности гриба отмечалось снижение количества в субстрате сырой клетчатки в 1,6–2,3 раза и лигнина в 1,2 раза.

В отработанном субстрате после культивирования *P. ostreatus* содержалось 48,4–52,7% общих углеводов, 4,3% зольных элементов, 7,3% общего и 4,0% истинного белка, 1,8% липидов, 1,18% кальция, 0,06% фосфора, 2 мг/кг каротина, 17,8 мг/кг витамина Е.

В водных экстрактах субстрата гриба *P. ostreatus* наблюдалась ферментативная активность: целлюлаз – до 23,4–27,4 МЕ/г, Мп-пероксидазы – до 0,8 МЕ/г и лакказы – до 1,4 МЕ/г (в пересчете на сухой субстрат). Благодаря содержанию ферментов субстрат вешенки перспективен для включения в рацион животных с целью улучшения переваримости грубых кормов.

Отработанный субстрат гриба *P. ostreatus* сохранял достаточно высокий уровень содержания антиоксидантов фенольной природы и высокую антиоксидантную активность (до 50–55% по отношению к

антиоксиданту – ионолу). Установлено, что субстрат является непатогенным и нетоксичным и может быть использован в кормопроизводстве.

Эффективность использования субстрата твердофазной культуры гриба вешенка обыкновенная (*P. ostreatus*) в рационах молодняка крупного рогатого скота при выращивании и откорме оценивалась по результатам исследований, проведенных в 2012–2014 гг. в условиях ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области. Животным скармливали отработанный субстрат вешенки путем смешивания его с объемистыми кормами.

Скармливание в составе рационов молодняка крупного рогатого скота до 12-месячного возраста отработанного субстрата вешенки в количестве до 1 кг способствовало активизации процессов биосинтеза белка в крови животных и повышению в ней концентрации макро- и микроэлементов. При этом обеспечивалось повышение среднесуточных приростов живой массы животных на 4,5%, а также снижение затрат кормов на 3,7% и себестоимости прироста на 3,3% по сравнению с молодняком крупного рогатого скота, получавшим аналогичный рацион без субстрата.

Использование в составе рационов молодняка крупного рогатого скота старше 12-мес возраста на откорме 1,5 кг отработанного субстрата вешенки оказывало положительное влияние на мясную продуктивность и качество получаемой продукции. Позволяло повысить переваримость питательных веществ на 2–3 п.п. и увеличить среднесуточный прирост на 11,3% ( $p < 0,05$ ), при снижении затрат кормов на 9,2%. Себестоимость продукции снижалась на 11,4%.

Включение в состав рациона молодняку крупного рогатого скота на откорме субстрата вешенки не изменяло органолептических, физико-химических и биологических свойств получаемой продукции.

На основе отхода производства грибов – отработанного субстрата твердофазной культуры гриба вешенка обыкновенная (*P. ostreatus*) разработана технология получения новой кормовой добавки (во влажной и сухой формах) и рекомендации по ее применению. Кормовая добавка предназначена для использования в составе рационов при выращивании и откорме молодняка крупного рогатого скота.

### Список литературы

1. Gregori A, Švagelj M, Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol Biotechnol.* 2007; 45(3): 236-47.
2. Rinker DL. Handling and using “Spent” mushroom substrate around the world. In: JE Sanchez, DJ Roysce & G Hernandez (eds). *Proc 4th Int Conf Mushroom Biol and Mushroom products.* Cuernavaca. Mexico. 2002: 43-60.
3. Попков Н.А., Фисинин В.И., Егоров И.А. и др. Корма и биологически активные вещества. Минск: Белорусская наука. 2005: 882 с.

## ЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ – ИНГИБИТОРЫ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ

Рузиева Д.М., Абдульмянова Л.И., Гулямова Т.Г.  
Институт микробиологии АНРУз, Ташкент. Узбекистан

Современная терапевтическая стратегия контроля гипергликемии заключается в снижении скорости переваривания углеводов и всасывания глюкозы. Постпрандиальная гипергликемия происходит вследствие действия двух кишечных ферментов –  $\alpha$ -амилазы и  $\alpha$ -гликозидазы, находящихся на щеточной каемке слизистой кишечника. Несмотря на огромные достижения в современной медицине, доступность инсулинотерапии и синтетических гипогликемических средств, их неспособность восстановить нормогликемию без побочных эффектов вызывает необходимость альтернативного подхода. Всемирная Организация Здравоохранения рекомендовала при диабете фитотерапию как безопасную, эффективную, доступную и недорогую.

Согласно базе данных NAPRALERT (Natural Products Alert) и этноботанической литературе, существуют около 800 видов антидиабетических растений. Многие из этих растений произрастают и на территории Узбекистана, в частности, растения семейств *Amarantus*, *Salvia*, *Rhodiola*, *Ocimum*, *Melissa*, *Phaseolus*, *Geranium*. При этом среди множества исследованных растительных экстрактов наиболее высокую ингибирующую активность проявляют те, что содержат флавоноиды и различные фенольные соединения.

Вместе с тем, эндофитные грибы, обитающие внутри живых тканей растений, способны продуцировать вещества, идентичные или сходные с соединениями растения-хозяина. В этой связи, они считаются многообещающим источником биоактивных фар-

мацевтически значимых вторичных метаболитов, в том числе, обладающих способностью подавлять активность панкреатической  $\alpha$ -амилазы. В частности, исследование гипополипидемической активности различных фракций экстрактов, полученных из мицелия 17-ти эндофитных грибов, выделенных из растения *Salvadora oleoides* Decne (*Salvadoraceae*), показало, что значительное снижение уровня глюкозы в крови вызывают экстракты из двух эндофитных грибов *Aspergillus* и *Phoma*.

В результате проведенных и исследований суммарных экстрактов 35 эндофитных грибов, выделенных из растений *Vinca*, *Allium*, *Ocimum*, *Mentha*, *Melissa*, *Chelidonium* и *Ephedra*, традиционно считающимися способными регулировать уровень глюкозы в крови, установлено, что 80% эндофитных грибов способны ингибировать активность  $\alpha$ -амилазы. При этом 17% исследованных штаммов подавляли активность фермента на 50 – 70 %.

Проведенный скрининг показал для дальнейших исследований 6 штаммов: *Fusarium* sp. – МР11R из корня мяты перечной, эндофиты рода *Alternaria* VE98L и VM119L, выделенные из листьев *Vinca erecta* и *V. minor*, *Aspergillus terreus* – AF104S из стебля и 2 штамма *Penicillium* AF106 и AF120 из луковицы *Allium filideus*.

Полученные и данные свидетельствуют о высоком гипогликемическом потенциале местных штаммов эндофитных грибов и предполагают перспективность исследований с целью создания антидиабетических препаратов.

## ПОИСК ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ-ПЕПТАИБОЛОВ СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA*

Садыхова В.С.<sup>1</sup>, Кураков А.В.<sup>2</sup>, Куварина А.Е.<sup>1,2</sup>, Коршун В.А.<sup>1,3</sup>, Рогожин Е.А.<sup>1,3</sup>, Баранова А.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>НИИНА, Москва

<sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup>Институт биохимии РАН, Москва

<sup>4</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Развитие у возбудителей резистентности к существующим лекарственным препаратам ставит перед современной медициной задачу постоянной разработки новых более эффективных лекарственных средств. Необходимы новые более совершенные и менее токсичные антибиотики, способные преодолеть резистентность и эффективно подавлять развитие микробных возбудителей и опухолевых клеток.

В последние годы во всем мире активно изучается новая группа природных пептидных антибиотиков – пептаибиолов. Это мембранно-активные линейные пептиды, содержащие диалкиламинокислоты и аминокислоты. Они обладают широким спектром действия в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий, фитопатогенных и патогенных грибов, опухолевых клеток и характеризуются низкой токсич-

ностью. Перспективность исследования этой группы обусловлена тем, что к ним практически не возникает резистентность у клеток-мишеней [1–3].

Пептаибиолы синтезируются, в основном, почвенными аскомицетами и их анаморфами из родов *Trichoderma*, *Emericellopsis* и *Fusarium*. У сапротрофных микромицетов синтез таких пептидов связан с механизмами антагонизма, а у фитопатогенных грибов они играют роль сигнальных молекул. Сравнительно недавно появились сведения о выделении пептаибиолов с антимикробной и противоопухолевой активностью из морских грибов – паразитов беспозвоночных [4]. К настоящему времени имеется подробная база пептаибиолов, насчитывающая сведения о 1043 соединениях, из которых более 600 описано для разных видов триходерм [5].

Одним из плодотворных подходов при проведении поисковых исследований продуцентов новых антибиотиков является скрининг изолятов из удаленных и слабо изученных регионов (Сибирь, тропические страны, полярные области, засоленные водоемы, культурные слои археологических раскопов, внутренние ткани растений). Расширение спектра продуцентов, за счет выделенных из ранее не исследованных эконисш микромицетов рода *Trichoderma*, дает неоспоримое преимущество, поскольку значительно повышает вероятность выявления новых уникальных пептабиолов.

**Цель работы** – скрининг продуцентов новых пептабиолов с фунгицидным и антибактериальным действием среди штаммов *Trichoderma*.

**Материалы и методы.** Для исследования были взяты 123 штамма 9 видов *Trichoderma* – *T. asperellum*, *T. viride*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum*, *T. gamsii*. Изоляты этих видов выделены из целинных и окультуренных почв, с поверхности растений, древесных остатков, плодовых тел макромицетов, отобранных из различных компонентов биогеоценозов Сибири, Европейской части России и некоторых южных регионов мира.

Антимикробную активность экстрактов мицелия и культуральных жидкостей (КЖ) штаммов изучали методом диффузии в агар с применением дисков (9 мм) [14]. Грибы выращивали стационарно в колбах на 100 мл на жидкой среде Чапека в течение 14 сут, культуральную жидкость фильтровали через мембранные фильтры на воронке Зейца под вакуумом. Для извлечения антибиотических веществ культуральную жидкость экстрагировали этилацетатом в соотношении 3:1. Полученные экстракты упаривали в вакууме на роторном испарителе Rotavapor-Büchi (Швейцария) при 42 °С досуха, остаток растворяли в водном 60%-ном этаноле и получали спиртовые концентраты. Во всех фракциях – исходной культуральной жидкости, спиртовых концентратах, осадке и мицелии определяли антимикробную активность методом дисков.

Тест-объектами для оценки фунгицидной активности были штаммы патогенных мицелиальных и дрожжевых грибов *Aspergillus niger* INA 00760, *Candida albicans* ATCC 2091, *C. tropicales* INA 00763 и условно-патогенных микромицетов – *A. oryzae* 1К, *A. niger* 2К, *A. fumigatus* 4К, *A. terreus* 4К, *A. fisheri* 3К, *A. flavus* 7К.

Спектр антибактериального действия изучали с использованием в качестве тест-культур штаммы грамположительных бактерий – *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, метициллин-резистентный штамм *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *B. coagulans* 429, грамотрицательных бактерий – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ATCC 8461. Полученный этилацетатный экстракт (К6) перерастворяли в этаноле и очищали с помощью колоночной хроматографии. ОФ-ВЭЖХ анализ и разделение активных фракций после прямофазной хроматографии проводили на полупрепаративной колонке Luna C18 100A размерами 250×10 мм (Phenomenex, США) в линейном градиенте увеличения концентрации подвижной фазы, создаваемый элюентом А (0,1%-ная трифторуксусная кислота

(ТФУ) в воде MQ) и элюентом В (80% ацетонитрил с добавлением 0,1% водной ТФУ) при скорости потока 2,5 мл/мин.

Из всех исследуемых культур 20 штаммов, относящихся к 6 видам *Trichoderma*, проявляли в разной степени антибактериальную и/или фунгицидную активности. Подавляющее большинство экскретировали антибиотические вещества в КЖ, экстракты мицелия были неактивны в отношении тест-микроорганизмов. Антибактериальная активность экстрактов КЖ у отобранных культур триходерм была отмечена в основном в отношении грамположительных бактерий *Bacillus*, в том числе к термофильному кислотоустойчивому *B. coagulans* 429.

Активными в отношении условно-патогенных микромицетов были экстракты штаммов *T. asperellum* (5 штаммов), *T. harzianum* (4 штамма), *T. viride* (2 штамма), *T. citrinoviride* (4 штамма) *T. koningii* (2 штамма), *T. gamsii* (2 штамма) и *T. longibrachiatum* (2 штамма). Рост патогенных дрожжей рода *Candida* подавляли только 9 штаммов, относящихся к 3-м видам: *T. harzianum*, *T. gamsii* и *T. citrinoviride*.

Среди исследованных культур наибольший интерес представлял штамм *T. citrinoviride* Tv4-1, подавляющий рост резистентного золотистого стафилококка, который вызывает наиболее опасные «госпитальные» инфекции и кислотоустойчивого *B. coagulans* 429. Экстракты культуральной жидкости этого штамма характеризовались и максимальной фунгицидной активностью в отношении патогенных видов *C. tropicales* INA 00763 и *A. niger* INA 00760. Величины зоны подавления роста тест-культур достигали 25±2 мм и 28±2 мм соответственно. Кроме того, этот штамм ингибировал рост условно-патогенных микромицетов *A. oryzae* 1К, *A. niger* 2К, *A. fumigatus* 4К и *A. terreus* 4К.

Антибиотический комплекс, продуцируемый этим штаммом, обладает гидрофобными свойствами. Для его первичной очистки использовали силикагель в ступенчатом градиенте увеличения процентного содержания метанола в хлороформе. В результате тестирования на наличие антимикробной активности полученных пяти фракций была отобрана одна фракция (№2), обладающая наиболее выраженными антибиотическими свойствами по отношению к тест-организмам *B. subtilis*, *B. coagulans*, *S. aureus* и *A. niger*.

Оценка цитотоксического действия фракции №2 показала, что она обладает выраженной цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток. При ее добавлении в 10%-ном концентрации степень ингибирования линий опухолевых клеток Colo 357 и ТЗМ4 составила 88,6 и 92,5% соответственно. Такой спектр действия характерен для пептабиолов, механизм действия которых связан с изменением ионных каналов мембран эукариот и прокариот с хорошо развитой клеточной стенкой [2, 5].

Проведение ОФ-ВЭЖХ наиболее активной фракции №2 после прямофазной хроматографии позволило получить профиль, состоящий из 32 основных фракций, которые были собраны вручную. Были выделены 5 индивидуальных соединений (время выхода на 28–32 мин), обладающих фунгицидной и/или антибактериальной активностями.

Индивидуальные соединения №29 и 31 проявляли только антибактериальную активность, соединение №32 обладало только антимикотическим действием, а соединения №28 и 30 характеризовались ингибирующим эффектом по отношению к грибам, и к бактериям.

Сравнение их молекулярных масс (1700–1750 Да) с данными базы пептаиболов (<https://peptai-biotics-database.boku.ac.at/www/index.html>) и базы природных соединений Я. Берди указывает на гомологию этих веществ с пептаиболами. Вещество №31 близко к пептаиболу – трихорзину [6], 4 других соединения не удалось отнести к известным пептаиболам, по-видимому, это новые соединения из этой группы.

#### Список литературы

- Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 87(3): 787–99.
- Reino JL, Guerriero RF, Hernández-Galán R, Collado IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev*. 2008; 7: 89–123
- Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварица А.Е., Порожин Е.А. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири. *Прикл. биохим. микробиол.* 2015; 51(3): 1–9.
- Gal-Hemed I, Atanasova L, Komon-Zelazowska M et al. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(15): 5100–9.
- Stoppacher N, Neumann NK, Burgstaller L et al. The comprehensive peptaibiotics database. *Chem Biodivers*. 2013; 10(5): 734–43.
- Neuhof T, Dieckmann R, Druzhinina I et al. Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma*/Hypocrea: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? *Microbiology*. 2007; 153: 3417–37.

## ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР *GANODERMA LUCIDUM*

Сащенко С.А.

Пензенская ГСХА, Пенза

Многочисленные литературные источники указывают, что важнейшими для роста, развития и размножения базидиальных грибов являются витамины группы В, однако потребности в них у разных видов значительно варьируют [1–3]. В то же время вопрос о значении витаминов в метаболизме и размножении грибов остается недостаточно изученным. Также не обнаружено связи между потребностями в витаминах и экологией грибов.

Значительная часть биотехнологий основана на использовании в качестве продуцентов штаммов грибов и микроорганизмов, выделенных в чистую культуру. Однако длительное культивирование на питательных средах в условиях лаборатории и производства часто связано с утратой ростовой способности, загрязнением посторонней микрофлорой и др. факторами, приводящими к потере штамма.

В качестве субстратов в технологиях культивирования съедобных грибов в основном используются отходы сельскохозяйственного производства и лесопереработки. Низкая питательная ценность соломы, опилок и др. субстратов приводит к замедлению скорости роста мицелия, удлинению технологического цикла и, как следствие, к снижению урожайности и уменьшению экономической эффективности производства.

Многие базидиальные грибы рассматриваются в настоящее время как перспективные продуценты физиологически активных веществ, в частности, *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. синтезирует широкий спектр веществ, которые находят широкое применение в медицине и фармацевтике [4–7]. Как объекты исследования отобраны 3 штамма этого вида, отличающиеся по интенсивности роста. А в качестве витаминной добавки использовали тиамин хлорид

(витамин В1), перидоксин (витамин В6), аскорбиновую кислоту (витамин С), стерильный раствор которых (0,05г/мл) вносили в 250 мл агаризованной среды после стерилизации и частичного остывания [8].

Установлено достоверное увеличение скорости роста при добавлении витаминов В1 и В6 (табл. 1).

Табл 1. Влияние добавления в пшеничный агар водорастворимых витаминов на скорость роста (мм/сут) мицелиальных культур.

Виды грибов	Контроль	Среда с витаминами		
		В1	В6	С
№ С01	8,11	10,92	7,83	6,72
№1	5,27	8,78	7,43	5,44
№3	6,37	10,57	10,05	6,30

Примечание: (6-е сут культивирования; +23° С) НСР 0,5: фактор А (штаммы) – 0,774; фактор В (влияние витаминов) – 0,612.

Причем, наибольший стимулирующий эффект имело использование тиамина (В1), скорость роста наиболее существенно возросла у штаммов № 1 и № 3 в 1,6 раза. У штамма № С01 она увеличилась в 1,3 раза. Менее существенное увеличение скорости роста для штаммов № 1 и № 3 наблюдалось при добавлении в среду пиридоксина (В6) – в 1,4 – 1,5 раза. У штамма № С01 интенсивность линейного роста уменьшилась, но наблюдалось увеличение средней плотности мицелия.

Добавление витамина С не оказало существенного влияния на штаммы №1 и 3 и способствовало снижению скорости роста штамма №С01.

При росте на зерновом субстрате, обогащенном витаминами, мицелиальные культуры также оказались более требовательны к витаминам В1 и В6, которые стимулировали рост мицелия. Добавление в зерновой субстрат витамина В1 существенно стимулировало рост всех взятых в эксперимент штаммов. Добавление витамина В6 существенно увеличило скорость роста только более медленно растущего штамма №1, для других штаммов этот фактор оказался несущественным. Добавление в зерновой субстрат витамина С отрицательно сказалось на скорости обрастания, что можно объяснить понижением кислотности среды. Это дает основание предложить необходимость снижения концентрации этого витамина в дальнейших экспериментах.

Выращивая мицелиальные культуры поверхностно на жидких питательных средах, отмечено положительное влияние на накопление биомассы добавления в питательную среду витамина В1. Менее существенная стимуляция установлена для вариантов с витамином В6. Масса мицелия в опытных вариантах увеличилась в 1,1–1,3 раза, с витамином В6 и в 1,2–1,7 раза с витамином В1. Причем наибольшая стимуляция отмечена для штамма №3. Таким образом, использование сред, обогащенных витаминами В1 и В6, позволяет увеличить скорость накопления биомассы при культивировании мицелия на жидких питательных средах.

Кроме того, на агаризованных средах, обогащенных витаминами В1, регистрировалось образование зачатков плодовых тел. Таким образом, наличие витаминов в питательной среде и субстрате является не только фактором роста, но и условием образования плодовых тел.

Аналогичные результаты были получены при добавлении витаминов в другие природно-органические питательные среды (овсяный и картофельно-глюкозный агар). Однако необходимо отметить, что на менее богатых питательными элементами средах стимулирующее влияние тиамин (витамина В1) было более

выраженным. Тогда как на картофельно-глюкозном агаре скорости роста на средах с витаминами В1 и В6 были сопоставимы между собой, достоверно отличаться от контроля.

При росте на органических субстратах (пшеничная солома, лузга подсолнечника), обогащенных витаминами, мицелиальные культуры также оказались более требовательны к витаминам В1 и В6, которые стимулировали рост мицелия. Показатели скорости роста в варианте с витамином С оказались на одном уровне с контролем. Таким образом, обогащение менее ценных питательных сред и субстратов витаминами В1 и В6 позволяет интенсифицировать рост мицелия и получить результаты сопоставимые с показателями роста на оптимальных питательных средах.

#### Список литературы

1. Fries W. The chemical environment of fungal growth. 3 vitamins and organic growth factors. *The fungal cell*. 1965: 491-523.
2. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. М.: МГУ. 1988: 230 с.
3. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка. 1998: 176 с.
4. Smith JE. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments Glasgow: University of Strathclyde, 2002: 256 p.
5. Краснопольская Л.М. Система скрининга экстрактов базидиальных грибов, обладающих противоопухолевой активностью. Усп. мед. микол. 2005; 5: 192-5.
6. Sliva D. Ganoderma lucidum in cancer research. *Leuk. Res.* 2006; 30: 767-8.
7. Ильина В. Эколого-физиологический потенциал природных изолятов ксилотрофных базидиомицетов. Автореф. дисс. ... д. биол. н. Саратов: Типография Саратовского ун-ва. 2011: 46 с.
8. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии (справочник). Киев: Наукова думка, 1982 – 552 с.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТОВ ЛИПИДНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА

Шарипова Д.А., Копицын Д.С., Барков А.В., Новиков А.А.

Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина, Москва

Одним из наиболее перспективных альтернативных источников энергии, привлекающих всё большее внимание исследователей за последние годы, является биодизельное топливо. Биодизельное топливо представляет собой смесь моноалкиловых эфиров жирных кислот, получаемых при трансэтерификации возобновляемых биологических ресурсов. На сегодняшний день число работ по исследованию возможности получения такого вида топлива из различных возобновляемых природных источников неуклонно растёт. Эти исследования, главным образом, касаются растительных масел, в меньшей степени, животных жиров. Кроме того, в качестве исходного сырья для биодизельного топлива рассматриваются бактерии, водоросли и грибы.

Для получения липидов в основном используют штаммы патогенных низших грибов, либо плодовые тела базидиомицетов, что не технологично [1].

В последнее время исследования посвящены выделению липидов из мицелия, полученного методом погруженного культивирования. Однако несмотря на достаточно высокий выход липидов (около 30%) время культивирования на оптимизированной среде бывает достаточно длительным (до 30 сут) [2].

Таким образом, актуальной является разработка технологии производства биодизельного топлива с использованием базидиальных грибов в качестве продуцентов липидного сырья.

В ходе работы была создана коллекция штаммов базидиальных грибов, выделенных из плодовых тел,

произрастающих на различных природных субстратах.

Проведен скрининг базидиомицетов, нацеленный на выявление штаммов, способных накапливать наибольшее количество липидов, в результате которого было выбрано 15 штаммов базидиомицетов, способных продуцировать не менее 15% липидов на неоптимизированной среде. Наибольший выход липидов (до 21%) показали три штамма: *Fomitopsis pinicola* MT-5.21, *Laetiporus sulphureus* MT-11.01, *Ustilago maydis* MT-22.02. Анализ полученных липидов показал, что они имеют следующий жирнокислотный состав от суммы жирных кислот: C16 : 0 – 18,86%; C18 : 0 – 2,38%; C18 : 1 – 11,03%; C18 : 2 – 45,6%.

В дальнейшем была проведена оптимизация состава питательной среды *Laetiporus sulphureus* MT-11.01, в результате которой на 3-и сут выход липидов составил 30%.

В результате оптимизации произошло изменение жирнокислотного состава в сторону увеличения ли-

нолевой кислоты до 58,8% и уменьшения олеиновой до 8,3%. Таким образом, базидиальные грибы – перспективный объект исследования в области получения сырья для производства биодизельного топлива.

*Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект 14.607.21.0074, уникальный идентификатор RFMEFI60714X0074).*

#### Список литературы

1. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Андрианова Д.А., Феофилова Е.П. Липиды мицелиальных грибов как основа для получения биодизельного топлива. Прикл. биохим. микробиол. 2008; 44(5): 576-81.
2. Громовых Т.И., Иванова И.Е., Шнырева А.И. и др. Исследование токсических свойств штамма Is-06 *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murril L. и оценка перспектив его использования. Пробл. мед. микол. 2012; 15(4): 63-9.

## ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЭКСТРАКТОВ НЕКОТОРЫХ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ

Шнырева А.В.<sup>1</sup>, Бадалян С.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Ереванский государственный университет, Армения

Изучение трутовых грибов, включая полипоровые (порядок Polyporales, отдел Basidiomycota), представляет определенный научный и практический интерес в силу того, что многие их представители способны продуцировать различные биоактивные соединения, обладающие иммуномодулирующим, антибактериальным, антифунгальным, противоопухолевым, противовирусным и другими лекарственными свойствами [1–6].

Исследовали химический состав и лекарственные свойства грибных экстрактов и их фракций, полученных из сухих плодовых тел и мицелия 9 видов (24 штамма) трутовых грибов: *Ganoderma applanatum*, *anoderma adspersum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Piptoporus betulinus*, *Phellinus igniarius* и *Phellinus linteus*.

Водорастворимые полисахариды экстрагировали из сухих плодовых тел и мицелиальной биомассы горячим способом. Выход полисахаридов определяли спектрофотометрически, концентрацию полученных экстрактов доводили до 10 мг/мл. Качественный и количественный состав насыщенных (пальмитиновая, стеариновая, маргариновая), мононенасыщенных (пентадеценовая, пальмитолеиновая, гептадеценовая, олеиновая, эруциновая) и полиненасыщенных (линолевая, α-, γ- и дигомо-γ линолевые, ALA GLA, DGLA и докозадиеновая) жирных кислот в этанольном экстракте мицелия *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma adspersum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius* определяли по методу газ хроматографии [7]. Жирные кислоты, в частности олеиновая и пальмитиновая, известны

своими лекарственными и диетическими свойствами (антибактериальным, антиоксидантным и противоопухолевым действием) [8–9]. Состав жирных кислот имеет также таксономическое значение [10]. У грибов наиболее часто встречаются линолевая, пальмитиновая и стеариновая кислоты [11].

У исследованных коллекций трутовых преобладали ненасыщенные жирные кислоты, особенно пентадеценовая (до 39,85% у *G. lucidum*), которая выявилась у всех исследованных видов/штаммов. Высокие показатели пальмитолеиновой и гептадеценовой кислот (соответственно до 71,32 и 26,24%) были отмечены у *G. adspersum*. Однако для видов *F. fomentarius* и *F. pinicola* характерно также высокое содержание насыщенной стеариновой кислоты (соответственно до 63,4 и 43,01%), чем они отличались от видов рода *Ganoderma*. Этот факт делает дальнейшие исследования, в частности, видов *G. adspersum* и *G. lucidum* перспективными с целью получения новых диетических биотехпродуктов грибного происхождения.

Грибные экстракты были также охарактеризованы по следующим биохимическим показателям: относительно содержанию глюкозы, белков и фенольных соединений. Наиболее активными оказались водные экстракты полисахаридов из сухих плодовых тел видов *Phellinus igniarius* и *Ph. linteus*. Причем, содержание фенолов и сахаров было выше в водных экстрактах из сухих плодовых тел, чем в экстрактах из мицелия.

Была проведена оценка индукции активных форм кислорода (ROS) при обработке опухолевых и здоровых клеток различными концентрациями грибных экстрактов. Экстракты трутовых грибов, полученные

из сухих плодовых тел и которые содержали больше фенольных соединений, индуцировали накопление активных форм кислорода в клетках в концентрациях 10 мкг/мл. Экстракты водорастворимых полисахаридов из мицелия трутовых грибов были менее активны. Мы объясняем факт присутствием в экстрактах из сухих плодовых тел значительных концентраций фенольных соединений.

Антиоксидантную активность грибных экстрактов определяли с помощью DPPH-метода (дифенилпикрилгидразил) и аскорбиновой кислоты в качестве эквивалента. Водные экстракты трутовых грибов как из мицелия, так и из сухих плодовых тел, обладали большей антиоксидантной активностью по сравнению с экстрактами съедобных грибов шампиньона и шитаке. Первичный скрининг противоопухолевой активности грибных экстрактов проводили с помощью ТТ-теста на линиях опухолевых клеток Jurkat и K562.

Клетки обрабатывали экстрактами грибов в концентрациях 10-100 мкг/мл в течение 48 ч. Было показано, что водные экстракты исследованных трутовых грибов (*Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Piptoporus betulinus*, *Phellinus linteus* и *Phellinus igniarius*) вызывали индукцию апоптоза опухолевых клеток линии K562 на 2-е сут инкубирования в концентрации 25 мкг/мл.

Наивысшие значения индекса ингибирования на линиях Jurkat и K562 наблюдали экстрактом *P. betulinus*. Наиболее перспективными для дальнейшего изучения противоопухолевой активности являются трутовые грибы видов *F. fomentarius*, *P. betulinus* и *Ph. igniarius*.

Таким образом, дальнейшие разносторонние исследования биологических особенностей и биотехнологического потенциала трутовых грибов являются перспективными.

*Работа была выполнена при финансовой поддержке Армяно-Российского совместного проекта ГКН МОН Республики Армения № 13AR-110 и РФФИ гранта 13-04-90607.*

### Список литературы

1. Zjawiony JK. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. J Nat Prod. 2004; 67:300-10.
2. Grienke U, Zöll M, Peintner U, Rollinger JM. European medicinal polypores. A modern view on traditional uses. J Ethnopharmacol. 2014; 154: 564-83.
3. Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms. Current perspectives. Int J Med Mushr. 1999; 1: 31-62.
4. Saltarelli R, Ceccarolia P, Buffalini M et al. Biochemical characterization, antioxidant and antiproliferative activities of different Ganoderma collections. J Mol Microbiol Biotechnol. 2015; 25: 16-25.
5. Badalyan SM, Shnyreva AV, Iotti M, Zambonelli A. Genetic resources and cultural characteristics of several medicinal polypore mushrooms (Basidiomycota, Polyporales). Int. J. Med. Mushr. 2015; 17(4).
6. Badalyan SM, Gharibyan NG, Shnyreva AV, Shahbazyan TA. Antifungal activity of Fomitopsis pinicola collections against potentially pathogenic for humans and animals filamentous fungi. ICMBMP8, New Delhi, India. 2014; 93-4.
7. Borchers A, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. Exp Biol Med. 2004; 229: 393-406.
8. Gao P, Hirano T, Chen Zh et al. Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of Ganoderma lucidum (Reishi mushroom). Fitoterapia. 2012; 83: 490-9.
9. Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, Hejaroude GA. Investigation of antimicrobial fatty acids from medicinal conk mushroom Ganoderma applanatum (Pers.) Pat. (Aphyllophoromycetidae) by TLC and spectroscopic detection Int. J Med Mushr. 2008; 10: 149-54.
10. Martinez AT, Barrasa JM, Prieto A, Blanco MN. Fatty acid composition and taxonomic status of Ganoderma australe from Southern Chile. Mycol Res. 1991; 95: 782-4.
11. Reis FS, Pereira E, Barros L et al. Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. Molecules. 2011; 16: 4328-38.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И ПИВНОГО СУСЛА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ LENTINUS TIGRINUS НА СОЛОМЕ

Шутова В.В., Кадималиев Д.А.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева. Саранск. Россия

На рост базидиомицетов и потребление ими целлюлозы и лигнина большое влияние оказывают источники углерода (в сыворотке – лактоза, в сусле – мальтоза) и азота, а также их соотношение [1-2]. Поэтому для интенсификации роста гриба в качестве добавок мы вносили неохмеленное пивное сусло и молочную творожную сыворотку.

Исследовали изменение химического состава пшеничной соломы в процессе биоконверсии грибом *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D.

При культивировании гриб активно колонизировал субстрат во всех вариантах опыта, однако визуально наилучшее обрастание грибом пшеничной соломы

наблюдалось в варианте с пивным суслом. Рост при увлажнении водой был менее интенсивным.

В вариантах с добавлением воды и сусла в первые 10 суток роста наблюдалось незначительное уменьшение массы (рис. 1), к 15 сут потеря веса резко увеличивалась и составляла 16,8 и 23% соответственно. Максимальная потеря массы соломопродукта (34,2%) к 15 сут культивирования была при добавлении молочной сыворотки. Таким образом, азотистые и минеральные вещества сусла и творожной сыворотки интенсифицируют рост *L. tigrinus* на соломе и увеличивают потерю массы субстрата.

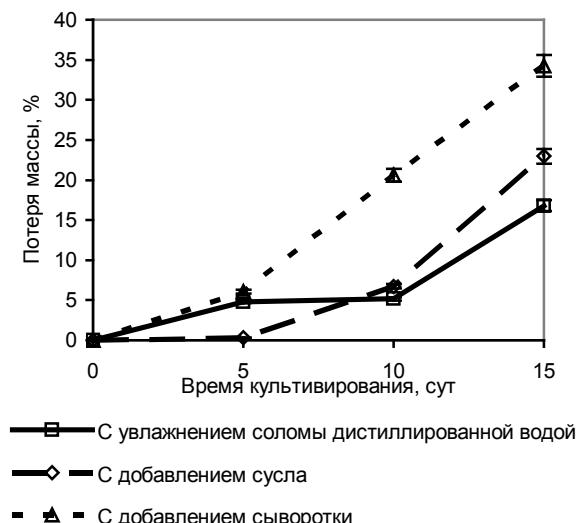


Рис. 1. Потеря массы белковоуглеродного продукта при культивировании *L. tigrinus* на пшеничной соломе

Интенсивное потребление целлюлозы наблюдалось с 5 по 15 сут (рис. 2,А). Самая высокая убыль целлюлозы зафиксирована при добавлении молочной сыворотки, а самая низкая – при увлажнении водой, хотя показатели отличались незначительно. Внесение легко утилизируемых источников углеродного и азотного питания практически не влияло на процесс потребления грибом целлюлозы.

Лигнин представляет собой вещество, которое очень трудно подвергается биодegradации. Грибы белой гнили выделяют внеклеточные неспецифические окислительные ферменты (лигниназы, Mn-зависимые пероксидазы и феноксидазы), которые способны воздействовать на устойчивые связи, присутствующие в молекуле лигнина. К таким грибам относится и *P. tigrinus*. Он выделяет довольно необычный комплекс лигнолитических ферментов, включающий Mn-зависимую пероксидазу и лакказу [3].

Убыль лигнина пшеничной соломы (рис. 2,Б) на начальном этапе культивирования несколько увеличивалась при добавлении молочной сыворотки и пивного сусла. Период активного снижения содержания лигнина наблюдался с 5 по 10 сут культивирования. Максимальная убыль лигнина (38,1%) зарегистрирована в варианте с добавлением пивного сусла.

Наименьшую убыль лигнина мы обнаружили в варианте с добавлением молочной сыворотки. Очевидно, азотсодержащие вещества молочной сыворотки, к которым относятся сывороточные белки, остаточный казеин, свободные аминокислоты, а также небелковые азотистые соединения, подавляют активность лигнинразрушающих ферментов.

Возможно, играет свою роль и слишком высокое для деградации лигнина соотношение углерод: азот. Поскольку лигниновый балласт в кормовых препаратах для сельскохозяйственных животных ухудшает его перевариваемость [4], гриб лучше культивировать на пшеничной соломе в течение 10 сут. В работе [4] при использовании *Phanerochaete chrysosporium* достигнута убыль лигнина в соломе горчицы 47 %, однако сроки биообработки слишком большие (> 35 сут).

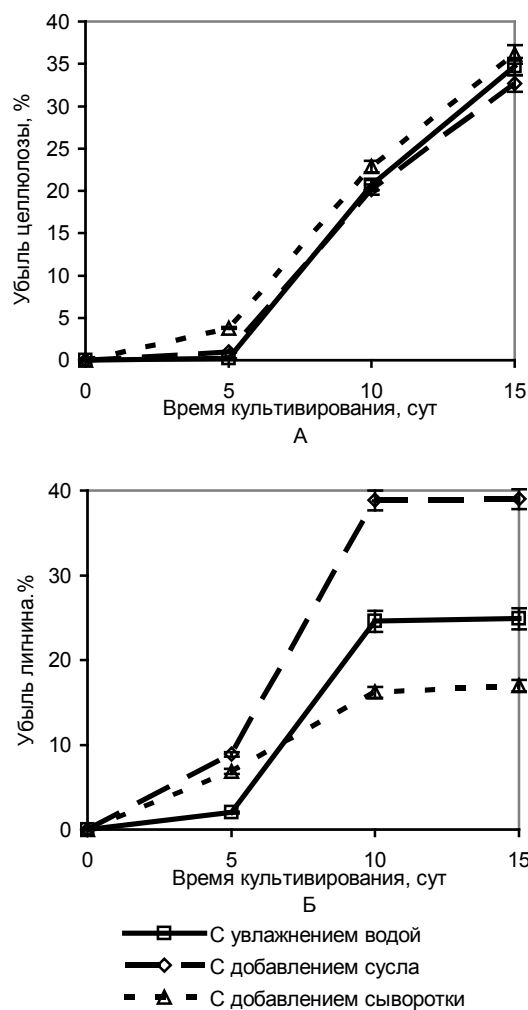


Рис. 2. Потребление целлюлозы (А) и лигнина (Б) при росте *L. tigrinus* на соломе

Низкая перевариваемость растительных материалов для животных зависит от содержания лигнина и целлюлозы. Поскольку по литературным данным их общее количество может достигать 60%, то для повышения питательной ценности соломы необходимо повысить содержание легко гидролизующих полисахаридов (ЛГП) и белка.

В процессе культивирования *L. tigrinus* содержание ЛГП колеблется в незначительных пределах. В 1-м варианте опыта при увлажнении соломы водой концентрация ЛГП несколько снижалась до 10 сут роста, а к 15 сут повышалась до 27,24%. Таким образом, в начале культивирования происходит разрушение ЛГП, затем следует активное разложение целлюлозы, приводящее к освобождению некоторой части гемицеллюлоз и, следовательно, к повышению содержания ЛГП.

При выращивании гриба в вариантах с добавлением сусла и сыворотки к 5 сут их количество резко снижалось. К 15 сут роста базидиомицета содержание ЛГП во всех вариантах опыта становилось примерно одинаковым – 27,1–27,5 %.

Заметный рост культуры, определяемый по накоплению белка, в варианте с добавлением воды наблюдался через 5 сут после посева (рис. 3). Добавки активизировали рост *L. tigrinus*, особенно, молочная сыворотка. Уже к 5 сут количество белка резко повы-



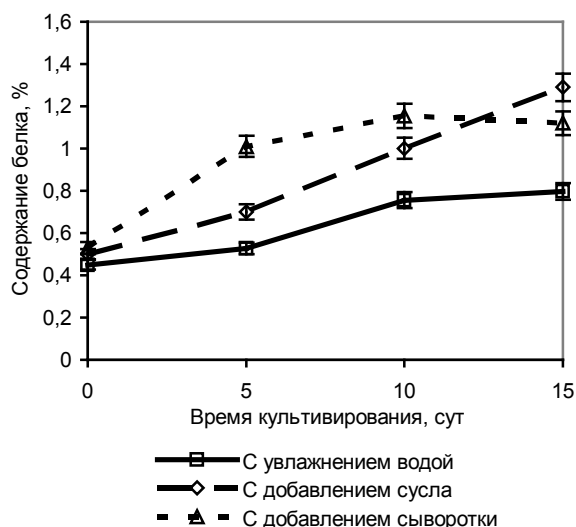


Рис. 3. Динамика накопления белка при культивировании гриба *L. tigrinus*

шалось, а после 10 сут гриб переходил в стационарную фазу роста. Использование сусла приводило к более медленному нарастанию биомассы, однако рост культуры продолжался до 15 сут. Максимальное коли-

чество белка (15 мг растворимого белка/г субстрата) образовывалось при внесении пивного сусла.

Таким образом, питательные вещества сусла и сыворотки, включающие глюкозу, декстрины, азотистые вещества, в том числе пептиды, белки, аминокислоты и витамины, приводят к большему обогащению истинным белком соломопродукта.

#### Список литературы

1. Shrivastava B, Thakur S, Khasa YP et al. White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. *Biodegradation*. 2011; 22(4): 823-31.
2. Yadav JS, Tripathi JP. Optimization of cultivation and nutrition conditions and substrate pretreatment for solid-substrate fermentation of wheat straw by *Coriolus versicolor*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 1991;36(3): 294-301.
3. Шутова В.В., Ревин В.В., Мякушина Ю.А. Влияние ионов меди на продукцию лакказы грибом *Lentinus (Panus) tigrinus*. *Прикл. биохим. микробиол.* 2008; 44(6): 683-7
4. Tripathi MK, Mishra AS, Misra AK et al. Selection of white-rot basidiomycetes for bioconversion of mustard (*Brassica campestris*) straw under solid-state fermentation into energy substrate for rumen microorganism. *Lett Appl Microbiol.* 2008; 46(3): 364-70.

## ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *AUREOBASIDIUM PULLULANS* B5, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ГЛЮКОЗОКСИДАЗУ

Смотровая Н.Г.

Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины, Днепропетровск

Грибы *Aureobasidium pullulans* B5, выделенные из почвы [1], проводили с целью изучения ростовых свойств, получения ферментного комплекса и использования клеток этого штамма в чувствительной части микробного биосенсора для определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях.

Зависимость накопления биомассы *A. pullulans* B5 от содержания источников азота и углерода изучали на средах Сабуро, Чапека-Докса, глюкозо-нитратном агаре, сусло-агаре, агаризованных картофельном, капустном, грибном отварах содержащих глюкозу – 10, 30, 50;  $KNO_3$  – 1, 5, 10 (г/л). На питательных средах, содержащих йодистый калий, – крахмальный индикатор, который реагировал с пероксидом водорода и вызывал появление сине-фиолетового окрашивания, определяли глюкозооксидазную активность штамма. Жидкие питательные среды готовили на основе растительных отваров: капустного, овсяного, грибного (из *Pleurotus ostreatus*). [2].

Ферментный комплекс из клеток *A. pullulans* B5 получали после их ультразвуковой дезинтеграции. Белки лизата осаждали 70%-ным сульфатом аммония, центрифугировали при 10000 g и растворяли в фосфатном буфере pH 7,4. Поглощение кислорода определяли в присутствии глюкозы в термостатированной микрочайке объемом 2 мкл с электродом Кларка. Содержание белка измеряли по методу Бредфорда [3], использовали калибровочные графики для определения концентрации глюкозы в стандартных растворах,

а в дальнейшем – и в сыворотке крови. Для изучения чувствительности клеток *A. pullulans* B5 к глюкозе с твердых сред смывали биомассу, центрифугировали 15 мин со скоростью 6000 g. Затем отмывали клетки фосфатным буфером pH 6,8 при повторном центрифугировании и использовали электрод Кларка и «Biologikal microanalyser» (Венгрия).

При культивировании штамма *A. pullulans* B5 в течение 3-х сут при 26 °C на грибном агаре, содержащем 50 г/л глюкозы, скорость поглощения  $O_2$  была наибольшей. Свойство клеточной суспензии окислять глюкозу пропорционально ее концентрации позволило использовать штамм в чувствительной части микробного сенсора. При сравнении со стандартным препаратом выявлена высокая активность глюкозооксидазы, что позволит использовать этот штамм в дальнейших исследованиях.

#### Список литературы

1. Смотровая Н.Г. Кременчуцкий Г.Н. Выделение штаммов микроорганизмов, обладающих глюкозооксидазной активностью, из окружающей среды. *Микробиол. журн.* 2002; 64(6): 25-31.
2. Кременчуцкий Г.Н., Мединская О.Н. Питательные среды для выделения и идентификации микроорганизмов. Патент № 53270 А РФ. Опубл. 15.01.2003. Бюл. № 1.
3. Практическая химия белка. Под ред. А. Дарбре. М.: Мир. 1989: 611 с.

## ОТРАБОТКА ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА *P. ACULEATUM* 225 В ПОЛУПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Стойко В.И., Айзенберг В.Л.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного, Киев, Украина

Среди ферментов, нашедших практическое применение при переработке растительного сырья, важное место занимают гидролазы, в частности инулиназа (КФ 3.2.1.7).

Возможность использования грибной инулиназы базируются на свойстве этого фермента осуществлять гидролиз инулина и фруктоолигосахаридов. Украина богата дешевым и доступным инулинсодержащим сырьем (топинамбур, цикорий), что является основополагающим в любом производстве. Инулиназа, в свою очередь, может быть использована для получения фруктозы, при приготовлении фруктозо-глюкозных сиропов, в питании больных диабетом, в ряде перерабатывающих промышленных отраслей, при производстве молочной кислоты, этилового спирта и т.д. из растительных инулоносителей.

В Украине отсутствует технология получения инулиназы. Потребности биотехнологической промышленности в ферментных препаратах удовлетворяются за счет ферментов заграничного производства. Поэтому поиск отечественных продуцентов инулиназы и исследование ее важнейших для технологического применения свойств является актуальным заданием.

В качестве продуцента инулиназы использовался штамм гриба *P. aculeatum* 225, селекционированный нами в отделе физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии.

Посевным материалом служила водная суспензия (0,5 мл) конидий гриба ( $2 \times 10^6$  конидий/мл), выращенного на скошенном сусло-агаре в течение 10–14 сут. Посевной материал (инокулюм) получали методом глубинного культивирования продуцента на питательной среде следующего состава, г/л: нитрат калия – 2,0; дегидрофосфат калия – 1,0; сульфат магния – 0,5; хлорид калия – 0,5; сульфат железа – 0,01; жмых топинамбура – 20,0. Инокулюм выращивали в лабораторных условиях на качалках в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со 150 мл питательной среды в течение 48 ч при скорости перемешивания 160 об/мин и температуре  $20 \pm 2$  °С.

Для апробации и отработки в полупроизводственных условиях процесса культивирования гриба *P. aculeatum* 225 с целью получения культуральной жидкости, содержащей инулиназу, использовали ферментационный комплекс КФ 104/3.

В состав комплекса входил блок из 4-х ферментеров объемом 3 л (полезный объем 1,5 л). Управление технологическими параметрами процесса ферментации осуществлялось системой управления QUADRUS, которая позволяет контролировать и (при необходимости) поддерживать на соответствующем уровне основные

технологические параметры биосинтеза (температуру, pH,  $pO_2$ , скорость вращения мешалки) в каждом ферментере отдельно и независимо друг от друга.

В течение ферментации отмечено умеренное пенообразование и необходимость внесения дополнительных химических пеногасителей отсутствовала. процесс культивирования продуцента вели в динамике до трех суток, определяя активность инулиназы через каждые 12 ч.

При отработке процесса культивирования гриба в полупроизводственных условиях проводили в ферментерах различной комплектации:

- 1 ярус мешалки без отбойных пластин;
- 1 ярус мешалки с отбойными пластинами;
- 2 яруса мешалки без отбойных пластин;
- 2 яруса мешалки с отбойными пластинами.

В ходе испытаний нами использованы различные режимы аэрации ( $Q = 0,5 \div 1,2$  об/1 об. к. ж.) и перемешивания ( $n = 100 \div 800$  об/мин) с целью определения оптимального массообмена, как для нарастания биомассы, так и для синтеза инулиназы ( $pO_2 = 20 \pm 5\%$ ,  $pO_2 = 40 \pm 5\%$ ,  $pO_2 = 60 \pm 5\%$ ,  $pO_2 = 80 \pm 5\%$ ).

Среди изученных вариантов самым эффективным оказался процесс, проходивший при следующих условиях: комплектация ферментера включала 2 яруса турбинной мешалки, 4 отбойные пластины, механический пеногаситель, барботер, датчики pH,  $pO_2$  и температуры.

Определены режимы процесса биосинтеза инулиназы в полупроизводственных условиях: температура  $20 \pm 2$  °С, pH в пределах 4,2–5,2, скорость перемешивания 150–180 об/мин, аэрация 0,7 – 1,0 об. воздуха/1 об. к. ж.

$pO_2$  в процессе ферментации равномерно снижалось до 40%, после чего его нужно поддерживать на уровне  $pO_2 = 40 \pm 5\%$ , постепенно повышая расход воздуха и обороты мешалки в ручном режиме или руководствуясь программным регулированием.

За счет оптимизации культивирования в ферментере продолжительность биосинтеза сократилась с 72 до 60 ч.

Установленные технические режимы позволили получить высокоактивный препарат с инулиназой активностью до 40 Ед/мл, что выше показателей активности, полученных при культивировании гриба в колбах на качалках (20–30 Ед/мл) и соответствующих известных зарубежных аналогов.

Ферментеры засевали лабораторным посевным материалом (инокулюмом), выращенным в колбах; количество посевного материала для ферментера составляло 10% к объему питательной среды.

## ВИТАМИНСОДЕРЖАЩИЕ КОМПЛЕКСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Супрун С.М.<sup>1</sup>, Донченко Г.В.<sup>1</sup>, Пархоменко Ю.М.<sup>1</sup>, Харкевич Е.С.<sup>2</sup>, Курченко И.Н.<sup>2</sup>, Степаненко С.П.<sup>1</sup>, Нечитайло Г.С.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, Киев, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ, Киев, Украина

<sup>3</sup>Институт биохимической физики РАН, Москва

Грибной белок по аминокислотному составу близок к животному, от других богатых белком продуктов грибы выгодно отличаются невысокой калорийностью и низким содержанием нуклеиновых кислот, наличием хитина и его комплексов с глюканами, обладающих свойствами сорбентов, что является предпосылкой их использования в качестве продуцентов для получения кормовых, пищевых и лекарственных препаратов [1–4].

В связи с этим изучение условий культивирования микромицетов, способствующих повышению биосинтеза ими биологически активных веществ, разработка биотехнологии получения комплексных препаратов на основе штаммов-продуцентов, а также изучение их действия на животных, не теряет своей актуальности. Проведено изучение особенностей роста и синтеза биологически активных веществ ранее селекционированными штаммами-продуцентами. Содержание жирных кислот и витаминов определяли с использованием стандартных методов [5].

Микромицеты культивировали на синтетической питательной среде Чапека. Получение комплексного препарата осуществляли в условиях глубинного культивирования в колбах Эрленмейера емкостью 0,75 л или в производственных условиях (ПП БТУ-Центр, г.

Ладыжин, Украина) в ферментере емкостью 1,2 м<sup>3</sup> в течение 28–30 ч. Питательную среду стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм в течение 30 мин и засеивали инокулятом (5% об/об).

На основе изучения физиолого-биохимических особенностей штаммов-продуцентов подобраны таммы для получения комплексного препарата *F. sambucinum* ИМВ F-100011 и *Mycelia sterilia* (white) ИМВ F-100014 [6]. Штамм *F. sambucinum* синтезирует и накапливает высокие количества никотиновой кислоты и ее производных, *M. sterilia* (white) – тиамин и его производных, белка. Штаммы синтезируют комплекс незаменимых аминокислот.

Общая сумма аминокислот *F. sambucinum* составляет 27,68 мг/100 мг продукта с преобладанием лизина, лейцина, а у *M. sterilia* – 16,5 мг/100 мг биомассы с преобладанием глутаминовой и аспарагиновой кислот. У штамма *F. sambucinum* идентифицировано 26 жирных кислот, из них преобладают: пальмитиновая (14%), пальмитолеиновая (насыщенные жирные кислоты); из полиненасыщенных – олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая, которые являются предшественниками простагландинов, входят в состав мембран и составляют у данного штамма до 76% от общей суммы липидов (4,2–4,4%) (рис. 1).

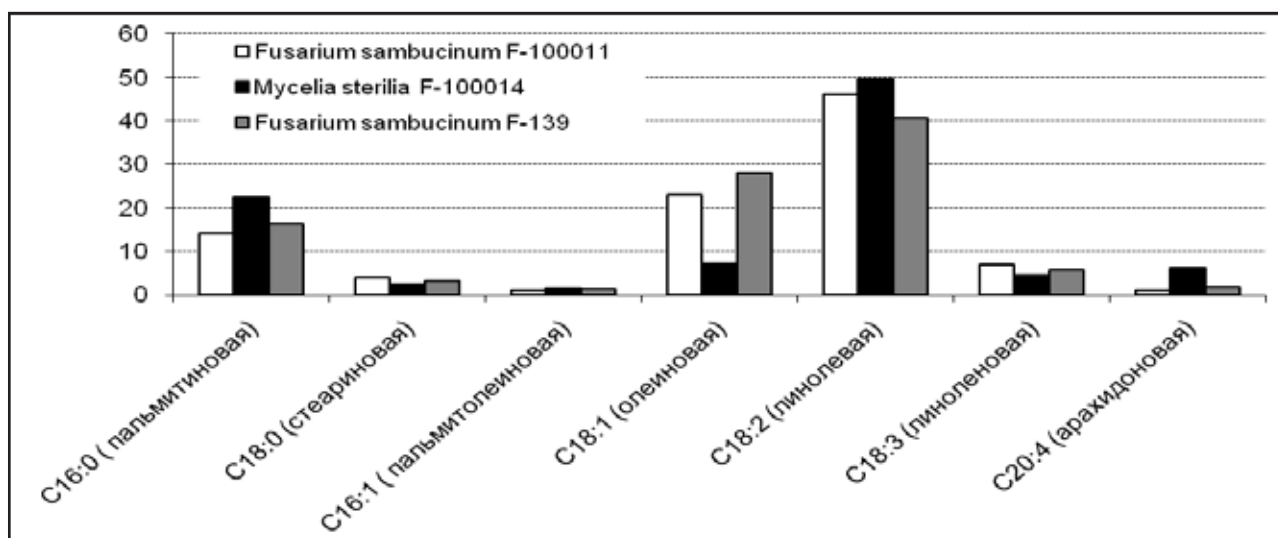


Рисунок 1. Жирнокислотный состав липидной фракции микромицетов (% от общей суммы).

В производственных условиях получена порошкообразная форма препарата на основе комплексной культуры штаммов *F. sambucinum* и *M. sterilia* (white). Полученный препарат является природным комплексом микроэлементов, витаминов, коферментов, незаменимых аминокислот, с преобладанием лизина и аланина. Содержание белка в препарате > 45%.

Изучены штаммы *F. sambucinum* ИМВ F-139 – продуцент кофермента А (CoA), убихинона Q10, *Penicillium sclerotiorum* – β-каротина, *P. vitale* – флавинаденидинуклеотида (FAD). Исследованы условия биосинтеза CoA и FAD штаммами-продуцентами. При добавлении в реакционную смесь предшественников синтеза CoA и FAD их выход значительно увеличивался.

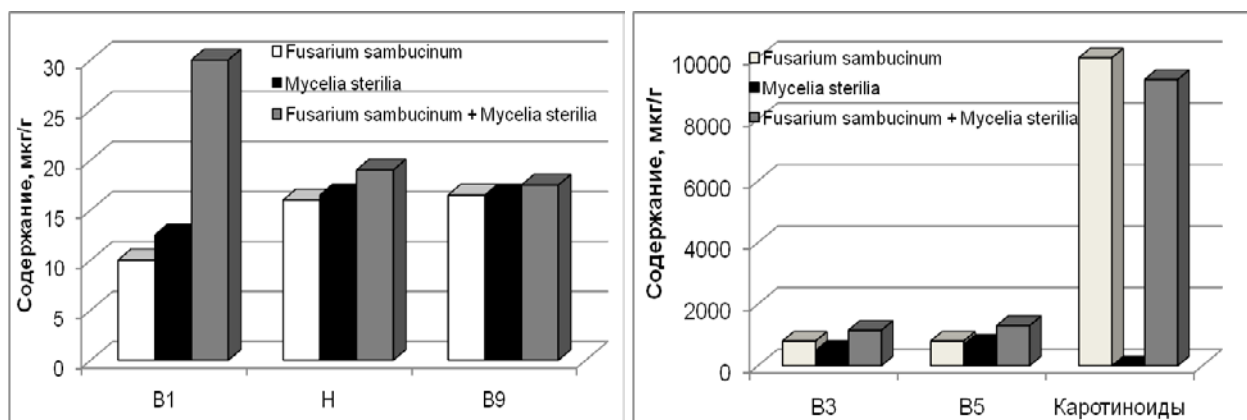


Рисунок 2. Биосинтез витаминов при моно- и совместном культивировании.

Известна способность штаммов микромицетов синтезировать как целую молекулу тиамина, так и ее тиазоловое и пиримидиновое основания. Изучено действие предшественников биосинтеза витаминов и коферментов на их конечный выход. Показано, что введение триптофана в культуральную среду повышает выход никотиновой кислоты, а введение никотиновой кислоты – выход ее коферментной формы никотинамидадениндинуклеотида (NAD) [7, 8].

Отмечено, что при совместном культивировании штаммов возрастало содержание витаминов в мицелии (рис. 2). Доклинические исследования влияния комплексного препарата проведены в опытах на лабораторных мышах, шелкопряде, рыбах, перепелах [9]. Выявлено позитивное действие препарата на рыбоводно-биологические и иммунологические показатели рыб, отмечено снижение зараженности рыб дактилогирусами, а икры карпа – сапролегниозом. Препарат способствовал увеличению прироста живой массы перепелов на 10,6%, а также повышал выживаемость особей. Содержание гемоглобина увеличивалось на 6,2%, возрастала бактерицидная (БАСК) и лизоцимная (ЛАСК) активности сыворотки крови. Введение в рацион препарата способствовало повышению яйценоскости и увеличению содержания витаминов А и В<sub>2</sub> в яйцах перепелок (табл. 1). Доклинические испытания препарата показали улучшение роста животных, их выживаемости, биохимических и иммунологических характеристик крови.

**Выводы.** Селекционированы штаммы микроскопических грибов для моно- и совместного культивирования с целью получения комплексного препарата с высоким содержанием витаминов. Испытание препарата на животных позволяет прогнозировать эффективность его использования как лечебно-профилактического средства для повышения производительных показателей и их природной резистентности. Результаты свидетельствуют о целесообразности применения комплексного грибного препарата в животноводстве.

#### Список литературы

1. Wainwright M. Novel use for fungi in biotechnology. Chem Ind. 1990; 2: 131-4.

Табл. 1. Влияние препарата на содержание витаминов в яйцах перепелок

№ п/п	Варианты опыта	Показатели	
		Витамин А	Витамин В <sub>2</sub>
1	добавка препарата 2%	0,52 ± 0,005	0,97 ± 0,01
2	добавка препарата 5%	0,5 ± 0,003	1,14 ± 0,02
3	Контроль	0,47 ± 0,002	0,73 ± 0,008

- Patent WO 97/22686 GB, C12N 1/08. Fungal food. Naylor TW, Williamson T, Trinci APJ et al; Zeneca limited, GB/GB, Locke TJ. PCT/GB96/03046; 16.12.95; 26.06.1997.
- Феофилова Е.П., Немцев Д.В., Терешина В.М., Козлов В.П. Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования. Прикл. биохим. микробиол. 1996; 32(5): 483-92.
- Феофилова Е.П., Алехин А.И., Гончаров Н.Г. и др. Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных препаратов из мицелиальных грибов М.: Нац. акад. микол. 2013: 152 с.
- Методы экспериментальной микологии. Под ред. В.И. Билай. Справочник. Киев: Наук. думка. 1982: 550 с.
- Спосіб одержання білково-вітамінного продукту на основі грибів *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 і *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014 Г.В. Донченко, Ю.М. Пархоменко, С.М. Супрун и др.; Патент на винахід №90403 Україна, МПК (2009), C12P 39/00, C12N 1/06. Бюл. № 8.: 6 с.
- Гулямова Т.Г., Рузиева Д.М., Супрун С.М. и др. О путях биосинтеза NAD (никотинамидадениндинуклеотида) в клетках гриба *Fusarium sambucinum*. Докл. АН СССР. 1991: 318 (6): 1483-5.
- Гулямова Т.Г., Рузиева Д.М., Супрун С.М. и др. Продуцирование никотинамидадениндинуклеотида некоторыми микромицетами. Микробиол. журн. 1991; 53(3): 25-30.
- Коцюмбас І.Я. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. Львів: Тріада плюс. 2006: 360 с.

## ОТБОР ПЕРСПЕКТИВНЫХ ВИДОВ И ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ИЗ БИОРАЗНООБРАЗИЯ СИБИРИ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ БИОТЕХНОЛОГИИ

Теплякова Т.В.<sup>1</sup>, Косогова Т.А.<sup>1</sup>, Бардашева А.В.<sup>1</sup>, Ананько Г.Г.<sup>1</sup>, Ильичева Т.Н.<sup>1</sup>, Горбунова И.А.<sup>2</sup>, Власенко В.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область

<sup>2</sup>Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск

Спектр фармакологического действия базидиомицетов достаточно разнообразен; известны противовирусное, противоопухолевое, иммуномодулирующее, гепатопротекторное и другие их свойства. Более 200 видов базидиомицетов используются в традиционной медицине Китая, Кореи, Японии и других юго-восточных стран. Грибы имеют большой потенциал для производства биотехнологических продуктов, но в современных биотехнологиях используется только около 5% всех известных грибов.

Микобиота Сибири изучена недостаточно. С увеличением антропогенной нагрузки на экосистемы уменьшается их устойчивость настолько, что появляется опасность исчезновения отдельных видов и целых таксономических групп. Важной задачей является сохранение естественного разнообразия, что может обеспечить интродукция в природу видов, сохраняющихся в коллекциях.

Другой важной задачей является изучение некоторых биологически активных соединений дикорастущих грибов и оценка возможности для создания на их основе противовирусных и противоопухолевых препаратов, что особенно сегодня актуально для независимости России от импорта. В ЦСБС проводится изучение видового, таксономического, экологического разнообразия и ресурсов базидиомицетов лесных местообитаний базидиомицетов Сибири.

В настоящее время только на юге Сибири выявлено более 2000 видов сумчатых и базидиальных грибов, проведена предварительная оценка видового разнообразия съедобных и лекарственных видов [1–3].

В ГНЦ ВБ «Вектор» создана Коллекция чистых культур грибов, включающая 98 штаммов из 49 видов грибов, впервые выделенных на территории Западной Сибири. Показана важность микроскопического контроля грибных культур на наличие микофильных грибов для гарантированного использования в биотехнологии истинных продуцентов базидиомицетов.

В «Векторе» имеются Коллекция вирусов, патогенных для человека, а также Коллекция культур клеток, что делает возможным оценить штаммы грибов на их противовирусную и противоопухолевую активности.

Анализ противовирусной активности 447 образцов (водных экстрактов, полисахаридов, меланинов) из грибов позволил отобрать наиболее перспективные для разработки препаратов природные штаммы, проявляющие противовирусный эффект в отношении

таких патогенов человека, как: вирус иммунодефицита человека 1 типа, вирус простого герпеса 2 типа, вирус Западного Нила, ортопоксвирусов (вируса натуральной оспы, вируса осповакцины, вируса оспы обезьян), вируса гриппа разных субтипов [4–8].

Тринадцать штаммов базидиальных грибов депонированы в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», с которыми проводятся исследования по выделению полисахаридов, белков, меланинов для создания противовирусных и противоопухолевых препаратов.

### Список литературы

1. Власенко В.А., Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А. et al. Изучение противовирусной активности лекарственных грибов рода *Phellinus* s.l. в Западной Сибири. Вестн. АГАУ. 2012; 4(90): 29-31.
2. Зауолкова Н.А., Горбунова И.А. Новые сведения о биоте агарикоидных и гастероидных грибов лесостепных сообществ Северо-Минусинской котловины (Республика Хакасия). *Turczaninowia*. 2013;16(2): 53-61.
3. Горбунова И.А. Биота агарикоидных и гастероидных базидиомицетов дриадовых тундр Алтае-Саянской горной области (Южная Сибирь). *Сиб. экол. журн.* 2014; 21(1): 53-60.
4. Teplyakova TV, Psurtseva NV, Kosogova TA et al. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (Higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia). *Intern J Med. Mushr.* 2012; 14(1): 37-45.
5. Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А. и др. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов. *Пробл. особо опасных инфекций.* 2012; 3(113): 99-101.
6. Разумов И.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И. и др. Протективная активность водных экстрактов из высших грибов при экспериментальной герпесвирусной инфекции у белых мышей. *Антибиот. химиотер.* 2013; 58(9-10): 8-12.
7. Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Ананько Г.Г. и др. Противовирусная активность базидиальных грибов. Обзор литературы. *Пробл. мед. микол.* 2014;16(2): 15-25.
8. Теплякова Т.В., Косогова Т.А. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. *Новосибирск.* 2014: 299 с.

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА МОРФОЛОГИЮ КОЛОНИЙ БАЗИДАЛЬНЫХ ГРИБОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ *TRAMETES*

Титова Л.А., Клечак И.Р.

Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», факультет биотехнологии и биотехники, Киев, Украина

Актуальность исследования морфологии мицелиальных колоний новых штаммов высших базидальных грибов рода *Trametes* Fr. обусловлена широким спектром лекарственных свойств, которыми обладают представители этого рода: противовирусной, антибактериальной, гепатопротекторной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностями, и кроме того, им также характерны высокие показатели роста и отсутствие токсичности [1].

Для представителей рода *Trametes* в условиях роста на различных агаризованных средах характерны следующие типы колоний мицелия: для *T. versicolor* (L.) – ватные и войлочные колонии [2]; для *T. pubescens* (Schumach.) – пушистые, хлопьевидно-шерстистые, войлочные, кожистые колонии [3].

Объектами нашего исследования были 5 видов (29 штаммов) грибов *Trametes* Fr., из Коллекции шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАНУ (ИБК) [4]. Штаммы культивировали на сусло-агаризованной среде с добавлением водного экстракта дубовой коры и без него, агаризованной синтетической среде Норкранс при  $28 \pm 1$  °C.

На каждой питательной среде в процессе роста штаммов описывали цвет, текстуру, плотность, край и реверзум колонии. Анализ характеристик мицелиальных колоний исследованных видов базидальных грибов *Trametes versicolor*, *T. pubescens*, *T. zonatus*, *T. hirsuta* и *T. villosa*, инкубированных на синтетической среде Норкранс, сусло-агаризованной среде с добавлением водного экстракта дубовой коры и без него, позволил обобщить полученные результаты.

В процессе культивирования на исследуемых средах базидальные грибы *Trametes* образовывали следующие основные морфологические типы колоний: (а) мучнисто-войлочные, зональные; (б) шелковисто-пушистые, со временем войлочные; (в) хлопьевидные, с небольшими гифальными пучками, которые поднимаются из агара или воздушного мицелия, с выраженной секторностью; (г) пушистые, бархатистые, со временем войлочные; (д) кожистые.

Отметим, что некоторые исследованные виды образовывали смешанные типы колоний. К примеру, грибы вида *T. versicolor* на сусло агаризованной среде с добавлением водного экстракта дубовой коры и без него образовывали шелковисто-пушистые колонии, которые со временем становились войлочными. Независимо от состава среды у видов *T. zonatus* и *T. villosa* доминировал мучнисто-войлочный смешанный тип мицелиальных колоний.

Вообще, войлочный тип колонии встречался у большинства исследованных видов. Например, коло-

нии *T. versicolor* и *T. pubescens* со временем приобретали войлочный тип колонии, а у *T. zonatus* и *T. villosa* этот тип колонии был смешан с другими типами колоний. Характерной особенностью видов *T. zonatus*, *T. hirsuta*, *T. pubescens*, в отличие от *T. versicolor* и *T. villosus*, было образование с возрастом кожистой пленки на поверхности колонии, которая усложняла процесс пересева мицелия на новую среду. Установлено, что такую пленку колонии *T. hirsutus* образовывали на 7 сут, *T. zonatus* – на 14 сут, а *T. pubescens* – на 20-е сут.

Как правило, колонии исследованных видов в молодом возрасте были белыми, однако со временем большинство из них приобретали другой цвет или оттенок (желтый, светло-кремовый, кремовый или лимонно-желтый). Только на синтетической среде Норкранс колонии 2 штаммов *T. zonatus*, 1 штамма *T. versicolor*, 4 штаммов *T. hirsuta*, 1 штамма *T. villosa* оставались белыми.

Культивирование на сусло-агаризованной среде способствовало образованию наиболее плотных колоний с хорошо развитым воздушным мицелием у *T. zonatus*, *T. pubescens* и *T. versicolor*, а сусло-агаризованная среда с добавлением экстракта дубовой коры такой же влияние оказывала только на *T. versicolor*. На синтетической среде Норкранс у всех исследованных видов, кроме *T. versicolor*, формировались тонкие колонии. Таким образом, вариабельность морфологических характеристик колоний на средах различного состава проявлялась в образовании смешанных типов колоний и изменении плотности колоний.

### Список литературы

1. Горшина Е.С., Скворцова М.М., Бирюков В.В. Технология получения биологически активной субстанции лекарственного гриба кориола опушенного. Биотехнология. 2003; 2: 45-53.
2. Цизь А.М., Бисько Н.А. Рост мицелия лекарственных грибов порядка *Aphyllophorales* на различных средах. Усп. мед. микол. М. 2007; 9: 266-8.
3. Горшина Е.С., Скворцов А.Г. Штамм гриба *Trametes pubescens* С-23 – продуцент эргостерина и препарат, положительно влияющий на тканевый обмен, стимулирующий иммуногенез и способствующий восстановлению нарушенной оксидаз-смешанной функции печени. Пат. № 2323966 РФ, МПК С 12 N 1/14, А 61 К 36/06. Заяв. ООО «Микролек». № 2005134036/13; заявл. 7.11.05; опубл. 10.05.08, Бюл. №13.
4. Бухало А.С., Митропольская Н.Ю., Михайлова О.Б. Каталог колекції культур шапинкових грибів ІБК. К.: Альтерпрес. 2011: 100 с.

## ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ ВОЛНЫ И КОГЕРЕНТНОСТИ СВЕТА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И СИНТЕЗ МЕЛАНИНА *INONOTUS OBLIQUUS* (ACH.:PERS.) PILÁT

Тугай Т.И.<sup>1</sup>, Поединок Н.Л.<sup>2</sup>, Тугай А.В.<sup>1</sup>, Михайлова О.Б.<sup>3</sup>, Негрейко А.М.<sup>4</sup>, Дудка И.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев,

<sup>2</sup>Институт пищевых биотехнологий и геномики НАН Украины, Киев, Украина

<sup>3</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев,

<sup>4</sup>Институт физики НАН Украины, Киев, Украина

Известный меланинсодержащий гриб *I. obliquus* обладает широким спектром лекарственных свойств [1, 2]. Уже известны работы, где исследователи рассматривают этот гриб как перспективный продуцент меланинов и меланинсодержащих субстанций [3].

Пигменты коричневого и черного света вырабатываются клетками многих живых организмов как защитная реакция в ответ на излучения разного вида. Структура меланинов позволяет этим биополимерам перехватывать и рассеивать фотоны и электроны. В результате происходит ослабление энергии облучения и преобразование ее в энергию химических связей. Имеются указания о положительном влиянии освещения в видимой части спектра на интенсивность пигментации разных видов микромицетов.

Данные о влиянии низкоинтенсивного излучения на рост и синтез меланиновых пигментов макромицетами в литературе практически отсутствуют.

Почти нет информации о ферментативной активности *I. obliquus*, включая антиоксидантные ферменты и ферменты, ответственные за синтез пигментов. Меланогенез регулируется ферментами, такими как тирозиназа и полифенолоксидаза [4]. Основные ферменты, которые обеспечивают антиоксидантную защиту клеток и поддержание концентрации активных форм кислорода на физиологическом уровне являются каталазы и пероксидазы, которые трансформируют перекись водорода. Исследование ферментативной активности макромицетов является одним из важных способов понять их физиологические, биохимические особенности для того, чтобы использовать их многообещающий потенциал.

Полученные нами результаты, позволяют утверждать, что низкоинтенсивный свет в видимой части спектра может быть использован в биотехнологии глубинного культивирования *I. obliquus* не только как стимулятор роста, но и как стимулятор синтеза меланина. Использование низкоинтенсивного лазерного излучения в большей степени индуцировало синтез меланина, в сравнении с облучением некогерентным светом (светодиоды).

Облучение посевного материала синим лазерным светом ( $\lambda$  488 нм) увеличивало количество синтезируемого грибом меланина при глубинном культивировании более чем в 2,5 раза, что сопоставимо с результатами полученными другими авторами при использовании в качестве стимуляторов роста и биосинтетической активности ионов меди и предшественников меланиновых пигментов [5]. Изучение динамики накопления меланина показало, что его синтез достигает стационарной фазы после облучения лазером с  $\lambda$  488 нм на 9-е сут, тогда как в контроле и при других режимах облучения на 12-е сут культи-

вирования перехода в стационарную фазу не было отмечено.

Таким образом, облучение посевного материала в указанном режиме позволило не только значительно увеличить выход меланина, но и сократить время культивирования. Максимальную стимуляцию роста, которая выражалась в увеличении накопления биомассы мицелия, вызывало облучение посевного материала синим когерентным светом – 56,9% по отношению к контролю. При этом количество эндомеланина увеличивалось на 250,0%. Облучение некогерентным светом той же длины волны было менее эффективным – увеличение биомассы составляло 17,6%, а эндомеланина – 181,0%. Стимулирующая активность красного света была значительно ниже. Фотоиндуцированное увеличение синтеза экзомеланина, было незначительным и составляло всего 2,5–7,2%.

Проведенный нами сравнительный анализ эффективности облучения посевного мицелия непрерывным и импульсным светом разной когерентности и длины волны показал преимущество использования импульсного света для стимуляции синтеза меланина, что подтвердило данные, полученные различными исследователями на других биологических объектах [6]. Дополнительный стимулирующий эффект от использования импульсного света (67%) отмечали в красном диапазоне длин волн. При облучении инокулюма импульсным светом с  $\lambda$  488,0 нм стимулирующий эффект увеличился на 26% по сравнению с его облучением непрерывным светом.

Изучение влияния низкоинтенсивных кратковременных световых воздействий на активность ферментов, катализирующих синтез меланина, вне- и внутриклеточной полифенолоксидазы и тирозиназы показал значительное изменение уровня их активности у *I. obliquus* во всех вариантах опыта. Максимальный стимулирующий эффект на активность как вне- так и внутриклеточных ферментов оказывал синий когерентный свет. Облучение увеличивало активность внутриклеточных полифенолоксидазы и тирозиназы в 25 и 27 раз, а внеклеточных – в 6 и 2 раза соответственно.

Однако достоверного изменения в соотношении этих ферментов не наблюдается (внутриклеточная тирозиназа: внутриклеточная полифенолоксидаза = 1 : 10). Оба эти фермента принимают участие в синтезе меланина и в норме функционируют взаимосвязано. Очевидно, что для нормального метаболизма существенно сохранение определенного соотношения между активностями этих ферментов. Отмечена положительная корреляция между активностью ферментов, регулирующих меланиногенез и его синтезом.

Синий и красный свет, как из лазерных источников так и светодиодов в разной степени ингибировали активность внеклеточной пероксидазы. Причем некогерентный свет оказывал больший негативный эффект по сравнению с когерентным. В то же время когерентный свет увеличивал активность внутриклеточной пероксидазы в 15–20 раз. Облучение *I. obliquus* когерентным светом, как в синем так красном диапазоне длин волн, напротив, увеличивало активность внеклеточной каталазы в 30 раз по отношению к контролю, тогда как некогерентный свет не вызывал значительных изменений. Световые воздействия в изученных режимах практически не изменяли активность внутриклеточной каталазы.

Установлена зависимость фотоиндуцированной интенсивности синтеза меланина и ферментативной активности гриба *I. obliquus* от концентрации источника азота. Снижение концентрации азота увеличивало стимулирующий эффект НИЛИ с  $\lambda$  488 нм на синтез меланина более чем в 2 раза. Использование питательных сред с пониженным содержанием источника азота оказалось целесообразным для повышения фотоиндуцированного стимулирующего эффекта при получении каталазы, внеклеточной тирозиназы и полифенолоксидазы, внутриклеточной пероксидазы.

На среде с 2 г/л пептона после облучения посевного мицелия светом с  $\lambda$  632,8 нм и 488,0 нм тирозиназная активность, по сравнению с культивированием на среде содержащей 4 г/л пептона, увеличивалась на 42,7 и 65,0% соответственно. На среде с пониженным содержанием азота увеличивалась более чем в 2 раза активность внеклеточной полифенолоксидазы при активации посевного мицелия красным некогерентным светом. Активность внеклеточной каталазы после облучения красным и синим когерентным светом на среде с 2 г/л пептона была выше соответственно в 2,6 и 10,0 раз, чем при культивировании на среде с более высоким содержанием азота.

Анализ полученных данных по эффективности кратковременного облучения посевного мицелия *I. obliquus* светом низкой интенсивности для повышения его биосинтетической активности показал, что использование синего когерентного света в технологии культивирования *I. obliquus* предпочтительно

для стимуляции роста мицелия, синтеза меланина, повышения внеклеточной и внутриклеточной активностей тирозиназы и полифенолоксидазы, а также внеклеточной каталазы.

Красный когерентный свет может эффективно использоваться как для стимуляции роста мицелия так и для повышения внутриклеточной и внеклеточной активности полифенолоксидазы, внеклеточной каталазы и тирозиназы, внутриклеточной пероксидазы. Некогерентный свет в большинстве вариантов наших исследований оказывал меньший стимулирующий эффект на биосинтетическую активность *I. obliquus*.

Однако его применение эффективно и экономически целесообразно при культивировании, направленном на получение меланина, полифенолоксидазы и внеклеточной тирозиназы даже при более низких показателях.

Это обусловлено большей доступностью и энергоэффективностью светодиодов. При культивировании *I. obliquus* параметры и режимы световой обработки посевного мицелия следует корректировать в соответствии целевыми биологически активными компонентами.

#### Список литературы

1. Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). Intern J Med Mushr. 1999; 1(1): 31-62.
2. Wasser SP. Medicinal mushroom science: current perspectives, advances, evidences, and challenges. Biomed J. 2014; 37(6): 345-56
3. Бабицкая В.Г., Щерба В.В. Природа меланиновых пигментов некоторых микро- и макромицетов. Прикл. биохим. и микробиол. 2002; 38(3): 286-91.
4. Chen Q-X, Song K, Qiu L et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by p-alkoxybenzoic acids. Food Chem. 2005; 91(2): 269-74.
5. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Бисько Н.А. Биологически активные соединения съедобных и лекарственных грибов. В сб. научн тр. «Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре». Под ред. С.П. Вассера. Киев: Альтепрес, 2012; 2: 74-344.
6. Посудин Ю. И. Лазерная фотобиология. Киев: Вища школа. 1989: 245 с.

## ШТАММ *GANODERMA LUCIDUM* – НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ КСИЛОМАННА НА КМГЛ, ПОЛИСАХАРИДА С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СВОЙСТВАМИ

Усов А.И.<sup>1</sup>, Краснопольская Л.М.<sup>2</sup>, Автономова А.В.<sup>2</sup>, Шуктуева М.И.<sup>2</sup>, Исакова Е.Б.<sup>2</sup>, Бухман В.М.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

<sup>2</sup>НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

<sup>3</sup>РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва

Базидиальный лекарственный гриб трутовик лакированный *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. известен своей способностью к синтезу биологически активных полисахаридов, обладающих иммуномодулирующими, противоопухолевыми, противовирусными

ми, антиоксидантными, противовоспалительными и другими полезными свойствами.

В связи с этим актуальным является поиск новых высокоактивных полисахаридов и новых штаммов-продуцентов. Ранее в наших исследованиях из



погруженного мицелия штамма *G. lucidum* 5-1 был выделен щелочерастворимый полисахарид ксиломаннан KMGL, установлена его структура и охарактеризованы противоопухолевые свойства [1, 2].

**Цель работы** – оценка способности штамма *G. lucidum* 10 к образованию ксиломаннана KMGL.

В работе использовали штамм *G. lucidum* 10 китайского происхождения. Хранение и культивирование исследуемого объекта проводили в соответствии с ранее описанными методами [3]. Для получения ксиломаннана KMGL использовали погруженный мицелий штамма 10. Выделение, определение состава моносахаридов, установление структуры полисахарида проводили по работе [1].

Противоопухолевую активность выделенных полисахаридов оценивали, используя модели перививаемых мышинных опухолей: лимфолейкоза Р 388 и меланомы В 16 [2]. Водный экстракт погруженного мицелия вводили перорально с помощью внутривентрикулярного зонда в течение 10 сут, начиная с 3 сут опыта. Ксиломаннан KMGL вводили внутримышечно однократно на 3-и сут эксперимента в дозе 2 мг/кг. Штамм *G. lucidum* 10 отличался от штамма 5-1 меньшей скоростью радиального роста на картофельно-глюкозном агаре и агаризованной среде с глюкозой и дрожжевым экстрактом (Serva), в то же время текстура колоний обоих штаммов была сходна.

Уровень накопления погруженной биомассы и длительность процесса погруженного культивирования штамма 10 были близки к аналогичным показателям процесса культивирования штамма 5-1. Изучение трофических потребностей штаммов показало, что штамм 10 по сравнению со штаммом 5-1 хуже рос на средах, в которых источником углерода служил глицерин. Такого различия не было отмечено на средах с другими источниками углерода: глюкозой, лактозой, мелассой, маслом растительным.

Из воздушно-сухого порошка погруженной биомассы, полученной в течение 4-сут культивирования, при последовательной обработке материала были получены водный и щелочной экстракты. Водный экстракт использован для оценки противоопухолевого действия водорастворимых полисахаридов мицелия штамма 10, щелочной – для выделения ксиломаннана KMGL.

Газожидкостная хроматография показала, что в состав полисахарида, выделенного из щелочного экстракта, входят остатки маннозы и ксилозы.

Методом ЯМР-спектроскопии было установлено, что структуры выделенных из мицелия штаммов 5-1 и 10 полисахаридов одинаковы. Главная цепь ксиломаннана состоит из (1-3)-связанных остатков  $\alpha$ -D-маннопиранозы, большая часть которых замещена по положению 4 единичными остатками  $\beta$ -D-ксилопиранозы или дисахаридными остатками  $\beta$ -D-Манр-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Хулр-(1 $\rightarrow$ ).

Водный экстракт погруженного мицелия штамма 10, как показал эксперимент с использованием клеток лимфолейкоза Р 388, обладал достоверной, но невысокой противоопухолевой активностью. Так, торможение роста опухоли на 18-е сут опыта (6 сут после окончания лечения) составило только 43%. Предварительное изучение на модели меланомы В 16 выделенного из штамма 10 препарата ксиломаннана KMGL выявило его высокую противоопухолевую активность. Торможение роста опухоли на 2-е сут эксперимента (8 сут после окончания лечения) достигало 80%.

Установлено, что штамм 10, подобно исследованному ранее штамму 5-1, способен синтезировать ксиломаннан KMGL. Установленный факт и высокая противоопухолевая активность ксиломаннана KMGL обосновывают целесообразность дальнейших работ как по поиску новых высокоактивных продуцентов этого полисахарида, так и по изучению механизма его противоопухолевого действия.

#### Список литературы

1. Евсенко М.С., Шашков А.С., Автономова А.В., Краснополянская Л.М., Усов А.И. Полисахариды базидиальных грибов. Растворимые в щелочи полисахариды из мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Биохимия. 2009; 74(5): 657-67.
2. Усов А.И., Бухман В.М., Автономова А.В. и др. Полисахариды ксиломаннан и фукогалактан из мицелия *Ganoderma lucidum*: получение и противоопухолевые свойства. В сб.: Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии (Мат. VII Межд. конф., Минск, 31 мая – 4 июня 2010 г.). Минск: «Белорусская наука». 2010: 217-9.
3. Автономова А.В., Краснополянская Л.М., Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды для погруженного культивирования *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Микробиология. 2006; 75(2): 186-92.

## БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТАНОЛА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Захарчук Л.М., Татарина Н.Ю.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва.

**Введение.** Этанол находит самое широкое применение в различных отраслях народного хозяйства – химической, пищевой, кондитерской промышленности. Он также является одним из вариантов альтернативного жидкого топлива. Это экологически чистое, малотоксичное топливо, образующее при сгорании

лишь воду и углекислый газ. Наиболее широко этанол в качестве топлива для автомобилей используют в Бразилии. Во многих странах применяется топливная смесь «газохол», содержащая 10–20% этанола и бензин [1, 2]. В начале XX столетия этанол получали в промышленных масштабах путём брожения, но

Таблица 1. Параметры процессов получения биоэтанола в биореакторе с помощью иммобилизованных в разные носители клеток *S. cerevisiae*.

Носитель	Процесс	Исходная-конц. глюкозы, %	Конверсия сахара, %	Достижимая концентрация этанола, об. %	Время удерживания, часы	Продуктивность, мл/л час
Агар	Периодический	15	82,0	6,1±0,9	14,0	4,4
Каррагинан	Периодический	20	88,0	8,8±0,8	13,0	6,8
Криогель ПВС	Периодический	25	99,7	12,4±1,1	11,0	11,3
Криогель ПВС	Непрерывный, 0,1 ч <sup>-1</sup>	25	99,3	14,0±1,2	10,0	14,0
Криогель ПВС	Непрерывный, 0,25 ч <sup>-1</sup>	25	74,0	9,5±1,0	4,0	23,8
Криогель ПВС	Непрерывный, 0,4 ч <sup>-1</sup>	25	62,0	7,7±0,8	2,5	30,8
Криогель ПВС	Непрерывный, 1,0 ч <sup>-1</sup>	25	42,0	5,0±0,6	1,0	50,0
Са-альгинат	Периодический	25	99,9	12,9±0,9	10,0	12,9
Са-альгинат	Непрерывный, 0,14 ч <sup>-1</sup>	25	99,0	13,0±0,7	7,1	18,6
Са-альгинат	Непрерывный, 1,0 ч <sup>-1</sup>	25	45,0	5,4±0,5	1,0	54,0

в дальнейшем до 70% этанола во многих странах, например в США, стали получать с помощью химического синтеза. Это объяснялось высокими ценами на такие субстраты брожения, как сахар и крахмал. Химический синтез этанола осуществляется из этилена при высокой температуре в присутствии воды и катализаторов. Этот процесс теперь из-за высоких цен на нефть и электроэнергию тоже стал очень дорог. Поэтому спиртовое брожение снова стало предпочтительным способом получения этанола.

На спирт перерабатывают любое зерно и картофель, в том числе и непригодные для пищевых и кормовых целей [3]. При этом качество зерна и картофеля, идущих на приготовление топливного этанола, не регламентируется. Таким образом, все некондиционное крахмалсодержащее сырье может быть переработано в биоэтанол. Кроме того, сырьем для получения этанола являются различные сельскохозяйственные и бытовые отходы – меласса, солома, люцерна, трава, бумага [1, 4, 5].

По данным международной энергетической ассоциации, производство биоэтанола в мире в 2020 г. достигнет 100 млн. т. в нефтяном эквиваленте. Значительная потребность в биотопливе делает расширение производства биоэтанола очень перспективным. Одним из направлений работы по интенсификации процесса получения биоэтанола является применение иммобилизованных клеток микроорганизмов-броуильщиков.

**Цель работы** – изучение эффективности применения различных типов биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для периодического и непрерывного получения биоэтанола в специальном биореакторе колонного типа.

**Результаты и их обсуждение.** Одними из главных продуцентов биоэтанола остаются до сих пор дрожжи *S. cerevisiae*. Разработано множество методов иммобилизации клеток дрожжей с применением широкого круга носителей [6–10]. В настоящее время наибольший практический интерес представляют методы иммобилизации клеток включением в гели различных полимеров: Са-альгинат, криогель поливинилового спирта (криогель ПВС), агар, каррагинан, коллаген, полиакриламид и т.п. [7, 11, 12].

Эти методы позволяют достичь более высоких концентраций иммобилизованных в носителе клеток-продуцентов, чем при использовании микроорганизмов в свободных суспензиях, что обеспечивает более высокую продуктивность биотехнологического процесса. Кроме того, включенные в массу носителя клетки защищены от прямого заражения посторонней микробиотой, обладают высокой операционной стабильностью, более высокой устойчивостью к высоким концентрациям этанола, резким изменениям значений pH и температуры [7, 11]. Способ включения клеток дрожжей в полимерную структуру определяется спецификой полимера. Нами были осуществлены процессы иммобилизации клеток специального штамма *S. cerevisiae* в Са-альгинатный гель, криогель ПВС, каррагинан и агар.

Для реализации высокой активности иммобилизованных клеток применен биореактор собственной конструкции колонного типа, содержащий слой гранул соответствующего носителя с иммобилизованными клетками дрожжей. Ферментер представляет собой прозрачную трубчатую колонну из оргстекла. В нижней части колонны находится входное отверстие для поступления питательного раствора, содержащего сахара и минеральные вещества, а в верхней

части имеются 2 отверстия – для выхода углекислоты и слива культуральной жидкости, содержащей этанол. Отверстие для выхода углекислоты также служит пробоотборником в случае периодического культивирования.

Для промышленных периодических процессов получения этанола на основе свободных клеток дрожжей продуктивность по выходу этанола равна 1–10 мл/л час и время полного сбраживания около 5–7 ч при исходной концентрации сахаров в среде 5–10% [5].

В табл. 1 представлены обобщенные данные процессов получения биоэтанола в биореакторе с помощью иммобилизованных в разные носители клеток дрожжей *S. cerevisiae*. Наилучшими носителями оказались криогель ПВС и Са-альгинат. При концентрации глюкозы в среде, поступающей в аппарат, 25%-ная конверсия сахара при использовании иммобилизованных в криогель ПВС-клеток в периодическом режиме составляла 99,7% при достигаемой концентрации этанола 12,4%.

В проточных режимах получения этанола при скоростях протока среды от 0,1 ч<sup>-1</sup> до 1,0 ч<sup>-1</sup> конверсия сахара в этанол с помощью криогеля ПВС уменьшалась с 99,3 до 42% соответственно. Максимальная продуктивность процесса – 50,0 мл/л час достигнута при ведении непрерывного процесса со скоростью 1 ч<sup>-1</sup>.

Сходные данные были получены также при использовании непрерывного процесса со скоростью 0,14 ч<sup>-1</sup> в биореакторе с клетками дрожжей, иммобилизованных в гранулы Са-альгината. При конверсии сахара, достигающей 99,0%, продуктивность процесса составляла 18,6 мл/л час при концентрации этанола на выходе ~13 об.%. При скорости 1 ч<sup>-1</sup> продуктивность процесса достигала 54 мл/л час, однако конверсия сахара не превышала 45%.

Впервые опытно-промышленное производство этанола из 15%-ного раствора тростниковой мелассы с помощью иммобилизованных в Са-альгинатном геле клеток дрожжей было осуществлено в Японии. При этом концентрация этанола на выходе составляла лишь 8,5% при производительности по этанолу около 20 мл/л час [7, 14].

Таким образом, иммобилизация клеток дрожжей в гели таких полимеров, как криогель ПВС и Са-альгинат, дает возможность перейти от периодического процесса получения этанола к непрерывному. Применение непрерывного процесса позволяет получать значительные количества этанола в малом объеме с сокращением затрат на загрузку, обслуживание и мойку биореакторов. Непрерывный процесс может осуществляться при высоких скоростях протока без риска потерять биомассу в результате ее уноса потоком.

Применение иммобилизованных клеток в непрерывных процессах приводит к незначительному содержанию клеток дрожжей в спиртосодержащей жид-

кости и получению высоких концентраций этанола в ней, что позволяет снизить себестоимость отделения клеток и получения конечного продукта в процессах сепарации и дистилляции, а также уменьшить степень загрязнения окружающей среды за счет снижения количества отходов спиртового производства.

#### Список литературы

1. Thomas V, Kwong A. Ethanol as a lead replacement: phasing out leaded gasoline of Africa. *Energy Policy*. 2002; 29: 1133-43.
2. Cardona CA., Sanchez OJ. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Biores Technol.* 2007; 98: 2415-57.
3. Зоров И.Н., Семёнова М.В., Цурикова Н.В., Синицын А.П. Гидролиз пшеничной муки под действием препаратов амилазы и индивидуальных ферментов. *Прикл. биохим. микробиол.* 2006; 42: 700-4.
4. Холл Д., Кумбс Д., Хиггинс И. Энергия и биотехнология. В сб. *Биотехнология. Принципы и применение*. М.: Мир. 1988: 35-86.
5. Яровенко В.Л., Маринченко В.А., Смирнов В.А. и др. *Технология спирта*. М.: Колос. 2002: 464 с.
6. Вудворд Дж. (ред). *Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы*. М. Мир. 1988: 215 с.
7. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. *Иммобилизованные клетки микроорганизмов*. М. Изд-во МГУ. 1994: 288 с.
8. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. *Усп. хим.* 1998; 67(7): 641-55.
9. Baptista CMSG, Coias JMA, Oliveira ACM et al. Natural immobilization of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme Microb Technol.* 2006; 40: 127-31.
10. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рубцова Е.В. и др. Адсорбционная иммобилизация клеток родококков в гидрофобизованных производных широкопористого полиакриламидного криогеля. *Прикл. биохим. микробиол.* 2011; 47(2): 176-82.
11. Ефременко Н.Е., Тагарина Н.Ю. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов. *Микробиология*. 2006; 76(3): 383-98.
12. Plieva F, Galaev IY, Noppe W, Mattiasson B. Cryogel application in microbiology. *Trends Microbiol.* 2008; 16: 543-51.
13. Ефременко Е.Н. Гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М. 2009: 51 с.
14. Кухаренко А.А., Винаров А.Ю. *Безотходная биотехнология этилового спирта*. М.: Энергоатомиздат. 2001: 268 с

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ РОДА *TRAMETES*Зарипова Г.Ф.<sup>1</sup>, Широких А.А.<sup>2</sup>, Широких И.Г.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ, г. Киров<sup>2</sup>НИИСХ Северо-Востока, г. Киров

В настоящее время ведутся активные поиски биологически активных соединений базидиомицетов, в частности, значительный интерес представляет их способность продуцировать антибиотики. Грибы рода *Trametes*, являются продуцентами антибактериальных агентов, наряду с другими ценными лекарственными свойствами [1, 2].

Цель работы – изучение антибактериальных свойств у трех видов грибов *Trametes* – *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *T. suaveolens*, а также выявление возможных штаммовых отличий для вида *T. versicolor* в проявлении антибактериальной активности их жидких метаболитов.

Объектами исследования служили культуры грибов с различным эколого-географическим происхождением. Так, один из штаммов *T. versicolor* и вид *T. hirsuta* были выделены в окрестностях г. Вятские Поляны Кировской области (подзона смешанных и широколиственных лесов). Другой штамм *T. versicolor* изолирован в чистую культуру в окрестностях Кирова (подзона южной тайги). Вид *T. suaveolens* был выделен в культуру в окрестностях Санкт-Петербурга, который находится на стыке двух зон: тайги и зоны смешанных и широколиственных лесов. Его выделение и идентификация всех использованных в работе штаммов выполнены И.В. Змитровичем (БИН, г. Санкт-Петербург).

В качестве тест-культур для определения антибактериальной активности грибов служили следующие штаммы бактерий: *Escherichia coli* K17, *Erwinia rhapontici* ДАГ1-1, *Pseudomonas fluorescens* 540, *Ps.*

*putida* 1608, *Artrobacter mysorens* 7. Бактерии высевали газоном на агаризированную среду РНМ, затем на поверхность посева помещали блочки с мицелием грибов или диски фильтровальной бумаги, пропитанной культуральной жидкостью и этилацетатной фракцией водного экстракта грибного мицелия. Каждый опыт проводили в трех повторениях. После культивирования в течение 3-х сут при 27 °С измеряли зоны ингибирования роста бактерий вокруг агаровых блочков с мицелием или бумажных дисков.

Первоначально для определения антибактериальной активности грибов использовали традиционный метод агаровых блоков, основанный на диффузии метаболитов гриба в агар [3]. На агаризированном пивном сусле, разведённом до 4 град. Балинга, выращивали мицелий исследуемых культур. Посев выполняли точечным уколом в центр чашки, далее культивировали при 27 °С в течение 10 сут. Из периферической части колоний стерильным пробочным сверлом (диаметр сверла 10 мм) вырезали круглые блочки агара вместе с мицелием, которые использовали для тестирования. В этом случае видимых зон ингибирования роста тест-культур бактерий не было возможности выявить из-за пролиферативного роста мицелия базидиомицета, который распространялся на поверхность среды РНМ, создавая вокруг блочка уплотненный мицелиальный валик. Величины предполагаемых зон угнетения роста тест-культур бактерий, соответствующие зонам пролиферативного роста мицелия грибов на бактериальных газонах, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Зоны ингибирования роста бактерий мицелием грибов рода *Trametes*, мм

Культуры грибов	Тест-культуры бактерий				
	<i>E. coli</i> K17	<i>E. rhapontici</i> ДА1-1	<i>Ps. fluorescens</i> 540	<i>Ps. putida</i> 1608	<i>Art. mysorens</i> 7
<i>T. suaveolens</i>	13,7±6,0*	25,3±0,6	0,0	31,0±6,9	12,0±4,0
<i>T. hirsuta</i>	27,7±2,5	22,7±9,3	0,0	22,3±12,4	21,0±5,6
<i>T. versicolor</i> Киров	24,7±8,4	20,7±8,4	0,0	24,7±10,1	15,7±9,3
<i>T. versicolor</i> В-Поляны	28,0±3,5	28,3±9,3	0,0	23,3±5,5	12,0±3,6

\* Здесь и далее статистическую обработку проводили, используя стандартные функции программы Excel.

Величины предполагаемых зон угнетения роста тест-культур бактерий, соответствующие зонам пролиферативного роста мицелия грибов на бактериальных газонах, приведены в табл. 1.

В целом, исследуемые грибы оказывали на грамотрицательные бактерии более сильное воздействие, чем на грамположительный вид *A. mysorens* 7, однако в отношении *Ps. fluorescens* 1608 среди исследованных культур не оказалось антагонистически активных.

На следующем этапе исследовали антибактериальную активность культуральной жидкости, получаемой при культивировании мицелия траметоидных грибов. Грибы выращивали в погруженной стационарной культуре в стеклянных флаконах, вместимостью 400 мл, заполненных на 50 мл пивным сусликом, разведённым до 4 град. Балинга. Среду инокулировали, используя мицелий на агаровых блочках, полученных выше описанным способом. Флаконы в горизонтальном

положении помещали в термостат при 27 °С и инкубировали в течение 30 сут. Биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием. Определяли антибактериальную активность культуральной жидкости методом бумажных дисков.

В результате этой серии экспериментов установлено, что культуральная жидкость, полученная в результате культивирования грибов рода *Trametes* на пивном сусле, не обладала антибактериальной активностью в отношении используемых тест-бактерий. Можно предположить, что изученные штаммы траметоидных трутовиков не синтезируют водорастворимых экзометаболитов с антибактериальной активностью, а ингибирующий эффект в отношении бактерий, наблюдаемый при непосредственном контакте грибного мицелия с бактериями обусловлен иными причинами.

Поэтому в задачу следующего этапа исследований входила экстракция эндометаболитов непосредственно из грибного мицелия и проверка их антибактериального действия. Биомассу выращенного в погруженной стационарной культуре мицелия трутовых грибов заливали 100 мл горячей воды (70 °С) и оставляли на

24 ч. Из полученного водного экстракта проводили концентрирование антибактериальных метаболитов [4]. Для этого из экстрактов каждого штамма отбирали по 15 мл, добавляли этилацетат в соотношении 2:1, смесь интенсивно встряхивали 10 мин и выдерживали при 4 °С в течение 20 ч. Затем этилацетатную фракцию упаривали на водяной бане, полученный осадок разводили в 10%-ном водном метаноле и наносили в объеме 25 мкл на диски фильтровальной бумаги, диаметром 15 мм, которые подсушивали на воздухе, а затем помещали на поверхность среды со свежим газонным посевом тестируемых бактерий. Инкубировали в течение 3-х сут при 27 °С, антибактериальную активность определяли по диаметру задержки роста бактерий вокруг дисков с концентратом.

Этилацетатная фракция водных экстрактов грибного мицелия, в отличие от культуральной жидкости этих же штаммов трутовых грибов, проявила выраженную антибактериальную активность в отношении грамотрицательных тест-бактерий. В то же время, в отношении грамположительной бактерии *A. mysorens* 7 такой активности не отмечено (табл. 2).

Таблица 2. Зоны (мм) ингибирования роста тест-бактерий этилацетатной фракцией водных экстрактов мицелия грибов рода *Trametes*

Культуры грибов	Тест-культуры бактерий				
	<i>E. coli</i> K17	<i>E. rhapsodica</i> ДАГ1-1	<i>Ps. fluorescens</i> 540	<i>Ps. putida</i> 1608	<i>Art. mysorens</i> 7
<i>T. suaveolens</i>	27,0±2,0	18,7±1,2	27,0±1,7	24,7±0,6	0,0
<i>T. hirsuta</i>	27,7±1,2	18,0±1,0	25,0±3,0	22,7±1,5	0,0
<i>T. versicolor</i> Киров	28,0±3,6	19,3±1,2	25,7±1,2	26,7±2,5	0,0
<i>T. versicolor</i> В-Поляны	27,0±2,6	21,0±2,6	25,0±1,0	26,3±2,1	0,0

Таким образом, исследованные грибы рода *Trametes* не выделяют в культуральную жидкость антибактериальных метаболитов. Вещества, проявляющие ингибирующий эффект в отношении грамотрицательных бактерий, связаны с клеточной стенкой мицелия грибов и могут быть экстрагированы из неё горячей водой. Вероятно, они имеют полисахаридную природу и могут проявлять антимицробную активность [5].

Описанный способ получения концентрата этилацетатной фракции водных экстрактов мицелия грибов может быть использован для скрининга штаммов базидиальных грибов, по признаку антибактериальной активности.

#### Список литературы

1. Белова Н.В. Природа биологической активности высших грибов. Усп. мед. микол. 2003; 1: 230-3.

2. Шариков А.М., Ушанова В.М. Антибиотическая активность углекислотных экстрактов гриба трутовика лекарственного *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. Et Sing. Вестн. АГАУ. 2009; 4(54): 42-5.

3. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука. 2004: 528 с.

4. Дьяков М.Ю., Камзолкина О.В., Штаер О.В. и др. Морфологические признаки природных штаммов некоторых видов базидиомицетов и биологический анализ антимицробной активности в условиях глубинного культивирования. Микол. фитопатол. 2010: 225-39.

5. Мурадов П.З., Гахраманова Ф.Х., Гасанова В.Я. и др. Базидиальные грибы как продуценты веществ, обладающих фармакологическими и радиопротекторными свойствами. Усп. мед. микол. 2014. 12: 326-8.

## ВЫЯВЛЕНИЕ БИОМИМЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКОСИНТЕЗИРОВАННОГО ЭЛЕМЕНТНОГО СЕЛЕНА

Цивилева О.М.<sup>1</sup>, Панкратов А.Н.<sup>2</sup>, Цымбал О.А.<sup>2</sup>, Маркин А.В.<sup>2</sup>, Перфильева А.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

<sup>3</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

Органические диселениды и элементный селен, проявляя выраженную противогрибковую и антибактериальную активности [1, 2], обладают высоким потенциалом биомедицинского применения. Поэтому важно понимать химизм подобного действия элементного селена, получаемого путем биотрансформации селеносодержащих соединений с использованием высших грибов.

Ранее была выявлена интенсивно красная пигментация мицелия шиитаке, обусловленная накоплением элементного селена в результате трансформации этим грибом 1,5-дифенил-3-селенпентандиона-1,5 (диацетофенонилселенид, бис(бензоилметил)селенид, препарат ДАФС-25) [3–4]. Полагают, что элементный селен образуется в результате взаимодействия его соединений с остатками незаменимой аминокислоты L-цистеина.

Можно предположить, что введение в глубинную культуру субстанции с высокой реакционной способностью в отношении цистеиновых остатков белков имитирует начальные этапы взаимодействия базидиомицета с посторонней микрофлорой и индуцирует соответствующие ответные реакции гриба. В ряде случаев такие ответные реакции связаны с биопродукцией богатых цистеинами пептидов, обладающих антимикробными свойствами.

Подтверждением права этой гипотезы на существование могут служить выявление и физико-химическая характеристика процессов формирования частиц элементного селена в изучаемых культурах, модельные эксперименты, сравнительные исследования антимикробной активности, доказательство усиленного биосинтеза цистеин-содержащих пептидов с их обнаружением.

Проведен скрининг >20 штаммов коллекционных культур базидиомицетов и продемонстрировано, что биодеструкция органического селенида до элементного Se происходит в погружённых культурах всех изученных грибов. Систематическое положение гриба, состав сред выращивания, величина концентрации вносимого в культуру селенорганического соединения и схема его внесения вносили вклад в различия по скорости развития окрашивания мицелия и интенсивности цвета, варьировавшего от розового до темно-красного. Это наблюдение связано с различиями в геометрических характеристиках сформированных частиц.

Для выяснения форм селена, полученного в мицелии грибов, использовали метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Регистрировали КР-спектры образцов мицелиев макробазидиомицетов, выращенных методом глубинного культивирования на синтетической питательной среде в присутствии препарата ДАФС-25. Исходная концентрация органического селенида составляла  $10^{-4}$  или  $10^{-3}$  моль/л.

Измерения спектров КР проводили с использованием зондовой нанолаборатории Интегра Спектра (НТ-МДТ, г. Зеленоград). Регистрировали также спектры препарата ДАФС-25, L-цистеина, селена серого и красного (полученного *in vitro*). В качестве контрольного образца использовали серый селен (99,99 масс.% Se).

Грибные культуры характеризовались разным соотношением красной и серой модификаций селена, образовавшегося в ходе биодеструкции органического селенида, с преобладанием во всех случаях красной формы Se. Преимуществом нашей методики исследования является возможность детектирования селена непосредственно в мицелии нетоксичного продуцента – съедобного гриба, без предварительной обработки образцов и дополнительной очистки, в том числе и в нативных живых системах.

Для изучения структуры, элементного состава образцов мицелиев применяли метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Mira LMU с приставкой для энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС).

Перед измерениями сухие образцы мицелиев закрепляли специальным образом и напыляли слой углерода для придания лучших токопроводящих свойств образцу. Изучали также водные суспензии *in vitro* синтезированных образцов красного и серого селена после их специальной подготовки. Построение изображений частиц Se проводили путем детектирования электронов, отраженных от образца. С помощью приставки для ЭДРС исследовали распределение химических элементов в изучаемых объектах посредством построения карт распределения сигнала того или иного элемента (картирования).

Необходимым условием осуществления вышеуказанных биотрансформирующих процессов служило наличие свободных (немодифицированных) тиольных групп. В работе изучено влияние моноиодацетата натрия – химического модификатора цистеиновых звеньев пептидов и белков, в системе культивируемого базидиомицета с частицами элементного селена. Согласно энциклопедическим сведениям, моноиодацетат необратимо связывается с тиольной группой цистеина [5]. О влиянии данного модификатора на жизнедеятельность культур базидиомицетов информации не найдено. Соавтором настоящей работы (А.И.П.) ранее обнаружено, что при 26 °С моноиодацетат не ограничивал жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae* [6].

Нами показано, что введение моноиодацетата в экспериментальную схему формирования частиц элементного селена в глубинной культуре базидиомицета приводит к элиминированию наблюдавшихся в отсутствие химического модификатора признаков появления биогенного селена. Выявлена, условно говоря, «минимальная ингибирующая концентрация» моноиодацетата, составлявшая порядка  $10^{-3}$  моль/л.

Очевидно, наблюдали свойство монойодацетата как модификатора тиольных групп.

Одним из наиболее важных требований к характеристикам биогенных частиц элементного селена является их внеклеточная доступность [7]. Бесклеточные экстракты способны стабилизировать наночастицы или служить подложкой для контролируемых сепарационных процессов и получения искомым наноструктур [8].

Показано, что бесклеточная культуральная жидкость, полученная в результате выращивания базидиомицетов в присутствии органического селенида с исходной концентрацией не менее  $10^{-4}$  моль/л, представляла собой суспензию *in vivo* синтезированных частиц красного селена в водном растворе продуктов метаболизма. Разработан способ получения изучаемых биогенных субмикроструктур из изолятов культур базидиомицетов, рассматривается возможность биотехнологического применения выделенных конъюгатов селена.

Дальнейшие исследования предполагается направить не только на дальнейшую характеристику факторов, ответственных за формирование частиц элементного селена, но и за возможность регулирования геометрических и иных параметров биосинтезируемых субмикробразований в биотехнологических целях.

#### Список литературы

1. Pesarico AP, Sartori G, Dos Santos CFA et al. 2,2'-Dithienyl diselenide pro-oxidant activity accounts for antibacterial and antifungal activities. *Microbiol. Res.* 2013; 168(9): 563-8.
2. Shahverdi AR, Fakhimi A, Mosavat G et al. Antifungal activity of biogenic selenium nanoparticles. *World Appl Sci J.* 2010; 10: 918-22.
3. Древко Б.И., Древко Р.И., Антипов В.А. и др. Средство для лечения и профилактики инфекционных заболеваний и отравлений животных и птиц, повышающее их продуктивность и сохранность. Пат. 2171110 РФ. МПК 7 А 61 К 33/04. Заявл. 26.05.1999, № 99111064/13; Оpubл. 27.07.2001. 16 с. Изобретения. Полезные модели. 2001. Бюл. № 21 (II ч.). С. 219.
4. Tsivileva OM, Loshchinina EA, Pankratov AN. et al. Biodegradation of an organoselenium compound to elemental selenium by *Lentinula edodes* (shiitake) mushroom. *Biol Trace Elem Resh.* 2012; 149(1): 97-101.
5. Samgina TYu, Gorshkov VA, Vorontsov EA et al. New cysteine\_modifying reagents: Efficiency of derivatization and influence on the signals of the protonated molecules of disulfide\_containing peptides in matrix\_assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Anal Chem.* 2010; 65(13): 1320-7.
6. Рымарева Е.В., Рихванов Е.Г., Торгашина М.А. и др. Влияние монойодацетата на термотолерантность *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *J Stress Physiol Biochem.* 2008; 4(2): 4-13.
7. Wang T, Yang L, Zhang B, Liu J. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in  $H_2O_2$  biosensor. *Colloids Surfaces. B, Biointerfaces.* 2010; 80(1): 94-102.
8. Dobias J, Suvorova EI, Bernier-Latmani R. Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size. *Nanotechnology.* 2011; 22(19): 195605. doi: 10.1088/0957-4484/22/19/195605

**Для заметок**



**Национальная академия микологии**  
ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

## **СОВРЕМЕННАЯ МИКОЛОГИЯ В РОССИИ**

Current Mycology in Russia

Том 5

Volume 5

Дополнение

Addendum

**Материалы, не вошедшие в том 4.  
Поздние поступления**

**Papers not included to vol. 4.  
Late submissions**

DOI: 10.14427/cmr.2015.v.add

## Содержание Дополнения к тому 4

ГРИБЫ-ГЛОМЕРОМИЦЕТЫ «ПРОЛОЖИЛИ ПУТЬ» СИМБИОТИЧЕСКИМ БАКТЕРИЯМ-АЗОТФИКСАТОРАМ В ТКАНИ РАСТЕНИЙ? Шгарк О.Ю.....	377
МИКРОБИОТА ГИФОСФЕРЫ АГАРИКОМИЦЕТОВ С РАЗНЫМ ТРОФИЧЕСКИМ СТАТУСОМ Сидорова И.И., Александрова А.В., Воронина Е.Ю., Лысак Л.В., Загрядская Ю.А.....	378
ВЛИЯНИЕ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ НА КАТЕГОРИИ ФИТОСАНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ НАСАЖДЕНИЙ В УСЛОВИЯХ МЕГАПОЛИСА Смирнова О.Г., Смирнов А.Н.....	381
ПАТОГЕННАЯ СТРАТЕГИЯ МИКОЦЕНОЗА ЧЕРНОЗЕМА В СВЕКЛОВИЧНОМ АГРОБИОГЕОЦЕНОЗЕ Стогниенко О.И.....	383
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ В ЭВОЛЮЦИОННОЙ ДИНАМИКЕ ФОРМИРОВАНИЯ ЛЕСОВ Стороженко В.Г.....	385
ИЗУЧЕНИЕ МИКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЖИЛЫХ ПОМЕЩЕНИЙ КИЕВА Суббота А.Г., Наконечная Л.Т., Курченко И.Н., Чуенко А.И., Письменная Ю.Б.....	387
СТАБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РЯДА ФАВ (АНТИОКСИДАНТЫ И АНТИБИОТИКИ) НА ЭРИТРОЦИТЫ В УСЛОВИЯХ ГЕМОЛИЗА И МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА Султанова Г.Г.....	390
ПОИСК И ВЫДЕЛЕНИЕ В КУЛЬТУРУ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ИЗ МЕСТООБИТАНИЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Бардашева А.В., Горбунова И.А., Власенко В.А.....	392
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ ТРАНСФОРМАЦИИ МИКОБИОТЫ ПОЧВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕДИ И ГУМИНОВОГО ПРЕПАРАТА Терехова В.А., Акулова М.И., Иванова А.Е., Федосеева Е.В., Пукальчик М.А., Якименко О.С., Шитиков В.К.....	394
ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ НА ПОЛИМЕРНЫХ ПОДЛОЖКАХ ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И ПОЛИЛАКТИДА Тертышная Ю.В., Шибряева Л.С., Бидей И.А., Левина Н.С.....	398
ЗАСЕЛЕННОСТЬ ОКУЛЬТУРЕННЫХ И ЦЕЛИННЫХ ПОЧВ ПРОПАГУЛАМИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОРНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ РАСТЕНИЙ Торопова Е.Ю., Кириченко А.А.....	400
ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ МИКОЛОГИЧЕСКОГО ФОНА В БИОТОПАХ ПОЧВ КАЗАНИ Валиуллин Л.Р., Гатиятуллина А.Ф., Юмангулова Г.М., Обухова О.А., Егоров В.И., Рагинов И.С., Шуралев Э.А., Тремасов М.Я., Иванов А.В.....	402
ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРИБОВ С КАМЕНИСТЫМ СУБСТРАТОМ В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ Власов Д.Ю., Зеленская М.С., Сазанова К.В.....	403
СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ САПРОТРОФНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ВИНОГРАДНИКОВ ЗАПАДНОГО ПРЕДКАВКАЗЬЯ Юрченко Е.Г., Грачева Н.П.....	405
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА ЛОКУСОВ, ФОРМИРУЕМЫХ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ В ЛЕСНОМ БИОЦЕНОЗЕ Загрядская Ю.А., Лысак Л.В., Сидорова И.И., Александрова А.В.....	407
МЕДИЦИНСКОЕ И ЛЕКАРСТВЕННОЕ ЗНАЧЕНИЕ АФИЛЛОФРОИДНЫХ ГРИБОВ В ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ВОСТОЧНОЙ ФЕННОСКАНДИИ Заводовский П.Г.....	409
ВОЗБУДИТЕЛИ ГНИЛЕЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЮГА РОССИИ Жалиева Л.Д.....	411
ДИНАМИКА ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ МОРСКИХ ГРУНТОВ В ЗАЛИВЕ ВОСТОК (ЗАЛИВ ПЕТРА ВЕЛИКОГО, ЯПОНСКОЕ МОРЕ) Зверева Л.В., Борзых О.Г.....	411
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ НЕКРОЗА ВЕТВЕЙ ЯСЕНЯ, ВЫЗВАННОГО ИНВАЗИВНЫМ ПАТОГЕНОМ <i>HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS</i> VARAL ET AL., В ПОДМОСКОВЬЕ И ВДОЛЬ АВТОТРАССЫ М1 Звягинцев В.Б., Баранов О.Ю., Пантелеев С.В.....	413
ИТОГИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ДНК-АНАЛИЗА В ПРАКТИЧЕСКОЙ ЛЕСОПАТОЛОГИИ Шишкина О.К., Сиволопов В.А., Карпеченко Н.А., Шилкина Е.А.....	415

## ГРИБЫ-ГЛОМЕРОМИЦЕТЫ «ПРОЛОЖИЛИ ПУТЬ» СИМБИОТИЧЕСКИМ БАКТЕРИЯМ-АЗОТФИКСАТОРАМ В ТКАНИ РАСТЕНИЙ?

Штарк О.Ю.

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

Грибы-гломеромицеты (ГГ), *Glomeromycota* – уникальная фила облигатно биотрофных грибов, существующая около 500 млн лет [1]. Все представители *Glomeromycota* образуют мутуалистические симбиозы с фототрофными организмами, снабжающими гриб углеводами в обмен на легкодоступные фосфаты, поставляемые грибом [1, 2].

подавляющее большинство ГГ формируют арбускулярную микоризу (АМ) – эндосимбиоз с 80% наземных растений. Арбускулярно-микоризные грибы (АМГ) проникают в глубоколежащие слои коры корня, где образуют разветвленные внутриклеточные структуры – арбускулы, служащие для обмена метаболитами между партнерами [1, 3]. Предполагается, что в древности именно симбиоз с ГГ обеспечил переход растений к наземному образу жизни и в дальнейшем растения эволюционировали в ассоциации с ГГ [1, 4].

Симбиоз с ГГ способствовал развитию у растений специального аппарата для размещения микросимбионта, который был впоследствии использован растениями клады *Eurosoid I* для формирования азотфиксирующих клубеньков [4–6].

Данный обзор затрагивает роль АМ в эволюции азотфиксирующего симбиоза (АФС) бобовых (*Fabaceae*) с альфа-, бета- и гамма-протеобактериями [7–9], имеющими обобщенное название ризобии. Также развивается гипотеза [10], рассматривающая ГГ как возможных переносчиков симбиотических азотфиксирующих протеобактерий в ткани растений, которые впоследствии могли преобразоваться в клубеньковые бактерии (ризобии).

### Механизмы, заимствованные растениями и бактериями из программы развития АМ

Предположения об эволюционном родстве АМ и АФС возникли после обнаружения у мутантов бобовых по развитию клубенька аномальной АМ [11]. Позже было показано, что в результате рецепции растением специфических микробных сигналов запускается общий  $Ca^{2+}$ -зависимый сигнальный каскад, контролируемый одними и теми же симбиотическими генами растений [6, 12, 13]. В процессе развития АМ и АФС в их корнях наблюдается коиндукция около 100 растительных генов [14].

Растения формируют похожие апопластные тубулярные структуры для проникновения АМГ и ризобий и окружают симбионтов сходными мембранами [1, 3, 5, 15, 16]. Оба симбиоза стимулируются флавоноидами и стриголактонами растений [17, 18]. Обнаружены общие механизмы системной регуляции АМ и АФС [19, 20].

Таким образом, предположение о том, что генетическая система бобовых, контролирующая развитие АФС, не возникла *de novo*, а эволюционировала на основе уже существующей программы развития АМ [5, 11, 21], получает все новые экспериментальные подтверждения.

Сигналами АМГ и ризобий являются похожие хитин-подобные молекулы [10; 13, 22]. Поскольку продукция хитина не характерна для прокариотов, предполагается, что древние ризобии могли получить гены синтеза Nod-факторов [13] непосредственно от ГГ и затем передать их другим протеобактериям [10].

### Кооперация гломеромицетов и бактерий

Реликтовый вид ГГ *Geosiphon pyriformis* не образует АМ, а является макросимбионтом в ассоциации с фототрофными азотфиксирующими цианобактериями *Nostoc punctiforme*. Этот симбиоз предлагают как модель для изучения эволюции АМ [1, 2].

В спорах и гифах ГГ, включая *Geosiphon*, обнаружены некультивируемые и вертикально наследуемые внутриклеточные бактерии: Гр (–) палочки (*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*), близкие к *Burkholderia* и Гр (+) кокки, родственные микоплазмам. Так наз. «микориза-хелперные» бактерии обнаруживаются на поверхности спор и гиф АМГ. Бактерии-симбионты ГГ поддерживают их нормальное физиологическое состояние и способны к азотфиксации [23–26].

### Грибы как векторы проникновения азотфиксирующих протеобактерий в ткани растений

Поскольку древние ГГ могли нести как фототрофных, так и гетеротрофных азотфиксаторов, АМ могла образоваться путем объединения древнейших наземных растений с подобными микробными консорциумами. Это привело к утрате ГГ симбиотических цианобактерий, как менее эффективных фотосинтезирующих партнеров, по сравнению с растениями [4]. Поскольку при развитии АМ происходит периодическое разрушение арбускул [1], оказавшиеся в растительных тканях гетеротрофные протеобактерии – спутники ГГ могли высвободиться в цитоплазму.

Это обеспечило условия для отбора бактерий, способных продолжать независимое от гриба существование *in planta*, а также для трансформации бактерий грибной ДНК, содержащей гены синтеза хитин-подобных молекул. На их основе у ризобий мог возникнуть синтез Nod-факторов, которые активируют колонизацию корней бактериями с использованием более древней программы развития АМ.

Таким образом, миграция протеобактерий из предковых АМГ в растения может рассматриваться как способ возникновения «первых» клубеньковых азотфиксаторов. Это может подтверждаться выявлением азотфиксирующих эндосимбионтов АМГ, близких к *Burkholderia* [23, 26, 27] – роду бета-протеобактерий, который включает виды, образующие АФС, преимущественно, с примитивными бобовыми (напр., *Mimosa*) [8]. Для подтверждения этой гипотезы необходимо проведение целенаправленных исследований с использованием тройных симбиотических систем: растение – ГГ – бактерии-спутники ГГ.

Работа выполнена при поддержке РФ (14-24-00135) и РФФИ (13-04-01703).

### Список литературы

1. Смит С.Э., Рид Д. Дж. Микоризный симбиоз. М.: Тов. научн. изд. КМК. Пер. с 3-го англ. изд. 2012: 776 с.
2. Kluge M, Mollenhauer D, Wolf E, Schüßler A. The Nostoc-Geosiphon endocytobiosis. Cyanobacteria in Symbiosis. AN Rai, B Bergman, U Rasmussen (eds.). Kluwer Acad Publish. 2002: 19-30.
3. Genre A, Bonfante P. The making of symbiotic cells in arbuscular mycorrhizal roots. Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Koltai H, Kapulnik Y (eds.) Springer Dordrecht. 2010: 57-81.
4. Проворов Н.А., Штарк О.Ю. Направленная эволюция грибов и растений в симбиотических системах. Микол. фитопатол. 2014; 48(3): 151-60.
5. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Rev Microbiol. 2008; 6(3): 763-75.
6. Markmann K, Parniske M. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? Trends Plant Sci. 2009; 14(1): 77-86.
7. Sprent JI. Nodulation in Legumes. Kew: Royal Botanical Gardens, Cromwell Press Ltd. 2001: 146 p.
8. Balachandar D, Raja P, Kumar K, Sundaram SP. Non-rhizobial nodulation in legumes. Biotechnol Molec Biol Rev. 2007; 2: 49-57.
9. Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martinez-Romero E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. The Prokaryotes. Berlin Heidelberg: Springer. 2013: 427-451.
10. Hirsch AM, Lum MR, Downie JA What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? Plant Physiol. 2001; 127(5): 1484-92.
11. Gianinazzi-Pearson V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. The Plant Cell. 1996; 8(6): 1871-83.
12. D'Haese W, Holsters M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. Glycobiology. 2002; 12(1): 79-105.
13. Oldroyd GED, Downie JA. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Annu Rev Plant Biol. 2008; 59: 519-46.
14. Küster H, Vieweg MF, Manthey K et al. Identification and expression regulation of symbiotically activated legume genes. Phytochemistry. 2007; 68: 8-18.
15. Fournier J, Timmers ACJ, Sieberer BJ et al. Mechanism of infection thread elongation in root hairs of Medicago truncatula and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. Plant Physiol. 2008; 148: 1985-95.
16. Brewin NJ. Plant cell wall remodeling in the Rhizobium-legume symbiosis. Crit. Rev. Plant Sci. 2004; 23: 1-24.
17. Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I et al. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. Molecules. 2007; 12: 1290-306.
18. Foo E, Davies NW. Strigolactones promote nodulation in pea. Planta. 2011; 234(5): 1073-81.
19. Catford JG, Staehelin C, Lerat S et al. Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. J Exp Bot. 2003; 54(386): 1481-7.
20. Staehelin C, Xie ZP, Illana A, Vierheilig H. Long-distance transport of signals during symbiosis: are nodule formation and mycorrhization autoregulated in a similar way? Plant Signal Behav. 2011; 6(3): 372-7.
21. Sprent JI, James EK. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? Plant Physiol. 2007; 144: 575-81.
22. Maillet F, Poinot V, André O et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. Nature. 2011; 469(7328): 58-63.
23. Bonfante P, Anca IA. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. Annu Rev Microbiol. 2009; 63: 363-83.
24. Naumann M, Schüßler A, Bonfante P. The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the Mollicutes. ISME J. 2010; 4(7): 862-71.
25. Lumini E, Bianciotto V, Jargeat P et al. Presymbiotic growth and spore morphology are affected in the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita cured of its endobacteria. Cell. Microbiol. 2007; 9(7): 1716-29.
26. Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol. 2007; 176: 22-36.
27. Estrada-De Los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(6): 2790-8.

## МИКРОБИОТА ГИФОСФЕРЫ АГАРИКОМИЦЕТОВ С РАЗНЫМ ТРОФИЧЕСКИМ СТАТУСОМ

Сидорова И.И., Александрова А.В., Воронина Е.Ю., Лысак Л.В., Загрядская Ю.А.  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Москва

Для понимания процессов, протекающих в ги-  
фосфере и выяснения их механизмов и значения для  
функционирования сообществ в целом, необходимы  
широкие исследования биоты этих специфических  
местообитаний [1]. Исследования микробиологии  
микосферы в мировой литературе посвящены ми-  
коризосфере, реже ги-фосфере свободного мицелия  
симбиотрофов, преимущественно гломеромицетов,

реже – агарикомицетов. Данные о микробиоте ги-  
фосферы агарикомицетов – сапротрофов, особенно  
подстилочных сапротрофов, формирующих большую  
биомассу мицелия в подстилке и играющих ведущую  
роль в процессах деструкции опада в лесных экоси-  
стемах, немногочисленны, что не позволяет провести  
сравнительный анализ ее структуры у двух групп  
грибов, выполняющих фундаментально разные роли

в экосистемах и различающихся как по способу питания, так и лимитирующим факторам развития [2, 3]. Столь существенные различия симбиотрофов и подстилочных сапротрофов позволяют предполагать, что их взаимодействия с другими группами почвенной биоты и отбор в гифосфере конкретных групп микроорганизмов также могут различаться.

Нами проведены исследования микробиоты гифосферы выборки доминантных и частых видов агарикомицетов из групп симбиотрофов и сапротрофов (преимущественно подстилочных), включающей 82 вида, принадлежащих к 40 родам из 27 семейств и 10 порядков (табл.; см. след. стр.).

В выборке были представлены три ведущих семейства микробиоты региона исследований. Образцы почв отбирали в гифосфере в картированных колониях видов на территории Звенигородской биостанции МГУ и стационара Крутицы Института проблем экологии и эволюции РАН (Тверская обл.). Контролем служили образцы, взятые вне колоний. Определяли численность КОЕ культивируемых бактерий и микромицетов путем посева из разведений на стандартные среды.

Анализ массива данных позволил установить существенные различия типов влияния агарикомицетов с разным трофическим статусом на микро- и микробиоту их гифосферы. Большинство видов в той или иной мере влияло на численность КОЕ изученных групп биоты почв и подстилки. Преобладающий тип действия изученных доминантных и частых видов на микробиоту гифосферы – увеличение численности КОЕ бактерий при одновременном снижении численности КОЕ микромицетов (рис. 1).

Однако при сравнении действия на микроорганизмы представителей разных трофических групп

агарикомицетов – симбиотрофов и подстилочных сапротрофов – видно, что среди первых практически отсутствуют виды, не влияющие на микроорганизмы, что же касается подстилочных сапротрофов, среди них довольно высока доля неактивных видов (16%).

Следует также отметить, что среди агарикомицетов – симбиотрофов доля видов, в гифосфере которых обнаружено значимое увеличение численности КОЕ бактерий, значительно превышает таковую у сапротрофов (соответственно 86 и 61% видов), такая же закономерность отмечена и для ингибиторов микромицетов (соответственно 94 и 67% видов).

Еще более четко видны различия между группами, если выделять типы действия на микробиоту на основании сочетания влияния на микромицеты и бактерии (рис. 2).

Если среди симбиотрофов 80% видов принадлежат к основному типу действия (ингибирование микромицетов и стимуляция бактерий), 12% видов ингибируют как микромицеты, так и бактерии, а 2 группы с другими типами действия (ингибирование микромицетов при отсутствии действия на бактерии, стимуляция бактерий при отсутствии влияния на численность микромицетов), представлены немногочисленными видами, у подстилочных сапротрофов при меньшем общем числе изученных видов обнаружено большое разнообразие типов действия на микробиоту.

Здесь выявлены 6 групп с разными сочетаниями влияния на численность КОЕ микромицетов и бактерий, причем группа с основным типом действия включает всего 48% видов. Интересна представленность разных типов действия на микробиоту гифосферы у агарикомицетов с разным трофическим статусом. Так,

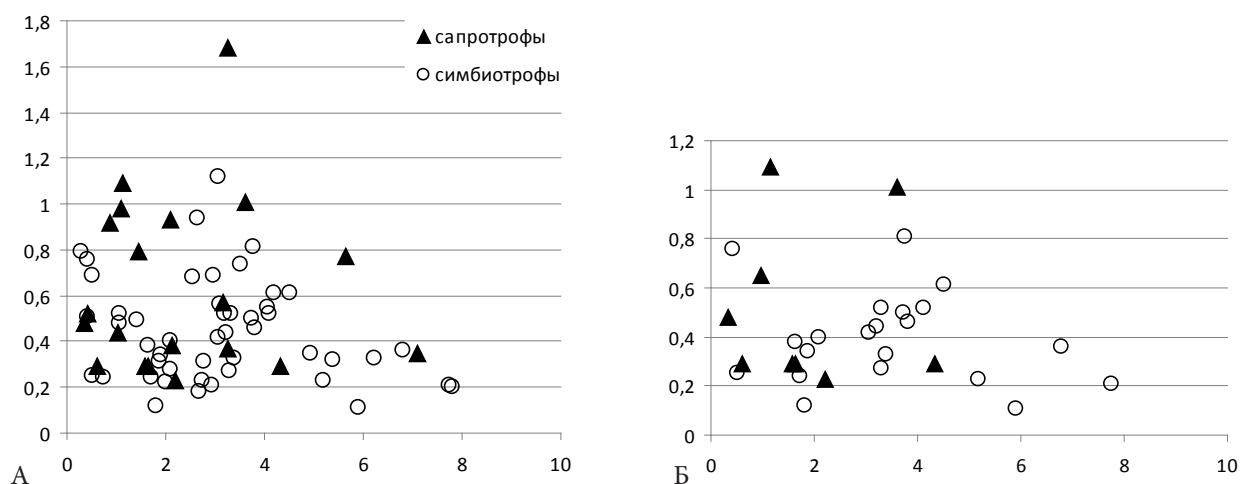


Рисунок 1. Влияние гифосферы агарикомицетов с разным трофическим статусом на численность КОЕ микромицетов и бактерий. А – доминантные и частые виды; Б – доминантные виды.

По оси ординат – индекс влияния на микромицеты, по оси абсцисс – индекс влияния на бактерии (индекс влияния агарикомицетов на численность КОЕ микроорганизмов – отношение численности КОЕ в гифосфере к их численности в контроле).

виды, ингибирующие развитие и бактерий, и микромицетов представлены в этих группах в равных долях – 12%. В группе симбиотрофов отсутствуют виды, не влияющие на микробиоту, а у сапротрофов их доля

достаточно велика (16% видов). В то же время среди сапротрофов в 4,5 раза больше видов, в гифосфере которых сокращение численности КОЕ микромицетов сочетается с отсутствием статистически значимого

## Состав исследованной выборки агарикомицетов

Порядок, семейство	Роды (число видов)
AGARICALES	
Agaricaceae	Agaricus (2), Macrolepiota (1), Lycoperdon (1)
Amanitaceae	Amanita (6)
Cortinariaceae	Cortinarius (5), Hebeloma (1)
Entolomataceae	Entoloma (1)
Hydnangiaceae	Laccaria (1)
Hygrophoraceae	Ampuloclitocybe (1)
Inocybaceae	Inocybe (1)
Mycenaceae	Mycena (5)
Omphalotaceae	Gymnopus (2), Rhodocollybia (1)
Physalacriaceae	Armillaria (1), Strobilurus (1)
Psathyrellaceae	Psathyrella (1)
Tricholomataceae	Clitocybe (4), Infundibulicybe (1), Lepista (4), Tricholoma (2)
BOLETALES	
Boletaceae	Boletus (3), Leccinum (4), Tylopilus (1), Xerocomellus (1)
Paxillaceae	Paxillus (1)
Sclerodermataceae	Scleroderma (2)
Suillaceae	Suillus (2)
CANTHARELLALES	
Cantharellaceae	Cantharellus (1)
Hydnaceae	Hydnum (1)
GEASTRALES	
Geastraceae	Geastrum (1)
GOMPHALES	
Clavariadelphaceae	Clavariadelphus (1)
Gomphaceae	Ramaria (3)
HYMENOCHAETALES	
Hymenochaetaeae	Coltricia (1), Onnia (1)
PHALLALES	
Phallaceae	Phallus (1)
POLYPORALES	
Polyporaceae	Polyporus (1)
RUSSULALES	
Albatrellaceae	Albatrellus (1)
Russulaceae	Lactarius (6), Russula (6)
THELEPHORALES	
Thelephoraceae	Thelephora (2)

влияния на бактерии, и более чем в 2 раза больше видов, стимулирующих развитие бактерий, но не влияющих на микромицеты. Сравнение материалов анализа таксономической структуры сообществ микромицетов в колониях симбиотрофов и подстилочных сапротрофов обнаружило существенные различия в степени их перестройки у этих двух контрастных по типу питания групп.

Если у первых при резком изменении таксономической структуры сообществ бактерий перестройка

группировок микромицетов сводится преимущественно к изменению рангов частот встречаемости и обилия и соответственно этому изменения структуры комплексов, у подстилочных сапротрофов происходит более глубокое их изменение – сокращение числа видов в комплексах, увеличение числа видов с низким обилием среди редких видов, концентрация доминирования, наконец, элиминация из сообществ не только редких видов, но и доминантных представителей комплексов.

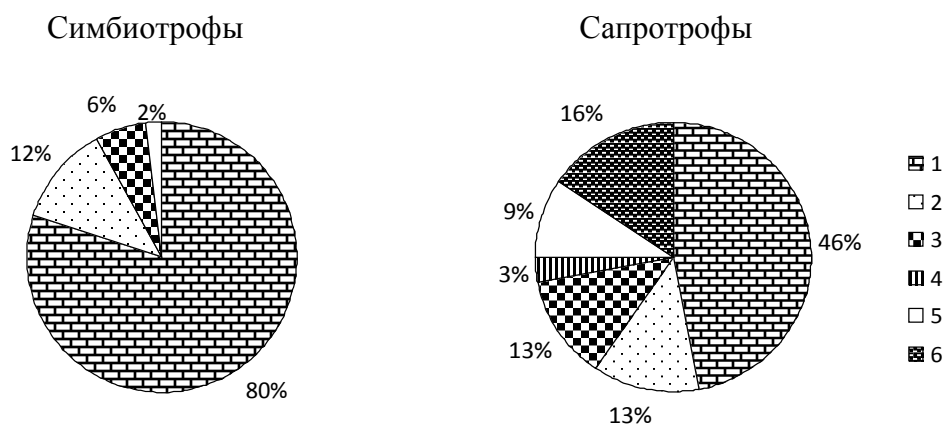


Рисунок 2. Типы влияния агарикоидных базидиомицетов на микробиоту почв: Б – бактерии; Г – микромицеты; + стимуляция; - ингибирование; 0 отсутствие действия: 1 – Б+Г-; 2 – Б- Г-; 3 – Б+Г0; 4 – Б+Г+; 5 – Б0Г-; 6 – Б0Г0

Урофные базидиомицеты, являющиеся доминирующими группами грибов в лесных экосистемах, активно влияют на структуру микро- и микробиоты в их гифосфере, увеличивая гетерогенность микробных сообществ почв и подстилки [4–6], но характер влияния этих трофических групп существенно различен.

Исследования микроорганизмов, обитающих в таких специфических пространственно организованных местообитаниях, как гифосфера почвенного мицелия симбиотрофов и сапротрофов, характеристика таксономической и функциональной структуры их комплексов позволяют оценить гетерогенность микробного населения почв и подстилки и установить механизмы, определяющие структурно-функциональную организацию микробных сообществ в этих местообитаниях.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00468а*

#### Список литературы

1. Timonen S, Marschner P. Mycorrhizosphere concept. Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J (eds.). Microbial activity in the rhizosphere. 2006: 155-72.

2. Lindahl BD, Ihrmark K, Boberg J et al. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytol.* 2007; 173: 611-20.
3. Hobbie EA, Horton TR. Evidence that saprotrophic fungi mobilize carbon and mycorrhizal fungi mobilize nitrogen during litter decomposition. *New Phytol.* 2007; 173: 447-9.
4. Сидорова И.И., Великанов Л.Л. Регуляция высшими базидиомицетами структуры мико- и микробиоты почв и подстилки лесных экосистем. I. Влияние базидиомицетов на численность грибов и бактерий. *Микол. фитопатол.* 1997; 31(4): 20-6.
5. Александрова А.В., Великанов Л.Л., Бубнова Е.Н. и др. Влияние мицелия симбиотрофных базидиомицетов на таксономическую структуру сообществ почвенных микромицетов. *Микол. фитопатол.* 2005; 39(6): 17-28
6. Сидорова И.И., Александрова А.В., Воронина Е.Ю. Микробиота гифосферы агарикоидных базидиомицетов – подстилочных сапротрофов и симбиотрофов. Сб. мат. в V межд. конференции «Изучение грибов в биогеоценозах». Пермь. 2009: 239-43

## ВЛИЯНИЕ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ НА КАТЕГОРИИ ФИТОСАНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ НАСАЖДЕНИЙ В УСЛОВИЯХ МЕГАПОЛИСА

*Смирнова О.Г., Смирнов А.Н.*

*Российский государственный аграрный университет-МСХА им. К.А. Тимирязева*

Важным показателем фитосанитарного состояния древостоя является наличие древесных пород, пораженных трутовиками, которые сильно ослабляют, а также приводят к гибели древостою. Категория санитарного состояния деревьев необходимо использовать при характеристике древостоев, так как она является комплексным показателем, учитывающим состояние фотосинтезирующих органов, кроны и пораженность древесного растения.

Обследование территории парка «Пойма р. Яуза» в Северном Медведково, выявил единичное поражение ивы козьей трутовыми грибами. Ива козья, ольха черная, рябина обыкновенная, ясень, вяз гладкий. Среди изученных древесных пород выявили усохшие экземпляры, относящиеся к 5 и 6 категориям санитарного состояния (рис. 1). На исследуемой территории больший процент усохших древесных пород выявлен у клена полевого, вяза гладкого и ясеня.



Рисунок 1. Диаграмма встречаемости усохших древесных пород на территории парка «Пойма р. Яуза» в Северном Медведково.

Порядка 25% насаждений улицы Тимирязевская, а также пересечение улиц Тимирязевская и Дубки поражено трутовиком настоящим, что обусловлено высоким уровнем стояния грунтовых вод.

Обследование территории ЛОД выявило 10 видов трутовых грибов: чага (березовый гриб, трутовик скошенный) (*Inonotus obliquus* (Pers.) Pil.), трутовик березовый (березовая губка) (*Piptoporus betulinus* (Bull. ex Fr.)), трутовик настоящий (*Fomes fomentarius* (L. ex Fr.)), трутовик окаймленный (*Fomitopsis pinicola* (Sow. ex Fr.)), трутовик ложный (*Phellinus igniarius* (L. ex Er.)), дедалеопсис бугристый (*Daedaleopsis confragosa* (Bolt. ex Fr.)), кориолус *Coriolus*, стереум *Stereum*, трутовик плоский (*Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.)), вешенка (*Pleurotus* sp.). В большей степени была поражена береза, в меньшей – хвойные породы.

На березе такие виды трутовых грибов, как трутовик настоящий и трутовик березовый, следует признать доминирующими, вызывающими разрушения березовых насаждений (табл. 1).

Результаты нашего исследования показали, что на 50% точках наблюдения были зафиксированы поражения древесных пород эпиксилными древоразрушающими грибами, что говорит о высокой степени пораженности древесных пород исследуемой территории. Кроме того, в залежах валежника было обнаружено довольно большое количество разнообразных древоразрушающих грибов с распростертыми по стволу плодовыми телами.

Сравнение с материалами лесотаксационного обследования ЛОД (Проект организации и ведения лесного хозяйства..., 1988) показало, что в течение 1990-х и 2000-х годов вырос уровень поражения древесных пород, особенно березы трутовыми грибами (настоящим и березовым трутовиками). Напротив, очагов корневой губки и смоляного рака сосны, а также опенка в нашем исследовании не выявили.

На исследуемой территории при определении категорий состояния древесных пород, выявили деревья 5 и 6 категории – свежий и старый сухостой. Среди

Таблица 1. Приуроченность трутовых грибов к древесным породам ЛОД РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева

Древоразрушающие грибы	Латинское название	Поражаемая древесная порода	Название болезни
Чага (березовый гриб, трутовик скошенный)	<i>Inonotus obliquus</i> (Pers.) Pil.	Береза повислая	Белая ядровая стволовая гниль
Трутовик березовый (березовая губка)	<i>Piptoporus betulinus</i> (Bull. ex Fr.)	Береза повислая	Красно-бурая ядрово-заболонная стволовая гниль
Трутовик настоящий	<i>Fomes fomentarius</i> (L. ex Fr.)	Береза повислая	Белая мраморная ядрово-заболонная стволовая гниль
Трутовик окаймленный	<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sow. ex Fr.)	Береза повислая, сосна обыкновенная	Светло-бурая ядрово-заболонная стволовая гниль
Трутовик ложный	<i>Phellinus igniarius</i> (L. ex Er.)	Дуб черешчатый	Белая ядровая стволовая гниль
Дедалеопсис бугристый (пластинчатый)	<i>Daedaleopsis confragosa</i> (Bolt. ex Fr.)	Дуб черешчатый	
Кориолус; Стереум	<i>Coriolus</i> spp.; <i>Stereum</i> spp.	Береза повислая, сосна обыкновенная	Белая ядрово-заболонная гниль
Трутовик плоский	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers. ex Wallr.)	Береза повислая	Белая ядрово-заболонная корневая и комлевая гниль
Вешенка	<i>Pleurotus</i> sp.	Береза повислая	



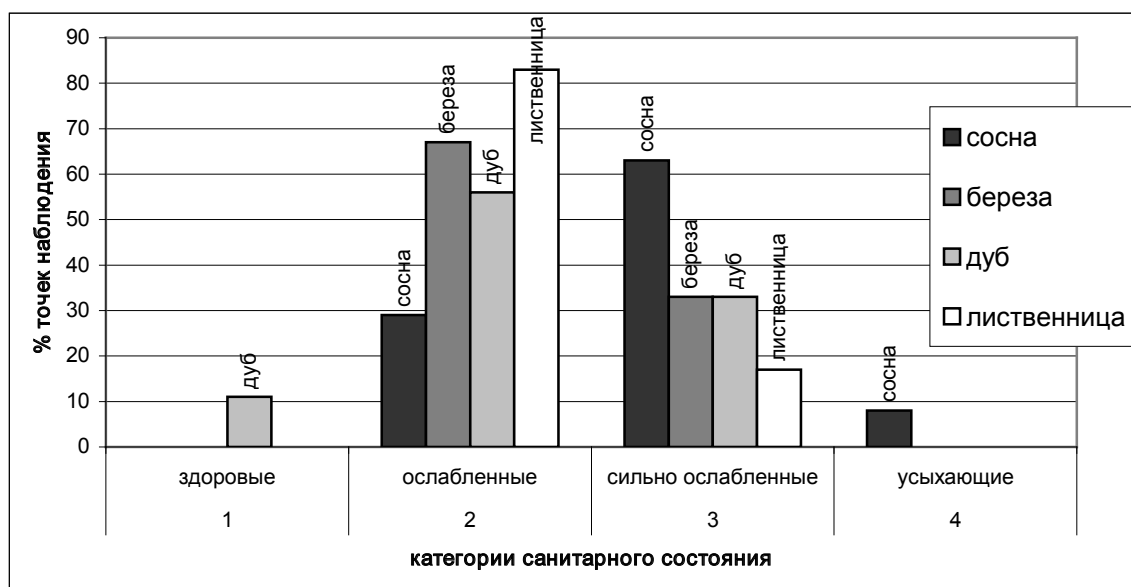


Рисунок 2. Распределение категорий санитарного состояния среди древесных пород (% – от количества точек наблюдения с преобладанием данной породы)

древесных пород, попавших в 5 и 6 категории, оказались береза, сосна и липа.

Распределение категорий санитарного состояния среди древесных пород, следующее (% – от количества точек наблюдения с преобладанием данной породы): 1 категория санитарного состояния – в 11% дубовых древостоях; 2 – в 83% лиственничных, 67% березовых, 56% дубовых, 33% сосновых древостоях; 3 – в 63% сосновых, 33% березовых, 33% дубовых, 17% лиственничных древостоях; 4 – в 11% сосновых древостоях (рис. 2).

Таким образом, основное количество точек наблюдения находится в ослабленном или сильно ослабленном состоянии, причем в сильно ослабленном состоянии находится сосновые, березовые и дубовые древостои. Характерно, что на точке наблюдения могло быть обнаружено небольшое количество деревьев, пораженных трутовыми грибами, но за счет этого

категория санитарного состояния древостоя точки наблюдения ухудшалась. Об этом свидетельствует большое количество точек наблюдения, отнесенных к 3-й и 4-й категориям санитарного состояния. В целом, фитосанитарное состояние древостоя территории ЛОД можно охарактеризовать как удовлетворительное.

Таким образом, в условиях мегаполиса неблагоприятная экологическая обстановка провоцирует ухудшение фитосанитарной ситуации древостоев. В таких условиях на фоне ослабления состояния древесных пород вероятны вспышки развития патогенов трутовых грибов, демонстрирующих толерантность по отношению к неблагоприятным факторам окружающей среды. Насаждения подвергаются воздействию антропогенной нагрузки, увеличение которой повлечет ухудшение санитарного состояния древостоев, их устойчивости и приведет к сильной степени деградации исследуемых территории в условиях мегаполиса.

## ПАТОГЕННАЯ СТРАТЕГИЯ МИКОЦЕНОЗА ЧЕРНОЗЕМА В СВЕКЛОВИЧНОМ АГРОБИОГЕОЦЕНОЗЕ

Стогниенко О.И.

Всероссийский НИИ сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова, Рамонь

В последние пять лет эпифитотии корневых гнилей не только сахарной свеклы, но и зерновых культур [1], обусловленные воздействием комплекса факультативных паразитов и биотрофных грибов на фоне экстремальных погодных условий, приводят к огромным потерям в связи со сложностью прогнозирования и разработкой превентивных защитных мероприятий на текущий сезон.

Почвенные грибы – это деструкторы растительного опада, пищевой базой которых являются растительные остатки, а при их отсутствии и сами растения. При изменении в фитоценозе, микоценоз

почвы начинает адаптироваться в направлении повышения приспособленности сообщества грибов к изменившимся условиям.

Стратегии адаптации микоценозов, разработанные для ксилотрофных грибов в лесном фитоценозе [2] носят, на наш взгляд, всеобщий характер и применимы для микоценоза почвы под культурными растениями. Стабильное состояние микоценоза почвы наблюдается под естественной для конкретной местности растительностью. Весь растительный опад возвращается и разлагается почвенными грибами. Разнородность пищевой базы для почвенных грибов в ненарушенных

степных почвах способствует большому их видовому разнообразию. В выщелоченном черноземе насчитывается до 250 видов грибов [3], в структуре популяции которых нет явных доминант. Все грибы при этом ведут сапротрофный образ жизни.

При распашке степей и использовании их в сельском хозяйстве для выращивания культурных растений сокращается видовое разнообразие последних, а продукция растениеводства полностью или частично изымается из оборота. Это приводит к снижению (количественному и качественному) пищевой базы для почвенных грибов. Для микоценоза последствия выражаются в уменьшении общей численности особей, снижении видового разнообразия, упрощении структуры сообщества и, следовательно, снижении устойчивости. Приспособлением почвенных грибов к таким условиям является стратегия угнетения.

В классических 9–10-польных зерно-паро-пропашных севооборотах с внесением навоза видовой состав грибов чернозема выщелоченного под сахарной свеклой представлен 70–100 видами, среди них доминирующих – 20–30 [4,5]. При соблюдении агротехники возделывания микоценоз может оставаться в таком состоянии очень долго без изменений.

Неблагоприятные экономические условия, узкая специализация сельскохозяйственных предприятий, снижение поголовья КРС привели к тому, что сахарную свеклу стали возделывать в короткоротационных севооборотах (3–4-польные) без внесения органических удобрений. В результате происходит банализация микоценоза почвы вследствие резкого сокращения разнообразия пищевой базы и увеличения количества однотипных субстратов, ведущая к упрощению структуры сообщества. Микоценоз в таком состоянии характеризуется малым видовым разнообразием (10–20 видов), со значительным обилием малоспециализированных видов. В таких условиях из-за недостаточного разнообразия пищевой базы для почвенных грибов, часть из них начинают в качестве пищевого субстрата использовать живые растения, вызывая специфичные гнили сахарной свеклы: фузариозная, ризоктониозная.

Микологический мониторинг почв производственных посевов сахарной свеклы в Центрально-Черноземных областях в 3–4-польных севооборотах без внесения навоза выявил бедный видовой состав (10–20 видов *Penicillium* Link. ex Fr., *Aspergillus* Mich. ex Fr., *Fusarium* sp. Lk.:Fr.), отсутствие *Mucor* sp. *Micheli emand.* Ehrenb., доминирующими повсеместно являлись *Penicillium* sp., *Fusarium* sp.. Частота встречаемости *Fusarium solani* (Mart) App. et Wr., *F. oxysporum* Schlecht. emand. Snyd. et Hans. достигала 60–100%, они же и вызывали массовые фузариозные гнили и увядания.

Сообщество почвенных грибов может находиться в состоянии банализации до тех пор, пока деятельность таких видов рода *Fusarium* не сформирует большее разнообразие экологических ниш вследствие развития процесса гниения культивируемых растений. Эта адаптивная стратегия была названа, как нельзя лучше, патогенной. При этом в микоценозе почвы происходит увеличение абсолютной и относительной доли биотрофных патогенов с целью быстрой деструкции поврежденных растений для

прекращения их роста и ускорения возврата веществ. Частота встречаемости в почве *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl возросла с 9–11% (2004–2010 гг.) до 66–100% (2011–2012 гг.). В патогенном комплексе возбудителей гнилей этот гриб ранее вообще не встречался, а с 2011 г. занял доминирующее положение. Такая же картина наблюдалась с *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Lind, который в 2010 г. вызвал ризопусную гниль, а виды рода *Aspergillus* (ранее зафиксированные как возбудители семенной инфекции сахарной свеклы) заняли доминирующее положение в структуре возбудителей корнееда (частота встречаемости в 2011–2012 гг. доходила до 60–70 %).

Из данной ситуации, в которой в настоящее время находится большинство свеклосеющих хозяйств, по нашему мнению, существует 2 выхода. Саморегуляция агрофитоценоза – массовые неконтролируемые гнили сахарной свеклы в 2011–2012 гг. привели к резкому сокращению посевных площадей. Сахарная свеклы стала замещаться другими сельскохозяйственными культурами (подсолнечник, кукуруза и пр.) без кардинальных изменений в агротехнике. Такое положение не изменит патогенной стратегии почвенных грибов. Через некоторое время возникнут массовые корневые гнили новых культур, вызванные все тем же комплексом почвенных доминирующих биотрофных грибов и раневых факультативных паразитов.

Невозможность найти выход из ситуации, приводило к тому, что почвы уходили в залежь, зарастали вначале сорной растительностью, после там восстанавливался типичный для данной почвенно-климатической зоны фитоценоз, растительный опад которого способствовал увеличению количества и разнообразия пищевой базы почвенных грибов, приводил к увеличению видового разнообразия и восстановлению стабильного состояния почвенного микоценоза.

Естественный путь восстановления микоценоза почвы и возврат его в стабильное состояние занимает продолжительное время. Целесообразно в современном сельском хозяйстве использовать другой путь с применением стратегии диверсификации, которая сопровождается появлением новых субстратов и, в том числе, нового его типа.

В соответствии с концепцией М.А. Сафонова [2], при увеличении количества доступных субстратов происходят изменения в микоценозе: роль некоторых видов (в первую очередь – биотрофы) минимизируется, или полностью исчезают из сообщества, ряд других видов появляется. Некоторые виды остаются постоянными членами сообщества вне зависимости от состояния фитоценоза, однако их значимость меняется.

В настоящее время есть попытки заместить недостаток органических удобрений внесением измельченной соломы зерновых культур. В результате происходит увеличение доступного однотипного субстрата для питания почвенных грибов, где развивается ограниченное число видов. К сожалению, этот агроприем кардинальным образом не изменит стратегию с патогенной на стратегию диверсификации, а лишь может вернуть в состояние банализации почвенного микоценоза.

Усугублять ситуацию будет то, что с растительными остатками в почву будет поступать большое

количество фитопатогенных видов (возбудители фузариоза колоса, гельминтоспориозных, альтернариозных пятнистостей, которые являются также возбудителями корневых гнилей).

Конечной целью изменения микоценоза почвы является восстановление баланса производства и разложения биомассы в экосистеме в соответствии с новыми условиями среды [2]. Следовательно, изымаемая растениеводческая продукция должна замещаться другими разнотипными видами субстрата, которые будут являться пищевой базой для почвенных грибов, с целью исключить использование ими в качестве пищевого субстрата культурных растений.

Этого можно достичь выращивая культурные растения из разных ботанических семейств в длинноротационных севооборотах с применением травосеяния; внося органические удобрения, выращивая сидеральные культуры, что способствует поступлению разнокачественного пищевого субстрата для питания почвенных грибов и поддерживает видовое разнообразие последних.

В классических 9–10-польных свекловичных севооборотах с внесением 60–80 т навоза в пару, расчетных доз минеральных удобрений и при наличии бобовых культур насчитывается до 100 видов почвенных грибов, так же как и в ненарушенных степных почвах доминирующими являются 20–30 видов. В таких севооборотах очень редко наблюдаются болезни корневой системы сахарной свеклы, да и то лишь в незначительной степени и на наиболее уязвимых этапах онтогенеза (корнеед). Разнотипность субстрата можно увеличить внесением измельченной соломы зернобобовых культур (горох, соя). Разработка и применение новых видов компостов может решить проблему диверсификации стратегии почвенных грибов.

Для снижения распространенности гнилей сельскохозяйственных культур необходимо провести смену стратегий банализации и патогенной почвенных микоценозов на стратегию диверсификации с последующей стабилизацией. Разрабатывая систему защиты сельскохозяйственных культур от гнилей микозной этиологии, необходимо знать, в каком состоянии находится почвенный микоценоз.

На стадии банализации необходимо выращивать устойчивые сорта и гибриды к доминирующим видам патогенных грибов. На стадии угнетения будет достаточно подбора композиций протравителей для эффективной защиты всходов в наиболее уязвимый период онтогенеза. В настоящее время есть попытки

снижения вредоносности корневых гнилей с помощью фунгицидов. Этот прием эффективен, если почвенный микоценоз находится в состоянии банализации с доминированием узкого круга патогенов (*Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp. Lk et Fr. и др.). Фунгициды против корневых гнилей, как правило, подавляют (или уничтожают) ограниченное количество видов. Если же почвенный микоценоз находится в состоянии патогенной адаптации применение фунгицидов, как и устойчивых сортов, будет малоэффективно, вследствие доминирования биотрофных видов почвенных грибов.

Таким образом, в систему защиты сахарной свеклы и других культур агроценоза от микозных гнилей классическим методом необходимо добавить следующие этапы:

1) определить состояние, в котором находится микоценоз почвы, на основе микологического мониторинга;

2) разработать мероприятия по стабилизации сообщества почвенных грибов с применением стратегии диверсификации (внесение разнотипной органики, использованием длинноротационных севооборотов с возделыванием большого набора растений разных ботанических семейств, применение сидератов и выращивание бобовых трав); одновременно с целлюлозосодержащим субстратом можно вносить биопрепараты на основе *Trichoderma* sp. или других микопаразитов;

3) возделывать устойчивые сорта и гибриды с видонеспецифической устойчивостью.

#### Список литературы

1. Санин С.С. Эпифитотии болезней зерновых культур: теория и практика. М. 2012: 60 с. [http://vniif.ru/uploads/article/21/сборник\\_трудов\\_1.pdf](http://vniif.ru/uploads/article/21/сборник_трудов_1.pdf)
2. Сафонов М.А. Стратегии адаптации грибных сообществ к изменениям условий среды. Фундаментальные исслед. 2013. № 6 (Ч5): 1160-3;
3. Билай В.И., Элланская И.А., Кириленко Т.С. и др. Микромицеты почв. Под общ. ред. В.И. Билай. Киев: Наук. думка. 1984: 264 с.
4. Кураков А.В. Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем: Учебно-методическое пособие. М.: МАКС Пресс. 2001: 92 с.
5. Стогниенко О.И. Частота встречаемости и численность почвенных грибов – возбудителей болезней сахарной свеклы. Вестн. защ. раст. 2006; 2: 53-8.

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ В ЭВОЛЮЦИОННОЙ ДИНАМИКЕ ФОРМИРОВАНИЯ ЛЕСОВ

Стороженко В.Г.

Институт лесоведения РАН, с. Успенское, Московская обл.

Грибная биота лесного сообщества представляет собой сложную многофункциональную систему, объединенную, как гетеротрофная формация, одной эволюционно определенной задачей (за некоторыми исключениями) разложения накапливаемой авто-

трофами биомассы, служащей для неё трофотопической основой. Вместе с тем понятно, что в любых замкнутых биологических системах, где соблюдается (или, по крайней мере, система к этому стремится) баланс накапливаемой и разлагаемой биомассы и

осуществляются круговые циклы воспроизводства и расхода энергии, всякая деструктивная функция опосредовано, но неизбежно и постоянно, связана с функцией воспроизводящей, накапливающей. Этот тезис непосредственно связан с особенностями экологии и биологии отдельных групп грибов и их пищевой специализацией.

В лесном биогеоценозе структура фитоценоза, в которой и накапливается биомасса, и которая входит в пищевую цепь грибов, так же имеет сложное морфологическое строение с многофункциональным содержанием. Нас в данном случае интересует древесный консорт фитоценоза и те консортивные цепи, которые связывают грибы и органы деревьев. Если рассматривать организм дерева как сложную систему, основанную на разнообразии морфологических форм его органов, то могут быть выделены группы грибов, выполняющих различные функциональные задачи, определяемые несколькими факторами: временем функционирования самих органов дерева, активностью функционирования органов дерева, временем функционирования гриба в органах дерева.

В соответствии с этими задачами в горизонтальной проекции дерева грибная биота разделяется на несколько трофотопических групп, в которые объединяются грибы, предпочитающие поселяться и функционировать на том или ином субстрате: от верхних ярусов ассимиляционного аппарата крон деревьев до их корневых систем, на тканях разной степени жизненной активности и от короткого до длительного времени функционирования – от очень активных (листья, луб, камбий) до малоактивных (ядро ствола) и отмерших (сухостой в составе древостоя, древесном отпаде и опаде).

В коэволюционной динамике развития грибной биоты и лесной древесной растительности у грибов разных таксономических групп выработались различные пищевые специализации: по вертикальной проекции дерева – от облигатных паразитов, вызывающих болезни листьев и некрозно-раковые образования, далее от факультативных сапротрофов и факультативных паразитов, вызывающих гнилевые фауты стволов деревьев и до сапротрофов, разлагающих древесный отпад и опад. Значительная часть видов факультативной группы грибов может функционировать как на живом, так и на мёртвом субстрате или на границе живого и мёртвого субстрата. Особое место в грибном консорте лесного биогеоценоза занимают микоризообразующие грибы корневого горизонта леса.

Классическая классификация грибов по пищевой специализации известна и широко используются в практической лесной фитопатологии и микологии. Все эти положения известны и мы лишь акцентируем их для того, чтобы обратить особое внимание на уникальную, на мой взгляд, группу грибов, отличающуюся особо важными для функционирования лесных сообществ функциональными способностями.

К этим видам относятся дереворазрушающие грибы факультативной группы, поселяющиеся в стволах живых деревьев и вызывающих их гнилевое поражение, и сапротрофы, разлагающие древесный отпад. Их уникальность для функционирования лесных сообществ заключается в нескольких позициях,

которые являются производными от главной функции. Эта группа грибов предназначена эволюцией, с использованием своей гетеротрофной природы, для корректировки балансовых процессов накопления и разложения биомассы в сукцессионных трендах развития лесных сообществ.

Казалось бы, утверждая это, мы пытаемся совместить не совмещаемые функции, присущие одной и той же группе грибов – функцию разложения, как основную для дереворазрушающих грибов и функцию баланса в процессах развития лесов. Тем не менее в этом противоречии и заключается их основная стратегическая задача в формировании коренных устойчивых лесных сообществ (Стороженко, 2007, 2014).

Ниже мы рассмотрим некоторые производные функции от этой главной стратегической функции. Для этого нам придётся принять в качестве одной из основных парадигм развития лесных систем их эволюционное стремление к постоянному движению к наиболее устойчивому сбалансированному состоянию биогеоценозов, то есть к состоянию климакса.

Из теории устойчивости лесных сообществ и практической оценки этого понятия в лесах известно, что основными критериями их устойчивости являются четыре составляющие структур фитоценозов: соответствие породного состава экотопу, разновозрастность вертикальной структуры, мозаичность горизонтальной структуры, присутствие достаточного количества древесного отпада (Стороженко, 2007, 2014). Рассмотрим то, как дереворазрушающие грибы участвуют в формировании этого качества.

Первый критерий рассматривается как базовый при формировании любых лесов, тем более при формировании лесов эволюционного развития. При отсутствии такового, леса подвержены сильнейшим эндогенным факторам разрушения, в числе которых часто выступают грибные возбудители болезней леса, в том числе и дереворазрушающие грибы.

В созданных без учёта соответствия главной породе экотопу культурах развиваются очаги грибных болезней некоторых известных биотрофных дереворазрушающих грибов, приводящие к частичному, а чаще к полному развалу древостоев. При естественной сукцессии, как правило, несоответствия породного состава формирующегося древостоя экотопу не возникает и такие эндогенные факторы разрушения отсутствуют. Присутствие дереворазрушающих биотрофных грибов при этом контролируется консортивными связями в каждый временной период жизни лесного сообщества в строго определённом количестве, необходимым для формирования устойчивых структур леса. Остальные три критерия тесно связаны между собой и могут рассматриваться как единый процесс формирования устойчивой структуры биогеоценоза в целом.

Формирование вертикальной и горизонтальной структур лесного сообщества в лесу, обладающем качеством устойчивости, связано с разновозрастностью структуры фитоценоза. Биотрофные дереворазрушающие грибы распространяются диффузно по площади лесного сообщества, поражают живые деревья, вызывают гнилевые фауты стволов, которые приводят к образованию валежа и формированию разновозрастности древесного полога. В возрастной структуре

коренного разновозрастного леса горизонтальная структура складывается из мозаик возрастных поколений разного возраста. Мозаики имеют различные уровни поражения дереворазрушающими грибами и, следовательно, различную вероятность ослабления и вывала деревьев.

Чем старше возрастное поколение, тем выше уровень поражения деревьев в нём грибами биотрофного комплекса, тем больше вероятность образования в

нем валежа, что напрямую связано с формированием новых поколений леса, разновозрастностью вертикальной и мозаичностью горизонтальной структур сообщества. Для примера представим поражённость дереворазрушающими биотрофными грибами мозаик возрастных поколений коренного девственного ельника в заповеднике «Кологривский лес» (южная тайга) – 8Е1Б1Лп+Пх, кислично-щитовниковый, I бонитет, 0,8, S – 0,6 га.

Таблица 1. Поражённость мозаик возрастных поколений девственного ельника в заповеднике «Кологривский лес» (южная тайга)

	Возраст деревьев в мозаиках возрастных поколений, лет						
	До 40	41-80	81-120	121-160	161-200	201-240	241-280
Поражённость, %	ед	2	28	35	35	54	62

Развитые гнили присутствуют в более 80% стволов бурелома до 3 лет образования. Гнили в данном случае являются причиной образования валежа.

Таким образом, дереворазрушающие биотрофные грибы факультативного комплекса, являясь причиной образования древесного отпада, выполняют функцию формирования вертикальной и горизонтальной структур лесного сообщества и, следовательно, формирования устойчивости леса.

Основная функция дереворазрушающих грибов ксилотрофного комплекса заключается в разложении древесного отпада с выделением продуктов ксиллиза – CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O и энергии. В коренном устойчивом лесу должен соблюдаться баланс прирастающей и разлагаемой биомассы, поэтому деятельность грибов ксилотрофного комплекса по времени разложения биомассы древесного отпада должна уравниваться со временем накопления биомассы древесной фитомассы, то есть объёмы текущего прироста древесины должны равняться объёмам текущего разложения.

Эти объёмы и этот баланс нами подсчитан и опубликован (Стороженко, 2011, 2014).

Все вышеприведённые положения доказаны экспериментальными данными. Эти данные могут быть основанием для выводов о том, что дереворазрушаю-

щие грибы запрограммированы эволюцией через свою гетеротрофную природу выполнять в динамике сукцессионного развития лесного сообщества функцию выстраивания всё более оптимальных структур автотрофов. В деструктивной цепи круговорота вещества и энергии в лесном сообществе дереворазрушающие грибы биотрофного и ксилотрофного комплексов, выполняя заражение живых деревьев, образование и развитие гнилевых фаутов, ослабление деревьев, перевод части древесной фракции в древесный отпад, разложение валежа в определённые сроки, составляют единый процесс, согласованный с динамикой накопления биомассы автотрофами.

Таким образом, они запрограммированы эволюцией как один из «механизмов» формирования качества устойчивости лесных сообществ.

#### Список литературы

1. Стороженко В.Г. Устойчивые лесные сообщества. М.: Гриф и К. 2007: 190 с.
2. Стороженко В.Г. Древесный отпад в коренных лесах Русской равнины. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2011: 122 с.
3. Стороженко В.Г. Эволюционные принципы поведения дереворазрушающих грибов в лесных биогеоценозах. М.: Гриф и К. 2014: 180 с.

## ИЗУЧЕНИЕ МИКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЖИЛЫХ ПОМЕЩЕНИЙ г. КИЕВА

*Суббота А.Г., Наконечная Л.Т., Курченко И.Н., Чуенко А.И., Письменная Ю.Б.  
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины*

Микроскопические грибы являются компонентами биоценозов и принимают участие в поддержании гомеостаза почвы, процессах почвообразования, разрушении различных органических и неорганических остатков, что и является одной из их основных функций [1–3]. В отличие от природных ценозов, в городской среде может формироваться специфическая микобиота, отличающаяся по численности и видовой структуре, а также доминированием других видов [4].

Благодаря лабильным ферментным системам, микроскопические грибы, развиваясь на различных

материалах, способны продуцировать большое количество биологически активных веществ, ускоряющих старение и нарушение прочности материалов [5, 6]. Подобные метаболиты в поврежденных грибами домах, обуславливают группу заболеваний, которые объединяют под общим названием «синдром больных зданий» (sick building syndrome), от которых страдают люди, долгое время находящиеся в них [7, 8].

Репродуктивные и переживающие структуры грибов распространяются воздушными потоками. В наружном воздухе споры грибов распространены по-

всеместно, их численность может быть в пределах  $10^2$  –  $5 \times 10^5$  КОЕ/м<sup>3</sup> и выше, в зависимости от различных факторов: времени года, высоты атмосферного слоя, температуры, влажности, характера местности, степени загрязнения территорий и т.д. [9]. Внутри помещений их уровень обычно ниже, чем снаружи, но может повышаться при наличии сырости и поврежденных микроорганизмами поверхностей [10]. По результатам исследований российских микологов в воздухе жилых помещений г. Москвы в невегетационный сезон (зимой) средняя численность микроскопических грибов составляла  $45 \pm 11$  КОЕ/м<sup>3</sup>, в вегетационный –  $130 \pm 21$  КОЕ/м<sup>3</sup>.

Ядро микобиоты в тех же помещениях формировалось видами родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, встречаемость которых в воздухе составляла 89, 81 и 59% соответственно. В результате анализа сезонной динамики микобиоты доказано многофакторность процесса ее формирования. Выделенные микромицеты по характеру сезонной динамики распределены на три группы: I – микромицеты, численность которых не зависит от сезона – *Penicillium*, *Aspergillus*, *Wallemia* и представители *Zygomycota*; II – микромицеты, встречаемость, которых увеличивается в вегетационный период (конец апреля – октябрь) – *Cladosporium*, *Alternaria*; III – микромицеты, появляющиеся в жилых помещениях только в вегетационный период – *Geotrichum*, *Oidiodendron*, *Botrytis*, стерильный мицелий и *Basidiomycota* [11].

Цель исследований – изучение микологического состояния жилых помещений г. Киева в нормальных условиях и в поставарийных ситуациях.

Исследование микобиоты помещений осуществляли в соответствии с нормативными документами и методами [12]. Отбор проб воздуха на стандартные агаризованные питательные среды в чашки Петри проводили с использованием прибора для бактериологического анализа воздуха «Тайфун» (Р 40). Состав выделенных микроскопических грибов выражали количественно в КОЕ/м<sup>3</sup>. Заспоренность воздуха вычисляли по формуле:

$$X = a \times 10^3 / V,$$

где  $X$  – число КОЕ/м<sup>3</sup> воздуха,  $a$  – число выросших колоний на чашке Петри,  $V$  – объем исследованного воздуха (90 л) при экспозиции чашки Петри (3 мин).

Культивирование осуществляли в термостате при температуре  $29 \pm 2$  °С, с периодическим учетом результатов в течение 30 сут. Идентификацию микроскопических грибов проводили по совокупности культурально-морфологических признаков и особенностям конидиогенеза с использованием соответствующих определителей микроскопических грибов отечественных и зарубежных авторов [13–20].

Частоту встречаемости каждого вида, рода определяли по общепринятой формуле [21]. По частоте встречаемости виды разделяли на: доминирующие – 50–100%; часто встречающиеся виды – 30–50%; типичные – 10–30%, случайные – 1–10% и редкие виды – менее 1% [22].

По результатам обследований помещений г. Киева установлено, что в каждом из них формируется микобиота, характерная только для данного помещения и условий, в которых оно находится. В благополучных

помещениях численность спор в 1 м<sup>3</sup> воздуха, в его спокойном состоянии, может быть в пределах 10 – 50 КОЕ. В помещениях с микологической деструкцией поверхностей стен, потолка, окон, уровень заспоренности воздуха составлял от 120 до 370 КОЕ, но при отборе проб с поврежденных участков он увеличивался до  $10^5$  КОЕ/м<sup>3</sup> и более.

В помещениях, которые при отборе проб находились под влиянием влажного воздуха, воды или имели повреждения поверхностей (поставарийная ситуация), из воздуха и стен выделено 158 изолятов микроскопических грибов, принадлежащих к 136 видам 42 родов *Zygomycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*. Из них доминировали виды *Penicillium* (90% – в воздухе и 78% – на поверхностях), *Aspergillus niger* (67 и 78% соответственно), *Aspergillus versicolor* (72 и 72%), *Aspergillus sydowii* (50 и 40%). К типичным относились виды: *Cladosporium cladosporioides* (55 и 18%), *C. sphaerospermum* (50 и 32%), *Stachybotrys chartarum* (44 и 34%), *Aspergillus flavus* (28 и 45%), *Ulocladium botrytis* (28 и 44%), *Chaetomium globosum* (12 и 40%). Остальные виды относились к случайным и редким (рис. 1).

В помещениях без признаков поражения поверхностей, располагающихся на верхних этажах многоэтажных новых жилых домов, построенных в период 2000–2010 гг., из воздуха с невысокой частотой выделяли *Aspergillus niger* (22%), *A. versicolor* (12%), *Cladosporium* sp. (22%) и виды *Penicillium* (11%). Следует отметить, что в таких помещениях *A. niger* концентрировался на поверхностях филлопланы комнатных растений с встречаемостью 55%.

Анализ микобиоты каждого из помещений отдельно доказывает специфичность ее формирования. В соответствии с предложенной градацией грибов на три группы [11], в зависимости от характера сезонной динамики, для г. Киева мы также выделяем три группы микромицетов с учетом поставарийных ситуаций: I – микромицеты, численность которых не зависит от сезона – виды родов *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Ulocladium* и грибы из отдела *Zygomycota*; II – микромицеты, встречаемость и численность которых увеличивается в вегетационный период (конец апреля – октябрь) – виды родов *Cladosporium*, *Alternaria*; III – микромицеты, появляющиеся в жилых помещениях только в вегетационный период – виды родов *Fusarium*, *Botrytis*, *Phoma* и стерильный мицелий. Из них особого внимания заслуживают виды, часто встречающиеся в помещениях, но не вошедшие в классификационный список Минздрава Украины патогенных для человека микроорганизмов: *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, виды рода *Trichoderma*, и особенно токсинобразующие виды: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *Stachybotrys chartarum*. О вредоносности многих из них для здоровья человека стало известно относительно недавно [17].

По данным литературы, выделенные в результате исследований грибы способны продуцировать метаболиты, вызывающие сенсibilизацию организма и влиять на иммунитет человека. Полученные нами

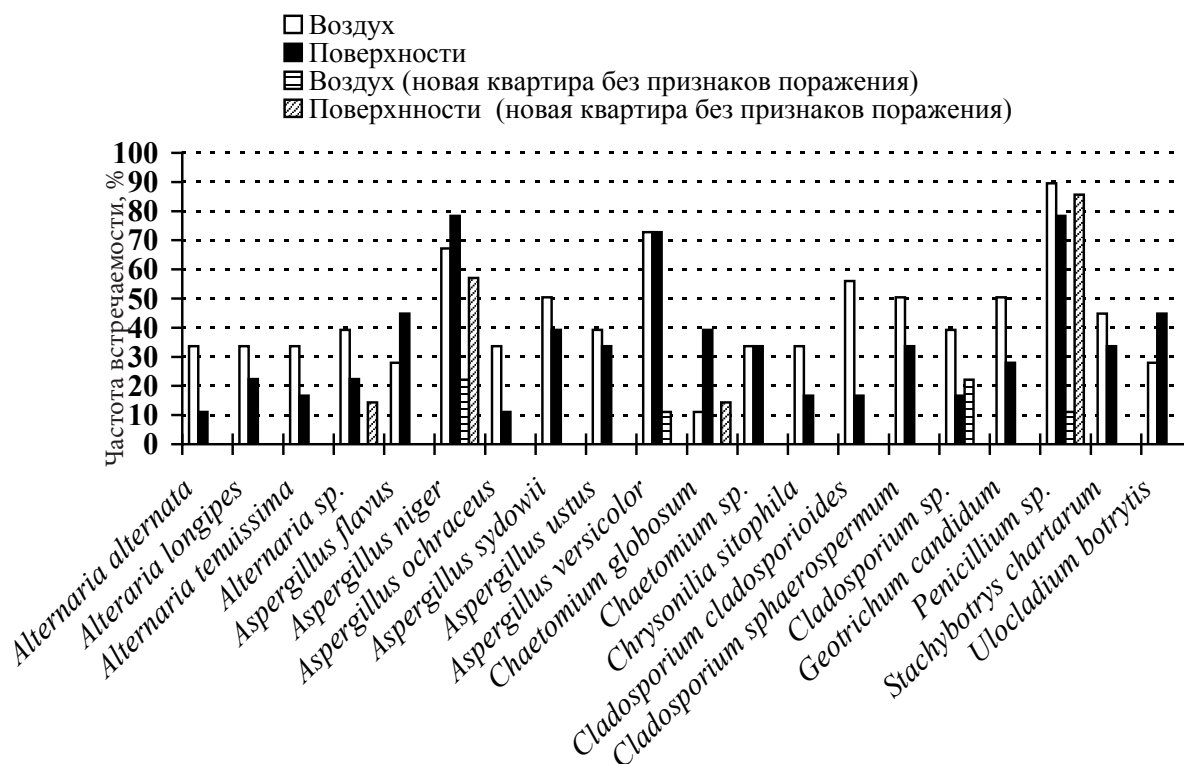


Рисунок 1. Частота встречаемости микроскопических грибов в микобиоте помещений

данные свидетельствуют о необходимости внедрения мониторинговых микологических обследований помещений различного назначения, особенно при наличии в них признаков микологического повреждения.

#### Список литературы

- Билай В.И. Основы общей микологии. Киев: Вища школа. 1989: 392 с.
- Кураков А.В. Структура биоты сопотрофных микроскопических грибов в почвах. Пробл. мед. микол. 2004; 6(2): 89-90.
- Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех. 2005: 196 с.
- Марфенина О.Е., Кулько А.Б., Иванова А.Е. и др. Микроскопические грибы во внешней среде города. Микол. фитопатол. 2002; 36(4): 22-31.
- Жданова Н.Н., Суббота А.Г., Харкевич Е.С. и др. Новые строительные материалы и проблемы их грибоустойчивости. Биоповреждения и биокоррозия в строительстве: Мат. 2-й Межд. науч.-техн. конф. – Саранск: Изд-во Мордов. ун.-та. 2006: 17-9.
- Коваль Э.З., Сидоренко Л. П. Микодеструкторы промышленных материалов. К.: Наук. думка. 1989: 192 с.
- Hodgson MJ, Morey Rh, Leung W-V et all. Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. JOEM. 1998; 40(3): 241-9.
- Марфенина О.Е., Фомичева Г.М. Потенциально патогенные грибы в среде обитания человека (Анализ современных данных). Усп. мед. микол. 2007; 9: 57-59.
- Flannigan B. Air sampling for fungi in indoor environments. J Aerosol Sci. 1997; 28(3): 381-92.
- Hunter A, Grant C, Flannigan B, Bravery AF. Mould in buildings: the air spora of domestic dwellings. Intern. Biodeterior. 1988; 24(2): 81-101.
- Антропова А.Б. Микромицеты как источник аллергенов в жилых помещениях г. Москвы. Автореф. дисс... к. б. н. М.: 2005: 24 с.
- Приказ МОЗ Украины от 14.12.2001 р. №502 «Методические рекомендации по контролю содержания микроорганизмов и частичек в воздухе производственных помещений». www.moz.gov.ua/ua/main/docs/docID=5553
- Билай В.И. Фузариозы. Киев: Наук. думка, 1977: 442 с.
- Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. Киев: Наук. думка. 1988: 204 с.
- Билай В.И., Курбачкая З.А. Определитель токсинобразующих микромицетов. Киев: Наук. думка, 1990: 227 с.
- Пидопличко Н.М. Пеницилли: Ключи для определения видов. Киев: Наук. думка, 1977: 150 с.
- Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. Пер. с англ. К.Л. Тарасова, Ю.Н. Ковалева. Под ред. И.Р. Дорожковой. М.: Мир. 2001: 468 с.
- Domsch KH, Gams W, Anderson T.-H. Compendium of soil Fungi. 2 ed. Eching: IHW-Verlag, 2007: 672 p.
- Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, England: Commonwealth Mycol. Inst. 1993: 608 p.
- Hoog de GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Universitet Rovira i Virgili. 2000: 1126 p.
- Методы экспериментальной микологии: Справочник. Под ред. Билай В.И. Киев: Наук. думка; 1982: 550 с.
- Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М.: Изд-во МГУ. 1988: 219 с.

## СТАБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РЯДА ФАВ (АНТИОКСИДАНТЫ И АНТИБИОТИКИ) НА ЭРИТРОЦИТЫ В УСЛОВИЯХ ГЕМОЛИЗА И МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА

Султанова Г.Г

Институт ботаники Национальной академии наук Азербайджана

Современная медицина широко использует аппараты искусственного кровообращения при длительном функционировании которых неизбежно механическое и окислительное разрушение клеток крови. В связи с этим возникает необходимость в изучении механизмов стабилизации мембран и поиске защитных средств. Наиболее показательным методом для исследования действия ФАВ на биологические мембраны является гемолиз.

Клеточные мембраны являются первичной мишенью действия биологически активных соединений. Эритроциты млекопитающих представляют собой классическую модель для изучения биологического действия мембранотропных соединений, поскольку метаболические процессы, происходящие в них, очень слабы, а свойства мембран хорошо изучены

Ранее установлено, что фенольные антиоксиданты повышают устойчивость клеток крови при механическом повреждении [3]. Двухфазную картину стабилизации мембраны эритроцитов наблюдали разные авторы [1, 2, 5]. Так наз. неспецифические гемолитики (ПАВ, ФАВ, лекарственные средства, антибиотики) в малых концентрациях выполняют функцию стабилизаторов мембраны, а в больших способствуют ее разрушению.

Механическая травма эритроцитов была смоделирована действием ультразвука (УЗ), который как показано при определенных условиях вызывает механический гемолиз эритроцитов [4]. Нами было изучено мембранотропное действие двух групп физиологически активных соединений – полиеновых антибиотиков и антиоксидантов.

Гемолитический эффект 20 полиенов был изучен на эритроцитах мышей и было показано, что самым активным среди них является филиппин, превышающий по этим свойствам остальные антибиотики. При этом филиппин обладает сильным гемолитическим действием на эритроциты человека и свиньи и менее зависим от состава и свойств эритроцитарной мембраны [8]. Однако в случае амфотерицина В и нистатина наблюдается зависимость степени гемолиза от вида эритроцитарной мембраны млекопитающих.

В тоже время гемолитическое действие филиппина можно уменьшить действием ионов кальция, анионов фосфата. Гемолитический эффект ПА зависит от концентрации антибиотиков, что показано на рис. 26. Для характеристики гемолитической активности исследуемых антибиотиков можно выделить УЗ-гемолитические зоны: стабилизации ( $>10^{-6}$  М), нормы ( $\sim 10^{-5}$  М) и гемолиза ( $<10^{-4}$  М).

Оказалось, что модифицирующее действие ПА на эритроциты приводит к изменению их гемолитической активности даже в поле действия ультразвука. Основные параметры, как время и скорость гемолиза, определяемые из экспериментальных кинетических кривых УЗ-гемолиза, характеризуют механическую устойчивость эритроцитов и ее изменения в результате обработки эритроцитов изученными выше соединениями.

В контрольных опытах показано, что чистый ДМСО в концентрации 1% не нарушает проводимость мембран мышечных волокон и эритроцитов. Однако при высоких концентрациях ПА относительно токсичны – обладают нефротоксичностью и гемолитической

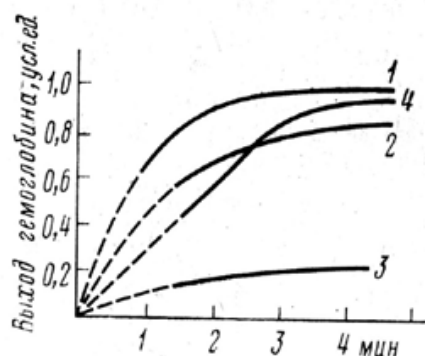
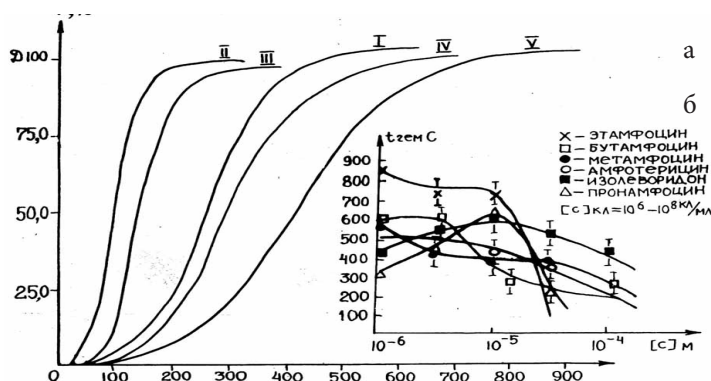


Рис. 1. Кинетика гемолиза: 1 – контроль, 2, 3, 4, – в присутствии различных концентраций ОП-1.

Рис. 2а. Кинетические кривые УЗ-гемолиза эритроцитов в контроле и при эквимоллярных концентрациях ПА.

Рис. 2б. Зависимость времени гемолиза эритроцитов от концентрации полиеновых антибиотиков в суспензии эритроцитов.



активностью [2]. Токсичность препарата сильно зависит от времени нахождения в мембране. Эргостерин содержащие клетки в 10–100 раз более чувствительны к действию ПА, чем холестеринсодержащие. При это леворин, как и другие антибиотики, прочно связывается с эргостерин содержащими микробами и практически не отмывается из них и способствуют блокированию их действия.



Также необходимо отметить, что леворин и другие антибиотики также эффективно используются в медицинской практике при лечении грибковых заболеваний и гнойных инфекций. Наибольший интерес представляют сравнительные исследования, связанные с особенностями изменения роста проницаемости мембран нативных клеток – полиены по эффективности действия на клетки располагаются в следующем порядке: нистатин < метиловый эфир амфотерицина В < микогептин < амфотерицин В < леворин < филипин [2, 8, 9]. Аналогичный ряд наблюдается при действии полиенов на БЛМ. В последнее время опубликовано много работ по использованию некоторых ПА в качестве антиоксидантов [9].

В данной работе также изучена эффективность водорастворимых антиоксидантов производных 3-оксипиридина и полиеновых антибиотиков в качестве стабилизаторов клеток крови при гипотоническом гемолизе и механической травме под действием акустических течений. При этом использовалась ультразвуковая энергия применяемая в физиотерапевтической практике (частота 0,8 МГц, интенсивность 0,4 Вт/см<sup>2</sup>).

На рис. 2а изображены кинетические кривые, отражающие процесс гемолиза эритроцитов человека в контроле и при трех концентрациях препарата ОП-1 (хлоргидрат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина). Процесс проходит при комнатной температуре. Как видно из рисунка, действие препарата на кинетику гемолиза свидетельствует о стабилизирующей способности этого вещества. Увеличение концентрации препарата до 10раз оказывает обратное действие: выход гемоглобина становится близким к исходному, а скорость гемолиза возрастает. Очевидно, существует концентрационная граница, за которой стабилизатор превращается в гемолитик.

Видно, что увеличение концентрации препарата приводит к изменению степени процесса. Для достижения литического действия необходима концентрация препарата выше 10<sup>-3</sup> М. Некоторыми авторами показано, что, адсорбируясь на мембране, препарат предохраняет ее от разрушения по меньшей мере в течение 10 ч.

Для изучения стабилизации при механической травме использовались нативные образцы крови. В качестве мембрано-активных стабилизаторов использовались антиоксиданты гетероциклического ряда – 2-этил-6-метил-3-оксипиридин и 2,6-диметил-3-оксипиридин. Механическая травма эритроцитов была смоделирована *in vitro* действие ультразвука низких интенсивностей (0,2–0,4 Вт/см<sup>2</sup> излучающей поверхности).

В работе использовали производные ОП в концентрациях 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-3</sup> М, рН 6,0–7,0. Время предварительной инкубации водорастворимого ОП-1 равнялось 60 мин, ОП-2 в виде спиртового раствора добавляли непосредственно в суспензию эритроцитов без предварительной инкубации (при этом концентрация спирта в инкубационной среде не превышала 0,1%).

Установлено, что химические соединения из класса 3-оксипиридинов дают защитный эффект в отношении гемолитического действия механических факторов УЗ.

Полученные ранее результаты свидетельствуют о том, что использованные в работе антиоксиданты не оказывают существенного влияния на структуру и функции мембран эритроцитов [5].

Можно предположить, что с увеличением интенсивности ультразвука (0,6 Вт/см<sup>2</sup>), ввиду усиления действия механических факторов, защитный эффект этих соединений снизится. По-видимому защитное действие препаратов ОП от механической травмы эритроцитов возможно до определенных пороговых значений механического воздействия на них. Это следует учитывать при выборе режимов работы аппаратов искусственного кровообращения во избежание механической травмы эритроцитов.

Результаты указывают на определяющую роль ОН-группы, как носителя стабилизирующих свойств. Выявлено, что наибольшим защитным эффектом обладает препарат ОП-1. Некоторыми авторами [6, 7] получено, что в присутствии антиоксидантов сохраняется способность крови связывать достаточные количества кислорода. Анализируя вышесказанное и учитывая то что все исследованные в данной работе соединения являются антиоксидантами, а некоторые из них также радиопротекторами [6], то можно предполагать, что их стабилизирующее действие связано со способностью противостоять окислительным свободнорадикальным превращениям липидных и белковых компонентов мембраны.

Полученные результаты могут иметь значение при использовании изученных препаратов для стабилизации клеток крови в клинической медицине.

#### Список литературы

1. Freeman AR, Spirtes MA. Effect of some phenothiazine derivatives on the hemolysis of red blood cells *in vitro* *Biochem Pharmacol.* 1972; 11: 161-3
2. Султанова Г.Г., Самедова А.А., Касумов Х.М. Гемолиз эритроцитов при комбинированном действии ультразвуковых волн и полиеновых антибиотиков. *Антибиот. химиотер.* 2008; 9-10.
3. Шумаков В.И., Цыпин А.Б. и др. Кровообращение 1997; 10: 2.
4. Эльпинер И.Е. *Ультразвук.* М. 1973
5. Брагинская Ф.И., Султанова Г.Г. и др. *Гематол. трансфузиол.* 1984; 1: 53-7
6. Бурлакова Е.Б. *Усп. хим.* 2005; 10: 1871.
7. Обухова Л.К., Цыпин Ф.Б. и др. *Изв. РАН, серия биол.* 1997; 548-552.
8. Knophik-Skricka A, Klafaczycka A, Bielawski J. The effect of polyene antibiotic filipin on pig red blood cells. *Cell Mol Biol Lett* 2002; 7: Suppl: 200
9. Kasumov Kh, Kurbanov O, Kasumov KhM. The 5th National Congress on Physical Education and Sports Sci. Iran. 2003; 48.

## ПОИСК И ВЫДЕЛЕНИЕ В КУЛЬТУРУ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ИЗ МЕСТООБИТАНИЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Теплякова Т.В.<sup>1</sup>, Косогова Т.А.<sup>1</sup>, Бардашева А.В.<sup>1</sup>, Горбунова И.А.<sup>2</sup>, Власенко В.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

<sup>2</sup>Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск

Высшие грибы являются перспективными источниками получения лекарственных препаратов, проявляющие противоопухолевые, противовирусные и иммуномодулирующие свойства. Более 200 видов издавна используются в традиционной медицине Китая, Кореи, Японии и других юго-восточных стран. В России широко известен гриб чага и препараты из него, но природные запасы лекарственных грибов истощаются, поэтому большую актуальность приобретает развитие биотехнологий на основе грибов.

Для разработки новых лекарственных препаратов на основе грибов важным является отбор эффективных штаммов – продуцентов биологически активных веществ среди дикорастущих видов грибов. Западная

Сибирь представляет собой уникальный регион России с высокой концентрацией биоразнообразия и природных ресурсов, в том числе и лекарственных видов грибов.

В ходе экспедиций по Новосибирской области, Алтайскому краю, республике Алтай собрана большая коллекция грибов, принадлежащих классу Базидиомицеты (Basidiomycetes).

Впервые в данном регионе в период 2007–2014 гг. из природных местообитаний в чистую культуру выделены 98 штаммов 49 видов базидиальных грибов [1-4]. В табл. 1 приведен список выделенных в культуру грибов, хранящихся в рабочей коллекции лаборатории микологии.

№ п/п	Вид гриба	Русское название	Количество штаммов
1	<i>Asterophora lycoperdoides</i> (Bull.) Ditmar	Астерофора звездчато-споровая	1
2	<i>Calvatia lilacina</i> (Mont. & Berk.) Henn.	Головач сиреневатый	2
3	<i>Cerrena unicolor</i> (Bull.) Murrill	Церрена многоцветная	1
4	<i>Clitocybe nebularis</i> (Batsch) P. Kumm.	Говорушка серая, дымчатая	1
5	<i>Coprinus comatus</i> (O.F. Müll.) Pers.	Навозник белый, лохматый	2
6	<i>Daedaleopsis confragosa</i> (Bolton) J. Schröt.	Дедалеопсис шершавый	5
7	<i>Daedaleopsis tricolor</i> (Bull.) Bondartsev & Singer	Дедалеопсис трехцветный	4
8	<i>Datronia mollis</i> (Sommerf.) Donk.	Датрония мягкая	1
9	<i>Dichomitus campestris</i> (Quél.) Domański & Orlicz	Дихомитус полевой	1
10	<i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr.	Трутовик настоящий, обыкновенный	6
11	<i>Fomitopsis officinalis</i> (Vill.) Bondartsev & Singer	Трутовик листовенничный, листовенничная губка	1
12	<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.) P. Karst.	Трутовик окаймленный	7
13	<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	Опенок зимний	1
14	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	Трутовик плоский	4
15	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Трутовик лакированный	1
16	<i>Ganoderma valesiacum</i> Boud.	Ганодерма из Валэ	1
17	<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray	Грифола курчавая	1

18	<i>Hericium cirrhatum</i> (Pers.) Nikol.	Ежовик кудрявый	1
19	<i>Hericium coralloides</i> (Scop.) Pers.	Ежовик коралловидный	1
20	<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.	Корневая губка	1
21	<i>Hypholoma</i> sp.	Гифолома sp.	1
22	<i>Inonotus obliquus</i> (Ach. Ex Pers.) Pilát	Трутовик скошенный, чага	4
23	<i>Irpex lacteus</i> (Fr.) Fr.	Ирпекс молочно-белый	1
24	<i>Ischnoderma benzoinum</i> (Wahlenb.) P. Karst.	Ишнодерма смолистая	2
25	<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	Трутовик серно-желтый	2
26	<i>Lentinus cyathiformis</i> (Schaeff.) Bres.	Пилолистник бокаловидный	2
27	<i>Lentinus tigrinus</i> (Bull.) Fr.	Пилолистник тигровый	1
28	<i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr.	Ленцитес березовый	1
29	<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.	Дождевик шиповатый, жемчужный	1
30	<i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaeff.	Дождевик мешковидный	1
31	<i>Lycoperdon utriforme</i> Bull.	Головач мешковидный	2
32	<i>Morchella elata</i> Fr.	Сморчок высокий	1
33	<i>Neolentinus lepideus</i> (Fr.) Redhead & Ginns	Шпальный гриб	2
34	<i>Panellus stipticus</i> (Bull.) P. Karst.	Панеллюс вяжущий	1
35	<i>Phallus impudicus</i> L.	Веселка обыкновенная	1
36	<i>Phellinus igniarius</i> (L.) Quél.	Трутовик ложный, дубовый	1
37	<i>Phellinus conchatus</i> (Pers.) Quél.	Феллинус раковинообразный	1
38	<i>Piptoporus betulinus</i> (Bull.) P. Karst.	Трутовик березовый, березовая губка	5
39	<i>Pleurotus calypttratus</i> (Lindblad ex Fr.) Sacc.	Вешенка покрытая	2
40	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	Вешенка устричная, обыкновенная	7
41	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél.	Вешенка легочная	2
42	<i>Polyporus squamosus</i> (Huds.) Fr.	Трутовик чешуйчатый	1
43	<i>Polyporus chozenia</i> (Vassilkov) Parmasto	Полипорус чозениевый	1
44	<i>Trametes gibbosa</i> (Pers.) Fr.	Трутовик горбатый	3
45	<i>Trametes pubescens</i> (Schumach.) Pilát	Траметес опушенный	1
46	<i>Trametes trogii</i> Berk.	Траметес Трога	1
47	<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	Траметес разноцветный	5
48	<i>Trichaptum bifforme</i> (Fr.) Ryvardeen	Трихаптум двоякий	1
49	<i>Trichaptum</i> sp.	Трихаптум sp.	1

Из данного списка депонированы в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» 13 штаммов: *Ganoderma applanatum* F-1242, *Laetiporus sulphureus* F-1243, *Inonotus obliquus* F-1244, *Fomitopsis officinalis* F-1245, *Phallus impudicus* F-1246, *Trametes versicolor* F-1247, *Pleurotus pulmonarius* F-1248, *Fomes fomentarius* F-1261, *Daedaleopsis confragosa* F-1290, *Pleurotus ostreatus* F-1291, *Lycoperdon perlatum* F-1307, *D. tricolor* F-1314, *D. tricolor* F-1315.

Выделенные культуры хранятся в лаборатории микологии ГНЦ ВБ «Вектор» в биологических пробирках на скошенной агаризованной питательной среде, а также в микропробирках под стерильной дистиллированной водой в виде агаровых блоков. При пересеве культур осуществляется микроскопический контроль на присутствие в них микофильных грибов.

### Список литературы

1. Косогова Т.А., Теплякова Т.В. Выделение в культуру лекарственных видов базидиальных грибов. Мат. 5 съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Москва, 2–4 дек. 2008 г. Под ред. Р.Г. Василова. М.: ИАЦ, 2008: 273-5.
2. Горбунова И.А., Власенко В.А., Теплякова Т.В. и др. Ресурсы лекарственных грибов на юге Западной Сибири. Хвойные бореальной зоны. 2009; 26(1): 12-21.
3. Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Ананько Г.Г. и др. Грибы – источник функциональных продуктов питания и лечебно-профилактических препаратов. Пища. Экология. Качество: Тр. X между. научн-практ. конф. (Краснообск, 1–3 июля 2013 г.). Новосибирск. 2013: 238-42.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ ТРАНСФОРМАЦИИ МИКОБИОТЫ ПОЧВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕДИ И ГУМИНОВОГО ПРЕПАРАТА

Терехова В.А.<sup>1,2</sup>, Акулова М.И.<sup>1</sup>, Иванова А.Е.<sup>1</sup>, Федосеева Е.В.<sup>2</sup>, Пукальчик М.А.<sup>1</sup>, Якименко О.С.<sup>1</sup>, Шитиков В.К.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва

<sup>2</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва

<sup>3</sup>Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти

**Введение.** С усилением антропогенной нагрузки на почвы широкое распространение в природоохранной практике получают продукты «зеленой химии», к числу которых относятся гуминовые препараты (ГП). Сырьем для изготовления ГП является бурый уголь, торф, сапропели и другие источники. Технологий производства множество, что определяет огромное разнообразие ГП [5]. При этом их безопасность и эффективность по биотическим параметрам оценены недостаточно. Наряду с многочисленными положительными результатами, опубликованы данные об отсутствии эффекта или увеличении токсичности ксенобиотиков в присутствии ГП [3].

Эффективность и биологическую безопасность ГП изучают с привлечением различных систем биотических показателей: с помощью растений, простейших, червей, ракообразных и грибов. Грибы, как неотъемлемый компонент наземных и водных биоценозов, контролируют широкий спектр биосферных функций [2]. Они достаточно устойчивы к действию токсических веществ и поэтому обитают даже в экстремальных и сильно нарушенных средах, тем не менее, даже в таких условиях отмечается трансформация их «откликов» на изменения состояния окружающей среды.

Антропогенная нагрузка на почвы вызывает обеднение видового состава в комплексах микромицетов, увеличение доли видов, не свойственных почвам в конкретных зональных условиях, а также видов, способных вызывать патологию растительных и животных организмов [1]. С практической позиции в целях экологического нормирования воздействий важно иметь обоснованное представление о том, какая степень изменения видового состава и численности микобиоты почв свидетельствует о нарушении каче-

ства среды. Для этого привлекаются различные модели и методы математической статистики.

**Цель работы** – оценка трансформации сообщества микромицетов почв, загрязненных медью и подвергнутых последующей гуматной ремедиации на основе методов математической статистики.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили на образцах искусственной стандартной почвы, так наз. модельного почвогрунта, приготовленного по международному стандарту ISO 11268-2. Опытные образцы (400 г) загрязняли солью меди  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ . Через 2 нед вносили в виде водного раствора ГП Флексом (гумат калия, произведенный из торфа – F). Испытуемые варианты представлены на схеме (табл. 1).

Табл. 1. Схема эксперимента и условные обозначения испытуемых образцов

Поллютант $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , мг Cu/кг с. в. почвы	Гуминовый препарат Флексом (F), г/кг с. в. почвы		
	0,0	0,1	1,0
0	K	-	-
264	$\text{Cu}_2$	$\text{Cu}_2 \text{F } 0,1$	$\text{Cu}_2 \text{F } 1$
528	$\text{Cu}_4$	$\text{Cu}_4 \text{F } 0,1$	$\text{Cu}_4 \text{F } 1$

Пробы из серийного разведения (1:100) исследуемых образцов анализировали методом глубинного посева на стандартной среде Чапека в термостате при 24 °С в течение 10–14 сут. Статистической обработке под-

Таблица 2. Видовой состав и структура сообществ культивируемых грибов в исследованных образцах искусственных почв\*

Виды микромицетов	Исследуемые образцы почвы							
	Шифр видов	Контроль	Cu <sub>2</sub>	Cu <sub>2</sub> F0,1	Cu <sub>2</sub> F1	Cu4	Cu <sub>4</sub> F0,1	Cu <sub>4</sub> F1
<i>Acremonium</i> sp.	AcrSp	33					11	
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	AspFu	11						33
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	AspNi			33	22	33		
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	AspTe		11					
<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church	AspUs	11			33	22	56	
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	ChaGl		22			11		
<i>Clostrachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	CloRo	11	33	100	67	22	33	22
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.	FusOx			22	44			
<i>Geotrichum candidum</i> Link	GeoCa		11					
<i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman	HaeHa		33	11	44	89	78	44
<i>Lichtheimia ramosa</i> (Zopf) Vuill.	LicRa	44	22	44	44		11	33
<i>Mortierella alpina</i> Peyronel	MorAl		11	78	89	44	33	
<i>Paraconiothyrium sporulosum</i> (W. Gams & Domsch) Verkley	ParSp		33					
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	PenAu		22	56	33			22
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	PenCi		67					
<i>Penicillium crustosum</i> Thom	PenCr	11	33		78	44	22	
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	PenGr	11		44			11	
<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom	PenOx					11		
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D.L. Lindner	PsePa	56		11				
<i>Rhizopus arrhizus</i> A. Fisch.	RhiAr	11	67	67	67	100	67	56
<i>Sarocladium kiliense</i> (Grütz) Summerb.	SarKi	44	33					22
<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg	TriAs	11						
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifaiu	TriHa		11	44		56	11	
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	TriKo	11				22		33
<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx	TriVi				22		67	
Всего видов		12	8	11	11	11	11	8

\* В таблице приведены показатели встречаемости видов (в %)

вергали по 9 повторностей каждого опытного и контрольного варианта. Допустимый уровень значимости принимали  $p \leq 0,05$ . Таксономическое разнообразие микромицетов оценивали по индексу разнообразия Шеннона. Для выявления сходства/различия образцов между собой рассчитывали симметричную матрицу

дистанций D, состоящую из коэффициентов расстояния Брея-Кёртиса.

Взаимную упорядоченность сообществ культивируемых микромицетов в системе относительных шкал графически представляли с помощью кластеризации  $k$ -средних и неметрического многомерного

шкалирования [4]. Для оценки различий в показателях видового разнообразия была построена модель однофакторного дисперсионного анализа.

На ее основе выполнены множественные парные сравнения как контрольной группы со всеми опытными образцами, так и реализована схема полного перебора всех вариантов на основе контрастов Тьюки. Методика получения бустстреп-оценок  $p$ -значений для  $t$ -критерия при сравнении индекса Шеннона в нескольких группах описана в работе [6]. Статистические

расчеты произведены с использованием статистической компьютерной программы R ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)).

**Результаты.** При внесении меди и ГП в образцы искусственных почв структура сообщества микромицетов претерпела значительные изменения. Виды, доминирующие в различных образцах, и частота их встречаемости приведены в табл. 2.

Статистические модели оценки трансформации комплексов почвенных микромицетов под влиянием меди и при ремедиации ГП приведены в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Анализ различий индексов видового разнообразия сообществ микромицетов по Шеннону между исследуемыми образцами

	K	Cu <sub>2</sub>	Cu <sub>2</sub> F0,1	Cu <sub>2</sub> F1	Cu <sub>4</sub>	Cu <sub>4</sub> F0,1	Cu <sub>4</sub> F1
K		0,236	0,994	0,453	0,581	0,664	0,458
Cu <sub>2</sub>	0,288		0,220	0,646	0,504	0,101	0,044
Cu <sub>2</sub> F0,1	-0	-0,291		0,447	0,584	0,666	0,453
Cu <sub>2</sub> F1	0,182	-0,106	0,185		0,824	0,225	0,112
Cu <sub>4</sub>	0,131	-0,157	0,133	-0,051		0,338	0,199
Cu <sub>4</sub> F0,1	-0,11	-0,393	-0,103	-0,287	-0,236		0,753
Cu <sub>4</sub> F1	-0,18	-0,47	-0,18	-0,364	-0,313	-0,077	

Примечание: \* ниже диагонали – нормированная на дисперсию разность индексов Шеннона, выше диагонали – вероятности нулевой гипотезы об отсутствии различий в видовом разнообразии.

Таблица 4. Матрица коэффициентов расстояния Брея-Кёртиса

	K	Cu <sub>2</sub>	Cu <sub>2</sub> F0,1	Cu <sub>2</sub> F1	Cu <sub>4</sub>	Cu <sub>4</sub> F0,1
Cu <sub>2</sub>	0,833					
Cu <sub>2</sub> F0,1	0,956	0,921				
Cu <sub>2</sub> F1	0,940	0,814	0,765			
Cu <sub>4</sub>	0,955	0,725	0,904	0,833		
Cu <sub>4</sub> F0,1	0,937	0,791	0,751	0,662	0,775	
Cu <sub>4</sub> F1	0,747	0,678	0,921	0,829	0,788	0,817

Как свидетельствуют результаты парных сравнений, индекс видового разнообразия по Шеннону статистически значимо отличается только между образцами двух вариантов Cu<sub>4</sub>F1 и Cu<sub>2</sub>.

Индекс Сьеренсена не учитывает относительное обилие отдельных видов, то есть не делает различий между случайной встречаемостью вида в одной колонии одной чашки и массовым доминированием. Поэтому мы рассчитали коэффициенты расстояния Брея-Кёртиса и сформировали симметричную матрицу дистанций D между образцами (табл. 4). Самыми близкими, согласно этому методу расчетов, оказались образцы Cu<sub>2</sub>F1 и Cu<sub>4</sub>F0,1.

Графическое представление взаимной упорядоченности сообществ культивируемых микромицетов выполняли в системе относительных шкал (компонент) с использованием матрицы экологических расстояний табл. 4. Первый вариант, представленный на рис. 1, получили методом кластеризации  $k$ -средних

с подстройкой классификационных отношений на основе нечетких множеств Заде-Бездека [6]. Исследуемые образцы по видовому сходству грибных сообществ распадаются на 3 группы.

Другой вариант проецирования данных в пространстве двух координат получили с использованием более распространенного метода – неметрического многомерного шкалирования (рис. 2). Метод использует произвольную матрицу дистанций D и проецирует ее на плоскость таким образом, чтобы приближенно сохранить расстояния между объектами, которые имели место в многомерном пространстве.

На рисунке представлен «биplot», совмещающий представление образцов почвы и связанных с этими образцами видов культивируемых грибов (если название одного вида налагается на другой, то сверху показан вид с большей численностью КОЕ).

Проекция точки вида на ординационную плоскость показывает экологический оптимум (точнее, центр

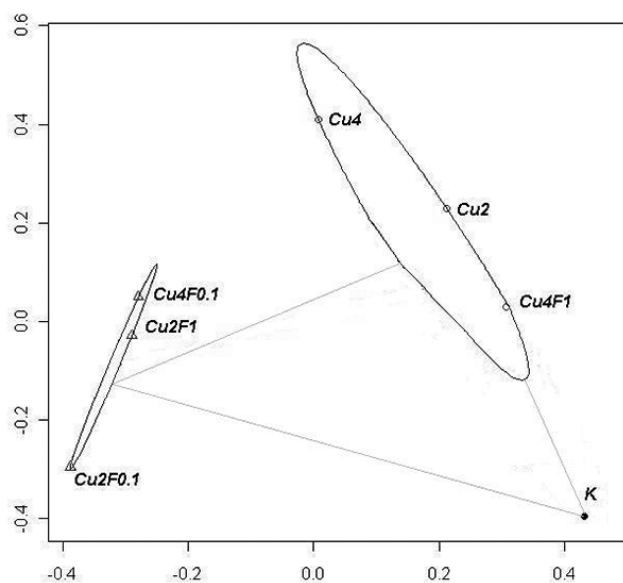


Рис. 1. Группировка сообществ культивируемых микромицетов в исследованных образцах почв с использованием алгоритма нечеткой классификации (по осям абсцисс и ординат – 1-я и 2-я нечеткие компоненты)

тяжести распределения обилия) этого вида относительно точек испытуемых образцов. Несмотря на принципиально разные подходы к проецированию (рис. 1 и 2), получены сходные тенденции в двух вариантах статистической обработки данных о видовом составе грибов в образцах с медью и гуматом.

**Заключение.** Анализ трансформации микобиоты, проведенный в эксперименте с моделированием загрязнения почвенных образцов тяжелыми металлами и последующей обработкой ГП Флексом, выявил существенные различия в видовом составе при разных дозах загрязнителя и ремедианта.

Анализ упорядоченности относительно друг друга образцов по сходству структуры сообществ культивируемых микромицетов в системе относительных шкал показал, что образцы по видовому сходству распадаются на 3 группы: 1-я – контроль; вторая –  $Cu_2$  и  $Cu_4$ , третья –  $Cu_2F0,1$ ,  $Cu_2F1$  и  $Cu_4F0,1$ . Отнесение образца  $Cu_4F1$  ко 2-й или 3-й группе не является однозначным.

Очевидно, образец  $Cu_4F1$  можно признать максимально неблагоприятным для развития микромицетов. Скорее всего, 1 г/кг ГП при высокой дозе меди (528 мг/кг) не способен ослабить действие загрязнителя, а лишь усиливает токсичность.

Таким образом, воздействие меди приводит к количественным и качественным нарушениям естественной структуры сообществ культивируемых

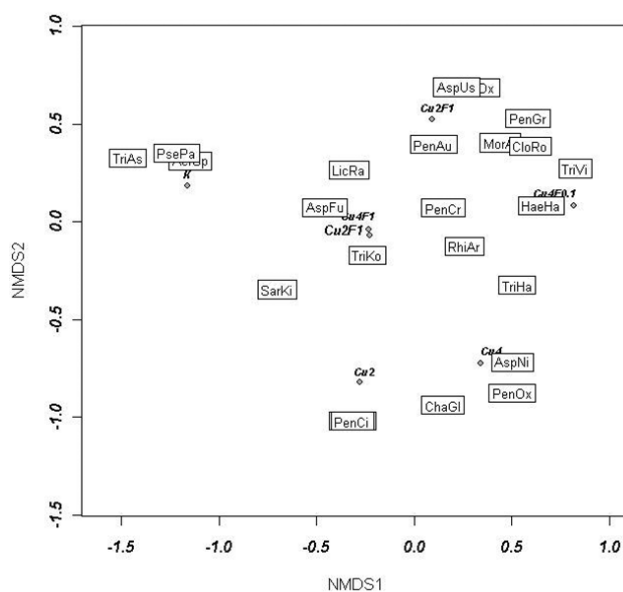


Рис. 2. Группировка сообществ культивируемых микромицетов в исследованных образцах с использованием алгоритма неметрического многомерного шкалирования.

грибов, и внесение такого гуминового препарата как Флексом не способно полностью смягчить эти негативные эффекты.

*Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ KR-2092.*

#### Список литературы

1. Marfenina OE. Anthropogenic ecology of soil fungi. M: Medicine for everything, 2005: 196 p.
2. Odum Yu. Ecology. M.: World, 1986. 1.:328 p., 2: 376 p.
3. Tsiroidis V, Petala M, Samaras P et all. Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. Ecotoxicol. Environm. Safety. 2006; 63: 158-67.
4. Дэйвисон М. Многомерное шкалирование. Методы наглядного представления данных. М.: Финансы и статистика. 1988: 348 с.
5. Шаповал О.А., Можарова И.П., Коршунов А.А., Грабовская Т.Ю. Инновационные формы удобрений на основе аминокислот растительного и животного происхождения. Сб. тез. «Гуминовые вещества и другие биологически активные соединения в сельском хозяйстве, МГУ им. М.В. Ломоносова. 2014: 76-80.
6. Шитиков В.К., Розенберг Г.С. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти: Кассандра. 2014: 314 с. URL: <http://www.ievbras.ru/ecostat/Kiril>

## ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ НА ПОЛИМЕРНЫХ ПОДЛОЖКАХ ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И ПОЛИЛАКТИДА

Тертышина Ю.В.<sup>1,2</sup>, Шибряева Л.С.<sup>1,2</sup>, Бидей И.А.<sup>2</sup>, Левина Н.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>2</sup>ВНИИ механизации сельского хозяйства, Москва

Как известно, микромицеты встречаются в нашей жизни повсеместно, начиная от воздуха, которым мы дышим и, заканчивая космическими кораблями. В данной работе рассматривается возможность поражения микромицетами почвы нетканого материала из полилактида и поли-3-гидроксибутирата, используемых в качестве подложки для прорастания семян пшеницы.

Задача состояла в следующем: получить подложку из биополимера, которая хорошо впитывает влагу и после использования биodeградирует в почвогрунте без образования токсичных веществ. Взятые для исследования полимеры являются биоразлагаемыми, экологически безопасными и нетоксичными представителями своего класса, при деструкции образуют CO<sub>2</sub> и воду.

Поли-3-гидроксибутират (ПГБ) – биополимер, линейный полиэфир, который получают путем биосинтеза, используя различные штаммы бактерий (рис. 1).

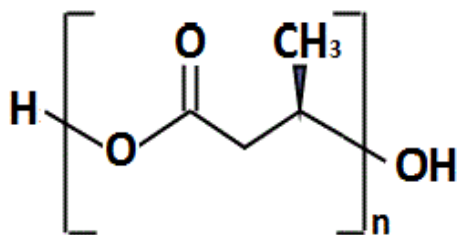


Рис. 1. Формула поли-3-гидроксибутирата

ПГБ демонстрирует высокие физико-механические показатели, совместимость с организмом человека, а также способность деструктурировать в окружающей среде с образованием нетоксичных продуктов: углекислого газа и воды. ПГБ и пленочные композиции на его основе активно изучаются исследователями во многих странах мира [1–3]. Помимо ПГБ, современным, перспективным и биоразлагаемым полимером считается полилактид (ПЛА) — продукт конденсации молочной кислоты (рис. 2).

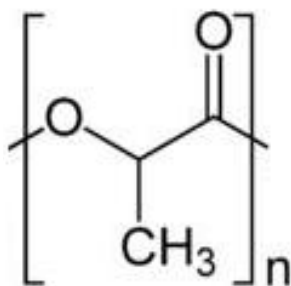


Рис. 2. Формула полилактида

Для примера ниже приведена микрофотография нетканого волокна ПГБ.

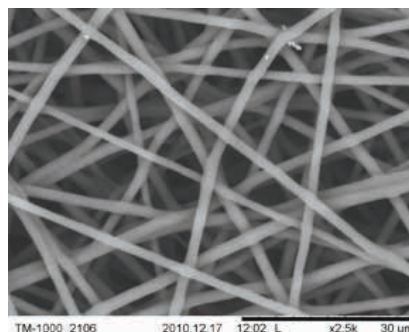


Рис. 3. Микрофотография нетканого волокна ПГБ.

Полилактид — прозрачный, бесцветный, термопластичный полимер, который получают как синтетическим способом, так и из природного сырья путем молочнокислого брожения сула кукурузы, картофеля, зерновых культур и другого сырья природного происхождения. Изделия из ПЛА характеризуются высокой прочностью, прозрачностью и блеском, а также лучшей способностью сохранять форму после сжатия или кручения по сравнению с полипропиленом [4].

**Экспериментальная часть.** Из вышеуказанных биополимеров методом электроформования получили нетканое волокно, которое было использовано в качестве подложки для прорастания пшеницы следующим образом. Отбор проб семян пшеницы сорта Московская 39 проводился в соответствии с ГОСТ 12036 [5]. Семена очищались от всякого рода органических, минеральных примесей, а также щуплых и поврежденных зерен. Для проращивания семян использовали стерилизованные в течение 2 ч при T=130 °C чашки Петри.

В опыте 1 (контроль) на дно чашки помещалась предварительно увлажненная бумага диаметром, соответствующим диаметру дна чашки. В опытах 2 и 3 в качестве подложки использовали нетканое волокно из ПГБ и ПЛА. В соответствии с ГОСТ 12038 [6] повторность опытов была 4-х кратная. Из выделенных навесок семян для каждого опыта отбирали 4 пробы по 100 семян в каждой. Для этого использовали счетчик семян “Contador” с блоком отбора проб “Contafiler” (Germany). Семена раскладывались на предварительно увлажненное ложе чашек Петри зародышами вниз. Чашки закрывались крышками, на дно которых помещалась увлажненная однослойная фильтровальная бумага. Проращивание семян проводили при T=20 °C в темноте. Для этого чашки Петри помещали в термостат. Состояние увлажненного ложа проверялось ежедневно. В случае заметного подсыхания ложа



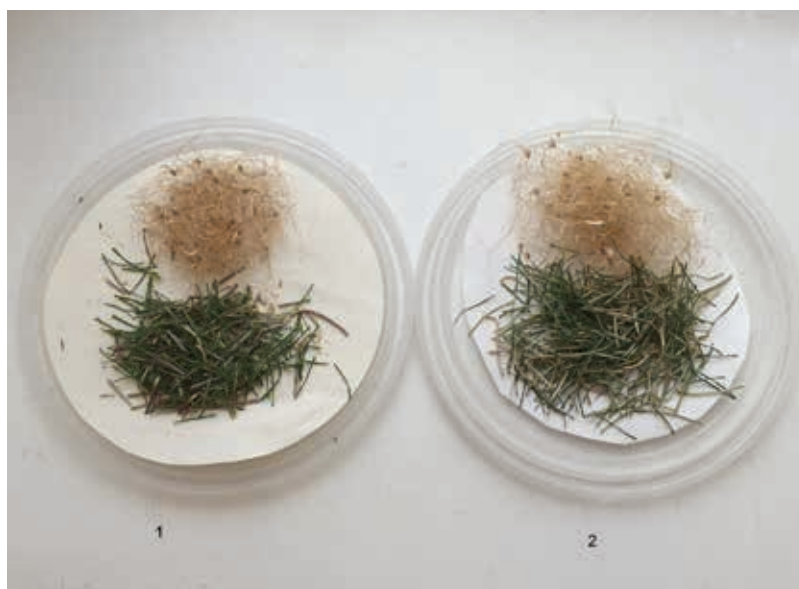


Рисунок 4. Корневая система и зеленая масса пшеницы в контрольном образце (1) и на подложке из нетканого материала ПГБ (2).

смачивалось водой комнатной температуры, не допуская переувлажнения. Ежедневно на несколько секунд крышки чашек Петри приоткрывались для обеспечения доступа воздушной среды. На дно термостата был установлен поддон с водой, которая менялась каждые 3 – 5 сут. Оценку и учет проросших семян проводили при сроках, регламентируемых ГОСТ 12308. Результаты, полученные в ходе эксперимента, можно считать вполне удовлетворительными. На рис. 4. представлены фотографии проросшей пшеницы в сухом виде. Полимерные подложки продемонстрировали, что могут создать альтернативу фильтровальной бумаге и их использование не влияет на всхожесть, она одинаково высокая в том и в другом случае.

**Следующий этап.** Исследование возможности поражения подложек из ПГБ и ПЛА микромицетами почвы. Как показано в работе [7] такие микромицеты, как *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* и *Trichoderma viride*, активно поражают ПГБ. Что касается ПЛА, его показатели биodeградации чуть ниже, хотя он так же, как и ПГБ относится к классу линейных полиэфиров. Известно, процесс развития мицелия у плесневых грибов зависит от многих факторов, поэтому сказать однозначно, почему так происходит, нельзя [8, 9].

Предварительно был проведен эксперимент на агарной среде, чтобы оценить силу воздействия плесневых грибов на исследуемые полимеры. Тест-объектами служили штаммы *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium brevis-com pactum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclospium* и *Trichoderma viride*, предоставленных для опытов кафедрой микологии и альгологии МГУ им. Ломоносова.

Обнаружено, что для ПГБ наиболее быстрое начало роста и формирование спороношения характерно у *A. flavus* (*A. flavus*), *T. viride* и *P. chrysogenum*, чуть хуже – *A. niger*, но через 7 дней *A. niger* не уступал в активности *A. flavus* и *P. chrysogenum*. Что касается ПЛА, то здесь активность плесневых грибов была несколько ниже. После опыта в агарной среде была изучена биodeградация в почве.

Грунт был подготовлен согласно ГОСТ 9.060-75 из песка, конского навоза и садовой земли, взятых в равных количествах по массе. Предварительно взвешенные образцы размером 30×30 мм были помещены в почвогрунт. При подсыхании грунт увлажняли фильтрованной водой. Влажность поддерживалась на протяжении всего эксперимента и составила 60%, рН грунта 6,4. Контроль биodeградации осуществляли по потере массы образцов после 30, 45 и 60 сут.

Нетканый материал из ПГБ и ПЛА вынимали, осторожно кисточкой снимали слой грунта, промывали водой и сушили в сушильном шкафу при t 40 °С не менее 24 ч. После этого образцы взвешивали и оценивали потерю массы ( $\Delta m$ ) по формуле:

$$(m_0 - m_1) / m_0 \times 100\%,$$

где  $m_0$  – начальная масса образца,  $m_1$  – после деградации.

После инкубации в течение 30 сут масса образцов уменьшилась:  $\Delta m$  ПГБ составила 55%, а  $\Delta m$  ПЛА – 11%. Через 45 сут нетканое волокно из ПГБ полностью разложилось в грунте без остатков видимых фрагментов. Образец ПЛА потерял 15% и через 60 сут фрагменты нетканого волокна ПЛА все еще находились в грунте. После 150 сут ПЛА также полностью разложился под действием микроорганизмов почвы.

**Заключение.** Следует отметить, что процесс биodeградации в почве, конечно же, очень зависит от состава и примесей почвы. При высоком содержании компостной составляющей и большого количества микромицетов период разложения объектов уменьшается, а наличие песка или глины продлевает время биодеструкции материала. Также на скорость биodeградации влияет температура, поскольку микробиологическая активность почвенных грибов тоже зависит от температуры [9].

Из всего вышесказанного можно заключить, что можно применять биополимерные подложки для проращивания семян. Они достаточно хорошо держат

влагу и быстро подвергаются процессу биологической деструкции в почве. Конечно, нетканый материал из ПГБ разлагается быстрее, однако и 150 дней, которые демонстрирует ПЛА можно считать вполне приемлемым сроком по сравнению с периодами распада промышленных синтетических полимеров.

#### Список литературы

1. Tertysnaya YuV, Shibryaeva LS, Popov AA. Thermooxidative degradation on blends based on poly-3-hydroxybutyrate. Specifics of the process. Russ J Phys Chem. B. 2012; 6(1): 38.
2. Manna A, Paul AK. Degradation of microbial polyester poly(3-hydroxybutyrate) in environmental samples and in culture. Biodegradation. 2000; 11: 323.
3. Подзорова М.В., Тертышная Ю.В. Перспективы применения полимерных материалов в сельском хозяйстве. Сельхоз. машины и технологии. 2014; 5: 31-34.
4. Подзорова М.В., Тертышная Ю.В., Попов А.А. Экологически безопасные пленки на основе поли-3-гидроксibuтирата и полилактида. Хим. физика. 2014; 33(9): 57-64.
5. ГОСТ 12036-85. Семена сельскохозяйственных культур. Правила приемки и методы отбора проб.
6. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести.
7. Тертышная Ю. В., Шибряева Л.С., Попов А.А. Деградация в почве и воде поли-3-гидроксibuтирата и композиций на его основе. Пластические массы. 2011; 7: 46.
8. Германов Н. И. Микробиология. М.: Просвещение. 1967: 227 с.
9. Толстихина Т.Е. Ауторегуляция прорастания спор почвенных грибов. Дисс. на соискание ... канд. биол. наук. М. 2007: 122 с.

## ЗАСЕЛЕННОСТЬ ОКУЛЬТУРЕННЫХ И ЦЕЛИННЫХ ПОЧВ ПРОПАГУЛАМИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОРНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ РАСТЕНИЙ

Торопова Е.Ю., Кириченко А.А.

Новосибирский государственный аграрный университет. Новосибирск

Устойчивое функционирование экосистем базируется на здоровье почв. Под здоровьем почвы понимают ее способность неопределенно долго функционировать в качестве компонента наземной экосистемы, обеспечивая ее биопродуктивность и поддерживая качество воды и воздуха, а также здоровье растений, животных и человека [1]. Здоровые почвы должны быть свободны от пропагул вредных организмов или заселены ими ниже ПВ (биологического порога вредоносности), выше уровня которого урожайность и качество сельскохозяйственной продукции снижаются с вероятностью 95% [2].

Возбудители корневых гнилей зерновых культур представлены 14 родами и видами грибов, при доминировании микромицетов *Fusarium* spp. и *Bipolaris sorokiniana* Sacc. Shoem. (syn. *Helminthosporium sativum* Pam., King et Bakke). Имея широкие трофические связи, грибы рода *Fusarium* паразитируют на более чем на 150 видах растений, *B. sorokiniana* – более 60 дикорастущих и культурных видах [3]. В последнее десятилетие фузариозные корневые гнили стали доминировать над гельминтоспориозными в агроценозах яровой пшеницы и ячменя Западной Сибири и Восточного Зауралья, что связано со сменой доминирующих видов в почвенных микоценозах [4].

**Цель исследований** – определение заселенности окультуренных и целинных почв Западной Сибири основных зональных типов пропагулами возбудителей корневых инфекций.

В соответствии с поставленной целью, задачи исследования сводятся к следующему:

1. Провести обследование зональных почв разного уровня продуктивности (высоко продуктивные, в два и более раза пониженной продуктивности, целинные

аналоги) по содержанию пропагул наиболее вредоносных почвенных фитопатогенов (*Bipolaris sorokiniana* Sacc. Shoem., *Fusarium* spp.)

2. Оценить влияние окультуривания на плотность пропагул в четырех типах почвы.

**Объект исследования** – почвы (окультуренная и целинная) (чернозем выщелоченный, серая лесная, лугово-черноземная, чернозем южный) хозяйственного назначения в регионах Западной Сибири (Новосибирская, Томская области)

Для достижения поставленной цели и решения задач был проведен одновременный отбор почвенных образцов в 9 хозяйствах, расположенных в разных регионах Западной Сибири по методике агрохимических исследований (ГОСТ 28168-89). Образцы были отобраны из верхнего 0–10 см слоя почвы в начале вегетационного периода на окультуренных участках высокой и низкой продуктивности и на непосредственно прилегающих к ним целинных участках.

Определение заселенности почв конидиями возбудителя обыкновенной корневой гнили зерновых культур – *B. sorokiniana* Sacc. Shoem. (syn. *H. sativum* Pam., King et Bakke) выполняли методом флотации [5]. Определение содержания пропагул *Fusarium* spp. – методом почвенных разведений [6].

В табл. 1 представлены данные по заселенности окультуренных и залежных почв 9 хозяйств лесостепи Западной Сибири конидиями *B. sorokiniana* и пропагулами (микро- и макроконидии, хламидоспоры, мицелий) грибов рода *Fusarium*.

Данные таблицы свидетельствуют, что зональные окультуренные и целинные почвы в значительной степени заселены пропагулами почвенных фитопатогенов. Образцов, свободных от пропагул фитопатогенов, не было.

Табл. 1. Плотность propagул основных почвенных фитопатогенов, экз./г возд.-сух. почвы

Почва	<i>Bipolaris sorokiniana</i>		<i>Fusarium spp.</i>	
	предел	средн	пред	средн
Окультуренная: с высокой продуктивностью	15-205	73,9	30,6-92,4	52,7
с низкой продуктивностью	30-310	180,6	56,6-220,8	78,8
Залежная: с высокой продуктивностью	15-80	26,7	41,2-86,4	48,6
с низкой продуктивностью	15-150	42,8	47,8-88,6	50,2
НСР <sub>05</sub>		13,9		17,0

тогенов, выявлено не было. Статистический анализ установил достоверные различия в заселенности окультуренных почв разного уровня продуктивности, а также залежных почв конидиями *B. sorokiniana*. Этот факт свидетельствует о потенциальной возможности использовать этот показатель для характеристики качества почв и выявления особо ценных почв.

Высокопродуктивные окультуренные почвы были заселены конидиями в среднем в 2,5 раза ниже, чем почвы с пониженной продуктивностью и в 2,8 раза выше по сравнению с примыкающими к ним целинными участками. Численность конидий отражает два противоположных процесса: размножение микромицета на злаковых растениях (культуры, сорных, дикорастущих) и постепенную деградацию конидий под действием почвенной микрофлоры и мезофауны. То есть по плотности конидий можно судить о культуре земледелия (структура севооборотов, засоренность посевов) и интенсивности поступления в почву органических остатков, необходимых для жизнедеятельности антагонистов.

Грибы *Fusarium* относительно равномерно заселяли высокопродуктивные и целинные почвы, достоверных статистических различий выявить не удалось. Это подтверждает высокую адаптацию микромицетов таксона к почвенным условиям и их широкие трофические связи с более, чем 150 видами культурных и дикорастущих растительных видов из разных семейств. Учитывая разнообразие фузариевых грибов в почвах и наличие в составе рода сапротрофных и антагонистических видов, численность этой группы микромицетов можно использовать для характеристики биологического разнообразия микрофлоры почв. Было выявлено более 10 видов рода *Fusarium*, наиболее распространены *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc., *F. gibbosum* App. et Wr. Emend. Bilai (*F. equiseti*), *F. sporotrichoides* Sherb., *F. oxysporum* (Schlecht) Snyder et Hans.

Учитывая зональное почвенное разнообразие, мы обобщили данные по заселенности окультуренных и целинных участков конидиями *B. sorokiniana* по типам почв, а также оценили их фитосанитарное состояние в

Таблица 2. Плотность propagул *B. sorokiniana* по типам почв

Вариант	Всего, экз./г возд.-сух. почвы		Число ПВ	
	целина	окультуренная	целина	окультуренная
Чернозем выщелоченный	20,0	165,0	1	6,6
Серая лесная	31,0	142,5	1	5,7
Лугово-черноземная	22,5	130,0	0,5	3,3
Чернозем южный	30,0	82,5	1,5	5,5

биологических порогах вредоносности (ПВ), которые численно различаются [7, 8] (табл. 2).

Данные таблицы свидетельствуют, что окультуренные почвы заселены конидиями *B. sorokiniana* на уровне 5,5–6,6 ПВ, а целинные – 1–1,5 ПВ, что свидетельствует о негативном влиянии окультуривания на фитосанитарный статус и здоровье почв. Почвы целинных участков поддерживали равновесную численность популяций патогенных почвенных микромицетов на уровне близком к ПВ.

Тип почвы, определяя ее микробиологический статус и супрессивность, также влиял на фитосанитарное состояние целинных почв. Так, самая благополучная ситуация выявлена в лугово-черноземной почве, характеризующейся высокой супрессивностью, а самая неблагоприятная – в наименее супрессивном черноземе южном [7].

**Вывод.** Проведенная оценка зональных почв по заселенности возбудителями основных почвенных инфекций растений (*B. sorokiniana*, грибами *Fusarium*) позволила установить достоверные отличия контрастных по продуктивности окультуренных почв и примыкающих к ним целинных почв 4 основных сибирских типов по фитосанитарным параметрам.

Выявлен достоверный рост заселенности почв фитопатогенными грибами в результате окультуривания, а также существенное различие уровня заселенности контрастных по продуктивности почв. Установлена равновесная численность конидий *B. sorokiniana* в целинных почвах на уровне ПВ.

#### Список литературы

1. Соколов М.С. Актуальные задачи оздоровления почв России. Почвы в биосфере и жизни человека. М.: МГУЛ. 2012: 356-84.
2. Торопова Е.Ю., Стецов Г.Я., Чулкина В.А. Эпифитотология. Новосибирск. 2011: 711 с.
3. Гагкаева Т.Ю., Ганнибал Ф.Б., Гаврилова О.П. Зараженность зерна пшеницы грибами *Fusarium* и *Alternaria* на юге России в 2010 г. Защ. карант. раст. 2012; 1: 37-41.
4. Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Воробьева И.Г., Селюк М.П. Фузариозные корневые гнили зерновых культур в Западной Сибири и Зауралье. Защ. карант. раст. 2013; 9: 23-6.

5. Составление и применение фитопатологических почвенных картограмм (ФПК) по заселенности почв возбудителем гельминтоспориозной гнили зерновых культур. Новосибирск. 1987: 21с.
6. Кураков А.В. Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем: Учебно-методическое пособие. М: МАКС Пресс. 2001: 92 с.
7. Павлова О.И. Особенности выживания и паразитической активности возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили зерновых культур в разных типах почв Западной Сибири: Автореф. дис...канд. биол. наук. М. 1988: 17 с.
8. Чулкина В.А. Биологические основы эпифитотиологии. М: Агропромиздат. 1991: 287 с.

## ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ МИКОЛОГИЧЕСКОГО ФОНА В БИОТОПАХ ПОЧВ КАЗАНИ

Валиуллин Л.Р.<sup>1</sup>, Гатиятуллина А.Ф.<sup>2</sup>, Юмангулова Г.М.<sup>2</sup>, Обухова О.А.<sup>2</sup>, Егоров В.И.<sup>1</sup>,

Рагинов И.С.<sup>3</sup>, Шуралев Э.А.<sup>2</sup>, Тремасов М.Я.<sup>1</sup>, Иванов А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>3</sup>Казанский государственный медицинский университет

Загрязнение окружающей среды городских территорий представляет собой одну из самых острых проблем в настоящее время. Высокая степень экологических нагрузок на экосистемы городских территорий при интенсивном антропогенном воздействии может вызвать геохимические и геофизические изменения, которые приводят к накоплению в почве тяжелых металлов, нитратов, нитритов, пестицидов и других экотоксикантов, что в свою очередь ведет к изменению экосистем почв (Валиуллин Л.Р. и др. 2010; Никитин О.В. и др. 2014).

Бесконтрольное использование пестицидов (Егоров В.И. и др. 2012) и осушение ранее обводненных районов, нерациональное применение регуляторов роста, фунгицидов, биологических средств защиты и корректоров иммунного статуса растений приводят к серьезным нарушениям экологического равновесия и возникновению все более опасных проявлений пораженности растений микроскопическими грибами (Stagnari F. et. al. 2015). Микроскопические грибы (микробиоты) могут приводить, как к респираторным заболеваниям человека (Шуралев Э.А. и др. 2013), так и образовывать высокотоксичные метаболиты, которые обладают канцерогенными, аллергенными и иммуноподавляющими свойствами.

Цель исследований – изучение зависимости содержания микробиот от уровня загрязнения почв нитратами в лесопарковых почвах города.

**Результаты.** Содержание нитратов в почвах Казани представлены в табл. 1. Из таблицы видно, что среднее значение содержания нитратов в почве из сквера у вокзала находится ниже уровня ПДК на 90%. В пробах грунта с перекрестка улиц Правобулачная/К. Наджми содержание нитратов было ниже ПДК на 83%, в почве Ленинского сада – на 87%, Лядского сада – на 74%. Содержание нитратов в почвах парка им. Горького было меньше уровня ПДК на 88%. Количественное содержание нитратов в почвах Лесонасаждения 8 марта было ниже ПДК на 97%, в пробах из КАН авто – на 98%, из Лесонасаждения Нагорный – на 93%.

Следовательно, во всех исследованных пробах содержание нитратов было значительно ниже уровня

Табл. 1. Изучение количественного содержания нитратов в почвах Казани

Точки отбора проб	Содержание азота в форме нитратов, мг/кг почвы
ПДК	130±0,2
Сквер у Ж/Д вокзала	12,3±0,7
Перекресток улиц Правобулачная/К. Наджми	22,4±0,5
Ленинский сад	16,2±0,6
Лядский сад	34,7±0,8
Парк им. Горького	15,9±0,6
Лесонасаждение 8 марта	4,00±0,5
КАН-авто	3,3±0,3
Лесонасаждение Нагорный	9,3±0,4

ПДК. Наибольшее же их количество было обнаружено в пробах грунта из Лядского сада (34,7±0,8 мг/кг).

Результаты проведенных исследований количественного содержания микроскопических грибов в почвах города Казани представлены в табл. 2.

Из таблицы видно, что наибольшее содержание микробиот было обнаружено в пробах почвы из Лядского сада, оно составило  $26,7 \times 10^4$ . В почве из сквера у вокзала количество обнаруженных микроскопических грибов было ниже на 80%. В пробах грунта с перекрестка улиц Правобулачная/К. Наджми содержание микробиот было меньше на 41%. В почвах из Ленинского сада и парка им. Горького ниже на 87 и 76% соответственно. В пробах почвы из КАН-авто и Лесонасаждения Нагорный было обнаружено наименьшее количество микробиот, а именно  $2,5 \times 10^4$  и  $3,3 \times 10^4$  соответственно, что ниже, чем в пробах из Лядского сада на 90 и 88%.

Таким образом, по количественному содержанию нитратов и микромицетов в пробах почв можно сделать вывод, что при повышении уровня содержания

Табл. 1. Изучение количественного содержания нитратов в почвах г. Казани

Точки отбора проб	Количественное содержание микромицетов в почве
Сквер у ж/д вокзала	$5,6 \times 10^4$
Перекресток улиц Правобулачная/К. Наджми	$15,8 \times 10^4$
Ленинский сад	$8,7 \times 10^4$
Лядский сад	$26,7 \times 10^4$
Парк им. Горького	$6,3 \times 10^4$
Лесонасаждение 8 марта	$1,5 \times 10^4$
КАН-авто	$2,5 \times 10^4$
Лесонасаждение Нагорный	$3,3 \times 10^4$

нитратов повышается и уровень загрязнения микроорганизмами, что указывает на возможное отрицательное влияние высоких экологических нагрузок на живые организмы в биотопах почв городских территорий.

#### Список литературы

1. Валиуллин Л.Р. Агротехногенное влияние на биотопы почв как фактор загрязнения агропродукции токсинами патогенных грибов. Биотехнология: экология крупных городов. М. 2010: 436.
2. Никитин О.В., Минакова Е.А., Степанова Н.Ю. и др. Геоэкологический мониторинг излучины реки Казанки и прилегающих территорий. Сб. тр. V Межд. Конгр. «Чистая вода. Казань» 26–28 марта 2014 г. Казань: типогр. ООО «Куранты». 2014: 228-30.
3. Егоров В.И. Токсикологическая оценка сочетанного воздействия дециса и Т-2 токсина на организм животных. Достиж. науки техн. АПК. М. 2012: 64-7.
4. Stagnari F, Perpetuini G, Tofalo R. et. all. Long-term impact of farm management and crops on soil microorganisms assessed by combined DGGE and PLFA analyses. Front Microbiol. 2014. 10(5): 644.
5. Шуралев Э.А., Ндаишимийе Э.В., Мукминов М.Н. и др. Факторы риска и индикация *Mycobacterium bovis* на территориальном уровне. Уч. зап. КГАВМ. 2013; 215: 367-71.

## ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРИБОВ С КАМЕНИСТЫМ СУБСТРАТОМ В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Власов Д.Ю., Зеленская М.С., Сазанова К.В.*

*Санкт-Петербургский государственный университет. Санкт-Петербург*

Одним из проявлений адаптационных возможностей грибов можно считать их обитание на горных породах, минералах, искусственном камне. На этих труднодоступных субстратах микромицеты встречаются в природных и техногенных экосистемах в различных климатических условиях, включая высокоширотные регионы [1]. Лимитирующими факторами развития грибов в подобных местообитаниях могут быть:

- дефицит источников питания;
- резкие изменения и экстремальные значения температуры и влажности;
- высокий уровень инсоляции;
- состав атмосферных осадков (особенно в промышленно загрязненных районах);
- твердость, химическая инертность и однородность субстрата.

Очевидно, что в таких условиях каменистый субстрат могут колонизировать грибы, характеризующиеся стресстолерантной жизненной стратегией. Если в городской среде в составе литобионных сообществ можно встретить типичные плесневые, дрожжевые и дрожжеподобные микромицеты, характеризующиеся различной скоростью роста и биохимической активностью, то в природных экосистемах, особенно в жестких климатических условиях, преобладают ме-

ланизированные мицелиальные и дрожжеподобные грибы, преимущественно, аскомицетного аффинитета. Среди них особое место принадлежит так называемым «черным дрожжеподобным грибам».

При изучении микромицетов, обитающих на природном или искусственном камне, особый интерес представляют их взаимоотношения с каменистым субстратом, а также взаимодействия, складывающиеся в литобионном сообществе. Эти два аспекта в сочетании с адаптационными свойствами микромицетов во многом определяют способность грибов последовательно колонизировать различные типы камня, оказывая на него деструктивное воздействие. Проблема микодеструкции природного и искусственного камня имеет и практическое значение в свете необходимости защиты памятников культурного наследия, зданий и сооружений от биоповреждений.

Несмотря на многочисленные работы последних лет, посвященные различным аспектам геомикологии, вопросы взаимодействия грибов и каменистого субстрата остаются недостаточно изученными. Наши исследования были нацелены на выявление особенностей взаимодействия грибов и каменистых субстратов в природных и экспериментальных условиях. Основное внимание было уделено особенностям колониза-

ции грибами различных горных пород (карбонатных и силикатных), а также процессам трансформации поверхностного слоя камня под воздействием метаболитов грибов.

Наблюдения проводились в различных климатических условиях, где отбирались образцы природного камня с признаками биологического повреждения. Были исследованы 6 типов мрамора, путиловский и пудожский известняк, гранит рапакиви, сердобольский гранит, габроид и кварцит. Основными методами анализа взаимодействия грибов и каменистого субстрата были сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микрозондовый анализ (исследования проводились на базе ресурсного центра СПбГУ «Развитие клеточных и молекулярных технологий»). Анализ продуцируемых грибами в среду карбоновых кислот проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе Agilent с масс-селективным детектором 5975С (США). В лабораторных опытах моделировались процессы взаимодействия грибов и различных типов камня, осуществлялись долгосрочные эксперименты (до 6 месяцев) по культивированию грибов на каменистом субстрате в различных условиях (поступление питательных веществ, увлажнение и др.).

При СЭМ-исследовании поверхности каменистого субстрата (карбонатного и силикатного) с признаками биологического повреждения были отмечены микроколонии и гифы микроскопических грибов на всех изученных горных породах. Во многих случаях микромицеты входили в состав биопленок (сообществ), объединяющих различные микроорганизмы: микроскопические водоросли (диатомовые и зеленые) и бактерии (в т.ч. цианобактерии). Доминирующей формой существования грибов на горных породах в природных условиях оказались микроколонии. Можно выделить несколько типов микроколоний. Мелкие компактные скопления (от 20 до 100 мкм), состоящие из округлых толстостенных клеток, занимают небольшие углубления на поверхности камня или располагаются на практически ровной поверхности. Часто в состав микроколоний входят частицы самого каменистого субстрата. Более крупные колонии (от 100 до 500 мкм) включают округлые толстостенные клетки и короткие гифы, а иногда состоят только из коротких гиф (цепочек толстостенных клеток). Грибы способны проникать по микротрещинам, порам и углублениям в толщу каменистого субстрата, вызывая при этом ослабление поверхностного слоя горной породы. При этом характер колонизации камня во многом зависит от свойств субстрата, внешних условий, а также состава литобионтного сообщества, что особенно наглядно проявляется при сравнении образцов из Антарктики, Санкт-Петербурга и Крыма (Херсонес Таврический).

Под воздействием продуктов метаболизма грибов изменяется минеральный состав субстрата, происходят процессы биогенной кристаллизации [2]. В результате модельных экспериментов показана роль грибов в химическом преобразовании поверхностного слоя камня. Так, на поверхности карбонатных пород под действием микромицетов (в условиях влажной камеры с минимальным количеством питательной среды, а также в жидкой среде) происходило образование кристаллов оксалатов кальция (уэделлитта и уэвеллита). В природе наблюдали присутствие оксалатов кальция рядом с накипными лишайниками (мелкие кристаллы, размером 10-15 мкм).

Подобные кристаллы удалось получить в эксперименте с литобионтными грибами, культивируемыми на карбонатном субстрате в условиях влажной камеры. Установлено, что процессы кристаллизации на поверхности карбонатных пород связаны с активным выделением грибами щавелевой кислоты [3]. Она продуцируется микромицетами даже при относительно низкой концентрации углеводов в питательной среде и, вероятно, является основной кислотой, выделяемой микромицетами в естественной среде обитания. Экспериментально показано, что присутствие в среде тяжелых металлов (Zn и Cu) способствует повышенному выделению грибами щавелевой кислоты [4], что, вероятно, имеет адаптационное значение и способствует детоксикации свободных катионов тяжелых металлов.

Полученные результаты указывают на способность грибов адаптироваться к существованию на горных породах в широком диапазоне внешних условий, включая экстремальные. Создание экспериментальных моделей литобионтных систем позволяет глубже понять характер и механизмы взаимодействия грибов и каменистого субстрата.

#### Литература

1. Власов Д.Ю. Микроскопические грибы в экстремальных местообитаниях: биологическое разнообразие и сущность взаимодействий. Биосфера. 2011;3(4): 479-92.
2. Frank-Kamenetskaya O, Rusakov A, Barinova K et al. The formation of oxalate patina on the surface of carbonate rocks under influence of microorganisms. Proc 10th Intern. Congr Appl Mineral (ICAM-2011). Trondheim. 2011: 213-20.
3. Сазанова К.В., Щипарёв С.М., Власов Д.Ю. Образование органических кислот грибами, изолированными с поверхности памятников из камня. Микробиология. 2014; 83(5): 1-9.
4. Sazanova K, Osmolovskaya N, Schiparev S et al. Organic acids induce tolerance to zinc- and copper-exposed fungi under various growth conditions. Curr Microbiol. 2014; 10.1007/s00284-014-0751-0.

## СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ САПРОТРОФНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ВИНОГРАДНИКОВ ЗАПАДНОГО ПРЕДКАВКАЗЬЯ

Юрченко Е.Г., Грачева Н.П.

Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства, Краснодар

Промышленные виноградники, одни из самых антропогенно нагруженных агроэкосистем, серьезными предпосылками для дестабилизации которых, является возделывание генетически однородных растений на больших площадях, вегетативное размножение, однотипные технологии выращивания, агротехническая интенсификация. За один вегетационный сезон проводится 12–18 фунгицидных и инсектицидных обработок, 2–3 гербицидных, 5–7 механических обработок почвы и 2–4 обработок растений.

Виноградники имеют сложную структуру и механизмы взаимодействия внутри и между сообществами живых организмов. Отличительными чертами многолетних агроценозов является продолжительное (принудительное) существование на постоянном месте одних и тех же видов растений, что значительно влияет на характер формирования функциональной структуры биосистем, в том числе микробиосистем, неотъемлемым компонентом которых являются грибы.

Из установленных закономерностей изменения функциональной структуры наземных микопатосистем ампелоценозов в течение последних 10–12 лет одной из самых значительных является возрастание роли сапротрофных и факультативно-сапротрофных грибов, расширение их видового разнообразия, встречаемости, вредоносности; проявление паразитических свойств у грибов, ранее не считавшихся агрессивными, у таких, как альтернариевые, фузариевые и аспергилловые, обладающих высокой токсикогенностью и широким абиотическим оптимумом существования. Происходящие трансформации в микопатосистемах ампелоценозов являются реакцией видов на усиление климатических и антропогенных воздействий [1]. Известно, что грибы опережают другие живые организмы по способности эффективно осваивать разнообразные экологические ниши [2]. Стрессовые для виноградных растений факторы (климатические,

антропогенные) способствуют поселению на них сапротрофных микромицетов и ускорению микроэволюционных процессов, направленных на возрастание паразитических свойств этих видов.

Поэтому актуальными являются исследования, связанные с системным изучением функциональной структуры сообществ микромицетов в ампелоценозах. Одним из важных свойств таких сообществ, которое отражает его сложность и структурированность, принято считать его разнообразие [3]. Оценка биологического разнообразия имеет важное прикладное значение – позволяет не только контролировать сохранение генетического потенциала, но и дает представление о состоянии экосистем на определенной территории, служит основой для разработки системы менеджмента отдельных видов и прогноза их вредоносности.

**Цель работы** – изучение структуры комплексов сапротрофных микромицетов в объектах экосистемы промышленных виноградников. В своих микробиологических исследованиях мы использовали общепринятые методы посева на плотные питательные среды.

**Объекты исследований** – почки, листья, ягоды, кора растений винограда и почва в виноградных насаждениях. Комплексы микромицетов изучались в виноградных агроценозах европейских сортов Саперави, Мерло (вид *Vitis vinifera*) и гибридного сорта Бианка (*V. vinifera* + *V. labrusca* + *V. riparia* + *V. rupestris* + *V. berlandieri* + *V. aestivalis* + *V. cinerea*). Почвенно-климатическая зона черноземов лесостепной и степной областей (Северо-Кавказский район возделывания культуры). Почва малогумусный чернозем, гумусированность 2,5–3,0%, мощность гумусового слоя 100–130 см, слабая и средняя степень целочности.

Исследования показали, что численность почвенных микромицетов колеблется в пределах 74,3...87,3 тыс. КОЕ/г сухой почвы и зависит от условий года, сезона отбора образцов. Качественный состав представлен в табл. 1.

Таблица 1. Качественный состав почвенных микромицетов в ампелоценозе (в % от общего количества учтенных), таманская подзона, Западное Предкавказье

Образец	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Acremonium</i>	Дрожже-подобные	Дрожжи
июнь	6,7	60,0	0,0	15,6	2,2	4,4	2,3	41,4
ноябрь	5,6	19,3	8,4	0,8	0,0	0,0	0,0	10,1

В отличие от почвы на растениях обнаруживается бо́льшая численность и более богатое видовое разнообразие микромицетов. Так, на коре она колеблется в

пределах  $1,1...8,5 \times 10^6$  КОЕ /г сухой коры, но чаще всего в пределах  $3-4 \times 10^6$  КОЕ /г сухой коры. Качественный состав представлен в табл. 2.

Таблица 2. Качественный состав микромицетов коры винограда  
(в % от общего количества обнаруженных), таманская подзона, Западное Предкавказье

Сорт	Год	<i>Cladosporium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Trichoderma</i>	Дрожжеподобные	Дрожжи
Бианка	2010	22,0	8,5	0,6	0,0	0,0	0,0	0,1	19,5	49,0
	2012	48,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	24,3	24,5
	2013	31,4	1,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	8,2	3,7
Мерло	2012	44,1	0,9	3,2	1,6	1,1	0,0	0,0	14,7	22,3
	2013	34,7	2,9	0,0	2,5	0,2	0,0	0,0	6,3	10,8

Таблица 3. Родовая структура комплексов сапротрофных микромицетов на коре и в почках, сорт Бианка, таманская подзона, Западное Предкавказье, февраль, 2010 г.

Микроскопические грибы	Объект исследования			
	Кора		Почки	
	тыс. КОЕ /г сухого вещества	% от общего количества	тыс. КОЕ /г сухого вещества	% от общего количества
Общее количество	1053,4	-	2710,2	-
<i>Alternaria</i> spp.	89,5	8,50	398,04	14,70
<i>Cladosporium</i> spp.	231,8	22,00	861,8	31,80
<i>Penicillium</i> spp.	6,3	0,60	13,6	0,50
<i>Trichoderma</i> spp.	1,3	0,12	0,00	0,00
Дрожжеподобные	205,4	19,50	243,9	9,00
Дрожжи	516,2	49,00	1192,5	44,00

Наибольшее количество сапротрофных микромицетов обнаруживается в почках. Например, в биобразцах виноградных почек на сорте Бианка было обнаружено более чем в 2,5 раза большее количество грибов, чем из образцов коры (табл. 3).

Лидирующую роль в структуре сапротрофных микромицетов коры и почек винограда занимают кладоспориевые грибы, почти отсутствуют триходермовые виды. Интересным фактом является и то, что альтернариевых грибов обнаружено в 4 раза больше в почках, чем на коре. В последние годы отмечается рост вредоносности одного из видов – *Alternaria tenuissima* Kunze ex Pers., который в течение 2006–2014 гг. ежегодно развивается в форме эксплозивной эпифитотии на гибридных евроамериканских сортах винограда, что

Табл. 4. Численность сапротрофных микромицетов на листьях и ягодах винограда различных сортов (тыс. КОЕ /г сухого вещества), таманская подзона, Западное Предкавказье

Сорт	Листья	Ягоды
Саперави (среднее за 3 года)	157,3	45,8
Бианка (среднее за 2 года)	127,4	33,6

связано, в первую очередь, с их неустойчивостью в жаре и участвовавшим высокотемпературным засухам [4, 5]. Отмечается возрастание роли паразитической фазы в развитии *A. tenuissima* на сортах винограда – межвидовых гибридах. Патоген заражает здоровые листья, проникая через устьица на обратной стороне.

На возобновляемых ежегодно вегетативных (листьях) и генеративных (ягодах) органах виноградных растений численность микромицетов зафиксирована значительно более низкой (табл. 4), чем на коре и в почках. Распределение групп микроорганизмов в микробиотических комплексах имело одинаковые тенденции у различных по генотипу сортов винограда (табл. 5), но в видовой структуре имелись отличия.

Так, на листьях и ягодах европейского сорта Саперави преобладали грибы рода *Cladosporium*. На листьях далее по частоте встречаемости располагались грибы из родов *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*. На ягодах – *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* sp.

На листьях межвидового гибридного сорта Бианка преобладали *A. tenuissima*, далее по частоте встречаемости располагались грибы из родов *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Acremonium*. На ягодах преобладали *Penicillium* sp., за ними по частоте встречаемости – *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* spp.

В результате проведенной работы установлены количественные параметры комплексов микромицетов в



Таблица 5. Качественный состав микромицетов на листьях и ягодах  
(в % от общего количества обнаруженных), таманская подзона, Западное Предкавказье

Сорт	Листья			Ягоды		
	Плесневые грибы	Дрожже-подобные	Дрожжи	Плесневые грибы	Дрожже-подобные	Дрожжи
Саперави (среднее за 3 года)	32,8	47,6	19,6	37,0	51,9	11,1
Бианка (среднее за 2 года)	22,7	60,6	16,7	25,0	72,0	3,0

различных объектах виноградной агроэкосистемы, что послужит основой для дальнейших биоценологических, микробиологических и других исследований по установлению причин роста экономической значимости сапротрофных микромицетов на винограде и разработке адаптивных, в том числе биологизированных технологий управления фитосанитарным состоянием ампелоценозов.

#### Список литературы

1. Юрченко Е.Г. Основные тенденции формирования микопатосистем наземной части ампелоценозов в современных средовых условиях Западного Предкавказья. Пробл. микол. фитопатол. в XXI в. Материалы междунар. науч. конф., посв. 150-летию А.А. Ячевского. Нац. акад. микол; БГС; СПб.: ООО «Копи-Р Групп». 2013: 310-13.
2. Бондарцева М.А. Эколого-биологические закономерности функционирования ксилотрофных базидиомицетов в лесных экосистемах. Под ред. В.Г. Стороженко и др. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН. 2000: 9-25.
3. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука. 2007: 215 с.
4. Юрченко Е.Г., Грачева Н.П. Оценка полевой устойчивости сортов винограда к альтернариозу в условиях Западного Предкавказья. Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в XXI веке (иммунитет, селекция, интродукция). Научн. труды: Россельхозакадемия. М. 2011;4(1): 536-43.
5. Юрченко Е.Г., Кузнецова А.П., Якуба Ю.Ф., Шестакова В.В. Изучение механизмов физиолого-биохимического барьера к возбудителю альтернариоза *Alternaria tenuissima* Kunze ex Pers. у растений рода *Vitis*. Идеи Н.И. Вавилова в совр. мире: мат. III Вавиловской междунар. науч. конф. СПб.: ГНУ ВИР. 2012: 117-8.

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА ЛОКУСОВ, ФОРМИРУЕМЫХ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ В ЛЕСНОМ БИОЦЕНОЗЕ

Загрядская Ю.А., Лысак Л.В., Сидорова И.И., Александрова А.В.  
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Грибы являются важным компонентом всех наземных и большинства водных экосистем и выполняют в них самые разнообразные экологические функции. В лесном биогеоценозе грибы представлены в основном базидиомицетами, как правило, формирующими заметные плодовые тела на поверхности почвы, растительных остатках и древесине и образующими обильный мицелий. Биомасса базидиомицетов в почвах лесных экосистем занимает 2-е место после биомассы растений и доминирует в почве и подстилке в течение значительной части вегетационного периода [1-4].

В лесном биогеоценозе базидиальные грибы формируют разнообразные местообитания для бактерий, такие как гиофосфера (почвенная зона, формирующаяся вокруг свободного мицелия грибов), микоризосфера (почвенная зона, формирующаяся вокруг микоризованных корней растений) [5] и плодовые тела.

Большинство работ по изучению бактериальных сообществ плодовых тел и гиофосферы базидиомицетов выполнено для объектов, имеющих экономически важное значение: сапротрофы, формирующие съедобные плодовые тела, некоторые микоризообразователи,

патогенные и культивируемые виды [6]. Практически не исследованы бактериальные сообщества гиофосферы, микоризосферы и плодовых тел базидиомицетов – типичных представителей лесного биогеоценоза в природных условиях.

**Цель работы** – изучение влияния базидиальных макромицетов на почвенные бактериальные комплексы в лесных биоценозах.

**Объекты исследования** – образцы дерново-подзолистой почвы и подзола, отобранные из гиофосферы (в точках обильного разрастания мицелия под плодовыми телами), микоризосферы (вокруг микоризованных корневых окончаний растений), а также сами плодовые тела базидиомицетов. Контролем служили образцы почвы за пределами колоний базидиомицетов.

Всего было изучено 32 вида базидиальных грибов (класс *Agaricomycetes*) трех морфологических групп: агариикоидные, афиллофороидные и гастероидные,

С помощью окраски акридином оранжевым была определена общая численность бактерий в образцах гиофосферы и контрольной почвы 20 видов базидиальных грибов.

Показатели общей численности бактерий в гифосфере базидиомицетов колебались от  $0,4 \times$  до  $21 \times 10^9$  клеток/г. Выявлено, что общая численность бактерий в гифосфере большинства видов агарикоидных базидиомицетов была ниже, чем в контроле в 1,1–2,8 раза, а в гифосфере большинства видов афиллофороидных и гастероидных базидиомицетов – выше, чем в контроле в 1,5–4 раза. Снижение общей численности бактерий в гифосфере большинства видов агарикоидных базидиомицетов, скорее всего, связано с высокой антибиотической активностью грибов. Предположение о негативном влиянии антибактериальных веществ агарикоидных базидиомицетов на почвенные бактерии подтверждается результатами подсчета общей численности потенциально жизнеспособных клеток бактерий с использованием красителя LIVE/DEAD. Обнаружено, что при более высокой общей численности бактерий в гифосфере по сравнению с контрольной почвой доля жизнеспособных клеток также была выше (в 1,6 раза).

Численность сапротрофных бактерий, определенная с помощью метода посева на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду, в гифосфере большинства видов агарикоидных, афиллофороидных и гастероидных базидиомицетов была выше, чем в контроле в 2–36 раз. Изучение структуры сапротрофного бактериального комплекса в исследуемых образцах показало значительное сходство гифосферы афиллофороидных и гастероидных базидиомицетов и их отличие от гифосферы агарикоидных базидиомицетов. Что выражается в доминировании в гифосфере агарикоидных базидиомицетов бактерий рода *Bacillus*, а в гифосфере афиллофороидных и гастероидных – родов *Streptomyces* и *Arthrobacter*.

Особого внимания заслуживает изучение бактериальных комплексов микоризосферы – почвенной зоны, формирующейся вокруг микоризованных корней растений. При изучении бактериальных комплексов микоризосферы обнаружено увеличение численности сапротрофных бактерий в микоризосфере и гифосфере всех изучаемых видов агарикоидных базидиомицетов в 2–5 раз по сравнению с контролем.

Анализ структуры сапротрофного бактериального комплекса микоризосферы выявил ее явное отличие от гифосферы и контрольной почвы. Что проявлялось в доминировании в микоризосфере бактерий рода *Pseudomonas*, а в гифосфере и контрольной почве – *Bacillus*. Доминирование бактерий рода *Pseudomonas* в микоризосфере исследованных симбиотрофных базидиомицетов указывает на важную роль этого таксона во взаимоотношениях с микоризованной корневой системой растений. Наиболее вероятной причиной доминирования псевдомонад в микоризосфере базидиальных грибов является выделение гифами базидиомицетов некоторых веществ, которые являются потенциально привлекательными для бактерий, способных к образованию биопленок [7, 8]. Так, для трегалозы было четко показано положительное действие на формирование биопленки *Pseudomonas fluorescens* на мицелии *Laccaria bicolor* [9].

Плодовые тела базидиомицетов обладают значительной биомассой и могут оказывать существенное влияние на бактериальные сообщества почв.

Изучение бактериальных комплексов плодовых тел 5 видов базидиомицетов показало, что общая численность бактерий изменяется от  $4,2 \times$  до  $20 \times 10^9$  клеток/г, и только у *Amanita muscaria* составляли  $196,7 \times 10^9$  клеток/г, что связано с тем, что плодовое тело находилось на поздней стадии разложения. А численность сапротрофных бактерий варьировала в пределах  $19,3 \times$  до  $271 \times 10^6$  КОЕ/г. Только в образце плодового тела *Amanita muscaria* численность бактерий была выше на несколько порядков и достигала величины  $185 \times 10^9$  КОЕ/г, что связано с активно идущим процессом разложения плодового тела.

Изучение структуры сапротрофных бактериальных комплексов плодовых тел выявило доминирование грамотрицательных бактерий на плодовых телах всех 5 видов грибов, доля которых изменяется от 73,5 до 100%, представленных родами *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Plesiomonas* и *Erwinia*. О частом обнаружении бактерий рода *Pseudomonas* на поверхности плодовых тел уже сообщалось ранее, для них был предложен термин “фунгифилы” [10]. Полученные результаты о доминировании в плодовых телах базидиомицетов грамотрицательных бактерий до определенной степени сходны с полученными ранее результатами по определению структуры сапротрофного бактериального комплекса филопланы и подстилки лесного биогеоценоза, где доминантами также были бактерии родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Mucosoccus* [11]).

В результате проведенного исследования анализ всего массива данных с помощью метода главных компонент показал, что бактериальный комплекс гифосферы гастероидных и афиллофороидных базидиомицетов проявляет значительное сходство друг с другом, чем каждый из них с агарикоидными. Бактериальный комплекс микоризосферы проявляет значительное сходство между собой и отличается от бактериальных комплексов гифосферы и контрольной почвы. Бактериальный комплекс плодовых тел проявляет значительное сходство между собой и с микоризосферой и отличается от комплексов гифосферы своих видов и контрольной почвы.

Таким образом, бактериальный комплекс гифосферы представляет собой своеобразное экотонное сообщество, отражающее в своем составе черты сообществ, обитающих в резко отличающихся друг от друга условиях: богатый корневыми выделениями растений и продуктами разложения полимеров, а также грибными метаболитами локус – микоризосфера, и более бедный – вне колоний базидиомицетов (контрольная почва). Плодовые тела, обогащенные грамотрицательными бактериями, в особенности представителями рода *Pseudomonas*, при попадании на поверхность почвы вносят важный вклад в формирование структуры бактериальных комплексов в пределах колоний базидиомицетов.

Очевидно, что в разные периоды года воздействие базидиомицетов на бактериальное сообщество почвы будет различно, в меньшей степени оно будет проявляться в сухой и холодный период года, в большей степени – во влажный и теплый (конец лета – осень). Базидиомицеты в исследованных почвенных локусах по отношению к бактериям реализуют, подобно

почвенным животным и растениям, функцию «эко-системных инженеров» [12].

#### Список литературы

1. Дылис Н.В. Основы биогеоценологии. М: Изд-во МГУ. 1978: 156 с.
2. Fogel R. Interaction among soil biota in coniferous ecosystems. *Agric Ecosyst Env.* 1988; 24(1-3): 69-85.
3. Hunt GA, Fogel R. Contribution of mycorrhizal and soil fungi to nutrient cycling in Douglas-fir ecosystem. *Canad. J Forest Res.* 1983; 13(2): 219-32.
4. Velikanov LL. Agaricales s.l. as edificators and stabilizer of soil-inhabiting microorganisms in forest communities. 10th Congr Europ Mycol (Tallinn, Aug. 1989). *Abstr. Tallinn, 1989:* 132.
5. Thornton RH. Features of growths of actinomycetes in soil. *Research. London.* 1953; 6: 44-54.
6. De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005; 29: 795-811.
7. Wiemken V. Trehalose synthesis in ectomycorrhizas a driving force of carbon gain for fungi? *New Phytologist.* 2007; 174: 228-30.
8. Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP et al. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 3019-27.
9. Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 2007; 176: 22-36.
10. Warmink JA, van Elsas JD. Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil microcosms. *Appl Environ Microb.* 2009; 75: 2820-30.
11. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. М.: ИКЦ «Академкнига». 2002: 282 с.
12. Тиунов А.В. Метабиоз в почвенной системе: влияние дождевых червей на структуру и функционирование почвенной биоты: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук 03.02.03. М. 2007: 44 с.

## МЕДИЦИНСКОЕ И ЛЕКАРСТВЕННОЕ ЗНАЧЕНИЕ АФИЛЛОФОРОИДНЫХ ГРИБОВ В ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ВОСТОЧНОЙ ФЕННОСКАНДИИ

Заводовский П.Г.

Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск

Фенноскандия (особенно территория Швеции, Норвегии и Финляндии) принадлежит к числу наиболее освоенных лесным и сельским хозяйством регионов таежной Евразии. К Восточной Фенноскандии относится Кольский полуостров, Финляндия, Республика Карелия [12–14].

В странах Фенноскандии дереворазрушающие афиллофороидные грибы широко используются в качестве природных индикаторов при выявлении старых естественных лесов с целью их охраны [4–8].

Исследование биосферной экологической роли афиллофороидных грибов в лесных экосистемах Восточной Фенноскандии проводилось в 2000–2015 гг. в Пудожском флористическом районе, биогеографической провинции Karelia Pudogensis (KP) и Водлозерском национальном парке, в результате чего в лесных экосистемах Восточной Фенноскандии было выявлено 205 видов афиллофороидных грибов [1–3].

Анализируют видовой состав, субстратная приуроченность, ресурсное и природоохранное значение афиллофороидных грибов на ООПТ и в биогеографических провинциях Зеленого пояса Восточной Фенноскандии [5–10]

В настоящее время благодаря сборам автора, анализу литературных источников и изучению микологических гербариев Петрозаводского государственного университета (PZV), КарНИЦ РАН (PTZ), Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE), Helsinki University Botanical Museum (H), КНИЦ РАН (INER) в лесных экосистемах Восточной Фенноскандии зарегистрировано 550 видов афиллофороидных грибов [8, 11]. На территории Восточной Фенноскандии зарегистрировано 11 видов афиллофороидных грибов, которые имеют медицинское и лекарственное значение:

1. *Cantharellus cibarius*. Съедобен. Содержит 8 незаменимых аминокислот и витамин А.

2. *Fomes fomentarius*. Гриб содержит противоопухолевые вещества (подавляет рост опухолей у мышей на 80 %). В медицине может применяться как кровоостанавливающее средство, а также при гастрите, геморроях, раке желудка и пищевода.

3. *Fomitopsis pinicola*. В медицине отвар этого гриба применяется как хорошее слабительное средство. Гриб содержит противоопухолевые вещества, подавляющие рост опухолей у белых мышей на 51%. В Северной Америке трутовик окаймленный используют при лечении скачкообразной лихорадки, хронических диареях, дизентерии, желтухе, а так же как кровоостанавливающее и рвотное средство для очищения желудка, при чрезмерном мочеиспускании.

4. *Ganoderma lipsiense*. Исследования показали, что трутовик плоский содержит вещества, повышающие общий тонус организма, снимает усталость и сонливость. В Китае используется горяче-водный экстракт плодовых тел при лечении рака пищевода, ревматического туберкулеза для уменьшения мокроты, как болеутоляющее и жаропонижающее средство. Хороший лечебный эффект наблюдается при суточной дозе примерно ~2–5 г порошка.

5. *Ganoderma lucidum*. Гриб используют в народной медицине Востока свыше 2000 лет. Учеными Китая, Японии и Вьетнама разработаны способы культивирования гриба на специальных плантациях. Лечебные свойства трутовика лакированного изучаются в ведущих медицинских учреждениях Японии, США, Франции и Канады. Гриб обладает сильными иммуномодулирующими свойствами, способен оказывать противоопухолевое, противовирусное действие,

эффективен в отношении заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, желудочно-кишечной, нервной систем. В медицине с помощью отвара из трутовика лакированного снимают воспаление десен.

6. *Hericium coralloides*. Гриб широко используется в китайской медицине при неврастении и общей ослабленности. Гриб способствует пищеварению, лечит гастрит и язву желудка.

7. *Inonotus obliquus*. Чага известна в медицине как тонизирующее и профилактическое средство против рака. Отечественная промышленность выпускает препарат «Бефунгин» – полугустой экстракт чаги. Его используют при лечении хронических гастритов, дискинезиях желудочно-кишечного тракта с преобладанием атонии. Настой чаги употребляется при анацидных гастритах и при опухлях как общеукрепляющее средство.

8. *Pleurotus pulmonaris*. Съедобен. Содержит протеолитические ферменты, противоопухолевые вещества, антибиотики, обладающие антивирусными свойствами. В Китае используется для лечения ломоты в суставах. Споровая пыль в массе вызывает аллергию.

9. *Phellinus igniarius*. В литературе есть сведения, что в медицине плодовые тела трутовика ложного используют в качестве противоопухолевого средства.

10. *Piptoporus betulinus*. Вытяжки из плодовых тел гриба оказывают активное противоопухолевое действие. Выделенная из березовой губки полипороновая кислота обладает противовоспалительным действием, не уступающим по силе кортизону.

11. *Polyporus squamosus*. Съедобен. Содержит высокомолекулярные полиеновые фосфолипиды, убихиноны, витамины А, F, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, D, H, ферменты. Вытяжка из этого гриба используется наружно в виде мази, применяемой для лечения остеохондроза, артроза, варикозного расширения вен, тромбоза, воспаления в суставах.

Дальнейшее изучение лесных экосистем Восточной Финляндии, возможно, позволит выявить новые виды афиллофороидных грибов, что даст возможность более детально проанализировать их медицинское и лекарственное значение.

#### Список литературы

1. Заводовский П.Г. Афиллофоровые грибы в составе вырубок различного возраста на территории Пудожского лесничества. Научно-исследовательская работа студентов. Докл. 55 научн. студ. конф. Петрозаводск: Изд. ПетрГУ. 2003: 179-80.
2. Заводовский П.Г. Афиллофороидные грибы в лесных экосистемах Биогеографической провинции Karelia Pudogensis (КР). Грибы в природных и антропогенных экосистемах. Тр. межд. конф. посвящ. 100-летию начала работы проф. А.С. Бондарцева в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН (24–28 апр. 2005 г.). СПб. 2005; 1: 200-3.
3. Заводовский П.Г. Ресурсное значение афиллофороидных базидиомицетов Водлозерского национального парка. Уч. зап. Петрозаводского гос. унив. Естеств. техн. науки. 2009; 9(103): 34-7.
4. Заводовский П.Г. Афиллофороидные грибы в лесных экосистемах Водлозерья: Дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск. 2010: 318 с.
5. Заводовский П.Г. К биоте афиллофороидных грибов островов Белого моря. Экология-2011: Мат. докл. IV молодежн. научн. конф. (06–11 июня 2011 г.). Архангельск. 2011: 160-1.
6. Заводовский П.Г. Первые данные об афиллофороидных грибах в лесных экосистемах Шотозерья. Уч. зап. Петрозаводского гос. унив. Сер.: Естеств. и техн. н. 2012; вып. 2 (Т. 2); 8(129): 18-19.
7. Заводовский П.Г., Чернышев А.Г., Чушков Т.А. Дереворазрушающие грибы в зеленых насаждениях МОУ «Гимназия №37» г. Петрозаводска. Совр. микол. России. Мат. 3 съезда Микологов России. М. 2012; 3: 130-1.
8. Заводовский П.Г. Использование афиллофороидных грибов как индикаторов лесных экосистем Зеленого пояса Финляндии. Мат. Межд. н.-практ. конф. "Зеленый пояс Финляндии-2013". Петрозаводск. 2013: 150-1.
9. Заводовский П.Г. Трутовые грибы Ботанического сада Петрозаводского государственного университета. Hortus bot. 2013; 8. URL: <http://hb.karelia.ru/journal/article.php?id=1781>. DOI: 10.15393/j4.art.2013.1781.
10. Заводовский П.Г., Чемоданов М.А., Лимбакова В.В. Ресурсное и хозяйственное значение афиллофороидных (дереворазрушающих) грибов в лесных экосистемах Восточной Финляндии. Мат. межд. форума «Классический университет в пространстве трансграничности на севере Европы: стратегия инновационного развития». Петрозаводск. 2014: 34-6.
11. Заводовский П.Г. Методы изучения грибов: уч. пос. для студентов эколого-биологического факультета. Петрозаводск: Изд. ПетрГУ, 2014. 20 с.
12. Кравченко А.В. Конспект флоры Карелии. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 2007: 403 с.
13. Курхинен Ю.П., Данилов П.И., Ивантер Э.В. Млекопитающие Восточной Финляндии в условиях антропогенной трансформации таежных экосистем. М.: Наука. 2006: 208 с.
14. Mela AJ, Cajander AK. Suomen kasvio. Helsinki. 1906. 764 s.

## ВОЗБУДИТЕЛИ ГНИЛЕЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЮГА РОССИИ

Жалиева Л.Д.  
ООО Сингента, Краснодар

В Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко исследованиями по изучению популяции возбудителей гнилей озимой пшеницы в Краснодарском крае занимаются с семидесятих годов, а с 1998 г. предпринята попытка изучения популяции в Западном Предкавказье. Для этого в 1998–2005 гг. были проведены маршрутные обследования посевов озимой пшеницы в 64-х районах. Работа выполнялась совместно с Краснодарской, Ставропольской краевыми и Ростовской областной станциями защиты растений.

Возбудители гнили, представленные в Западном Предкавказье видами рода *Pythium*, *Helminthosporium*, *Wojnowicia*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Ophiobolus*, *Rhizoctonia*, *Alternaria* имеют различные уровни встречаемости в патогенозах озимой пшеницы. Частота встречаемости всех видов по годам менялась от 0,5 до 95%. Состав и частота встречаемости возбудителей гнилей колебалась по фазам развития растений озимой пшеницы. Так, в фазе кущения–трубкования основными были виды из рода *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Helminthosporium*, *Cercospora*, *Wojnowicia* (по мере уменьшения процента встречаемости). А в фазе налива зерна – *Ophiobolus*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Cercospora*.

Виды из рода *Pythium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* в фазе налива зерна или имели очень низкий процент встречаемости, или вообще не отмечались. Частота встречаемости видов *Alternaria* коррелирует с влажными условиями уборки зерна в предыдущем году и с применяемыми протравителями. Так, в 1998 г. заспоренность семян перед посевом этими грибами составляла 28,5–50,0%, а в 1999 г. частота встречаемости этих видов в образцах растений пораженных гнилями в фазе кущения–трубкования составляла соответственно 18,5 и 20,0%.

Фузариоз широко представлен в патогенозах гнилей особенно в фазе кущения – трубкования. При этом частота встречаемости *Fusarium nivale* в 1995–1998 гг. составляла 15,0%, а в 1999–2003 гг. уже 34,5% с максимумом в снежные годы 2000 и 2002. В 1998 г. некоторые районы Северной подзоны Краснодарского

и Ставропольского краев характеризовались очень низким процентом фузариоза на озимой пшенице. В то же время здесь наблюдалось значительное присутствие грибов антагонистов фузариоза из рода *Acremonium*, *Gliocladium*, *Chaetomium*, *Trichoderma* и др. Может это связано с самоочищением агроценозов от накопившихся там фузариоза и является одним из элементов многолетних процессов динамики видового состава микробных ценозов на полях.

С 2010 г. изучалась популяция возбудителей гнилей озимой пшеницы в условиях Ставропольского края. В 2010, 2012–2014 гг. (и особенно начало 2015 г.) основным в патогенозах возбудителей гнилей являлись грибы *Fusarium*. На некоторых полях представленность *Microdochium nivale* (*F. nivale*) составляла 60–85%.

На 5% пораженных корней фузариозной инфекции сопутствовала *Alternaria*. Грибы этого рода в последнее время часто входят в сложный патогенный комплекс с основными возбудителями гнилей (*F. nivale* (Fr.) Ces, *F. graminearum*, Schwabe *F. culmorum* (Sm.) Sacc, *Rhizoctonia cerealis* E. P. Hoenen., *Rh. solani* Kuehn., *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton и *Bipolaris sorokoniana* (Sacc.) Shoem), что не может не влиять на течение и исход заболевания. В 2011 г. на Ставрополье была отмечена эпифитотия гибеленозной гнили (*Gibellina cerealis* Pass.), которая была отмечена в 21 районе из 26 районах Ставропольского края с максимальным распространением в Левокумском, Новоселицком, Степновском, Курском, Изобильненском районах края. Все последующие годы данный возбудитель гнили в видовом комплексе занимал от 5 до 30%.

Частота встречаемости того или другого возбудителя гнилей в значительной степени зависела не только от складывающихся погодно-климатических условий, но и от того, в какой степени нарушалась сама технология возделывания озимой пшеницы: как выдерживался севооборот культур, какова была система обработки почвы, какие использовались протравители, гербициды, величины и сбалансированности основных элементов питания и др.

## ДИНАМИКА ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ МОРСКИХ ГРУНТОВ В ЗАЛИВЕ ВОСТОК (ЗАЛИВ ПЕТРА ВЕЛИКОГО, ЯПОНСКОЕ МОРЕ)

Зверева Л.В., Борзых О.Г.  
Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

Актуальность научной оценки биоструктуры комплексов мицелиальных грибов прибрежных вод, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, обусловлена строительством нефтепровода «Сибирь – Тихий океан» и нефтеналивного терминала на побережье Приморского края.

Исследовали динамику биоразнообразия мицелиальных грибов в морских грунтах в условиях хронического загрязнения углеводородами нефти и нефтепродуктов в бухте Гайдамак (залив Восток, Японское море), где находятся судоремонтный завод, агаровый завод и база рыболовных судов [1].

В 1998–1999 гг. в морских грунтах бухты Гайдамак обнаружен 41 вид мицелиальных грибов, принадлежащих 21 роду, из них 36 видов – из 17 родов анаморфных грибов и 5 видов из 4 родов зигомицетов. Доминирующее положение по видовому обилию занимал род *Penicillium* – 10 видов, далее роды *Aspergillus* – 4 вида, *Trichoderma* – 3, *Cladosporium* – 3, *Alternaria* – 2, *Verticillium* – 2, *Fusarium* – 2, *Mucor* – 2, остальные 13 родов – по 1 виду. На долю 8 перечисленных родов приходится ~70% – 28 видов, обнаруженных в илисто-песчаном грунте, тогда как на остальные 13 родов ~30% – 13 видов.

В 2003–2004 гг. в морских грунтах бухты Гайдамак обнаружено 44 вида (18 родов), из них 38 видов – 14 родов анаморфных грибов, 4 вида из 3 родов зигомицетов и 2 вида рода *Chaetomium* (Ascomycota). Доминирующее положение по видовому обилию занимают *Penicillium* – 12 видов и *Aspergillus* – 10 видов, *Cladosporium* – 3, *Acremonium* – 2, *Trichoderma* – 2, *Chaetomium* – 2, *Mucor* – 2, остальные 11 родов – по 1 виду. На долю 7 перечисленных родов приходится ~75% – 33 вида, тогда как на долю остальных 11 родов ~25% (11 видов).

В 2006 – 2007 гг. в морских грунтах бухты Гайдамак обнаружено 53 вида мицелиальных грибов из 18 родов, из них 47 видов в составе 15 родов анаморфных грибов, 3 вида из 2-х родов зигомицетов и 3 вида рода *Chaetomium* (Ascomycota). Доминирующее положение по видовому обилию занимают *Penicillium* – 15 видов и *Aspergillus* – 13 видов, *Cladosporium* – 3, *Acremonium* – 2, *Trichoderma* – 2, *Chaetomium* – 3, *Mucor* – 2, остальные 11 родов – по 1 виду. На долю 7 перечисленных родов приходится ~75,5% (40 видов), тогда как на долю остальных 11 родов ~24,5% (13 видов).

По данным 2006–2007 гг., в составе микоценоза морского грунта доминируют светлоокрашенные гифомицеты сем. Moniliaceae, доля которых составляет ~70% от общего числа обнаруженных видов (37 видов из 7 родов), доля темноокрашенных гифомицетов из семейства Dematiaceae составляет ~12% (6 видов из 5 родов), доли остальных семейств распределяются следующим образом: Mucoraceae ~6%, Sphaeropsidaceae ~2%, Tuberculariaceae ~4%, Chaetomiaceae ~6%.

Выявленные в бухте Гайдамак виды мицелиальных грибов являются эврибионтными, факультативно морскими (вторичноводными), широко распространенными как в наземных, так и в морских местообитаниях. Из облигатно морских микромицетов в пробах 1998 – 1999 гг. обнаружен анаморфный гриб *Paradendryphiella arenariae*, в пробах 2003–2004 гг. облигатно морские микромицеты не обнаружены. Таксономическую структуру микобиоты морского грунта бухты Гайдамак по данным 1998 – 1999 гг. составляют анаморфные грибы (88%) и зигомицеты (12%), по данным 2003 – 2004 гг. – анаморфные грибы (86,5%), сумчатые грибы (4,5%) и зигомицеты (9%), по данным 2006 – 2007 гг. – анаморфные грибы (88,7%), сумчатые грибы (5,65%) и зигомицеты (5,65%).

Наиболее существенными изменениями биоразнообразия микобиоты морского грунта в условиях хронического нефтяного загрязнения в бухте Гайдамак за период проведения исследований являются следующие: увеличение в структуре мико-

ценоза доли *Aspergillus* с 4 до 13 видов, появление *A. amstelodami*, *A. melleus*, *A. halophilicus*, *A. ochraceus*, *A. sidowii*, *A. versicolor*, *A. ustus* и др.; сукцессия мицелиальных грибов *Penicillium*: исчезновение видов *P. claviforme*, *P. lanosum*, *P. thomii*, *P. luteum*, появление видов *P. chrysogenum*, *P. corylophilum*, *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. commune*, *P. velutinum*, *P. verrucosum* var. *cyclopium* и др.; появление полисапробных сумчатых грибов *Chaetomium*: *Ch. globosum*, *Ch. spiculipilium*, *Ch. murorum* (Ascomycota); исчезновение облигатно морского гифомицета – *Paradendryphiella arenariae*.

Характерно для нефтезагрязненных грунтов увеличение видового обилия в структуре микоценоза грибов *Aspergillus*. У многих видов аспергиллов установлена способность усваивать углеводороды нефти и нефтепродуктов (*A. glaucus*, *A. fumigatus*, *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, *A. niger*, *A. ustus*, *A. sydowii* [2, 3]). Увеличение видового богатства грибов рода *Aspergillus* отмечено М.В. Пивкиным в районе нефтедобычи на восточном побережье шельфа острова Сахалин [4].

Известно, что микроскопические грибы *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* и др. играют важную роль в процессах биодеструкции и биотрансформации углеводородов нефти как в почвах [2], так и в морских грунтах [3–5].

#### Выводы

1. Многолетние исследования (1998–1999 гг., 2003–2004 гг., 2006–2007 гг.) позволили выявить закономерности динамики биоразнообразия мицелиальных грибов в сообществах прибрежных грунтов в условиях хронического загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Установлено, что таксономическую структуру микоценоза морских грунтов составляют факультативно морские (или вторичноводные) галотолерантные формы анаморфных, сумчатых грибов и зигомицетов, соотношение которых составляет 86,5 : 4,5 : 9% соответственно.

2. Установлено, что биоразнообразие и численность мицелиальных грибов в изученных загрязненных биотопах выше, чем в относительно чистых биотопах.

3. Установлено, что стабильным комплексом мицелиальных грибов загрязненных биотопов являются представители анаморфных грибов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, и сумчатых грибов *Chaetomium*, способные осуществлять деструкцию углеводородов нефти и нефтепродуктов; виды указанных пяти родов составляют 66% от общего числа всех видов, тогда как на остальные 13 родов приходится 34% от общего числа видов.

4. Установлено, что в загрязненных биотопах возрастает видовое богатство условно-патогенных и токсигенных грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, продуцирующих микотоксины и способных вызывать микозы и микотоксикозы гидробионтов.

5. В донных осадках бухты Гайдамак часто попадаются представители муковоксовых грибов (Zygomycota) из родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Mortierella*, характерных для пресных стоячих водоемов, что свидетельствует о застойных явлениях в данных морских биотопах.

6. В составе грибного комплекса загрязненных донных осадков нами обнаружены полисапробные сумчатые грибы *Chaetomium*, способные образовывать

гемотоксины, обуславливающие патогенные свойства грибов.

7. Обнаружен в большом количестве проб анаморфный гриб *Aureobasidium pullulans*, способный развиваться в условиях дефицита кислорода, что наблюдается при загрязнении донных осадков нефтепродуктами.

8. В загрязненных биотопах исчезают стенобионтные, редкие виды, в частности, облигатно морские представители семейств Halosphaeriaceae и Dematiaceae.

Можно предположить, что динамика микоценоза в нефтезагрязненных морских грунтах в сторону доминирования токсикогенных видов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Cladosporium* и др. является дополнительным фактором, обуславливающим высокую токсичность нефтезагрязненных морских грунтов для организмов морского мейо- и макробентоса.

Для устойчивого функционирования морских сообществ опасны не только аварийные разливы нефти, но чрезвычайно опасно долговременное хроническое загрязнение углеводородами морских вод, что приводит к нарушению структурно-функциональных характеристик морских сообществ, нарушению трофических связей, накоплению продуктов биодеструкции нефти в окружающей среде и в гидробионтах при разложении нефти микроорганизмами – редуцентами, в том числе микроскопическими грибами, увеличение доли углеводородокисляющих и токсигенных штаммов морских грибов, способствующих ликвидации

последствий попадания углеводородов нефти в морскую среду и поддерживающих гомеостаз морских сообществ.

*Исследования микобиоты нефтезагрязненных морских грунтов поддержаны грантом ДВО РАН № 15-1-6-012 "Устойчивость и безопасность морских и прибрежных экосистем в современных условиях".*

#### Список литературы

1. Зверева Л.В., Борзых О.Г. Микологические аспекты биологической безопасности Дальневосточных морей России. Биологическая безопасность дальневосточных морей Российской Федерации. Мат. Целевой комплексной программы ориентир. фундам. научн. исследований. ДВО РАН на 2007-2012 гг. Отв. ред. А.В. Адрианов. Владивосток: Дальнаука. 2014: 370-408.
2. Билай В.И., Коваль Э.З. Рост грибов на углеводородах нефти. Киев: Наукова думка. 1980: 280 с.
3. Артемчук Н.Я. Микофлора морей СССР. М.: Наука. 1981: 192 с.
4. Пивкин М.В. Вторичные морские грибы Японского и Охотского морей. Дис. ... докт. биол. наук. Владивосток. 2010: 404 с.
5. Chen Bi-e, Liu Zu-tong. Shiyou xuebao. Shiyou jiaogong = Acta Petrol Sin Petrol Proc Sec. 2002; 18(3): 13-17. [Биотрансформация углеводородов нефти морскими мицелиальными грибами].

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ НЕКРОЗА ВЕТВЕЙ ЯСЕНЯ, ВЫЗВАННОГО ИНВАЗИВНЫМ ПАТОГЕНОМ *HUMENOSCYPHUS FRAXINEUS* BARAL ET AL., В ПОДМОСКОВЬЕ И ВДОЛЬ АВТОТРАССЫ М1

Звягинцев В.Б.<sup>1</sup>, Баранов О.Ю.<sup>2</sup>, Пантелеев С.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный технологический университет, Минск

<sup>2</sup>Институт леса НАНБ, Гомель

В конце XX – начале XXI вв. ясеневые насаждения Европы охватила эпифитотия халарового некроза ветвей (суховершинности), вызываемая аскомицетом *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Nosoia, (= Basionym: *Chalara fraxinea* T. Kowalski; = Synonym: *Hymenoscyphus pseudoalbidus* Queloz et al.). Естественный ареал патогена расположен на Дальнем Востоке. В Беларуси *H. fraxineus* выявлен в 2010 г. [1], проникнув, по-видимому, с территории Польши, где был впервые описан в 2006 г. [2]. К 2014 г. заболевание стало причиной гибели более 54% ясеневых насаждений Беларуси [5], а в странах Западной Европы последствия оказались еще более катастрофическими.

Имеются сведения о продвижении инвазии на Юго-Восток и Северо-Восток от места первого обнаружения. Опубликованы сведения о выявлении *H. fraxineus* в ясенниках Украины [3] и в Северо-Западных регионах РФ [4].

**Цель работы** – изучение распространения инвазии *H. fraxineus* по ареалу ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior*) в восточном направлении. Рекогносцировоч-

ное обследование ясеневых насаждений было проведено в сентябре 2014 г. на территории Московского государственного университета леса, в аллеях вдоль железных и автомобильных дорог Мытищинского, Одинцовского и Рузского районов Московской области и вдоль автотрассы М1 от Москвы до границы с Республикой Беларусь.

При обследовании было отобрано 10 образцов пораженных ветвей и побегов для микологической и генетической идентификации возбудителя заболевания методом ПЦР–ПДРФ-анализа с последующим секвенированием. Учитывая прогрессирующее инвазии ясеневой изумрудной узкотелой златки *Agrilus planipennis* Fairm. в Подмоскowie, повреждения которой также приводят к отмиранию ветвей, суховершинности и гибели отдельных деревьев, при обследовании фиксировали и наличие поселений этого вредителя.

Древесные растения из рода ясеневых широко использовались в Подмоскowie с целью озеленения автомобильных и железных дорог. Особенно много чистых ясеневых посадок или в смеси с тополями, яв-

зами и кленами вдоль трассы М1 от Москвы до Вязьмы. Ясеновые 1–2-рядные посадки часто образуют здесь непрерывные аллеи длиной до 10 км. Далее до границы Беларуси встречаются лишь единичные небольшие по протяженности аллеи, приуроченные в основном к населенным пунктам. Необходимо отметить заброшенное состояние большинства придорожных полос, отсутствие уходов, повреждение посадок пожарами, загрязнение бытовыми отходами. В придорожных аллеях доминируют североамериканские виды ясеней – *Fraxinus pennsylvanica* Marsh. и *F. lanceolata* Borkh. Аборигенный вид, ясень обыкновенный *F. excelsior* L., отмечен только в виде отдельных деревьев на территории МГУЛ, изредка встречается в придорожных посадках и в качестве примеси входит в состав лесных насаждений, примыкающих к автотрассе М1.

Визуальная диагностика состояния ясеня повсеместно выявляла симптомы болезни в виде усохших крупных ветвей в различных частях кроны, усохших побегов текущего года, некротизированных участков ветвей вокруг листовых рубцов, водяных побегов на стволах и крупных ветвях, некротических язв на крупных ветвях и стволах, преждевременно усохших листьев с бурными пятнами и побуревшей центральной жилкой и черешком.

В отличие от повреждений ясеновой изумрудной узкотелой златкой, интенсивность которых снижается по мере удаления от Москвы (последние заселенные деревья выявлены у н. п. Андрейково под Вязьмой и у н. п. Семиречье под Смоленском), четких закономерностей в распространенности некроза не выявлено. Поражённость побегов текущего года составляла от 10 до 90%. Причем, если в Мытищинском районе отмечалась минимальная пораженность (10%), то в соседних Одинцовском и Рузском – 60 и 50% соответственно, а в Гагаринском районе Смоленской области только 30%. К примеру, в Беларуси, при встречаемости 100%, пораженность заболеванием средневозрастных деревьев в первом ярусе лесных насаждений составляет  $42,9 \pm 4,2\%$  [5].

В большей степени некрозом повреждается пневая поросль, молодые побеги которой достигают длины до 1 м и несут большое количество листьев, считающейся «воротами» инфекции. Укороченные побеги взрослых деревьев поражаются в меньшей степени, что может быть связано с меньшим количеством несомых листьев.

Меньшую устойчивость к халаровому некрозу проявляет ясень обыкновенный, причем если на нелесных землях болезнь носит, как правило, хроническую форму, то в лесных насаждениях отмирание деревьев происходит более интенсивно за счет заражения корней ослабленных некрозом ясеней вторичными патогенными – ксилотрофными грибами *Armillaria*

*borealis* Marxm., Korhonen и *A. cepistipes* Velen [6].

В аллеях Подмосквья, стволы ясеневых деревьев практически повсеместно отработаны узкотелой изумрудной златкой и погибли. Однако из-за неспособности златки заселять прикорневую часть у молодых и средневозрастных деревьев наблюдается высокая порослевая активность, что способствует интенсивному развитию некрозов.

Из древесины и луба побегов на границе некротизированных и живых тканей путем выделения на твердую питательную среду были получены колонии мицелия, сходные по типу и окраске с колониями *H. fraxineus*, имеющимися в коллекции чистых культур кафедры лесозащиты и древесиноведения БГТУ. Через 2 мес сформировались бутылковидные конидионосцы, характерные для этого вида. По результатам ПЦР–ПДРФ-анализа в 5 образцах были выявлены видоспецифические рестрикционные спектры, идентичные *H. fraxineus*, что было впоследствии подтверждено секвенированием.

Судя по характеру распространенности некроза ветвей ясеня, вызванного патогеном *H. fraxineus*, инвазия этого гриба достигла Московской области несколько лет назад и создает дополнительную угрозу выживанию как местного так и интродуцированных видов ясеня.

#### Список литературы

1. Zvyagintsev VB, Baranov OYu, Melnik LF. Pathogenic fungal diseases of branches of the ash in the drying out plantations in Belarus. Fungi and lichens in the Baltics and Beyond: XVIII Symp. of the Baltic Mycologists and Lichenologists. Lithuania, Dubingiai, Sep. 19–23. 2011: 21.
2. Kowalski T. Chalara fraxinea sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. Forest Pathology. 2006; 36: 264.
3. Мешкова В.Л., Давиденко Е.В. Насекомые и возбудители болезней ясеня на востоке Украины. Совр. сост. и персп. охраны и защ. лесов в системе устойчив. разв. Гомель. 2013: 96–100.
4. Шабунин Д.А. и др. Усыхание ясеня на территории памятника природы "Дудергофские высоты", вызванное грибом *Humenoscyrphus pseudoalbidus*, и морфологические особенности его аскоспор. Тр. СПб НИИ лесн. хозяйства. 2012; 1–2: 70–9.
5. Звягинцев В.Б., Шарандо А.В., Филиппович В.Н. Роль халарового некроза в процессе деградации ясенников Беларуси. Лесн. охотн. хоз. 2014; 9: 8–11.
6. Звягинцев В.Б., Сазонов А.А. Массовое усыхание ясеня в Беларуси. В сб.: «Грибные сообщества лесных экосистем». Под ред. В.И. Крутова, В.Г. Стороженко. М.–Петрозаводск: КНЦ РАН. 2012; 3: 192 с.



## ИТОГИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ДНК-АНАЛИЗА В ПРАКТИЧЕСКОЙ ЛЕСОПАТОЛОГИИ

Шишкина О.К., Сиволопов В.А., Карпеченко Н.А., Шилкина Е.А.  
ФБУ «Российский центр защиты леса», Минприроды РФ, Пушкино, Московская область

В течение последних 4 лет в ФБУ «Российский центр защиты леса» создается сеть генетических лабораторий на всей территории РФ с целью внедрения методов ДНК-анализа в практику лесного хозяйства.

Работы проводятся по нескольким направлениям: лесоводство (определение географического происхождения репродуктивного материала), лесная фитопатология (определение патогенов до вида по их ДНК) и лесная энтомология (определение расы насекомых вредителей и состояния их популяций в очагах поражения).

В настоящей работе подводятся некоторые итоги практического применения молекулярно-генетических методов в фитопатологическом мониторинге лесных насаждений и питомников РФ.

С помощью анализа ДНК патогенов можно проводить:

- фитопатологический анализ насаждений на ранних стадиях развития инфекции без выделения патогена в чистую культуру;
- определение наличия фитопатогенов в почве при подготовке посадочных площадей в качестве экспресс-анализа;
- определение истинных границ распространения инфекции при обнаружении очага поражения;
- определение источника инфекции (вода, почва и др.) и количества патогенов (определение максимальной допустимой концентрации для заражения растений);
- оценку эффективности карантинных и санитарных мероприятий;
- выявление устойчивых и толерантных клонов древесных пород;
- мониторинг появления новых видов патогенов и гибридов и др. [1].

Кроме того, сроки анализа сокращаются от нескольких недель до нескольких дней, методы отличаются высокой производительностью и достоверностью.

Для сети ДНК-лабораторий ФБУ «Российский центр защиты леса» отобраны, апробированы, унифицированы и приведены в единую систему различные методы определения фитопатогенов по их ДНК для получения сравнимых результатов. За основу были взяты методы анализа ДНК, описанные или разработанные в ИЛ НАН Беларуси [2], которые в процессе апробации были частично модифицированы. В работе применяли как универсальные праймеры (ITS-локус рДНК), так и видоспецифические, в зависимости от поставленной задачи. В качестве контроля использовали плодовые тела патогенов или явно поврежденные ткани, при Сэнгеру на генетическом анализаторе марки ABI Prism 310 и 3500. Для определения до вида в этом случае использовали программу BLAST.

За период 2010–2014 гг. обследовано 1700 га площадей, подготовленных для посадки лесных культур, на наличие генетического материала корневой губки

(*Henerobasidion annozum* (Fr) Breff 1889) в Московской обл. Частота встречаемости патогена варьирует от 5 до 85% в различных лесничествах. Даны рекомендации по возможности проведения лесовосстановительных работ на обследованных площадях.

Обследовано 674 га территорий в Московской обл., пройденных пожарами 2010 г. для определения наличия генетического материала ризины волнистой (*Rhizina undulata* Fr.), которая вызывает гибель саженцев течение первых 3-х лет после посадки, если лесовосстановление проведено в 1-й год после пожара. Частота встречаемости патогена на разных площадях от 50 до 85%.

Способность *R. undulata* паразитировать на корнях хвойных была известна в Европе еще в конце прошлого века, но до сих пор она еще полностью не исследована. Болезнь вызывает корневую гниль и особенно сильно поражает саженцы, их гибель иногда достигает до 100%. Характерная черта этой болезни – стремительное развитие. Она внезапно появляется, в течение нескольких лет (обычно 5 – 6) нарастает, вызывая массовое усыхание растений, а потом медленно утихает. После лесных пожаров *R. undulata* развивается в больших количествах, особенно на песчаной почве и хорошо освещенных местах [3].

Результаты наших наблюдений за развитием инфекции в почве и корнях растений на пробных площадях показали, что восстановление лесов в 1-й год после пожаров нецелесообразно, к 3-му году выращивания половина саженцев погибает в результате поражения *R. undulata*. На 2-й год после пожара патоген в почве уже не определяется, присутствует только на корнях погибающих растений, т.е. заражение происходит в основном в первый год. На 3-м году было отмечено начало естественного возобновления насаждений.

Проведено определение степени зараженности 20-летних культур ели корневой губкой (Московская обл., Дмитровское лесничество, Пантюхинское участковое, 45,8 га) с целью прогнозирования состояния насаждения в последующие десятилетия. Генетического материала *H. annozum* (Fr.) Breff не обнаружено. Однако, при обследованиях насаждений сосны обыкновенной 10 лесничеств Алтайского края, в 3-х было выявлена высокая степень скрытого поражения корневой губкой.

К настоящему времени проведен фитопатологический мониторинг на 1409,5 га лесных питомников Центрального и Сибирского Федеральных округов. Всего в РФ насчитывается ~16 тыс. га действующих лесных питомников. По разработанному плану обследования питомников будут продолжаться до 2020 г.

Ранняя и оперативная диагностика развития инфекции в питомниках особенно важна, поскольку в короткие сроки может быть потеряно до 100% сеянцев. В связи с этим у методов анализа ДНК, кроме значительного сокращения сроков, есть еще одно неспо-

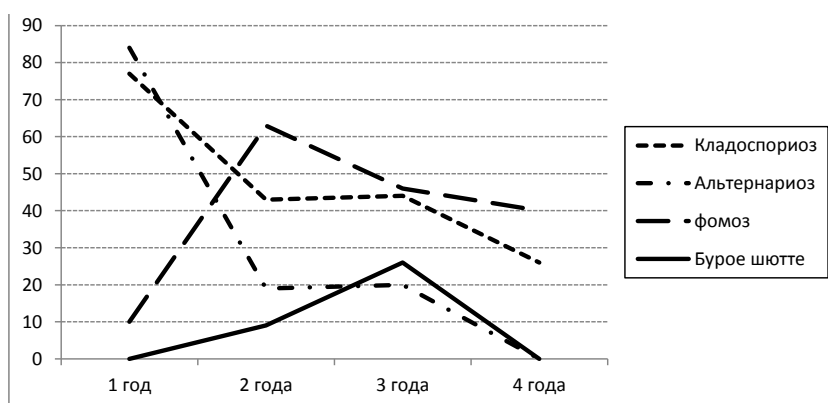


Рисунок 1. Пики развития основных заболеваний в разных возрастных группах семян и саженцев в лесных питомниках ЦФО и СФО.

римое преимущество перед всеми остальными применяемыми в настоящее время методами. ДНК-анализ позволяет выделить доминантный патоген, который является действительной причиной заболевания, независимо от сопутствующей микрофлоры.

Причем, патоген может быть определен на любой стадии развития болезни, включая самую раннюю, и количественно. Общий перечень обнаруженных при обследовании питомников основных патогенов в ЦФО и СФО приведен в табл. 1.

Табл. 1 Общий перечень основных патогенов, распространенных в лесных питомниках ЦФО и СФО (по результатам 2014 г.)

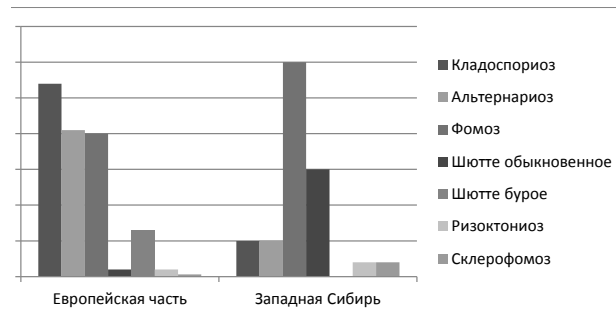
№ п/п	Заболевание	Возбудитель	Встречаемость (%)
1	Кладоспориоз	<i>Cladosporium sp.</i>	54,0
2	Альтернариоз	<i>Alternaria alternata</i>	41,0
3	Фомоз	<i>Phoma sp. (macrostoma, pomorum)</i>	40,0
4	Шютте бурое	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	13,0
5	Шютте обыкновенное	<i>Lophodermium seeditiosum</i> ели – <i>Rhizosphaera macrospora</i>	2,0
6	Шютте подобное (ели)	<i>Ceuthospora pinastri</i>	2,0
7	Ризоктониоз (парша)	<i>Rhizoctonia sp.</i>	2,0
8	Склерофомоз	<i>Sydowia polyspora</i>	0,6
9	Патогенез хвои	<i>Pladicium lateum</i>	0,1

Пики развития основных заболеваний по возрастным группам семян и саженцев представлены на рис. 1. После анализа полученных данных можно утверждать, что основные болезни 1-го года жизни семян в питомниках РФ – кладоспориоз и альтернариоз, 2-го – кладоспориоз и фомоз, 3-го – кладоспориоз, фомоз и бурое шютте. Остальные болезни встречаются значительно реже.

Сравнительный анализ частоты встречаемости основных заболеваний семян в питомниках Евро-

пейской части РФ и Западной Сибири приведены на рис. 2. Из представленных результатов видно, что альтернариозы и кладоспориозы в Западной Сибири встречаются гораздо реже, нежели в Европейской части, тогда как фомозы, наоборот, там значительно более часты.

Рис. 2. Сравнительный анализ частоты встречаемости заболеваний семян в питомниках Европейской части РФ и Западной Сибири.



При анализе полученных данных можно сделать вывод о том, что состав патогенов на лесных питомниках очень близок на всех обследованных территориях, соответственно должны быть близкими и меры борьбы с вызываемыми ими болезнями.

Ранее считалось, что наиболее часто гибель семян вызывают виды рода *Fusarium* (фузариозы). Однако обследование питомников Беларуси с применением ДНК-анализа показало, что на самом деле гибель семян происходит в результате поражения различными видами патогенных грибов рода *Phoma* (фомозы) [4-5].

По результатам наших исследований видно, что и в питомниках РФ основной болезнью семян 2-го года жизни также являются фомозы, фузариозы же, как причина заболевания, не определяются совсем. Причина такой ошибки заключается, по-видимому, в том, что грибы рода *Fusarium*, в отличие от рода *Phoma*, легко культивируются на искусственных питательных средах, тогда как выращивание и выделение в чистую культуру *Phoma sp.* сопряжено с определенными трудностями. Внешнее проявление основных болезней питомников чаще всего сво-

дится к пожелтению и усыханию хвои (шютте), что зачастую приводит ошибочной постановке диагноза при непосредственной визуальной оценке и делает неэффективными меры борьбы. Последнее, в свою очередь, кроме экономического ущерба, усиливает химическое воздействие на экосистемы.

Таким образом, внедрение методов молекулярно-генетического анализа в практику лесного хозяйства России позволит сохранять леса, успешно применяя меры борьбы с болезнями на самых ранних стадиях развития последних, когда эти меры наиболее эффективны.

#### Список литературы

1. Баранов О.Ю. Молекулярная фитопатология: Современные подходы и основные направления диагностики болезней древесных растений. Сиб. лесн. журн. 2014; 4: 42-5.
  2. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Мн.: Юнипол, 2007: 176 с.
  3. Сидорова И.И. Класс Аскомицеты (Ascomycetes). «Жизнь растений» в 6-ти тт.; гл. ред. А.А. Федоров. Т. 2, под ред М.В. Горленко. М.: Просвещение. 1976: 479 с.
  4. Баранов О.Ю., Падутов В.Е, Пантелеев С.В. Молекулярно-генетическое маркирование патогенеза лесных древесных видов. Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. Прилож. к журналу «Молодежь в науке-2009». 2010. 4: 10-12.
  5. Баранов О.Ю., Ярмолович В.А., Пантелеев С.В., Купреенко Д. Г. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней в лесных питомниках. Лесн. охотн. хоз. 2012; 6: 21-9.
-

## Именной указатель

- А**
- Абдуллаев А.А. .... 48  
 Абдульмянова Л.И. .... 352  
 Абизгильдина Р.Р. .... 136  
 Авдеева Л.В. .... 184  
 Аверьянов А.А. .... 14  
 Аветисян Г.А. .... 15,  
 17  
 Автономова А.В. .... 407  
 Агеева И.В. .... 153  
 Агольцов В.А. .... 219,  
 247  
 Азизбекян Р.Р. .... 81  
 Айзенберг В.Л. .... 360  
 Акимова Е.А. .... 107  
 Акопян Л.Л. .... 264  
 Аксенов И.В. .... 221  
 Акулова М.И. .... 394  
 Алейникова Н.В. .... 33  
 Александрова А.В. .... 378,  
 407  
 Аль-Маали Г.А. .... 267  
 Альмяшева Н.Р. .... 269  
 Ананьева Е.П. .... 270  
 Ананько Г.Г. .... 363  
 Андреева А.В. .... 246  
 Анисимова А.В. .... 5,  
 225  
 Анисимова Е.О. .... 299  
 Антонова Т.С. .... 9,61  
 Арасланова Н.М. .... 9,61  
 Арутюнян М.Ж. .... 273  
 Арутюнян Ш.Г. .... 273  
 Аршава Н.В. .... 171  
 Асатурова А.М. .... 173,  
 187  
 Афанасенко О.С. .... 5  
 Афонина С.В. .... 158  
 Ахметова А.К. .... 7, 58  
 Ашмарина Л.Ф. .... 11
- Б**
- Бабоша А.В. .... 15,  
 17  
 Бадалян С.М. .... 275,  
 277, 356  
 Бандура И.И. .... 279  
 Баранов О.Ю. .... 413  
 Баранова А.А. .... 352  
 Баранова Н.А. .... 282  
 Баранова О.А. .... 5, 92  
 Баратова Л.А. .... 210  
 Бардашева А.В. .... 284  
 387, 363  
 Барков А.В. .... 269,  
 313, 352  
 Барштейн В.Ю. .... 315  
 Батакова О.Б. .... 5  
 Батракова К.В. .... 218  
 Беккаревич А.О. .... 286,  
 332  
 Белошапкина О.О. .... 38
- Белявская Л.А. .... 175  
 Берёзов Ю.И. .... 66  
 Березюк Ю.Н. .... 25  
 Берестецкий А.О. .... 19,  
 39, 114, 175, 178, 199  
 Бескоровайная Д.А. .... 269,  
 313  
 Бидей И.А. .... 398  
 Бильдер И.В. .... 39  
 Бирюков В.В. .... 299,  
 330  
 Благовещенская Е.Ю. .... 19  
 Богдаев А.А. .... 287,  
 320, 287  
 Богомолова Е.В. .... 288  
 Богословская Н.Б. .... 53  
 Бодряков А.Н. .... 181  
 Божко К.Н. .... 171  
 Бокарева Д.А. .... 295  
 Бокун Е.А. .... 252  
 Большакова К.П. .... 199  
 Бондаревич Н.В. .... 290  
 Бондаренко И.И. .... 21  
 Боранбаева Р.С. .... 257  
 Борзых О.Г. .... 411  
 Борисенко О.А. .... 291  
 Бородина Е.В. .... 144  
 Братковская Л.Б. .... 153  
 Бубнова Т.В. .... 286,  
 332  
 Буко В.У. .... 349  
 Булгаков Е.А. .... 22  
 Булгаков Т.С. .... 23  
 Бунятова Л.Н. .... 326  
 Буркин А.А. .... 221,  
 223, 230  
 Буров А.М. .... 321  
 Бурцева С.А. .... 25  
 Бухман В.М. .... 366  
 Бучарская А.Б. .... 328  
 Бырса М.Н. .... 25
- В**
- Ваганова О.Ф. .... 155  
 Валиев А.Р. .... 241,  
 259  
 Валиуллин Л.Р. .... 402  
 Васильева Б.Ф. .... 294,  
 341  
 Велиева С.С. .... 41  
 Ветчинкина Е.П. .... 321  
 Винокуров В.А. .... 313  
 Вишневская Н.А. .... 144  
 Власенко В.А. .... 363,  
 403  
 Власенко Е.Н. .... 166  
 Власов Д.Ю. .... 403  
 Власова Т.А. .... 153  
 Войнило Н.В. .... 150  
 Войтка Д.В. .... 50,  
 214  
 Волков Д.Э. .... 112
- Волкова Г.В. .... 155  
 Волкова Т.Н. .... 156  
 Волосатова Н.С. .... 178  
 Воробьева И.Г. .... 158  
 Воронина Е.Ю. .... 378
- Г**
- Гаврилов С.Г. .... 241  
 Гаврилова О.П. .... 44,  
 221, 230, 232  
 Гагкаева Т.Ю. .... 44,  
 221, 230, 232  
 Галкина Е.С. .... 33  
 Гамаюнова М.А. .... 320  
 Ганнибал Ф.Б. .... 35,  
 39  
 Гапеева Н.Е. .... 41  
 Гарибова Л.В. .... 310,  
 311, 296  
 Гарибян Н.Г. .... 275  
 Гасанова А.Р. .... 326  
 Гасанова В.Я. .... 326  
 Гасич Е.Л. .... 19,  
 35, 39, 206  
 Гасымов Ш.Н. .... 41  
 Гатиятуллина А.Ф. .... 4025  
 Гашук А.И. .... 315  
 Герасимов С.В. .... 104  
 Глинушкин А.П. .... 82  
 Глухова Л.А. .... 123  
 Глухова Л.А. .... 48  
 Головченко Л.А. .... 150  
 Головченко Л.А. .... 50,  
 Гончаров Н.П. .... 58  
 Горбуля В.С. .... 119  
 Горбунова И.А. .... 363,  
 403  
 Гордонова И.К. .... 297  
 Горшина Е.С. .... 299,  
 330  
 Горьковенко В.С. .... 52,  
 53  
 Грабова А.Ю. .... 184  
 Грачева Н.П. .... 4 05  
 Грибченко Э.С. .... 44  
 Григорович И.А. .... 190  
 Григорян К.М. .... 264  
 Гринько Н.Н. .... 55  
 Гришечкина Л.Д. .... 186  
 Гродзинская А.А. .... 301  
 Гудзенко Е.В. .... 305  
 Гульятеева Е.И. .... 55,  
 122, 148  
 Гулямова Т.Г. .... 327,  
 352  
 Гунар О.В. .... 306  
 Гурина С.В. .... 270
- Д**
- Далинова А.А. .... 178  
 Данилова А.В. .... 155  
 Дворнина Е.Г. .... 291  
 Джавахян Б.Р. .... 296

- Дзантиев Б.Б. .... 259  
 Диваева Л.Н. .... 181  
 Дидык Н.П. .... 182  
 Дишук Н.Г. .... 200  
 Долженко В.И. .... 179  
 Донченко Г.В. .... 335,  
 361  
 Драговоз И.В. .... 184  
 Дробин Ю.Д. .... 181,  
 252  
 Дубяга В.М. .... 173  
 Дудка И.А. .... 341,  
 343, 365  
 Дудченко И.П. .... 28  
 Дурнова Н.А. .... 328  
 Дюсенова Г.Т. .... 227
- Е**  
 Егоров В.И. .... 228,  
 402  
 Егоров Н.С. .... 282,  
 339  
 Егорова Е.В. .... 31  
 Еланский С.Н. .... 66,  
 190  
 Ефименко Т.А. .... 294  
 Ефременкова Е.В. .... 175  
 Ефременкова О.В. .... 294,  
 341
- Ж**  
 Жалиева Л.Д. .... 411  
 Жапаев Р.К. .... 7  
 Жевнова Н.А. .... 187  
 Желтова Е.В. .... 171  
 Жемчужина А.И. .... 158  
 Жердев А.В. .... 259
- З**  
 Заводовский П.Г. .... 409  
 Завриев С.К. .... 139,  
 141  
 Завьялова Л.А. .... 296  
 Загрядская Ю.А. .... 378,  
 407  
 Заименко Н.В. .... 182  
 Зайнитдинова Р.М. .... 197  
 Зарипова Г.Ф. .... 370  
 Захарчук Л.М. .... 367  
 Захидов А. .... 123  
 Зачиняев Я.В. .... 217  
 Зачиняева А.В. .... 217  
 Зверева Л.В. .... 411  
 Звонарева Е.С. .... 282,  
 339  
 Звягинцев В.Б. .... 413  
 Зеленская М.С. .... 403  
 Зеленский Ю.И. .... 7  
 Зенкова В.А. .... 175  
 Зохидов А.А. .... 48  
 Зубенко А.А. .... 181  
 Зубкович А.А. .... 5
- И**  
 Ибрагимов Р.И. .... 162  
 Ибрагимова В.Х. .... 307  
 Иванов А.А. .... 235  
 Иванов А.В. .... 256,  
 402  
 Иванова А.Е. .... 394  
 Иванова А.Н. .... 178  
 Ивашечкин А.А. .... 295  
 Ивебор М.В. .... 61  
 Ивебор М.В. .... 9  
 Идиятов И.И. .... 249  
 Ильин Д.Ю. .... 310,  
 311  
 Ильина Г.В. .... 310,  
 311  
 Ильина Л.А. .... 234,  
 263  
 Ильина М.В. .... 210  
 Ильина Н.А. .... 240  
 Ильичева Т.Н. .... 363  
 Илюхина Д.Л. .... 62  
 Инсарова И.Д. .... 296  
 Инюшева В.В. .... 175  
 Исакова Е.Б. .... 366  
 Иутинская Г.А. .... 175  
 Ишкова Т.И. .... 179  
 Йылдырым Е.А. .... 234,  
 263
- К**  
 Кадиков И.Р. .... 237,  
 249  
 Кадималиев Д.А. .... 357  
 Казарцев И.А. .... 9,  
 122, 148  
 Канарская З.А. .... 241  
 Кантерова А.В. .... 290  
 Карабаев М.К. .... 7  
 Каракотов С.Д. .... 171  
 Карамова Н.С. .... 62  
 Карапетян А.Ф. .... 238  
 Каратаева Р.К. .... 7  
 Каримова Ф.А. .... 327  
 Карпеева Е.А. .... 240  
 Карпеченко Н.А. .... 415  
 Катруха Г.С. .... 210  
 Кинчарова М.Н. .... 64  
 Кирик Н.Н. .... 110  
 Кириченко А.А. .... 212,  
 400  
 Китаев К.А. .... 136  
 Клапко С.Ф. .... 291  
 Клечак И.Р. .... 364  
 Коваленко А.В. .... 181  
 Коваленко К.Н. .... 250  
 Коваленко Н.М. .... 92  
 Ковчигина М.А. .... 194,  
 195  
 Ковчигина М.А. .... 88  
 Кожевникова Е.Ю. .... 313  
 Козинец А.И. .... 351  
 Козырицкая В.Е. .... 175  
 Кокаева Л.Ю. .... 66  
 Колганихина Г.Б. .... 67  
 Коломиец Т.М. .... 68,  
 132  
 Комаров А.А. .... 251  
 Кондрашева Е.Г. .... 286  
 Кононенко Г.П. .... 221,  
 223, 230  
 Копина М.Б. .... 28  
 Копицын Д.С. .... 269  
 Копицын Д.С. .... 352  
 Кориняк С.И. .... 70  
 Коробова Л.Н. .... 71  
 Коршун В.А. .... 352  
 Косман Е. .... 58  
 Косогова Т.А. .... 284,  
 387, 403  
 Костеневич А.А. .... 349,  
 351  
 Котлярова И.А. .... 74  
 Кошелев А.В. .... 286,  
 332  
 Красинько В.О. .... 317  
 Краснопольская Л.М. .... 314,  
 366  
 Крейер В.Г. .... 282,  
 339  
 Кремнева О.Ю. .... 155  
 Крупа Н.Н. .... 124  
 Круподёрова Т.А. .... 315  
 Крючкова Л.А. .... 184  
 Куварина А.Е. .... 352  
 Кудрявец Е.В. .... 317  
 Кузин А.И. .... 81  
 Кузнецова М.А. .... 192  
 Кузнецова М.А. .... 149  
 Кузнецова М.А. .... 78  
 Кузнецова Н.И. .... 81  
 Кузнецова О.В. .... 317  
 Кунгурцева О.В. .... 179  
 Кураков А.В. .... 282,  
 352  
 Курамшина З.М. .... 76  
 Куркова Н.А. .... 108  
 Курский В.Ф. .... 321  
 Курчатова М.А. .... 328  
 Курченко И.Н. .... 387,  
 361  
 Кутузова И.А. .... 190
- Л**  
 Лаблюк С.В. .... 291  
 Лавлинский А.В. .... 320  
 Лапикова В.П. .... 14  
 Лаптев Г.Ю. .... 234  
 Лаптев Г.Ю. .... 263  
 Левина Н.С. .... 398  
 Левитин М.М. .... 35  
 Линник Л.И. .... 150  
 Литвинова Е.А. .... 337  
 Литовка Ю.А. .... 337  
 Лихачев А.Н. .... 310,  
 311  
 Лоенко Н.Н. .... 242  
 Ломберг М.Л. .... 317  
 Лоскутов И.Г. .... 44  
 Лощинина Е.А. .... 321  
 Лукьянцев В.С. .... 82  
 Лунин В.В. .... 295  
 Лысак Л.В. .... 378,  
 407
- М**  
 Макаренко Е.В. .... 85  
 Максимов И.В. .... 136  
 Маланичева И.А. .... 294  
 Мамедова Н.Х. .... 86,  
 126

Манаенкова Е.В. ....	328	Никитина М.Б. ....	334	Псурцева Н.В. ....	345,
Марданова А.М. ....	62	Николаева О.Н. ....	246		347
Маркин А.В. ....	372	Николаенко М.А. ....	81	Псурцева Н.В. ....	270
Марчук О.В. ....	5	Никонов И.Н. ....	234,	Пукальчик М.А. ....	394
Марьин Г.С. ....	99		263	Пуца Н.М. ....	120
Маслиенко Л.В. ....	88,	Новик Г.И. ....	290	Пучкова Т.А. ....	349,
	194, 195	Новиков А.А. ....	269,		351
Маслова М.В. ....	114		355	Рагинов И.С. ....	402
Маслякова Г.Н. ....	328	Новикова Л.В. ....	334	Разгуляева Н.В. ....	120
Массалимов И.А. ....	197	Новикова Н.И. ....	234,	Райзер О.Б. ....	119
Матвеева Т.В. ....	206		263	Райчук Т.Н. ....	118
Матвиенко Е.В. ....	89,	Новоселова Е.И. ....	162	Рамазанова С.А. ....	61
	90	<b>О</b>		Расулова Г.А. ....	327
Матросова Л.Е. ....	235	Обухова О.А. ....	402	Рахмонов Ж.Х. ....	123
Матыс В.Ю. ....	286,	Овсянкина А.В. ....	101,	Рогожин А.Н. ....	78,
	332		104		192
Медведев Ю.А. ....	177	Озерская С.М. ....	347	Рогожин Е.А. ....	352
	197	Окунев О.Н. ....	286,	Рогожникова Е.С. ....	131
Мелькумов Г.М. ....	112		332	Рузиева Д.М. ....	352
Мелькумова Е.А. ....	198	Орловская Е.Н. ....	52	Русанов В.А. ....	181,
Мельникова Е.С. ....	198	Осадчая О.В. ....	349,		252
Метальников П.С. ....	251		351	Русинова Т.В. ....	299,
Мироненко Н.В. ....	5, 92	Осетрова Е.П. ....	99		330
	144	Осипов В.В. ....	156	Рыженкова Ю.И. ....	50
Михайлова Л.А. ....	92	Осипов Д.О. ....	286	Рябова О.В. ....	146
Михайлова О.Б. ....	341	Осмоловский А.А. ....	282,	Рябченко А.С. ....	17
Михайлова О.Б. ....	343,	339		Рязанова Т.В. ....	337
	365	<b>П</b>		<b>С</b>	
Михайлова Р.В. ....	324	Павлов И.Н. ....	337	Садыкова В.С. ....	352
Мищенко И.Г. ....	88	Павлова М.Д. ....	173	Сазанова К.В. ....	403
Монастырская Э.И. ....	53	Панин А.Н. ....	251	Сазоненкова Я.А. ....	178
Моргунов А.И. ....	7	Панина Л.К. ....	288	Сайитганиева З.Т. ....	123
Морковник А.С. ....	181	Панкратов А.Н. ....	372	Сайтов В.Р. ....	249
Мороз И.В. ....	324	Панкратова Л.Ф. ....	68	Салахутдинов И.Б. ....	48
Морозова Е.В. ....	78	Панкратова Л.Э. ....	328	Салимова Д.Р. ....	178
Москалюк О.Е. ....	315	Пантелеев С.В. ....	413	Сальникова Н.Н. ....	107,
Мурадов П.З. ....	326	Папуниди К.Х. ....	228,		108
Муругова Г.А. ....	5		235, 241, 249, 255, 256	Самсонов А.И. ....	235
Мусаева Т.Д. ....	114	Папуниди Э.К. ....	228	Самчук А.И. ....	301
Мусолин Д.Л. ....	23	Пархоменко Ю.М. ....	335	Санина А.А. ....	107,
Муфазалова Л.Ф. ....	218	Пархоменко Ю.М. ....	361		108
Муфазалова Н.А. ....	218	Пасечник Т.Д. ....	14	Саргсян М.П. ....	264
Мухаметзянова А.Я. ....	218	Пахолкова Е.В. ....	107,	Саркисов К.А. ....	250
Мухарлямова А.З. ....	243,		108	Саттарова Л.Р. ....	76
	244	Перфильева А.И. ....	372	Саукова С.Л. ....	9, 61
Мушенко В.М. ....	114	Петракова А.В. ....	259	Сахно Н.Г. ....	306
Мысякина И.С. ....	295	Пешук Л.В. ....	315	Сашенкова С.А. ....	354
<b>Н</b>		Пиковский М.И. ....	110	Седова И.Б. ....	221
Набеева Р.А. ....	95	Пирязева Е.А. ....	111,	Селимов Р.Н. ....	251
Наволокин Н.А. ....	328		247	Селина И.В. ....	156
Надаринская М.А. ....	351	Пискункова Н.Ф. ....	282	Семёнов Э.И. ....	235,
Назарова Я.И. ....	146	Письменная Ю.Б. ....	387		241, 255, 259
Наконечная Л.Т. ....	387	Плотникова А.М. ....	235	Середич М.О. ....	200
Нанагюлян С.Г. ....	134,	Побединская М.А. ....	190	Сиволапов В.А. ....	415
	273	Поединок Н.Л. ....	341,	Сигитова О.М. ....	112
Насметова С.М. ....	326		343, 365	Сидорова И.И. ....	378,
Негрейко А.М. ....	341,	Пойрас Н.А. ....	25		407
	365	Поликсенова В.Д. ....	116	Сидорова Т.М. ....	173
Неманова Е.О. ....	330	Полуконова Н.В. ....	328	Силаев А.И. ....	179
Немашкалов В.А. ....	286,	Полузэтова Е.В. ....	114,	Синицын А.П. ....	286
	332		175, 199, 206	Синяк Е.В. ....	155
Нечай Н.Л. ....	97	Попкова Е.Г. ....	19	Скворцова В.В. ....	328
Нечитайло Г.С. ....	335,	Попова Е.А. ....	339	Сколотнева Е.С. ....	132
	361	Попова О.М. ....	219,	Скрипка О.В. ....	28
Никитина В.Е. ....	321		247	Скрипникова Е.В. ....	204
Никитина З.К. ....	297	Приходько Е.С. ....	38	Скрипникова М.К. ....	204

- Сметанина Т.И. .... 78,  
149, 192
- Смирнов А.Н. .... 38,  
378
- Смирнова О.Г. .... 381
- Смирнова Ю.В. .... 76
- Смотрова Н.Г. .... 359
- Смук В.В. .... 129
- Согоян Е.Ю. .... 134
- Созинова М.С. .... 156
- Сокорнова С.В. .... 175,  
206
- Солдатенко Н.А. .... 181,  
252
- Соловых А.А. .... 82
- Соловьева А.Ю. .... 52
- Сорокань А.В. .... 136
- Спиглазова С.Ю. .... 78
- Спиридонов Г.Н. .... 259
- Стахеев А.А. .... 139,  
141
- Сташевски З. .... 62
- Степаненко С.П. .... 335,  
361
- Степанова Г.В. .... 3
- Степаньчева Е.А. .... 175
- Стогниенко О.И. .... 207,  
383
- Стойко В.И. .... 360
- Стороженко В.Г. .... 385
- Струнникова О.К. .... 144
- Суббота А.Г. .... 387
- Сударенков Г.В. .... 82
- Суллейменов Р.М. .... 7
- Султанова Г.Г. .... 390
- Супрун С.М. .... 335,  
361
- Супрунова Т.П. .... 149
- Сухих Е.А. .... 252
- Сырбу Т.Ф. .... 202
- Т**
- Татарина Н.Ю. .... 367
- Тахмазова Д.Н. .... 43
- Теплякова Т.В. .... 284,  
387, 363
- Терехова В.А. .... 394
- Терещенко Г.А. .... 74
- Тергышная Ю.В. .... 398
- Тимофеева А.В. .... 210
- Тимофеева В.А. .... 150
- Титова Л.А. .... 364
- Ткаченко О.Б. .... 152
- Томошевич М.А. .... 158
- Торопова Е.Ю. .... 212,  
400
- Тремасов М.Я. .... 235,  
243, 255, 256, 259, 402
- Тремасова А.М. .... 253,  
255
- Трофимова И.А. .... 155
- Тугай А.В. .... 365
- Тугай Т.И. .... 365
- Тюрина Ж.П. .... 291
- Умаров И.А. .... 162
- Умитжанов М. .... 257
- Урусов А.Е. .... 259
- Усов А.И. .... 366
- Устюжанин И.А. .... 334
- Ф**
- Фарукшина К.Т. .... 190
- Фархутдинов Р. Г. .... 95
- Федосеева Е.В. .... 394
- Феофилова Е.П. .... 295
- Фетисов Л.Н. .... 181,  
252
- Филиппов А.В. .... 78
- Филиппова В.А. .... 234,  
263
- Х**
- Хадиева Г.Ф. .... 62
- Хайруллин Р.М. .... 76,
- Хайруллина Р.Р. .... 95
- Хайтбаева Н. .... 123
- Хакимов А.А. .... 123
- Хапилина О.Н. .... 119
- Харкевич Е.С. .... 335,  
361
- Хлопунова Л.Б. .... 35,  
39
- Ходаковский В.М. .... 343
- Холод Н.А. .... 194
- Хомяк А.И. .... 187
- Хусаинов И.Т. .... 241,  
259
- Цивилева О.М. .... 412
- Цымбал О.А. .... 412
- Ц**
- Цивилева О.М. .... 372
- Цымбал О.А. .... 372
- Ч**
- Чернова И.Е. .... 242
- Чеховская Л.И. .... 335
- Чикишева Г.Е. .... 177
- Чилочи А.А. .... 291
- Чиркин А.М. .... 204
- Чуенко А.И. .... 387
- Чупрова Н.А. .... 337
- Чхенкели В.А. .... 225
- Ш**
- Шайдаюк Е.Л. .... 58,  
122, 140
- Шамин А.А. .... 207
- Шарипова Д.А. .... 355
- Шахбазян Т.А. .... 277
- Шахова Н.В. .... 345
- Шейко Е.А. .... 124
- Шералиев А.Ш. .... 48,  
123
- Шеримбетов А.Г. .... 48,  
123
- Шибряева Л.С. .... 398
- Шилкина Е.А. .... 415
- Шимирбекова Б.А. .... 114
- Шипилов Я.С. .... 314
- Шипилова Н. П. .... 128
- Шиповская Е.А. .... 19
- Широких А.А. .... 146,  
370
- Широких И.Г. .... 370,
- Шитиков В.К. .... 394
- Шихлинский Г.М. .... 86,  
126
- Шишкина О.К. .... 415
- Шнырева А.В. .... 356
- Шондина О.В. .... 144
- Шпанев А.М. .... 129,  
131
- Шгарк О.Ю. .... 377
- Шуктуева М.И. .... 366
- Шумилина Д.В. .... 149
- Шумилов Ю.В. .... 155
- Шуралев Э.А. .... 402
- Шутова В.В. .... 357
- Щ**
- Щедрин В.А. .... 171
- Щербакова Л.А. .... 141,  
149
- Щуковская А.Г. .... 152
- Э**
- Эгамбердиев Ш.Ш. .... 48
- Элланская Н.Э. .... 182
- Ю**
- Юзефович Е.К. .... 50,  
214
- Юлдашев Р.А. .... 136
- Юмангулова Г.М. .... 402
- Юношева Е.П. .... 182
- Юрков А.П. .... 41
- Юрченко Е.Г. .... 405
- Юшкевич Т.И. .... 160
- Я**
- Якименко О.С. .... 394
- Якоби Л.М. .... 41
- Якуба Г.В. .... 88,  
195
- Якуткин В.И. .... 161
- Ямалеева А.А. .... 95
- Янахметов М.Р. .... 197
- Ярина М.С. .... 314
- Ярмолович В.А. .... 200
- Яруллина Л.М. .... 162
- Яфаров С.Ф. .... 164
- В**
- Baker C.J. .... 114

Научное издание  
**Современная микология в России**

Том 5

Главный редактор  
**Ю.Т. Дьяков**

Заместитель главного редактора  
**Ю.В. Сергеев**

**Издание**  
**Национальной Академии Микологии**

<http://www.mycology.ru>



Компьютерная обработка и печать

ИП «Мильграм А&В»

Подписано в печать 15.10.2015. Формат 60x90/8

Гарнитура Minion. Печать офсетная.

Усл печ. л. 54,0. Тираж 500 экз.