УДК 632.4.01/08
DOI: 10.36305/0513-1634-2022-143-132-138

ПАТОКОМПЛЕКС МИКРОМИЦЕТОВ НА СЕМЕНАХ СВЕКЛЫ СТОЛОВОЙ В *IN VITRO*

Любовь Михайловна Соколова, Любовь Николаевна Тимакова

Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал Федерального научного центра овощеводства 140153,
Московская обл., Раменский р-н, д. Верея, стр. 500.
E-mail: lsokolova74@mail.ru, ljubovtimakova@rambler.ru

В формировании урожая сельскохозяйственных культур особое место занимает высококачественный посевной и посадочный материал. Известно, что фитопатогенные грибы занимают первое место по нанесению ущерба в растениеводстве и семеноводстве овощных культур. Во всем мире остро стоит проблема загрязнения семенной продукции *Fusarium* sp. и *Alternaria* sp, а также другими плесневелыми грибами. Цель работы: Выявить патокомплекс микромицетов присутствующих на семенах свеклы столовой в *in vitro* с использованием четырех разных питательных сред. В результате проведенных *in* vitro исследований на разных питательных средах выявлено: образц № 136 на пивном агаре 100% преобладание патогенов рр. *Alternaria, Fusarium, Mucor, Aspergillus* – 34,2%, *Pythium* – 32,1%, *Acremonium* – 21,4%. На среде Чапек *Alternaria* – 72,1%, *Fusarium* – 52,4%, *Aspergillus* – 21,3%, *Pythium* – 21,7%, *Cladosporium* – 24,2%. По линии № 139 на пивном агаре 100% преобладание *Alternaria* и 22,7% присутствие бактериоза. На среде Чапек *Alternaria* – 100%, *Aspergillus* – 54,6%. Выявлено, что прирост мицелия в среднем за опыт - от 0,5 на голодном агаре до 4,4 на пивной среде. Оптимальными питательными средами для идентификации являются среда Чапек и среда, приготовленная из пивного сусла.

Ключевые слова: *свекла столовая; микромицеты; патогенны; Alternaria; Fusarium; питательные среды*

Введение

Интенсификация возделывания сельскохозяйственных культур приводит к сдвигу баланса между микроорганизмами в сторону патогенов. Одной из главных причин заболеваний растений является нарушение их питания, снижение качества получаемых семян и плодородия почв, которое существенно зависит от состояния почвенной биоты [1, 2]. В формировании урожая сельскохозяйственных культур особое место занимает высококачественный посевной и посадочный материал.

Известно, что фитопатогенные грибы занимают первое место по нанесению ущерба в растениеводстве и семеноводстве овощных культур среди других возбудителей болезней [3-6]. Во всем мире остро стоит проблема загрязнения семенной продукции фузариозом и альтернариозом, а также другими плесневелыми грибами [1, 7-10]. Повсеместное распространение разных видов *Fusarium*, а также способность их поражать все органы овощных культур могут приводить к потерям урожая от 40-80% [11-14]. При выращивании семенников свеклы и моркови развитие *Alternaria dauci* достигает от 40 до 60%, а в отдельные годы может достигать 100%. При такой инфицированности семян их жизнеспособность подает до 75% [15-17].

Химических фунгицидов, способных эффективно предохранять от воздействия патогена, немного. Как правило, наибольшая эффективность современных препаратов оценивается не выше 60-70% снижения видимых симптомов заболевания в поле [18].

Авторы А.В. Янченко и др. (2016) рассматривая вопрос для предпосевной подготовки семян, а точнее для семеноводства рекомендуют использовать комплекс препаратов «Максим 480». «КС» 1,0 л/т + «Круйзер 600» КС 10,0 л/т + «Изабион» 3,0 л/т. [19].

Для снятия внешней инфицированности семян патокомплексов микромицетов авторы Л.М. Соколова, А.В. Янченко и др. (2021) рекомендуют проводить термическую обработку семян. Термическая обработка семян представляет собой альтернативу химической обработки для уничтожения патогенов. Авторами показана высокая эффективность термической обработки семян свеклы и моркови столовой против *Alternaria*. [20].

Исходя из выше изложенного целью работы было: Выявить патокомплекс микромицетов присутствующих на семенах свеклы столовой (BETA VULGARIS.L) в *in vitro* с использованием четырех разных питательных сред.

Объекты и методы исследования

Годы и место проведения работы. Лабораторные исследования *in vitro* проводились с 2019 по 2021 гг. во ВНИИО - филиал ФГБНУ ФНЦО в отделе селекция и семеноводство лаборатория корнеплодных культур и луков.

Объекты и предметы исследования. 4 питательные среды (разные по своему составу), семена перспективных инцухт-линий свеклы столовой № 136 и № 139 полученные за два года исследований [21].

Описание состава питательных сред и метод их приготовления:

Голодный агар – берем колбу на 2 л, наливаем в нее 1,5 л дистиллированной воды. Далее ставим колбу в кастрюлю, в колбу закладываем 40 г агара доливаем воды до отметки 2 л и доводим до полного растворения. Далее разливаем по 250 мл в колбы и ставим в автоклав для автоклавирования (режим 1 атмосфера при 121^0С).

Среда Чапек - берем колбу на 2 л, наливаем в нее 1 л дистиллированной воды. Далее ставим колбу в кастрюлю, в колбу закладываем 40 г агара. Далее берем вторую колбу 300 мл с теплой водой и высыпаем в неё KCl – 1 г, $MgSO_4$ – 1 г, KH_2PO_4 – 2 г, $NaNo_3$ – 6 г, сахароза – 60 г, всё перемешиваем и выливаем в колбу с агаром, далее добавляем дистиллированной воды до отметки 2 л. Доводим содержимое до полного растворения. После чего разливаем среду по 250 мл в колбы и ставим в автоклав для автоклавирования (режим 1 атмосфера при 121^0С).

Среда из пивного сусла – для приготовления данной среды необходимо пивное сусло, которое приготовлено из натурального ячменя, не химическое, не хмельное. Перед началом приготовления среды сусла 600 мл необходимо прокипятить, снимая пенку. Процедить сусло через 3 слоя фильтровальной бумаги.

Приготовление среды: берем колбу на 2 л, наливаем в нее 1 л дистиллированной воды. Далее ставим колбу в кастрюлю, в колбу закладываем 40 г агара. Доводим до полного растворения агара. Далее в эту колбу наливаем 500 мл пивного сусла. Всё перемешиваем и добавляем дистиллированной воды до отметки 2 л. Доводим содержимое до полного растворения. После чего разливаем среду по 250 мл в колбы и ставим в автоклав для стерилизации (режим 1 атмосфера при 121^0С).

Бактериальная среда – Для приготовления бактериальной среды мы используем готовую сухую смесь под названием «Питательная среда № 1 ГРМ» (для выращивания бактерий) ТУ 9398-001-78095326-2020. Состав среды: Панкреатический гидролизат рыбной муки, панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, натрий хлорид, Д-глюкоза, агар. Способ приготовления: 80 г сухого парашка засыпаем в двух литровую колбу с дистиллированной водой. Доводим до кипения, после чего разливаем среду по 250 мл в колбы и ставим в автоклав для автоклавирования (режим 1 атмосфера при 121^0С).

Метод оценки зараженности семян. В чашки Петри разливаем питательные среды. После застывания в четырехкратной повторности на каждую из четырех сред были разложены семена свеклы (в каждую чашку по 10 семян). Далее исследуемый

материал в чашках размещаем в термостате с поддержанием температуры 25^0С. Учеты проводили на 2, 3, 4, и 6 сутки. При учете проводим линейные замеры разрастания мицелия. На 6 заключительные сутки делаем микроскопирование выросших колоний, определяем родовой состав микромицетов и фотографирование [22].

Результаты и обсуждение

Лабораторные исследования *in vitro* проводились с 2019 по 2021 гг. во ВНИИО - филиала ФГБНУ ФНЦО в отделе селекция и семеноводство лаборатория корнеплодных культур и луков.

В связи с большой заспоренностью семенного материала овощных культур, был заложен опыт в четырех кратной повторности по выявлению патокомплекса патогенов присутствующих на семенном материале свеклы столовой.

На рисунке 1 представлено разрастание мицелия на семенном материале свеклы столовой № 136 и № 139.

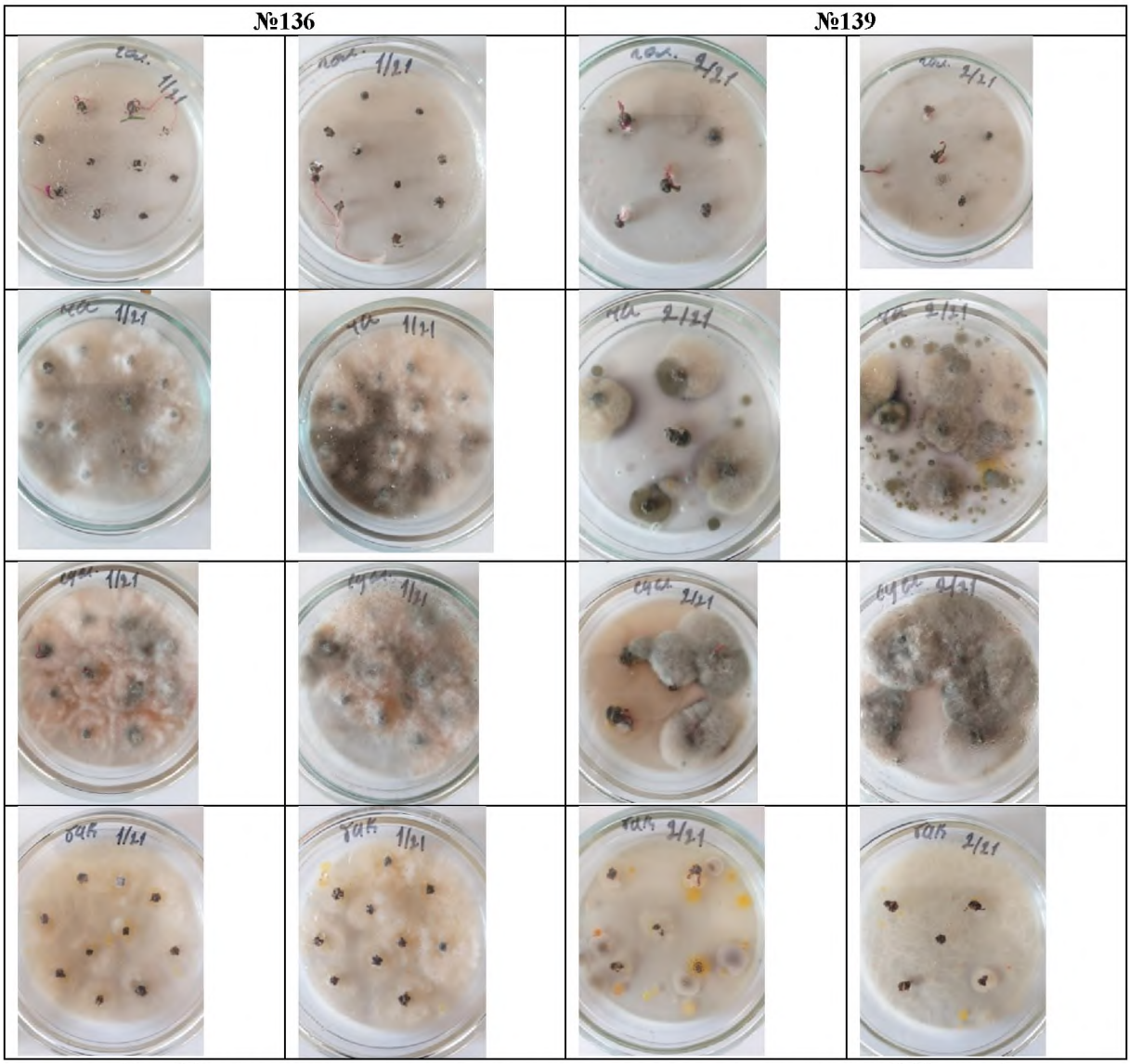

Рис. 1 Разрастание мицелия на семенном материале свеклы столовой (6 сутки)
Примечание: (гол) – голодный агар; (ча) – питательная среда Чапек; (сусл) – среда из пивного сусла; (бак) – бактериальная среда.

На голодном агаре мицелий развивается очень слабо по обоим образцам, так же наблюдалось прорастание семян свеклы столовой. На среде Чапек, бактериальная и на пивной среде разрастание мицелия на образце № 136 интенсивнее, чем на образце № 139, это свидетельствует о более высокой заспоренности образца № 136.

При заключительном учете на 6 сутки выявлен патокомплекс микромицетов, который присутствует на семенах свеклы столовой. Микроскопирование патогенов проводили микроскопом «Биомет-6» с фотонасадкой при увеличении 40/0.65 (160/0.17). Данные по родовому происхождению представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Родовой состав и частота встречаемости (%) патогенов на семенах свеклы столовой линии №136

Род патогена	По линии №136			
	Голодный агар	Среда Чапек	Пивное сусло	Бактериальная среда
Mucor	-	-	100	-
Alternaria	-	72,1	100	-
Fusarium	-	52,4	100	52,4
Aspergillus	-	21,3	34,2	-
Pythium	31,2	21,7	32,1	25,6
Cladosporium	-	24,2	-	-
Acremonium	-	-	21,4	-
Бактериоз	-	-	-	100%

На семенах образца № 136 на пивном агаре выявлено 100 преобладание грибов рр. *Alternaria, Fusarium* и представителя низших плесневых грибов *Mucor*. Так же выявлены *Aspergillus* – 34,2%, *Pythium* – 32,1%, *Acremonium* – 21,4%.

На среде Чапек патогены рр. *Alternaria* – 72,1%, *Fusarium* – 52,4%, *Aspergillus* – 21,3%, *Pythium* – 21,7%, *Cladosporium* – 24,2%. По бактериальной среде выявлено 100% поражение семян бактериозом, а также 52,4% *Fusarium* и 25,6% *Pythium.* На голодном агаре выявлен *Pythium* с 31,2% поражением семян.

При анализе линии № 139 (табл. 2) мы видим, что на пивном агаре выявлено 100% преобладание гриба р. *Alternaria,* а также 22,7% присутствие бактериоза.

Таблица 2

Родовой состав и частота встречаемости (%) патогенов на семенах свеклы столовой линии №139

Род патогена	По линии №139			
	Голодный агар	Среда Чапек	Пивное сусло	Бактериальная среда
Alternaria	-	100	100	-
Aspergillus	-	54,6	-	-
Penicillum	-	-	-	44,7
Pythium	31,5			
Бактериоз			22,7	100

На среде Чапек патогены рр. *Alternaria* – 100%, *Aspergillus* – 54,6%. На бактериальной среде выявлено 100% поражение семян бактериозом, а также 44,7% *Penicillum.* На голодном агаре выявен *Pythium* с 31,5% поражением семян.

В ходе исследований мы также проводили посуточно линейные замеры разрастания мицелия по всем четырем средам. Данные наблюдений со вторых по 6 сутки представлены в таблице 3.

При анализе (табл. 3) полученных данных было выявлено: во-первых, что для выделения микромицетов с семян свеклы столовой наибольший эффект был достигнут на пивной питательной среде и среде Чапек.

Таблица 3

Посуточное нарастание мицелия на семенах свеклы столовой

Повторности по порядку	№136				Нарастание мицелия за опыт в среднем	№139				Нарастание мицелия за опыт в среднем
	2 сутки	3 сутки	4 сутки	6 сутки		2 сутки	3 сутки	4 сутки	6 сутки	
Голодный агар										
1п	0,5	0,5	0,5	0,8	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2п	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3п	0,5	0,5	0,5	0,9	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
4п	0,5	0,5	0,5	1	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Средняя	0,5	0,5	0,5	0,8	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
СредаЧапек										
1п	0,5	1	2,5	4,5	2,1	0,5	0,5	1	2,1	1,0
2п	0,5	1,2	2,4	4,5	2,1	0,5	0,5	1,5	2	1,1
3п	0,5	1	2	4	1,9	0,5	0,5	1,5	2	1,1
4п	0,5	1	2,2	3,5	1,8	0,5	0,5	1	2,4	1,1
Средняя	0,5	1,05	2,3	4,1	2,0	0,5	0,5	1,2	2,2	1,1
Бактериальная среда										
1п	0,5	0,5	1	2,1	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2п	0,5	1	2	2,5	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3п	0,5	1,5	2,5	2,5	2,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
4п	0,5	1	1,7	2,8	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Средняя	0,5	1	1,8	2,9	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Пивная среда										
1п	0,5	3,5	5	8	4,3	0,5	2,4	3,1	5,4	2,9
2п	0,5	2,5	4	8	3,8	0,5	2,1	3	5,8	2,9
3п	0,5	3,5	5	8	4,3	0,5	2	3,4	5,7	2,9
4п	0,5	4	5	8	4,4	0,5	2,2	3,1	5,7	2,9
Средняя	0,5	3,4	4,8	8	4,2	0,5	2,2	3,1	5,7	2,9

Наибольшее число колоний было образовано на пивной среде. В ходе анализа была рассчитана средняя по приросту мицелия за сутки. Так на вторые сутки прирост мицелия от дня закладки составил 0,5 мм. На 6 сутки прирост мицелия по каждой среде колебался от 0,8 до 8 мм (см. табл. 3). Так же выявлен прирост мицелия в среднем за опыт. Значения колебались от 0,5 на голодном агаре до 4,4 на пивной среде.

Во-вторых, выявлено что наиболее подвержены поражению патокомплекса микромицетов семена инсухт – линии № 136.

Выводы

В результате проведенных *in vitro* исследований с использованием четырех разных питательных сред выявлено, что на семенах образца №136 на пивном агаре выявлено 100% преобладание грибов рр. *Alternaria, Fusarium* и представителя низших

плесневых грибов *Mucor*. Так же выявлены *Aspergillus* – 34,2%, *Pythium* – 32,1%, *Acremonium* – 21,4%.

На среде Чапек патогены рр. *Alternaria* – 72,1%, *Fusarium* – 52,4, *Aspergillus* – 21,3%, *Pythium* – 21,7%, *Cladosporium* – 24,2%. По бактериальной среде выявлено 100% поражение семян бактериозом, а также 52,4% *Fusarium* и 25,6% *Pythium*. На голодном агаре выявлен *Pythium* с 31,2% поражением семян.

По линии № 139 на пивном агаре выявлено 100% преобладание гриба р. *Alternaria,* а также 22,7% присутствие бактериоза.

На среде Чапек патогены рр. *Alternaria* – 100%, *Aspergillus* – 54,6%. На бактериальной среде выявлено 100% поражение семян бактериозом, а также 44,7% *Penicillum*. На голодном агаре выявен *Pythium* с 31,5% поражением семян.

Таким образом, определено, что линия № 136 более подвержена поражению комплексом патогенов, чем линия № 139.

Выявлено, что наибольшее количество спороносящего мицелия было образовано на пивной среде. Прирост мицелия от дня закладки составил на 6 сутки от 0,8 на голодном агаре до 8 мм на пивной среде. Прирост мицелия в среднем за опыт - от 0,5 на голодном агаре до 4,4 на пивной среде.

Оптимальными питательными средами для идентификации микромицетов на семенах свеклы столовой являются питательная среда Чапек и среда, приготовленная из пивного сусла.

Список литературы

1. *Бурова Ю.А., Ибрагимова В.В., Ревин В.В.* Действие культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* на развитие семян пшеницы и фитопатогенных грибов // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2012. – Вып. 3. – С. 198-206.

2. *Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В.* Фузариоз зерновых культур // СПб.: РАСХН, 2011. – 120 с.

3. *Горьковенко В.С., Оберюхтина Л.А., Куркин Е.А.* Вредоносность гриба *Microdochium nivale* в агроценозе озимой пшеницы // Защита и карантин растений. – 2009. – С.34-36.

4. *Леунов В.И., Ховрин А.Н., Терешонкова Т.А., Соколова Л.М., Горшкова Н.С., Алексеева К.Л.* Методы ускоренной селекции моркови столовой на комплексную устойчивость к грибным болезням (*Alternaria* и *Fusarium*). Методические рекомендации. – 2011. – 61 с.

5. *Налобова В.Л., Бохан А.И.* Влияние способов выращивания семенников моркови столовой на качество семян и их фитосанитарное состояние // Овощеводство: сборник научных трудов. – Минск, 2010. – Т. 18. – 52 с.

6. *Попкова К.В.* Общая фитопатология. – М.: Дрофа. – 2005. – 445 с.

7. *Романенко Н.Д., Попов И.О., Таболин С.Б., Бугаева Е.Н., Заец В.Г.* Перспективы использования бактерий-антагонистов против наиболее фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов. – Изд-во Агрорус. – 2008.

8. *Соколов М.С., Дородных Ю.Л., Марченко А.* Здоровая почва как необходимое условия жизни человека // Почвоведение. – 2010. – № 7. – С. 858-866.

9. *Соколова Л.М., Янченко А.В., Федосов А.Ю., Азопков М.И., Голубович В.С.* Термическое обеззараживание семян моркови и свеклы // Картофель и овощи. – 2021. – №8. – С. 24-27. DOI:1025630/PAV.2021.69.23.004.

10. *Соколова Л.М.* Анализ видового разнообразия грибов из рода *Fusarium* // Аграрная наука. – 2019. – № S1. – С. 118-122. DOI:10.32634/0869-8155-2019-326-1-118-122

11. *Тимакова Л.Н., Долгополова М.А.* Морфометрическое проявление признаков у инбредных линий раздельноплодной свеклы столовой (BETA VULGARIS.L) // Овощи России. – 2021. – № 6. – С. 42-46.

12. *Тимакова Л.Н., Соколова Л.М.* Хранение корнеплодных культур при летнем сроке выращивания в условиях Московской области // Картофель и овощи. – 2021. – № 9. – С. 19-21. DOI:10.25630/PAV.2021.13.16.002

13. *Янченко А.В., Азопков М.И., Соколова Л.М.* Обработка семян для увеличения выхода маточников // Картофель и овощи. – 2016. – № 10. – С. 32-34.

14. *Bleakley B.H., Draper M.A., Ruden K.R.* Control of *Fusarium* head blight with biological antagonists // In: Proceedings of National Fusarium Head Blight Forum, USA, 2000. – P. 75-76.

15. *Elis P.R., Hardman J.A.* Pests of umbelliferous crops // Vegetable Crop Pests. Florida. – 1992. – P. 327-378.

16. *Luz W.C., Stockwell C.A., Bergstrom C.A.* Biological control of *Fusarium graminearum* // In: Fusarium head blight of wheat and barley. APS Press, 2003. – P. 381-394.

17. *Leunov V.I., Sokolova L.M., Beloshapkina O.O., Khovrin A.N.* Resistance of carrots to *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. And factors influencing it // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – p. 624. DOI: 10.1088/1755-1315/624/1/012010.

18. *Nazarov P.A., Baleev D.N., Ivanova M.I., Sokolova L.M., Karakozova M.V.* Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection // Acta Naturae. – 2020. – № 12(3). – С.46-59. DOI:10.32607/actanaturae.11026.

19. *Rosas Susana B., Pastor Nicolás A., Guiñazú B.L., Javier A.A., Carlier E., Vogt V., Bergesse J., Rovera M.* Efficacy of Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca SR1 for Improving Productivity of Several Crops // Crop Production Technologies. – 2012. – P. 209-212.

20. *Stockwell C.A., Luz W.C., Bergstrom G.C.* Biocontrol of wheat scab with microbial antagonists // Phytopathol. – 1997. – Vol. 87. – P. 94-98.

21. *Thrane U., Adler A., Clasen P.E., Galvano F.* Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides* // Intern. J. Food Microbiol. – 2004. – V. 95. – P. 257-266.

22. *Wakulinski W.* Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight) // Acta Physiol. Plant. – 1989. –Vol.11. – №4. – P. 301-306.

Статья поступила в редакцию 28.02.2022 г.

Sokolova L.M., Timakova L.N., Pathocomplex of micromycetes on table beet seeds *in vitro* // Bull. Of the State Nikita Botan. Gard. – 2022. – № 143. – P. 132-138

In the formation of the crop yield, a special place is occupied by high-quality seed and planting material. It is known that phytopathogenic fungi occupy the first place in causing damage in crop production and seed production of vegetable crops. The problem of contamination of seed products *Fusarium sp.* and *Alternaria sp*, as well as other moldy fungi, is acute all over the world. Objective: To identify the pathocomplex of micromycetes present on table beet seeds *in vitro* using four different nutrient media. As a result of *in vitro* studies conducted on different nutrient media, it was revealed: sample No. 136 on beer agar 100% prevalence of pathogens pp. *Alternaria, Fusarium, Mucor, Aspergillus* – 34.2%, *Pythium* - 32.1%, *Acremonium* – 21.4%. On the medium of Chapec *Alternaria* – 72.1%, *Fusarium* – 52.4, *Aspergillus* – 21.3, *Pythium* - 21.7, *Cladosporium* -24.2%. According to line No. 139, *Alternaria* prevails 100% on beer agar and bacteriosis is present 22.7%. On the medium of Chapec *Alternaria* – 100%, *Aspergillus* – 54.6. It was revealed that the mycelium growth on average during the experiment ranged from 0.5 on hungry agar to 4.4 on beer medium. The optimal nutrient media for identification are the Chapek medium and the medium prepared from beer wort.

Key words: *table beet; micromycetes; pathogens; Alternaria; Fusarium; nutrient media*