Сравнение двух методов искусственного заражения семян льна масличного возбудителями фузариоза *in vitro*

Л.В. Маслиенко¹,

доктор биологических наук

А.Х. Воронкова¹,

младший научный сотрудник

Л.А. Даценко^{1,2},

лаборант-исследователь, магистрант КубГУ

Е.А. Ефимцева^{1,2},

лаборант-исследователь, магистрант КубГУ

¹ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

350038, Россия, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@yandex.ru

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет

Для цитирования: Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х., Даценко Л.А., Ефимцева Е.А. Сравнение двух методов искусственного заражения семян льна масличного возбудителями фузариоза *in vitro* // Масличные культуры. – 2019. – Вып. 3 (179). – С. 100–105.

Ключевые слова: лен масличный, фузариоз, искусственное заражение, *in vitro*, *Fusarium poae*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*.

Испытаны два метода искусственного заражения семян льна масличного возбудителями фузариоза *in vitro* для дальнейшего проведения вторичного скрининга выделенных перспективных штаммов-антагонистов. С этой целью можно использовать оба испытанных метода. При применении первого метода, когда семена льна раскладывали на поверхность 15-дневных колоний возбудителей фузариоза, рекомендуем использовать агрессивный изолят *Fusarium poae* (Peck) Wollenw., in Lewis (1), который уже через трое суток поражал 80 % проросших семян. При необходимости создания среднего фона можно использовать изолят *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Shyd. et Hans. var. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilai, который через семь суток поражал 55 %, а через десять суток – 70 % проростков. При применении второго метода, когда семена льна рас-

кладывали на поверхность 15-дневных колоний возбудителей фузариоза, высланных фильтровальной бумагой, можно применять изолят *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*, который на седьмые сутки поражал 55 %, а на десятые – 95 % проростков.

UDC 633.854.54:632.937

Comparison of two method of artificial infection of oil flax seeds with fusarirose pathogen *in vitro*.

L.V. Maslienko¹, doctor of biology

A.Kh. Voronkova¹, junior researcher

L.A. Datsenko^{1,2}, laboratory assistant

E.A. Efimtseva^{1,2}, laboratory assistant

¹V.S. Pustovoi All-Russian Research Institute of Oil Crops

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@yandex.ru

²Kuban State University

Key words: oil flax, fusarirose, artificial infection, *in vitro*, *Fusarium poae*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*.

We tested two methods of artificial infection of oil flax seeds with fusarirose pathogen *in vitro* in order to conduct second screening of the selected perspective strains-antagonists. The both methods appeared to be promising. First method consists of placing oil flax seeds on surface of 15-days colonies of *Fusarium* pathogen. We recommended to use an aggressive isolate *Fusarium poae* (Peck) Wollenw., in Lewis. (1) here, it infected about 80% of germinating seeds in three days. The isolate *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Shyd. et Hans. var. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilai can be used if it is necessary to create a middle infection plot. In seven days it infected 55 %, and in ten days – 70% of seedlings. Second method consists of placing oil flax seeds on surface of 15-days colonies of *Fusarium* pathogen which are covered with sterile filter paper. In this case, the isolate *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* infecting 55% of seedlings in seven days and 95% in ten days can be used.

Введение. Основными формами проявления фузариоза льна масличного являются корневые гнили (фузариоз всходов), трахеомикозное увядание, побурение верхушек растений и коробочек. В Краснодарском крае наибольшее поражение растений льна фузариозом отмече-

но в фазе созревания в форме трахеомикозного увядания [1; 2; 3].

В основе разработанной нами концепции целенаправленного создания микробиопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от болезней лежит ступенчатый скрининг выделенных штаммов-антагонистов фитопатогенов, который включает первичную оценку антагонистической активности *in vitro* к наиболее распространенным и вредоносным возбудителям болезней методом двойных или встречных культур [4; 5]. Затем лабораторные образцы микробиопрепаратов, изготовленные на основе выделенных в первичном скрининге перспективных штаммов, оценивают на фоне искусственного заражения патогенами в лабораторных условиях *in vitro*, во влажной камере и в почве [6]. Так как применяемый нами метод агаровых блоков [7] для искусственного заражения возбудителями болезней подсолнечника и сои не подходит для культуры льна в связи с малыми размерами семян, мы испытывали модифицированные нами методы, разработанные для заражения фузариозом семян рапса и горчицы [8].

Настоящая работа посвящена испытанию методов искусственного заражения семян льна масличного *in vitro* наиболее распространенными видами возбудителей фузариоза, выделенных нами на полях ВНИИМК, для дальнейшего проведения вторичного скрининга перспективных штаммов антагонистов.

Материалы и методы. Для заражения семян льна масличного сорта ВНИИМК 620 использовали изоляты возбудителей фузариоза, выделенных нами из корней пораженных растений льна масличного в 2016–2019 гг.: два изолята *Fusarium poae* (Peck) Wollenw., in Lewis и один изолят *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Shyd. et Hans. var. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilai. Определение возбудителей фузариоза проводили по определителям Шипиловой [9] и Билай [10].

Испытывали следующие методы искусственного заражения семян льна масличного возбудителями фузариоза *in vitro*:

1 – семена льна раскладывали на поверхность 15-дневных колоний возбудителей фузариоза;

2 – семена льна раскладывали на увлажненную стерильной водой фильтровальную бумагу, выстланную на поверхность 15-дневных колоний патогена.

Патогенные изоляты грибов рода *Fusarium* выращивали на картофельно-сахарозном агаре (КСА) в течение 15 суток при температуре 25 °С. Затем в каждую чашку Петри раскладывали по 20 семян льна масличного, при этом верхнюю крышку чашки Петри выстилали стерильной фильтровальной бумагой, смоченной стерильной водой. Повторность 3-кратная. Учёт проводили на третьи, седьмые и десятые сутки.

Результаты и обсуждение. Установлена различная эффективность методов заражения семян льна масличного возбудителями фузариоза *in vitro*.

При раскладывании семян льна на поверхность 15-дневных колоний патогенов, на третьи сутки в варианте с возбудителем фузариоза *F. poae* (1) поразились 80 % проклюнувшихся семян. Тогда как в вариантах с изолятами *F. poae* (2) и *F. oxysporum* пораженных проростков не было (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1

Поражение проростков льна масличного возбудителями фузариоза при испытании метода искусственного заражения раскладыванием семян на поверхность 15-дневных колоний патогена *in vitro*

г. Краснодар, 2019 г.

Вариант	Поражено фузариозом, %, через, суток		
	3	7	10
<i>Fusarium poae</i> (1)	80,0	85,0	85,0
<i>Fusarium poae</i> (2)	0	0	20,0
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i>	0	55,0	70,0

Рис. 1

На седьмые сутки в варианте с изолятом *F. poae* (1) количество пораженных проростков составило 85,0 %, при этом все они покрылись мицелием патогена. В варианте с изолятом *F. poae* (2) проростки выросли, сформировали семядольные листья, но фузариозом не поразились. С изолятом *F. oxysporum* var. *orthoceras* поразились 55,0 % проростков, при этом гипокотили у них были изогнуты и кончики корня сгнили.

На десятые сутки в варианте с изолятом *F. poae* (1) количество пораженных проростков сохранилось (85,0 %). В вариантах с изолятом *F. poae* (2) поразились фузариозом 20,0 % проростков, а с изолятом *F. oxysporum* var. *orthoceras* количество пораженных проростков выросло до 70,0 %, а корни у проросших семян почти полностью сгнили.

Таким образом, при испытании первого метода, при раскладывании семян льна на поверхность 15-дневных колоний патогена, из трех изолятов возбудителей фузариоза наиболее агрессивным показал себя изолят *F. poae* (1), который уже через трое суток поражал 80,0 % проклюнувшихся семян. При необходимости создания среднего фона можно использовать изолят *F. oxysporum* var. *orthoceras*, который через семь суток поражал 55,0 %, а через десять суток – 70,0 % проростков. Изолят *F. poae* (2) оказался не агрессивным. При испытании второго метода, когда семена льна раскладывали на увлажненную стерильной водой фильтровальную бумагу, выстланную на поверхность 15-дневных колоний возбудителей фузариоза, результаты заражения значительно отличались от предыдущего метода (табл. 2, рис. 2).

Поражение проростков льна масличного возбудителями фузариоза при испытании метода искусственного заражения раскладыванием семян на увлажненную стерильной водой фильтровальную бумагу, выстланную на поверхность колоний патогена *in vitro*

г. Краснодар, 2019 г.

Вариант	Поражено фузариозом, %, через, суток		
	3	7	10
<i>Fusarium poae</i> (1)	0	20,0	30,0
<i>Fusarium poae</i> (2)	0	5,0	20,0
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i>	0	55,0	95,0

На третьи сутки во всех трех вариантах с возбудителями фузариоза проростки льна патогенами не поразились. При этом в первых двух вариантах семена льна в большинстве проросли, тогда как в варианте с изолятом *F. oxysporum* var. *orthoceras* только проклюнулись.

На седьмые сутки во всех трех вариантах с возбудителями фузариоза проростки льна поразились патогеном, но максимально (55 %) – с изолятом *F. oxysporum* var. *orthoceras*.

На десятые сутки во всех вариантах с возбудителями фузариоза произошло увеличение поражения патогеном и максимальное – у изолята *F. oxysporum* var. *orthoceras* (95,0 %), при этом корни проростков сгнили.

Таким образом, при испытании второго метода, при раскладывании семян льна на поверхность колоний патогенов, выстланной фильтровальной бумагой, из трех изолятов возбудителей фузариоза наиболее агрессивным показал себя изолят *F. oxysporum* var. *orthoceras*, который на седьмые сутки поражал 55,0 %, а на десятые – 95,0 % проростков.

Рис. 2

Выводы. Для проведения вторичного скрининга штаммов-антагонистов возбудителей фузариоза льна масличного на фоне искусственного заражения патогенами *in vitro* можно использовать оба испытанных метода. При применении первого метода при раскладывании семян льна на поверхность 15-дневных колоний патогенов, для создания жесткого фона следует использовать изолят *F. roae* (1), который уже через трое суток поражал 80,0 % проклюнувшихся семян. При необходимости создания среднего фона можно использовать изолят *F. oxysporum* var. *orthoceras*, который через семь суток поражал 55,0 %, а через десять суток – 70,0 % проростков. При применении второго метода, при раскладывании семян льна на поверхность колоний патогенов, высланных фильтровальной бумагой, следует применять изолят *F. oxysporum* var. *orthoceras*, который на седьмые сутки поражал 55,0 %, а на десятые – 95,0 % проростков.

Список литературы

1. Курилова Д.А., Бушнев А.С., Подлесный С.П. Пораженность масличного льна фузариозом в зависимости от приемов возделывания в условиях центральной зоны Краснодарского края // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2017. – Вып. 2 (174). – С. 112–119.
2. Семеренко С.А., Курилова Д.А. Инкрустация семян льна масличного как способ защиты всходов от вредных организмов в условиях центральной зоны Краснодарского края // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2017. – Вып. 4 (172). – С. 125–133.
3. Сулейманова А.К. Устойчивость сортов льна масличного к фузариозному увяданию // Международный сельскохозяйственный журнал. – 2018. – №. 4 (364). – С. 41–43.
4. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1957. – 78 с.
5. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд-во «Наука», 2004. – 525 с.
6. Маслиенко Л.В. Лаборатория биологических средств защиты растений (вчера, сегодня, завтра) // История научных исследований во ВНИИМК за 90 лет. – Краснодар, 2003. – С. 273–281.
7. Зайчук В.Ф. Об устойчивости подсолнечника к гнилям // Масличные культуры. – 1983. – № 1. – С. 16–17.
8. Зайчук В.Ф., Коновалов Н.Г., Калужная Г.А., Полянская О.Ф. Метод оценки устойчивости рап-

са и горчицы к фузариозу // Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 1990. – Вып. 4 (111). – С. 49–52.

9. Шупилова Н.П., Иващенко В.Г. Систематика и диагностика грибов рода *Fusarium* на зерновых культурах. – СПб, ВИЗР, 2008. – 84 с.

10. Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. [и др.]. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / Под ред. Билай В.И. – Киев: Наукова думка, 1988. – 552 с.

References

1. Kurilova D.A., Bushnev A.S., Podlesnyy S.P. Porazhennost' maslichnogo l'na fuzariozom v zavisimosti ot priemov vozdeleyvaniya v usloviyakh tsentral'noy zony Krasnodarskogo kraya // Maslichnye kul'tury: Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2017. – Vyp. 2 (174). – S. 112–119.
2. Semerenko S.A., Kurilova D.A. Inkruatsiya semyan l'na maslichnogo kak sposob zashchity vskhodov ot vrednykh organizmov v usloviyakh tsentral'noy zony Krasnodarskogo kraya // Maslichnye kul'tury: Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2017. – Vyp. 4 (172). – S. 125–133.
3. Suleymanova A.K. Ustoychivost' sortov l'na maslichnogo k fuzarioznomu uvyadaniyu // Mezhdunarodnyy sel'skokhozyaystvennyy zhurnal. – 2018. – №. 4 (364). – S. 41–43.
4. Egorov N.S. Vydelenie mikrobov-antagonistov i biologicheskie metody ucheta ikh antibioticheskoy aktivnosti. – M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1957. – 78 s.
5. Egorov N.S. Osnovy ucheniya ob antibiotikakh. – M.: Izd-vo «Nauka», 2004. – 525 s.
6. Maslienko L.V. Laboratoriya biologicheskikh sredstv zashchity rasteniy (vchera, segodnya, zavtra) // Istoriya nauchnykh issledovaniy vo VNIIMKe za 90 let. – Krasnodar, 2003. – S. 273–281.
7. Zaychuk V.F. Ob ustoychivosti podsolnechnika k gnilyam // Maslichnye kul'tury. – 1983. – № 1. – S. 16–17.
8. Zaychuk V.F., Kononov N.G., Kalyuzhnaya G.A., Polyanskaya O.F. Metod otsenki ustoychivosti rapsa i gorchitsy k fuzariozu // Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 1990. – Vyp. 4 (111). – S. 49–52.
9. Shipilova N.P., Ivashchenko V.G. Sistematika i diagnostika gribov roda *Fusarium* na zernovykh kul'turakh. – SPb, VIZR, 2008. – 84 s.
10. Bilay V.I., Gvozdyak R.I., Skripal' I.G. [i dr.]. Mikroorganizmy – vzbuditeli bolezney rasteniy / Pod red. Bilay V.I. – Kiev: Naukova dumka, 1988. – 552 s.

Получено: 30.08.2019 Принято: 16.09.2019

Received: 30.08.2019 Accepted: 16.09.2019

1

a

б

в

2

a

б

в

3

a

б

в

Рисунок 1 – Метод искусственного заражения льна масличного раскладыванием семян на поверхность 15-дневных колоний возбудителя фузариоза, 2019 г. (ориг.).
Варианты: а – *Fusarium poae* (1); б – *Fusarium poae* (2); в – *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*:
1 – на 3-и сутки после заражения;
2 – на 7-е сутки после заражения;
3 – на 10-е сутки после заражения

1

а

б

в

2

а

б

в

3

а

б

в

Рисунок 2 – Метод искусственного заражения льна масличного раскладыванием семян на увлажнённую фильтровальную бумагу, помещённую на поверхность колоний возбудителя фузариоза *in vitro*, 2019 г. (ориг.).

Варианты: а – *Fusarium poae* (1); б – *Fusarium poae* (2); в – *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*:

1 – на 3-и сутки после заражения;

2 – на 7-е сутки после заражения;

3 – на 10-е сутки после заражения