

2. Sherstoboieva O.V., Chaikovska V.V., Chabaniuk Ya.V. (2007). *Kompleksni mikrobnii preparaty dlia intehrovanykh system zemlerobstva* [Complex microbial drugs for integrated farming systems]. *Mikrobiolohiia i biotekhnolohiia* [Microbiology and Biotechnology]. No. 1, pp. 75–81 (in Ukrainian).
3. Nelson L.M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop Management*. 2004; doi:10.1094/CM-2004-0301-05-RV (in English).
4. Magomedov R.D., Ryabukha S.S., Shelyakin V.A. (2012). *Vliyanie inokulyatsii shtammami Bradirhizobium japonicum na sodержanie belka* [Effect of inoculation Bradirhizobium japonicum strains for protein content]. *Maslichnye kultury: Nauchno-tehnicheskii byulleten Vserossiyskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnykh kultur* [Oilseeds: Scientific and technical bulletin of All-Russian Research Institute of oilseeds], No. 2 (151–152), pp. 175–178 (in Russian).
5. Grego Stefano (2012). Toward a sustainable agriculture. ESNA Meeting 2012 and the Recent Advances in Plant Biotechnology Workshop. Stara Lesna, Slovak Republic, 24–28th September, 2012, p. 17 (in English).
6. *Metody issledovaniya arbuskulyarnykh mikoriznykh gribov* [Research methods of arbuscular mycorrhizal fungi]. Leningrad, 2000, 24 p. (in Russian).
7. Volkohon V.V., Nadkernychna O.V., Tokmakova L.M. (2010). *Eksperymentalna gruntova mikrobiolohiia* [Experimental soil microbiology]. Kyiv: Ahrarna nauka Publ., 464 p. (in Ukrainian).
8. Mukha V.D. (1980). *O pokazatelyakh otrazhayushchikh intensivnost i napravlennost pochvennykh protsessov* [About indicators that reflects the intensity and direction of soil processes]. Collection of Kharkiv Agricultural Institute, Vol. 273, pp. 13–16 (in Ukrainian).
9. Hrytsaienko Z.M., Hrytsaienko A.O., Karpenko V.P. (2003). *Metody biologichnykh i ahrokhimichnykh doslidzhen roslin i gruntiv* [Methods of biological and agrochemical research of plants and soil]. Kyiv: NICH LAVA Publ., 320 p. (in Ukrainian).

УДК 661.686:631.544:631.153.7

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ МІКРОМІЦЕТІВ ТА АНАЛЬЦИМУ ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН КАПУСТИ ВІД ФУЗАРІОЗУ

**Н.В. Заїменко, Н.П. Дідик, Н.Е. Елланська, Н.А. Павлюченко,
О.П. Юношева, О.В. Закрасов, Н.В. Росіцька**

Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України

*За дослідження мікробної взаємодії у ґрунтовому середовищі виявлено значний анти-фунгальний вплив культуральної рідини *Penicillium roseo-rubrum* на фітопатогенні гриби роду *Fusarium* та імуностимулюючі властивості наноматеріалу анальциму. Встановлено ефект потенціювання за сумісного застосування анальциму та культуральної рідини *P. roseo-rubrum* для захисту рослин капусти від ураження фузаріозом.*

Ключові слова: *анальцим, Penicillium roseo-rubrum, капуста, проростки, мікробіоценоз, біохімічні та алелопатичні властивості ґрунту.*

В Україні гостро постає проблема захисту культурних рослин від фітопатогенів. Щорічні втрати врожаю від грибкових захворювань становлять близько 50% [1]. Мікроміцети роду *Fusarium* входять до десятки найбільш шкочинних фітопатогенів

у світі внаслідок своєї високої екологічної пластичності, пристосовності та здатності продукувати близько 190 токсинів [1, 2]. Сучасні технології контролю ураження сільськогосподарських рослин фітопатогенними мікроорганізмами базуються на застосуванні синтетичних фунгіцидів. Проте їх використання є обмеженим, оскільки вони потребують економічних витрат, спричиняють значні екологічні проблеми та ви-

© Н.В. Заїменко, Н.П. Дідик, Н.Е. Елланська, Н.А. Павлюченко, О.П. Юношева, О.В. Закрасов, Н.В. Росіцька, 2015

никнення стійких популяцій фітопатогенів. З іншого боку, селекція стійких до фітопатогенів сортів культурних рослин лімітується існуванням широкого спектра останніх. Тому розроблення екологічних препаратів на основі кремнієвісних природних мінералів та екзометаболітів мікроміцетів, що є антагоністами фітопатогенних грибів, може бути дієвою альтернативою сучасній хімізації сільськогосподарства.

Позитивний вплив екзогенних активних форм кремнію на рослини доволі широко розглядається в науковій літературі [3]. Наприклад, що водорозчинний кремній сприяє росту та продуктивності сільськогосподарських культур, а також покращує їхню якість. Крім того, екзогенний Si знижує захворюваність рослин грибовими та бактеріальними патогенами [4].

Мікроміцети *Penicillium roseopurpureum* є природними антагоністами багатьох видів фітопатогенних грибів та бактерій, оскільки продукують потужний мікотоксин — кулвуларин.

Метою наших досліджень було оцінити вплив обробки насіння тест-рослин капусти культуральною рідиною мікроміцетів *P. roseopurpureum*, внесення в ґрунт подрібненого до наночастинок природного кремнієвісного мінералу анальцим та сумісного застосування цих обох чинників на стійкість проростків до інокуляції фітопатогенними штамми мікроміцетів роду *Fusarium*, а також мікробоценоз, біохімічні та алелопатичні властивості ґрунту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були природний кремнієвісний мінерал анальцим, подрібнений до наночастинок розміром 100 мкм, культуральна рідина мікроміцетів *P. roseopurpureum*, надана Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова. За модельні рослини було взято капусту (*Brassica oleracea* L.) сорту Білосніжка. Інфекційний фон створювали за допомогою фітопатогенних видів роду *Fusarium* (суміш *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*).

Насіння капусти замочували в культуральній рідині (1:50) упродовж 24 год.,

контроль — стерилізована водопровідна вода. Природний кремнієвісний мінерал анальцим, подрібнений до наночастинок, вносили в ґрунт у дозі 1:1000 відповідно до маси перед посівом насіння тест-рослин. Після замочування насіння висівали у вегетаційні посудини з просіяним через 2 мм сито та стерилізованим сірим опідзоленим ґрунтом. Рослини культивували впродовж шести тижнів при температурі 28°C, розсіяному сонячному освітленні, відносній вологості повітря 60–75%. Вологість ґрунту підтримували на рівні 60% від повної вологості впродовж тривалості дослідження. На стадії появи двох справжніх листочків тест-рослини поливали сумішшю культуральних екстрактів грибів роду *Fusarium* (15 мл на посудину). Повторний інфекційний фон створювали через п'ять діб.

Стійкість проростків капусти до фузаріозу визначали за видимими симптомами ураження (поява фузаріозної перетяжки на кореневій шийці), морфометричними (висота, площа листків, маса надземних частин та коренів) та фізіолого-біохімічними показниками життєвого стану (вміст основних фотосинтетичних пігментів, захисних речовин (флавоноїдів), активність каталази) рослин через два тижні після повторного зараження. Фотосинтетичні пігменти екстрагували з сирих листків диметилсульфоксидом. Кількісний вміст визначали спектрофотометрично відповідним методом [5]. Активність каталази — методом О.Н. Баха та О.І. Опаріна [6] за кількістю перекису водню, що розклався під дією ферменту. Флавоноїди екстрагували 70%-м етанолом, кількісний вміст визначали спектрофотометрично на приладі Spekol 11 (Carlzeiss/Jena, Germany) за якісної реакції з хлоридом алюмінію [7]. Алелопатичну активність ґрунту вивчали методами прямого біотестування [8] і біологічних проб (водна витяжка з ґрунту 1,5:1) [9]. Цитостатичну дію гідрофільних речовин ґрунту досліджували з використанням проростків *Cucumis sativus* L. сорту Далекосхідний як тест-об'єкта [10]. Визначали вміст фенольних речовин та окисно-відновний потенціал (ОВП) ґрунту [9].

Наприкінці досліду було проведено мікро-біологічний посів, визначено чисельність мікроміцетів у ґрунті.

Повторність дослідів – чотириразова, повторення – триразове.

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали методами описової статистики та однофакторного дисперсійного аналізу за допомогою програм Statistica 10.0 та Microsoft Office Excel 2007. У таблицях наведено групові середньозважені дані. Достовірність впливу чинників оцінювали за рівнем значущості (P) та критерієм Фішера (F).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення аделопатичної активності методом прямого біотестування свідчить про наявність фітотоксичних речовин у ґрунті за участю мікроміцетів роду *Fusarium*, що проявлялося у пригніченні ростових процесів *Lepidium sativum* L. на 42% (за внесення анальциму) та на 73% (ґрунт без домішок) щодо контролю (ґрунт без фітопатогенів) – (табл. 1). Встановлено різке зменшення фітотоксичності ґрунту після обробки насіння капusti культуральною рідиною *P. roseo-purpureum* як окремо, так і спільно з анальцимом.

За результатами аналізу аделопатичної активності гідрофільних речовин ґрунту з фітопатогенами виявлено фітотоксичність на рівні 65% порівняно з контролем щодо

Cucumis sativus L. Внесення анальциму в ґрунт сприяло зниженню цього показника на 30%. Найефективнішим було використання анальциму разом з культуральною рідиною *P. roseo-purpureum*, що стимулювало ріст біотесту, а також застосування лише останньої.

Зафіксовано цитостатичний ефект гідрофільних речовин ґрунту за наявності фітопатогенних мікроміцетів, що нівелювався за передпосівної обробки насіння вищезгаданою культуральною рідиною. Спостерігалось також посилення проліферації бічних коренів за спільної дії останньої з анальцимом.

Біохімічний стан ґрунту оцінювали за значеннями окисно-відновного потенціалу (ОВП). Зниження ОВП порівняно з контролем (ґрунт без фітопатогенів) відбувалося більшою мірою (в 1,9 раза) для ґрунту за дії метаболітів мікроміцетів роду *Fusarium* без додавання анальциму та без попередньої обробки насіння культуральною рідиною, що свідчить про акумуляцію рухливих органічних сполук, які можуть спричиняти аделопатичний вплив. Слід відзначити інтенсивно відновні особливості процесу, що вважається несприятливим як для перебігу процесів гуміфікації, так і підтримання поживного режиму ґрунту для рослин. Застосування культуральної рідини *P. roseo-purpureum* як окремо, так і спільно з анальцимом покращувало цей по-

Таблиця 1

Аделопатична активність ґрунту та цитостатична дія його гідрофільних речовин за наявності фітопатогенів роду *Fusarium*, % до контролю (ґрунт без фітопатогенів)

Варіант	Аделопатична активність		Цитостатична дія гідрофільних речовин ґрунту (кількість бічних коренів <i>Cucumis sativus</i> L.)
	метод прямого біотестування (приріст коренів <i>Lepidium sativum</i> L.)	гідрофільні речовини ґрунту (приріст коренів <i>Cucumis sativus</i> L.)	
ґрунт без домішок	27,2±0,8	35,0±1,0	30,0±0,9
<i>P. roseo-purpureum</i>	93,0±2,8	103,0±3,2	102,0±3,1
Анальцим	58,2±1,7	65,0±1,9	45,0±1,3
<i>P. roseo-purpureum</i> + анальцим	106,3±3,2	115,1±3,4	110,0±3,3

казник, унаслідок чого окисно-відновний процес можна було охарактеризувати як помірно відновний.

Оскільки мікроміцети здатні синтезувати фітотоксини, у т.ч. й фенольної природи, досліджували вміст фенольних речовин у ґрунті. Кількість фенольних сполук у ґрунті без домішок за наявності фітопатогенів роду *Fusarium* перевищувала контроль (ґрунт без фітопатогенів) у 1,4 раза. Додавання в ґрунт анальциму та обробка насіння культуральною рідиною дещо знижувало їхню акумуляцію (відповідно у 1,1 та 1,2 раза). За спільної дії культуральної рідини та анальциму концентрація фенольних речовин стабілізувалася і була на рівні контролю.

Виявлено також, що обробка насіння рослин капусти впродовж 24 год. культуральною рідиною гриба *P. roseopurpureum* у концентрації 1:50 інгібує розвиток мікроміцетів роду *Fusarium* у ґрунті у 1,5 раза (табл. 2). Синергічна дія культуральної рідини *P. roseopurpureum* та анальциму підсилює гальмівний ефект щодо фузаріуму і становить 20%.

Покращення аеллопатичного та біохімічного стану ґрунту за застосування культуральної рідини *P. roseopurpureum* та анальциму, за наявності мікроміцетів роду *Fusarium*, позначилися на фізіологічних процесах рослин капусти.

Наприкінці досліду проростки капусти, інोकюльовані сумішшю фітопатогенних

грибів роду *Fusarium*, мали видимі симптоми ураження фузаріозом (фузаріозні перетяжки на кореневих шийках). Показники росту та життєвого стану (площа листків, маса надземних частин та коренів, вміст хлорофілів *a* та *b*) характеризувалися як достовірно пригнічені порівняно з неінोकюльованими рослинами (табл. 3). Фізіолого-біохімічні показники стресового стану (вміст флавоноїдів та активність каталази) зростали.

Обробка насіння культуральною рідиною *P. roseopurpureum* та внесення наноматеріалу анальциму у ґрунт сприяли зростанню стійкості проростків капусти до ураження фітопатогенами: їхня кількість з фузаріозною перетяжкою знижувалася, показники росту (висота, площа поверхні листків, маса надземних частин та коренів) і вміст фотосинтетичних пігментів підвищувалися. Також дещо збільшувався загальний вміст флавоноїдів та активність каталази.

Флавоноїди відіграють важливу роль у стійкості рослин проти патогенних бактерій і грибів: беруть участь у формуванні реакції гіперчутливості (найперший захисний механізм заражених рослин), можуть безпосередньо інгібувати ферментні системи, розвиток спор і міцелію, пошкоджувати мембрани патогену. Вважається, що захисна дія флавоноїдів є більшою мірою неспецифічною і зумовленою їхніми антиоксидантними властивостями. Тому зростання вмісту вторинних метаболітів у тканинах проростків капусти може бути одним із механізмів захисної дії досліджених речовин.

Активація каталази як захисний прояв на стреси — це ключовий процес формування і спрямованості захисних реакцій у рослинних клітинах. Отже, стимулювання активності каталази може бути також одним з механізмів захисної дії досліджених речовин.

Ефект від обробки насіння культуральною рідиною був значно більшим, ніж від внесення анальциму в ґрунт. За сумісного застосування культуральної рідини *P. roseopurpureum* та наномате-

Таблиця 2

Чисельність мікроміцетів у ґрунті під капустою

Варіанти досліджу	Тис. КУО в 1 г абс.сух. ґрунту
Контроль	38,7±3,5
Обробка насіння <i>P. roseopurpureum</i>	25,2±4,7
Внесення анальциму	79,3±13,9
Обробка насіння <i>P. roseopurpureum</i> + внесення анальциму	30,9±1,1

ріалу анальциму спостерігалось потенціювання (посилення ефекту) порівняно із дією порізного застосування речовин. Так, у рослин, оброблених культуральною рідиною, які вирощували у ґрунті з анальцимом, не виявлено видимих симптомів ураження фузаріозом (фузаріозної перетяжки), а показники росту (висота, площа листків, маса надземних частин та коренів) навіть перевищували відповідні їх значення у рослин, не інокульованих фітопатогенами (на контролі, без обробок).

За відсутності інокуляції фітопатогенами застосування анальциму та культуральної рідини стимулювало ріст надземних частин (площу поверхні листків) та коренів, біосинтез фотосинтетичних пігментів (хлорофілів *a*, *b* та каротиноїдів), а також флавоноїдів у листках проростків капусти. Натомість, активність каталази дещо знижувалася. Це свідчить про загальну дію, що стимулює імунітет та ріст рослин, культурної рідини *P. roseoriprigitum* наноматеріалу анальциму.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження підтвердили високу антифунгальну дію культуральної рідини *P. roseoriprigitum* на прикладі фітопатогенних грибів роду *Fusarium* та імуностимулюючі властивості наноматеріалу анальциму. Встановлено ефект потенціювання за сумісного застосування анальциму та культуральної рідини *P. roseoriprigitum* для захисту рослин від ураження фузаріозом. До того ж досліджені речовини стимулюють накопичення флавоноїдів та активність каталази в листках проростків, що частково обумовлює захисну дію цих речовин.

Таблиця 3

Вплив *Penicillium roseoriprigitum* та анальциму на стійкість рослин капусти до фузаріозу

Варіанти	Висота надз. частини рослини, мм	Площа листків, см ²	% рослин з фузаріозною перетяжкою	Маса сухої речовини, мг		Вміст фотосинтетичних пігментів, мг/г сирої речовини			Вміст флавоноїдів, % на 1 г сирої речовини	Активність каталази, мкмоль Н ₂ O ₂ за хв на 1 г сирої речовини
				надз. част.	корені	хлорофіл <i>a</i>	хлорофіл <i>b</i>	каротиноїди		
<i>Інокуляція фітопатогенами</i>										
Контроль	70,4	5,7	39%	27,4	3,3	1,8	0,7	0,4	0,84%	8,3
<i>P. roseoriprigitum</i>	73,3	9,1	12%	42,6	6,6	2,1	0,8	0,4	0,99%	10
Анальцим	72,5	10,5	22%	32,5	6,6	2,6	0,9	0,4	0,92%	10,8
<i>P. roseoriprigitum</i> + анальцим	75,0	8,2	0%	49,7	5,7	2,9	1,0	0,5	1,08%	11,67
<i>Без інокуляції</i>										
Контроль	72,5	6,8	0%	37,4	4,4	2,4	0,9	0,4	0,78%	6,7
<i>P. roseoriprigitum</i>	72,9	9,7	0%	27,6	4,9	2,7	0,9	0,5	0,97%	6,6
Анальцим	72,5	9,5	0%	28,9	4,6	2,8	0,9	0,5	0,99%	6,67
<i>P. roseoriprigitum</i> + анальцим	72,9	10,3	0%	26,9	5,1	3,1	1,2	0,5	1,02%	6,17
НІР	0,6	0,4	0,9%	1,1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,04%	0,5

ЛІТЕРАТУРА

1. Ретман С. Якісне протруєння насіння — основа захисту озимої пшениці / С. Ретман, Т. Кислих // Агробізнес Сьогодні. — № 22 (269) листопад 2013. — С. 28–30.
2. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology / R. Dean, J.A.L. Van Kan, Z.A. Pretorius et al. // *Molecular Plant Pathology*. — 2012. — Vol. 13, no. 4. — P. 414–430.
3. Epstein E. Silicon in plants: facts vs. concepts / L.E. Datnoff, G.H. Snyder and G.H. Korndooer, Eds. // *Silicon in Agriculture*. — Elsevier, Amsterdam the Netherlands, 2001. — P. 1–16.
4. Use of silicon for integrated disease management: Reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance / L.E. Datnoff, K.W. Seebold, Correa-Victoria et al. eds. // *Silicon in Agriculture*. — Elsevier Science, Amsterdam the Netherlands, 2001. — P. 171–184.
5. Hiscox J.D. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration / J.D. Hiscox, C.F. Israelstam // *Can. J. Bot.* — 1979. — Vol. 57. — P. 1332–1334.
6. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. — 3-е изд. доп. и перераб. / Б.П. Плешков. — М.: Агропромиздат, 1985. — 255 с.
7. Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья: Методические указания к лабораторным занятиям / под ред. М.Н. Комарова и др. — СПб.: СПХФА, 1998. — С. 30–35.
8. Прямые методы биотестирования почвы и метаболитов микроорганизмов / А.М. Гродзинский, Е.Ю. Кострома, Т.С. Шроль, И.Г. Хохлова // *Аллелопатия и продуктивность растений: Сб. науч. тр.* — К.: Наук. думка, 1990. — С. 121–124.
9. *Гродзинский А.М.* Руководство по применению биохимических методов в аллелопатических исследованиях почв / А.М. Гродзинский, С.А. Горобец, Л.И. Крупа. — К., 1988. — 18 с.
10. Ivanov V.B. Using the roots as test objects for the assessment of biological action of chemical substances / V.B. Ivanov // *Rus. J. Plant Physiol.* — 2011. — Vol. 58, no. 6. — P. 1082–1089.

REFERENCES

1. Retman S., Kyslykh T. (2013). *Yakisne protruennia nasinnia — osnova zakhystu ozymoi pshenytsi* [Quality seed dressing — the basis of protecting winter wheat]. *Ahrobiznes Sohodni* [Agribusiness Today]. No. 22 (269), p. 28–30 (in Ukrainian).
2. Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Spanu A.P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. Vol. 13, no. 4, p. 414–430 (in English).
3. Epstein E., Datnoff L.E., Snyder G.H., Korndooer G.H. (2001). Silicon in plants: facts vs. concepts. *Silicon in Agriculture*. Elsevier, Amsterdam the Netherlands, p. 1–16 (in Netherlands).
4. Datnoff L.E., Seebold K.W., Correa-Victoria (2001). Use of silicon for integrated disease management: Reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. *Silicon in Agriculture*. Elsevier Science, Amsterdam the Netherlands, p.171–184 (in Netherlands).
5. Hiscox J.D., Israelstam C.F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* Vol. 57, p. 1332–1334 (in English).
6. Pleshkov B.P. (1985). *Praktikum po biokhymii rasteniy. 3-e izd. dop. i pererab.* [Workshop on Plant Biochemistry]. Moscow: Agropromizdat, 255 p. (in Russian).
7. Komarova M.N., Nikolaeva L.A. (1998). *Fitokhimiicheskiy analiz lekarstvennogo rastitelnogo syr'ya. Metodicheskie ukazaniya k laboratornym zanyatiyam* [Phytochemical analysis of medicinal plants. Methodical instructions to laboratory work]. Sankt-Peterburg: SPKhFA. p. 30–35 (in Russian).
8. Grodzinskiy A.M., Kostroma Ye.Yu., Shrol T.S., Khokhlova I.G. (1990). *Pryamye metody biotestirovaniya pochvy i metabolitov mikroorganizmov* [Direct methods of bioassay of soil microorganisms and metabolites]. *Allelopatiya i produktivnost rasteniy*: Sb. nauch. tr. Kiev: Nauk. dumka, p. 121–124 (in Russian).
9. Grodzinskiy A.M., Gorobets S.A., Krupa L.I. (1988). *Rukovodstvo po primeneniyu biokhimiicheskikh metodov v allelopaticheskikh issledovaniyakh pochv* [Guidance on the application of biochemical methods in allelopathic soil research]. Kiev, 18 p. (in Russian).
10. Ivanov V.B. (2011). Using the roots as test objects for the assessment of biological action of chemical substances. *Rus. J. Plant Physiol*, vol. 58, No. 6, p. 1082–1089 (in English).