

На правах рукописи



Исламова Надежда Александровна

**ПРЕДЕЛЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ *FUSARIUM EQUISETI* И
CYLINDROCARPON MAGNUSIANUM И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ИНОКУЛЯЦИИ РАСТЕНИЙ ПРИ СОЗДАНИИ УСТОЙЧИВЫХ
ИСКУССТВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ**

1.5.15 – Экология (биологические науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владимир – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Удмуртский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Бухарина Ирина Леонидовна

Официальные оппоненты: **Зайцев Глеб Анатольевич**
доктор биологических наук, профессор, Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лесоведения

Соляникова Инна Петровна
доктор биологических наук, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», директор Регионального микробиологического центра

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2022г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета 24.2.281.02 при ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых» по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького, 87, ВлГУ, корп.1, ауд. 335.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВлГУ и на сайте <http://diss.vlsu.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, можно присылать по адресу: 600000, г.Владимир, ул. Горького, 87, ВлГУ, кафедра биологии и экологии.

Автореферат разослан «__» _____ 2022г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Кулагина Екатерина Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Жизнедеятельность растений связана с микроорганизмами, в том числе симбиотическими микроскопическими грибами, обитающими в корнях растений (Железняков и др., 2020; Yan и др., 2019). Грибы влияют на способность растений более эффективно усваивать из почвы минеральные элементы, поддерживать жизнеспособность в условиях повышенных или низких температур, засоленности почв, а также проявлять устойчивость к патогенным организмам (Rosier и др., 2016; Kumar, Dwivedi, 2019). Установлено, что в результате взаимодействия с корневыми микромицетами растения могут проявлять более широкие пределы устойчивости к внешним факторам, в том числе антропогенным (Титов, 2009; Ali и др., 2019). В тоже время весьма актуально изучение влияния выделенных штаммов и изолятов грибов на стрессоустойчивость растений, изучение инокуляции растений грибами как фактора адаптации к условиям среды. Однако наиболее изученные в этой области арбускулярно-микоризные грибы, формирующие эндомикоризу, имеют ряд особенностей, затрудняющих возможность их культивирования при разработке технологии микоризации в силу их облигатного симбиотрофизма. В этой связи перспективно изучение отдельных представителей группы корневых эндофитных микромицетов, в том числе культивируемых вне корневой системы растений (Murphy и др., 2014). Они имеют широкий ареал распространения, морфологически разнообразны и способны противостоять стрессам окружающей среды. Культуры (изоляты) этих грибов, выделенные из загрязненных почв и корней растений, произрастающих в условиях длительного загрязнения, могут иметь широкие пределы толерантности к действию загрязняющих веществ, в том числе тяжелых металлов (Kumar, Dwivedi, 2019), что требует дополнительного изучения. Также весьма актуально изучение влияния грибов на стрессоустойчивость растений, инокуляции растений грибами как фактора адаптации к условиям среды.

Степень разработанности темы исследования. Изучение влияния абиотических и антропогенных факторов на процессы жизнедеятельности организма – одна из задач факториальной экологии. Ряд научных работ посвящен изучению влияния абиотических факторов на жизнедеятельность растений (Костин, Ерофеева, 2010; Pareek, 2010). Автор опирался на труды отечественных (Селиванов И.А., 1981; Бухарина И.Л., 2009; Штарк О.Ю., Лабутова Н.М., 2014; Васильева Е.Н. и др., 2019 и др.) и зарубежных ученых, исследующих теоретические и практические вопросы влияния эндофитных грибов на жизнедеятельность и устойчивость растений (Andrade-Linares D.R. и др., 2012; Domka A.M. и др., 2019; Bilal S. и др., 2020 и др.), отмечая недостаточность изученности данного вопроса.

Представители группы корневых эндофитных микромицетов – *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* – являются космополитами, в том числе встречаются на техногенных территориях (Halleen и др., 2004; Macia-Vicente, 2009), и обладают партнерскими связями в формировании адаптивных реакций растений к стрессовым факторам (Rydlova, Vosatka, 2003; Domka и др., 2019; Hou, 2020), что весьма актуально при разработке научных основ создания искусственных экосистем.

Цель работы: установить пределы толерантности *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum*, обосновать возможность использования их взаимодействия с растениями в формировании адаптивных реакций в условиях загрязнения почв.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- 1) изучить пределы толерантности микроскопических грибов, относящихся к родам *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Arthopyrenia* и *Leptosphaeria*, к действию хлорида натрия в лабораторных условиях;
- 2) изучить пределы толерантности *F. equiseti* и *C. magnusianum* к действию тяжелых металлов в лабораторных условиях;
- 3) изучить влияние инокуляции растений культурами и адаптированными популяциями *F. equiseti* и *C. magnusianum* на их устойчивость к действию тяжелых металлов на примере анализа содержания фотосинтетических пигментов и биохимических показателей растений;
- 4) оценить степень развития грибной инфекции в корневой системе инокулированных растений;
- 5) обосновать возможность использования инокуляции растений *F. equiseti* и *C. magnusianum* для создания устойчивых экосистем.

Научная новизна исследования.

Впервые проведено исследование пределов толерантности микромицетов, относящихся к родам *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Arthopyrenia* и *Leptosphaeria*, к действию хлорида натрия. Впервые исследовано влияние разных концентраций цинка, меди, хрома и свинца на рост колоний и содержание малонового диальдегида в мицелии *F. equiseti* и *C. magnusianum*. На примере тест-культуры томата показано влияние инокуляции культурами и специально подготовленными адаптированными популяциями *F. equiseti* и *C. magnusianum* на устойчивость растений к содержанию тяжелых металлов в субстрате.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты исследования дополняют имеющиеся и дают новые теоретические представления о металлорезистентности и солеустойчивости микромицетов, о роли консортивных связей высших растений и корневых микромицетов в формировании выносливости растений, служат научной основой применения инокуляции для

повышения устойчивости растений при создании искусственных экосистем. Разработана технология приготовления суспензии *F. equiseti* и *C. magnusianum* и инокуляции растений (патент на изобретение № 2722206 от 28.05.2020 «Способ приготовления и внесения грибного биопрепарата для повышения устойчивости растений», авторы Бухарина И.Л., Исламова Н.А).

Материалы диссертационной работы используются в образовательном процессе Удмуртского государственного университета при проведении учебных занятий по дисциплинам «Экология», «Основы биотехнологий в природообустройстве».

Методы исследования. Основой диссертационной работы послужили результаты лабораторных экспериментов, проведенных автором в период 2015-2021 гг. в учебно-научной лаборатории «Экологические биотехнологии» ФГБОУ ВО «УдГУ». В ходе выполнения исследований использованы общепринятые методы: культивирование микроорганизмов, молекулярно-генетический анализ, световая микроскопия, спектрофотометрия, морфометрия, биохимический анализ растений, математический статистический анализ.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждена четкой постановкой цели и задач, тщательным планированием экспериментов, использованием адекватных цели и задачам методов, корректным применением статистических методов обработки экспериментального материала.

Положения, выносимые на защиту:

1. Корневые микромицеты *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* проявляют широкие пределы толерантности к действию солей хлорида натрия и тяжелых металлов.

2. Инокуляция растений культурами и особенно адаптированными к действию негативного фактора популяциями *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* влияет на ряд адаптивных реакций растений в условиях загрязнения почв тяжелыми металлами.

3. Технология инокуляции растений с использованием разработанного способа приготовления и внесения грибной суспензии обеспечивает высокие показатели развития полезной грибной инфекции в корневой системе растений.

4. Обоснована возможность применения инокуляции растений культурами и адаптированными к действию негативного фактора популяциями *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* при создании устойчивых искусственных экосистем.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в постановке цели и задач диссертационного исследования, выборе методик исследований, отборе образцов и проведении анализов растений, обобщении полученных

результатов, формулировке основных научных положений, выносимых на защиту, в анализе результатов и формулировке выводов. Часть научных публикаций выполнена в соавторстве, доля участия автора диссертации в них составляет до 80%.

Апробация работы. Основные результаты исследований изложены на международных и всероссийских научно-практических конференциях с международным участием: III Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2018); IV Международная научная конференция «Экология и география растений и растительных сообществ (Екатеринбург, 2018); IX Съезд Общества физиологов растений России и Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019), VI и VII Всероссийские конференции с международным участием «ЭкоБиоТех» (Уфа, 2019, 2021) и др. Исследования были поддержаны грантами РФФИ «Мой первый грант» № 16-34-00855 (2016-2018), «Аспиранты» № 19-316-90003 (2019-2022), .

Публикации. По теме диссертации опубликовано 23 работы, в том числе 13 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (из них 1 статья в журнале, переводная версия которого индексируется Web of Science; 5 статей в журналах, индексируемых Scopus).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 166 страницах, состоит из Введения, 5 глав, Заключения, Списка литературы, включающего 158 источников, из них 85 – на иностранном языке, и Приложения, изложенного на 21 странице. Работа содержит 32 рисунка и 67 таблиц, из них 36 – в приложении.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Роль консортивных взаимодействий между высшими растениями и корневыми микробиотами в адаптации к условиям среды

Рассмотрены особенности адаптивных реакций растений в условиях среды (Бухарина, 2009; Кабашникова, 2014; Пахомова, 2018 и др.), отмечена актуальность изучения межорганизменных процессов адаптации (Васильева, 2019; Bilal et al., 2019; Yan et al., 2019 и др.). Представлены: основные виды взаимодействий между грибами и высшими растениями (Селиванов, 1981; Картыжова, 2017; Franken, George, 2007; Smith, Read, 2008; Yan et al., 2019 и др.); классификация эндофитных грибов (Rodriguez et al., 2008; Afra et al., 2016); роль корневых эндофитов в жизнедеятельности растений, включая устойчивость к загрязнению почв (Литовка, 2018; Nyakumachi, 2011; Domka et al., 2019; Sharma et al., 2019; Hou, 2020 и др.).

Глава 2. Объекты и методы исследований

Программа исследований включала: 1. Изучение пределов толерантности эндофитных грибов к разным концентрациям хлорида натрия и тяжелых металлов (ТМ); 2. Изучение влияния инокуляции растений культурой гриба и адаптированными популяциями *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* на устойчивость растений к NaCl и ТМ. Объекты исследования и схема лабораторных экспериментов отражены в табл. 1.

Таблица 1 – Схема лабораторных экспериментов

№ эксп.	Объект	Схема эксперимента	Лабораторные анализы
1-2	- <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> , - <i>Arthopyreniaceae sp.</i> , - <i>Leptosphaeria sp.</i> , - <i>Fusarium oxysporum</i> , - <i>Fusarium equiseti</i>	Фактор – содержание NaCl (№1) и ТМ (№ 2) в субстрате (пересчет на содержание химического элемента в мг/л или мг/кг субстрата)	- диаметр колоний гриба - скорость роста колоний гриба Применимо к эксперименту № 8
3-5	- тест-культура (томат) (Andrade-Linares, 2012) - <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> - <i>Fusarium equiseti</i>	- фактор А – культура /популяция гриба - фактор В – содержание NaCl (№3-4) и цинка (№5) в субстрате	- биомасса надземной части и корней (весовой метод) - сухое вещество (ГОСТ 31640-2012) - фотосинтетические пигменты (Гавриленко, Жигалова, 2003; Булда и др., 2008)
6-7	- тест-культура - <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> (№ 6) - <i>Fusarium equiseti</i> (№ 7)	- фактор А – культура /популяция гриба - фактор В – содержание ТМ в субстрате	- аскорбиновая кислота (титриметрический метод) (ГОСТ 24556-89) - нитраты (Аринушкина, 1961) - степень развития грибной инфекции в корнях (Штарк, Лабутова, 2014) Применимо к эксперименту № 9
8	- <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> , - <i>Fusarium equiseti</i>	Фактор – содержание ТМ в субстрате	- малоновый диальдегид (МДА) (Жильцова, 2011)
9	- тест-культура - <i>Fusarium equiseti</i>	- фактор А – культура /популяция гриба - фактор В – содержание ТМ в субстрате	- МДА в листьях (Жильцова, 2011) - тяжелые металлы в субстрате и растениях (АО Агротехцентр «Удмуртский», № RA.RU.21ПА13).

Глава 3. Пределы толерантности микроскопических грибов к засолению

Исследование пределов толерантности микроскопических грибов к действию хлорида натрия показало достоверное уменьшение размеров колоний у всех пяти изучаемых культур грибов, за исключением вариантов: *C. magnusianum* (0.5

моль/л); *F. equiseti* (0.5 и 1.0 моль/л). Для *F. oxysporum* концентрация соли 1,5 моль/л оказалась летальной. NaCl в концентрациях 0.5 и 1 моль/л стимулировал рост *F. equiseti*.

Далее изучение особенностей металлорезистентности проведено на культурах *F. equiseti* и *C. magnusianum*, отличившихся устойчивостью к действию хлорида натрия. Моделировались разные концентрации цинка и меди (биогенные элементы), хрома и свинца (не биогенные элементы) в субстрате. Результаты представлены на рис. 1.

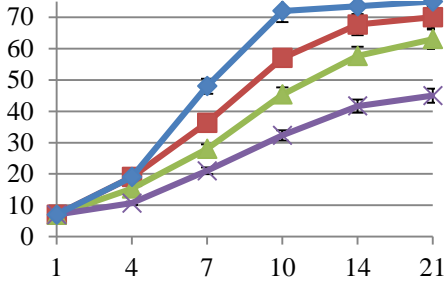
Цинк и медь вызвали ингибирование роста *C. magnusianum*, причем цинк был более агрессивным. Но даже при их высокой концентрации в субстрате ростовые процессы у колоний грибов не прекращались, рост достоверно возрастал со второй недели эксперимента. Хром и свинец оказались менее токсичными. Размеры колоний гриба при всех моделируемых концентрациях хрома достоверно не отличались от контроля, а в варианте Pb 25 мг/л диаметр колоний гриба был существенно больше, чем в контроле.

В эксперименте с *F. equiseti* результаты аналогичны, однако имели особенности: при росте концентрации цинка в субстрате диаметр колоний гриба достоверно уменьшался; Cu 150 мг/л оказалась токсичной; Pb 25 мг/л не оказал достоверного влияния на рост; Cr 2.5, Cr 5 и Cr 10 мг/л вызвали уменьшение диаметра колоний гриба (без достоверной разницы между вариантами).

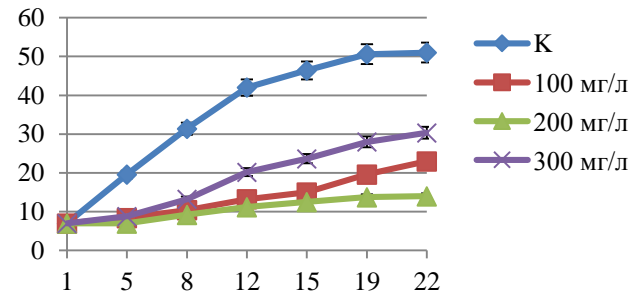
Таким образом, *C. magnusianum* и *F. equiseti* устойчивы к действию хлорида натрия и тяжелым металлам (наиболее – к не биогенным химическим элементам).

Глава 4. Прием инокуляции и формирование адаптивных реакций у растений

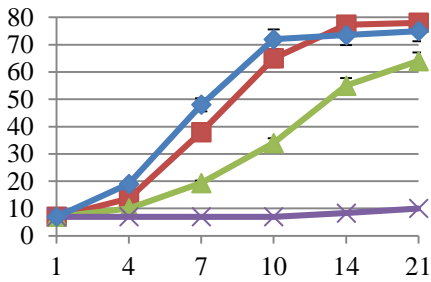
Изучение роли инокуляции растений в формировании устойчивости проводили с использованием культур *C. magnusianum* и *F. equiseti*, а также популяций этих грибов, выращенных на субстратах с внесением хлорида натрия и ТМ в разных концентрациях (далее «адаптированные популяции грибов»). Для сравнения использовали варианты АК (абсолютный контроль) – тест-растение + контрольный субстрат (без внесения NaCl и ТМ), К (контроль) – инокулированное культурой гриба тест-растение + контрольный субстрат.



Fusarium equiseti

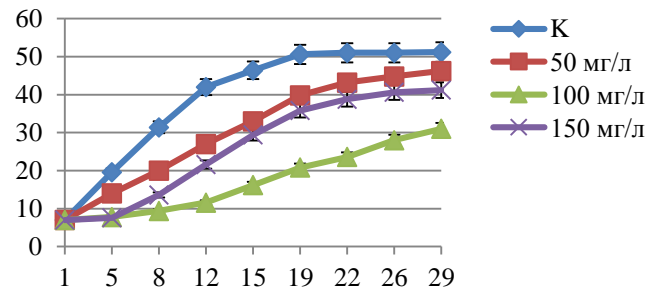


Cy lindrocarpon magnusianum

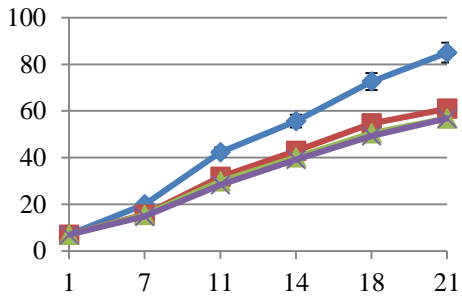


Fusarium equiseti

Цинк

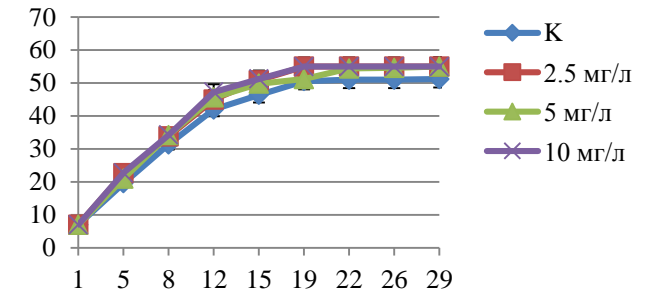


Cy lindrocarpon magnusianum

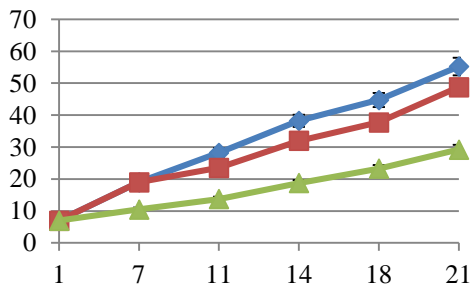


Fusarium equiseti

Медь

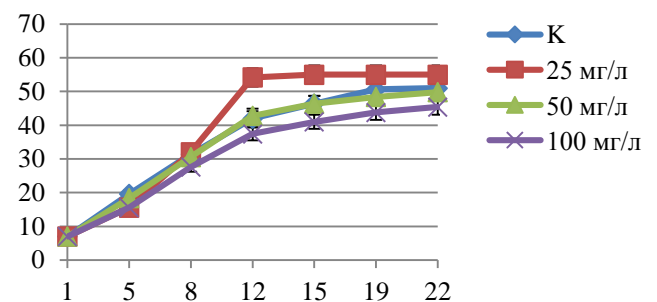


Cy lindrocarpon magnusianum



Fusarium equiseti

Хром



Cy lindrocarpon magnusianum

Свинец

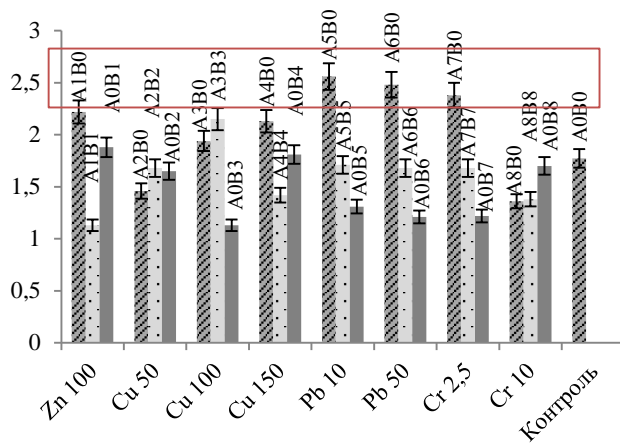
Рисунок 1 – Динамика размеров колоний *Fusarium equiseti* и *Cy lindrocarpon magnusianum* на субстратах с разными концентрациями тяжелых металлов. Ось X – дни эксперимента, ось Y – диаметр колоний мицелиальных грибов, мм.

Влияние инокуляции микромицетами *F. equiseti* и *C. magnusianum* на устойчивость растений к действию хлорида натрия не получило подтверждения. Выжили лишь отдельные особи растений, причем интенсивность развития грибной инфекции в корнях инокулированных растений соответствовала 1 классу, встречаемость – более 80 %.

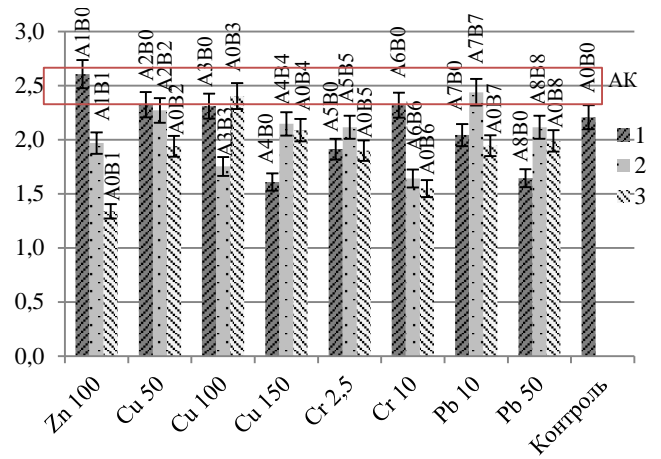
В следующем разделе главы представлены результаты влияния инокуляции на устойчивость растений к действию тяжелых металлов. Во-первых, оценивали влияние инокуляции культурой и адаптированными популяциями грибов (при выращивании растений на контрольном субстрате). Установлено, что инокуляция культурой и адаптированными популяциями *C. magnusianum* привела к уменьшению биомассы надземной части, увеличению биомассы корней, к снижению содержания нитратов и фотосинтетических пигментов в листьях (рис. 2), росту соотношения $хл.a+хл.b/каротиноиды$.

Во-вторых, при внесении в субстрат цинка и меди у растений наблюдалось достоверное уменьшение биомассы надземной части, рост биомассы корней (кроме вариантов Cu_{50}/Cu_{50} и Cu_{100}/Cu_{100}), снижение содержания нитратов и показателей общей суммы хлорофиллов и каротиноидов, отношения $хл.a/хл.b$. Однако, при инокуляции адаптированными популяциями, в условиях Cu 100 мг/кг в субстрате отмечен наибольший положительный эффект: достоверное снижение содержания нитратов, рост содержания хлорофилла *a* и каротиноидов в листьях растений, рост биомассы надземной части.

Внесение в субстрат свинца (10 и 50 мг/кг) оказало сходное влияние на показатели растений: снижение содержания сухого вещества в надземной части и хлорофилла *a* в листьях растений (инокулят – культура *C. magnusianum*); уменьшение биомассы корней, содержания аскорбиновой кислоты, рост концентрации хлорофилла *a* в листьях (инокулят – адаптированные популяции гриба), что связано с адаптивными реакциями растений. При внесении в субстрат хрома (2,5 мг/кг) у растений наблюдалось: достоверное снижение биомассы корней и содержания фотосинтетических пигментов (инокулят – культура гриба); существенное уменьшение биомассы корней, увеличение биомассы надземной части (на 1,50...2,02 г) и содержания хлорофилла *a* (на 0,084... 0,462 мг/г) в листьях (инокулят – адаптированные популяции гриба). Внесение хрома в концентрации 10 мг/кг также вызвало уменьшение биомассы надземной части и содержания нитратов в листьях у растений, инокулированных культурой гриба, а при инокуляции адаптированной популяцией гриба – и снижение биомассы корней, при этом соотношение $хл.a+хл.b/каротиноиды$ в обоих случаях было выше, чем в абсолютном контроле.

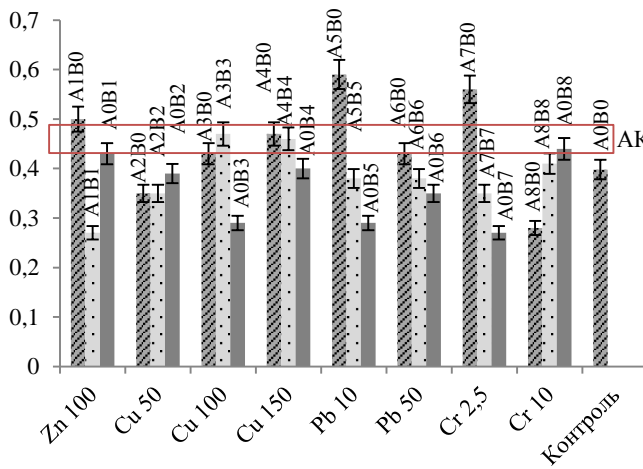


Cylindrocarpon magnusianum

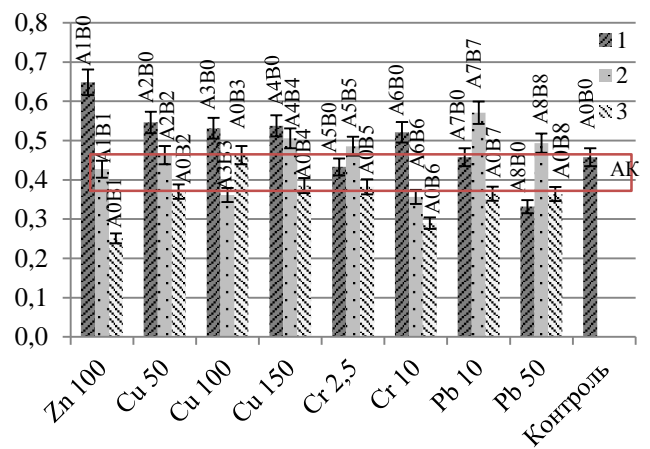


Fusarium equiseti

Хлорофилл а

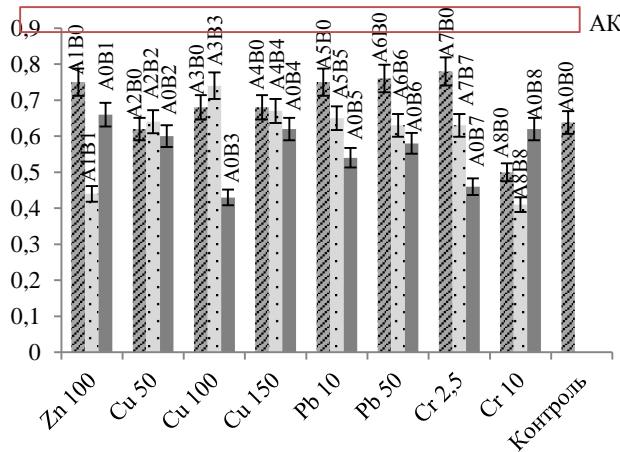


Cylindrocarpon magnusianum

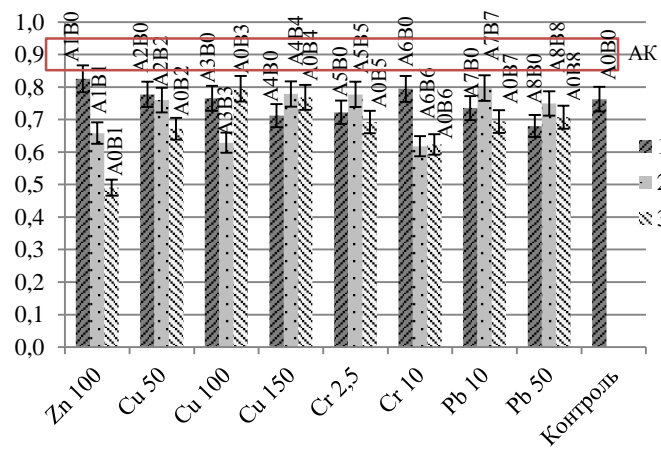


Fusarium equiseti

Хлорофилл b



Cylindrocarpon magnusianum



Fusarium equiseti

Каротиноиды

Рисунок 2 – Содержание фотосинтетических пигментов в листьях тест-культуры. Примечания: 1, 2 – популяция гриба (A1 – Zn₁₀₀, A2 – Cu₅₀, A3 – Cu₁₀₀, A4 – Cu₁₅₀, A5 – Pb₁₀, A6 – Pb₅₀, A7 – Cr_{2,5}, A8 – Cr₁₀) + контрольный субстрат (B0) или с тяжелыми металлами, мг/кг (B1 – Zn₁₀₀, B2 – Cu₅₀, B3 – Cu₁₀₀, B4 – Cu₁₅₀, B5 – Pb₁₀, B6 – Pb₅₀, B7 – Cr_{2,5}, B8 – Cr₁₀); 3 – культура гриба (A0) +

субстрат с тяжелыми металлами В1 –В8, мг/кг; А0В0 – культура гриба + субстрат без тяжелых металлов; АК – абсолютный контроль (прямоугольник – доверительный интервал средних значений показателя для АК)

Частота встречаемости грибной инфекции в корнях растений, инокулированных *C. magnusianum*, была выше 60 %, а интенсивность – 2,0-5,0 %.

В эксперименте с *F. equiseti* инокуляция растений культурой и адаптированными популяциями гриба при их выращивании на контрольном субстрате аналогично *C. magnusianum* не оказала существенного положительного эффекта. Однако инокуляция растений адаптированными популяциями гриба во многих вариантах (кроме популяций Pb₅₀, Cu₁₀₀) способствовала достоверному росту содержания фотосинтетических пигментов и биомассы надземной части растений, соотношения хл.а+хл.б/каротиноиды. Частота встречаемости грибной инфекции в корнях растений была более 70-80 % (максимальная – в вариантах с инокуляцией культурой гриба и содержанием в субстрате Zn100, Cu150, Pb50, Cr2.5 мг/кг, а также в варианте Pb₅₀/Pb₅₀), интенсивность – от 3 до 10%.

Таким образом, при воздействии на растения тяжелых металлов наибольший положительный эффект (увеличение содержания хлорофилла *a*, распределение пластического вещества между надземной частью и корневой системой) оказала инокуляция растений адаптированными популяциями гриба.

Глава 5. Исследование механизмов металлорезистентности микроскопических грибов и инокулированных ими растений

Для оценки механизмов формирования металлорезистентности *F. equiseti* и *C. magnusianum* и инокулированных растений использовали показатель содержания малонового диальдегида (МДА). МДА является продуктом окисления липидов и служит показателем степени повреждения мембранных структур в клетках организма.

5.1. Динамика роста колоний *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* и содержание малонового диальдегида в мицелии при культивировании на субстратах с внесением меди и хрома. Установлено, что моделируемые концентрации хрома в субстрате не оказали достоверного влияния на размеры колоний *C. magnusianum*. Содержание в субстрате Cu 50 и 100 мг/л стимулировали рост колоний *F. equiseti* по сравнению с контролем. При этом происходило существенное увеличение содержания МДА в мицелии: *C. magnusianum* в 1,8-2,6 раз при воздействии хрома; *F. equiseti* – в 2,6-4,7 раз при воздействии меди.

5.2. Эколого-биохимические особенности инокулированных растений при их выращивании на субстратах с внесением меди и хрома. Дополнительно к ранее анализируемым показателям растений оценено содержание МДА в листьях, как показателя устойчивости, а также распределение тяжелых металлов в системе субстрат–растение на примере инокуляции *F. equiseti* (таб. 2, 3).

Таблица 2 – Биологические показатели тест-культуры в условиях эксперимента с *Fusarium equiseti*

Культура или популяция гриба / содержание тяжелых металлов в субстрате	Показатели				
	биомасса, г		содержание сухого вещества, %		содержание нитратов, мг/100г
	надземная часть	корни	надземная часть	корни	
Без гриба / Контроль ¹	47,07±1,67 ² 44,41...49,74	1,46±0,10 1,31...1,62	10,55±0,97 9,01...12,08	51,73±6,10 42,03...61,43	7135±930 6205...8065
Без гриба/ Cr _{2,5}	50,75±4,16 44,13...57,37	1,77±0,43 1,07...2,46	9,26±0,34 8,72...9,80	19,26±1,44 16,97...21,56	6359±829 5530...7188
Cr _{2,5} / Cr _{2,5}	45,37±0,91 43,93...46,81	2,39±0,14 2,17...2,60	10,13±0,66 9,08...11,19	11,88±0,38 11,28...12,49	6073±792 5281...6865
Без гриба/ Cr ₅	51,18±2,21 47,66...54,70	2,11±0,17 1,84...2,38	8,87±1,01 7,27...10,48	11,71±0,56 10,82...12,61	6659±868 5791...7527
Cr ₅ / Cr ₅	36,30±3,40 30,88...41,71	1,63±0,16 1,37...1,89	9,04±0,37 8,45...9,63	15,98±2,72 11,65...20,31	7823±920 6903...8843
Без гриба/ Cr ₁₀	22,31±2,67 18,05...26,56	0,83±0,20 0,51...1,16	9,34±0,72 8,20...10,48	25,11±4,31 18,25...31,97	Р.М. ³
Cr ₁₀ / Cr ₁₀	46,18±1,22 44,24...48,12	2,56±0,11 2,39...2,74	8,11±0,28 7,66...8,56	10,11±0,66 9,06...11,15	5606±595 5011...6201
Без гриба/ Cu ₅₀	18,06±4,63 10,68...25,43	1,09±0,20 0,77...1,41	7,71±0,61 6,73...8,68	20,83±2,19 17,35...24,31	Р.М.
Cu ₅₀ / Cu ₅₀	45,46±5,10 37,34...53,59	2,55±0,25 2,15...2,95	8,63±0,55 7,75...9,51	14,54±3,23 9,40...19,68	5227±682 4545...5909
Без гриба/ Cu ₁₀₀	16,76±0,16 16,51...17,01	1,95±0,50 1,16...2,75	10,13±0,05 10,06...10,21	14,06±2,17 10,60...17,52	Р.М.
Cu ₁₀₀ / Cu ₁₀₀	39,23±1,49 36,87...41,60	1,26±0,16 1,00...1,52	8,83±0,56 7,93...9,73	22,28±2,11 18,92...25,64	6891±898 6023...7789
Без гриба/ Cu ₁₅₀	30,13±1,39 27,93...32,34	0,98±0,03 0,93...1,03	10,33±0,55 9,46...11,20	13,28±0,98 11,73...14,83	Р.М.
Cu ₁₅₀ / Cu ₁₅₀	46,42±2,29 42,78...50,06	2,15±0,02 2,12...2,19	9,28±0,50 8,49...10,07	7,81±0,41 7,16...8,46	5833±334 5099...6167

¹ Абсолютный контроль – не инокулированное растение, выращенное на субстрате без внесения ТМ; ² Среднее значение показателя ± стандартное отклонение, доверительный интервал для среднего значения; ³ Р.М. – растения имели минимальные размеры, анализ не проводился.

Таблица 3 – Содержание тяжелых металлов в субстрате и растениях, малонового диальдегида в листьях в условиях эксперимента с *Fusarium equiseti*

Варианты опыта: культура или популяция гриба / содержание тяжелого металла в субстрате	Внесено изначально в субстрат, мг/кг	Массовая доля металла по завершении эксперимента, мг/кг		Содержание МДА в листьях, мкмоль/г
		в субстрате	в растениях	
хром				
Без гриба / Контроль ¹	0	0,21 ± 0,01 ² 0,20...0,22	0,14 ± 0,02 0,12...0,16	1,007 ± 0,036 0,645...1,369
Без гриба / Cr _{2,5}	2,5	2,67 ± 0,28 2,39...2,95	0,46 ± 0,02 0,44...0,48	1,630 ± 0,008 1,617...1,643
Cr _{2,5} / Cr _{2,5}	2,5	2,56 ± 0,38 2,18...2,94	0,28 ± 0,01 0,27...0,29	0,848 ± 0,031 0,798...0,897
Без гриба / Cr ₅	5	5,62 ± 0,38 5,24...6,0	0,56 ± 0,03 0,53...0,59	2,170 ± 0,071 2,057...2,283
Cr ₅ / Cr ₅	5	5,11 ± 0,41 4,70...5,52	0,35 ± 0,02 0,33...0,37	1,498 ± 0,045 1,426...1,569
Без гриба / Cr ₁₀	10	9,71 ± 0,59 9,12...10,30	0,53 ± 0,03 0,50...0,56	2,198 ± 0,054 2,111...2,284
Cr ₁₀ / Cr ₁₀	10	9,11 ± 0,46 8,65...9,57	0,37 ± 0,02 0,35...0,39	2,443 ± 0,056 2,354...2,531
медь				
Без гриба / Cu ₅₀	50	50,1 ± 3,51 46,60...53,61	14,72 ± 0,74 13,98...15,46	3,190 ± 0,071 3,077...3,303
Cu ₅₀ / Cu ₅₀	50	40,88 ± 2,04 38,84...42,92	5,64 ± 0,28 5,36...5,92	0,613 ± 0,031 0,563...0,662
Без гриба / Cu ₁₀₀	100	100,4 ± 6,02 94,38...106,42	6,56 ± 0,33 6,23...6,89	1,570 ± 0,065 1,467...1,673
Cu ₁₀₀ / Cu ₁₀₀	100	51,58 ± 2,58 49,00...54,16	6,96 ± 0,35 6,61...7,31	1,860 ± 0,029 1,813...1,907
Без гриба / Cu ₁₅₀	150	148,6 ± 8,93 139,67...157,53	11,46 ± 0,57 10,89...12,03	3,120 ± 0,559 2,231...4,009
Cu ₁₅₀ / Cu ₁₅₀	150	134,22 ± 9,21 131,01...137,43	9,41 ± 0,47 8,94...9,88	1,590 ± 0,028 1,545...1,635

При внесении хрома в субстрат у инокулированных растений не изменялась биомасса надземной части и содержание сухого вещества в корневой системе, в отличие от не инокулированных растений, у которых показатели биомассы снижались. При внесении меди также у инокулированных растений не нарушались продукционные процессы. Инокуляция адаптированными популяциями привела к снижению содержания нитратов в листьях (Cr₁₀/Cr₁₀ и Cu₅₀/Cu₅₀).

При воздействии ТМ у не инокулированных растений происходит достоверное снижение фотосинтетических пигментов по сравнению с контролем (кроме вариантов Cu₁₀₀/Cu₁₀₀ и Cu₁₅₀/Cu₁₅₀). Однако в вариантах с хромом инокуляция *F. equiseti* способствовала сохранению содержания пигментов в пределах значений контроля. Воздействие меди (100 и 150 мг/кг) оказалось более

сильным и вызвало достоверное снижение концентрации хлорофилла *b* и каротиноидов в листьях, несмотря на инокуляцию растений адаптированными популяциями гриба. Инокуляция растений культурой и адаптированными популяциями *F. equiseti* вызвала рост показателя отношения суммы хлорофиллов к содержанию каротиноидов.

Частота встречаемости грибной инфекции в корнях инокулированных растений во всех вариантах составила более 60 %, интенсивность – 3,0-5,0 %.

Инокуляция растений адаптированными популяциями грибов повлияла на устойчивость растений к окислительному стрессу при воздействии хрома и меди. У не инокулированных растений наблюдается более существенное увеличение МДА в листьях (в 2-5 раза), по сравнению с инокулированными.

Анализ распределения тяжелых металлов в системе субстрат-растение по завершении эксперимента (табл. 3) показал, что у инокулированных растений содержание хрома в биомассе во всех вариантах опыта достоверно ниже, чем у не инокулированных растений. Аналогично и содержание меди (за исключением Cu_{100}/Cu_{100}). Таким образом, инокуляция растений способствовала снижению накопления тяжелых металлов в биомассе растений.

Таким образом, инокуляция растений микромицетами *F. equiseti* и *C. magnusianum* влияет на физиолого-биохимические показатели растений, в том числе, отражающие адаптивные процессы растений к действию стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований показан положительный эффект инокуляции растений микромицетами *C. magnusianum* и *F. equiseti* (увеличение биомассы, фотосинтетических пигментов, устойчивость к повреждению мембранных структур в результате окисления липидов, снижение накопления тяжелых металлов в надземной части растений). Наиболее эффективна инокуляция адаптированными популяциями грибов. Полученный экспериментальный материал позволяет обосновать возможность использования инокуляции растений как приема повышения их устойчивости при создании урбано- и агроэкосистем.

ВЫВОДЫ

1. Впервые протестированы пять видов микромицетов на толерантность к действию хлорида натрия: *Arthopyreniaceae sp.*, *Leptosphaeria sp.* и *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum*. Внесение хлорида натрия в субстрат вызвало ингибирование роста *Arthopyreniaceae sp.*, *Leptosphaeria sp.* и *Fusarium oxysporum*. Наблюдалось достоверное уменьшение диаметра (на 22...47, 25...70 и 6...74 мм соответственно) и снижение скорости роста колоний этих грибов (на 1.2...2.6, 1.3...2.8 и 0.7...3.6 мм/сут. соответственно). Виды рода *Fusarium* с более интенсивным ростом менее устойчивы к действию хлорида

натрия. Концентрация NaCl 1.5 моль/л для *F. oxysporum*, с максимальной скоростью ростовых процессов, является летальной.

Cylindrocarpon magnusianum и *Fusarium equiseti* устойчивы к действию хлорида натрия. Концентрации NaCl 0.5 и 1 моль/л стимулировали рост колоний *Fusarium equiseti*, достоверное увеличение диаметра колоний составило 33 и 42 мм соответственно.

2. Впервые проведены лабораторные исследования пределов толерантности двух видов микромицетов *Cylindrocarpon magnusianum* и *Fusarium equiseti* к воздействию меди, цинка, свинца и хрома. Установлено, что культуры *F. equiseti* и *C. magnusianum* обладают в целом высокой металлорезистентностью, при этом большую устойчивость они проявили к хрому и свинцу, чем к биогенным элементам (цинку и меди). Для *F. equiseti* концентрация меди 150 мг/л оказалась токсичной. Внесение в ростовую среду хрома не оказывало существенного влияния на диаметр и рост колоний *F. equiseti* и *C. magnusianum*. Свинец в концентрации 25 мг/л вызвал достоверное увеличение диаметра колоний *C. magnusianum* по сравнению с контролем (на 5 мм) и не влиял во всем диапазоне проверенных концентраций на размеры колоний *F. equiseti*.

3. Исследована динамика образования малонового диальдегида в мицелии грибов под действием тяжелых металлов. Внесение хрома в субстрат вызвало существенное увеличение содержания малонового диальдегида в мицелии *C. magnusianum* на 1.847...5.242 мкмоль/1 г сырой массы, аналогично, внесение меди привело к увеличению содержания малонового диальдегида на 5.078...6.786 мкмоль/1 г сырой массы по сравнению с контролем в мицелии *F. equiseti*. Это свидетельствует о том, что *F. equiseti* и *C. magnusianum* обладают видоспецифичностью по отношению к тяжелым металлам: *C. magnusianum* более устойчив к действию высоких концентраций меди, *F. equiseti* – хрома.

4. Проведено исследование влияния инокуляции растений культурами *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* на устойчивость растений к засолению и тяжелым металлам. Инокуляция культурами и адаптированными к NaCl популяциями существенно не повлияла на формирование адаптивных реакций у растений к засолению.

Инокуляция растений культурой *C. magnusianum* и его адаптированными популяциями, при выращивании на субстратах без внесения металлов проявилась в увеличении биомассы корней, росте содержания нитратов в листьях. При внесении тяжелых металлов в субстрат положительный эффект наблюдался лишь при инокуляции растений популяциями грибов, адаптированными к действию стрессора (на субстратах с внесением Cu 100, Cu 150, Pb 50, Cr 2.5 мг/кг). В целом наименьший положительный эффект имела инокуляция растений при их культивировании на субстратах с внесением биогенных элементов (Zn 100 мг/кг и

Cu 50 мг/кг), наибольший – на субстратах с внесением не биогенных элементов (Pb 50 мг/кг и Cr 2.5 мг/кг).

Положительный эффект в экспериментах с *F. equiseti* также наблюдался при использовании в качестве инокулята популяций гриба, адаптированных к разным концентрациям тяжелых металлов: рост биомассы надземной части (на 6.10, 3.62, 6.82, 10.49 г) и содержания фотосинтетических пигментов в листьях (на 0.177, 0.552, 0.104, 0.123 мг/г) инокулированных растений по сравнению с контролем (на субстратах с внесением Cu 150, Pb 10, Pb 50, Cr 2.5 мг/кг соответственно). Наибольший положительный эффект инокуляции отмечен также на субстратах с не биогенными элементами (Pb 10 мг/кг и Cr 2.5 и 10 мг/кг).

Таким образом, наибольший эффект формирования адаптивных реакций у растений наблюдался при их инокуляции адаптированными популяциями грибов и культивировании в условиях действия стрессора, причем при действии не биогенных химических элементов.

У растений, инокулированных адаптированными к влиянию тяжелых металлов популяциями *Fusarium equiseti*, отмечено достоверное снижение содержания хрома и меди в надземной части по сравнению с растениями без инокуляции (в 1.6, 1.6, 1.4 и 2.6, 1.2 раза на субстратах Cr 2.5, 5, 10 и Cu 50, 150 мг/кг соответственно). В вариантах с Cr 5, 10 и Cu 100, 150 мг/кг наблюдался рост содержания малонового диальдегида в растениях по сравнению с контролем.

5. Средняя частота встречаемости грибной инфекции в корнях растений, инокулированных *Cylindrocarpon magnusianum*, составила более 60 %, инокулированных *Fusarium equiseti* – более 70 %. Наибольшая интенсивность развития грибной инфекции в вариантах с *C. magnusianum* составляла около 5%, в вариантах с *F. equiseti* – 10 %. Высокая степень развития грибной инфекции наблюдалась как у растений, инокулированных культурами грибов, так и у растений, инокулированных их адаптированными популяциями.

6. Полученные результаты подтверждают влияние приема инокуляции микромицетами *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* на ряд биохимических показателей растений, отражающих процесс формирования адаптивных реакций к действию стрессовых факторов (концентрации тяжелых металлов в субстрате) и положительный эффект снижения содержания тяжелых металлов в субстрате (меди) и в биомассе (меди и хрома), что востребовано при создании искусственных насаждений (экосистем), устойчивых к засолению, в том числе, солями наиболее токсичных химических элементов (хром, свинец).

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных перечнем ВАК

1. Исламова Н.А., Бухарина И.Л., Камашева А.А., Латыпова Р.Г. и др. Исследование пределов устойчивости микроскопических грибов и формирование коллекции перспективных изолятов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3.
2. Лямзин В.И., Бухарина И.Л., Здобяхина О.В., Исламова Н.А. и др. Исследование эффективности совместного применения биопрепарата нефтедеструктора и эндотрофных грибов на этапе биологического восстановления нефтезагрязненных земель // Астраханский вестник экологического образования. – 2018. – № 3 (45). – С. 94-98.
3. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Жавад А.Ф., Абдуллах М.Р. и др. Особенности формирования металлрезистентности при инокуляции томата микромицетом *Cylindrocarpon magnusianum* // Естественные и технические науки. – 2019. – № 10 (136). – С. 105-112.
4. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Жавад А.Ф., Абдуллах М.Р. и др. Влияние инокулята *Cylindrocarpon magnusianum* на формирование адаптивных реакций растений к стрессовым факторам // Аграрная Россия. – 2019. – № 12. – С. 26-32.
5. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Жавад А.Ф., Абдуллах М.Р. и др. Особенности формирования металлрезистентности при инокуляции томата микромицетом *Cylindrocarpon magnusianum* // АгроЭкоИнфо. – 2019, №3. (электронный журнал).
6. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Лебедева М.А. Влияние инокуляции корневой системы эндофитом *Cylindrocarpon magnusianum* на показатели растений при воздействии солей тяжелых металлов // Российская сельскохозяйственная наука. – № 6. – 2020. – С. 24-29.
7. Bukharina I., Islamova N., Lebedeva M. Effect of Inoculating the Root System of Plants with Endophyte *Cylindrocarpon magnusianum* on Plant Performance When Exposed to Heavy Metal Salts // Russian Agricultural Sciences. – Vol. 47, No. 1. – 2021. – P. 42–47.

Патент:

Бухарина И.Л., Исламова Н.А. Патент на изобретение 2722206 С1, 28.05.2020. «Способ приготовления и внесения грибного биопрепарата для повышения устойчивости растений».

Публикации, включённые в международные базы цитирования:

8. Bukharina I., Franken P., Kamasheva A., Vedernikov K. and Islamova N. About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment // International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – Vol.7 (4). – 2016. – P. 1386-1394.

9. Bukharina I.L., Islamova N.A., Lebedeva M.A. Species of fungi in the root system of woody plants in urban plantations // The Fourth International Scientific Conference Ecology and Geography of Plants and Plant Communities. Сер. "KnE Life Sciences" – 2018. – P. 49-55.

10. Konôpková A., Petek A., Kmet' J., Islamova N. et al. Húdoková Impact of the european bark beetle ips typographus on biochemical and growth properties of wood and needles in siberian spruce *Picea obovata* // Central European Forestry Journal. – 2020. – Т. 66. – № 4. – С. 243-254.

11. Islamova N., Bukharina I., Isupova A. Study of the limits of resistance of endophytic fungi *Fusarium equiseti* and *Cylindrocarpon magnusianum* to the action of copper and chromium (VI) // E3S Web of Conferences. – Vol. 296. – 2021.

12. Bukharina I., Islamova N. The effect of inoculation of the root system with *Cylindrocarpon magnusianum* on plant performance exposed to heavy metal salts // Revista Brasileira de Ciências Agrárias. – Vol. 16, № 1. – 2021.

13. Bukharina I., Islamova N. The Possibility of Using Endophytic Micromycetes for Increasing Plant Metal Resistance / I. Bukharina, N. Islamova // KnE Life Sciences. – Vol. 7(1). – 2022. – P.216–227.

Основные публикации в сборниках материалов конференций:

14. Бухарина И.Л., Исламова Н.А. Исследование пределов устойчивости микроскопических грибов и формирование коллекции перспективных изолятов // Годичное собрание ОФР. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. 21-24.06.16, С.-Петербург: Изд-во С-ПГУ, 2016. – С. 362-363.

15. Бухарина И. Л., Исламова Н. А. Исследование металлрезистентности изолятов микроскопических грибов // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол.уч., 18-24.09.17, Судак. – М: АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. – С. 121.

16. Бухарина И.Л., Исламова Н.А. Изучение металлрезистентности изолятов микроскопических грибов // Проблемы популяционной биологии: материалы XII Всероссийского популяционного семинара памяти Н.В. Глотова – Йошкар-Ола, 11-14.04.17. – Йошкар-Ола: ООО ИПФ «СТРИНГ». – 2017. – 284 с.

17. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Аль-Зеяди А.А.Ф. Влияние инокуляции томата эндофитом *Cylindrocarpon magnusianum* на устойчивость к действию солей тяжелых металлов // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Сборник матер. Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской науч. конференции с международным участием и школы молодых ученых, Иркутск, 10–15.06.18. – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2018. – Часть I. – С. 163-166.

18. Бухарина И.Л., Исламова Н.А. Исследование пределов выносливости эндотрофных симбиотических грибов для технологии управления устойчивостью растений // Экология и география растений и растительных сообществ: мат. IV Международной науч. конференции (Екатеринбург, 16–19.04.18). – Екатеринбург: Изд-во Урал.ун-та, 2018. – С. 125-128.

19. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Фархан Жавад А., Лебедева М.А. Влияние инокуляции томата эндофитом *Cylindrocarpon magnusianum* на устойчивость к действию солей тяжелых металлов // в сборнике: «ЭкоБиоТех 2019»: мат. VI Всероссийской конференции с международным участием. – Уфа, 2019. – С. 50-54.

20. Бухарина И.Л., Исламова Н.А. Влияние инокуляции растений эндофитом *Cylindrocarpon magnusianum* на устойчивость к действию солей тяжелых металлов // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего». Тезисы докладов, Казань. – 2019. – С. 89.

21. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Исупова А.А., Лямзин В.И. Перспективы использования корневых микромицетов в управлении устойчивостью растений // Тезисы докладов II научно-практической конференции ученых России и Хорватии в Дубровнике. – Москва, 2020. – С. 50-51.

22. Bukharina I.L., Islamova N.A. Metal resistance and tolerance to temperature stress of plants inoculated with endophyte *Cylindrocarpon magnusianum* wollenw // Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality. – 2020. – С. 44-58.

23. Исламова Н.А., Бухарина И.Л. Исследование выносливости *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* к действию хрома и меди // в сборнике: «ЭкоБиоТех 2021», мат. VII всероссийской конференции с международным участием. – Уфа, 2021. – С. 139-144.