

ВЛИЯНИЕ ГРИБОВ РОДА *COLLETOTRICHUM* НА РОСТ И РАЗВИТИЕ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*CALENDULA OFFICINALIS*) *

Кутузова Ирина Алексеевна¹, Хуснетдинова Тамара Ивановна²,
Еланский Сергей Николаевич³, Чепурных Андрей Дмитриевич⁴

Московский государственный ун-т имени М.В. Ломоносова
119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Российский государственный ун-т народного хозяйства имени В.И. Вернадского
143907, Московская область, г. Балашиха, шоссе Энтузиастов, д. 50

¹ – к. б. н., м. н. с. каф. общего земледелия и агроэкологии МГУ имени М.В. Ломоносова;
e-mail: the_dark_horse@mail.ru

² – к. б. н., с. н. с. каф. общего земледелия и агроэкологии МГУ имени М.В. Ломоносова

³ – д. б. н., в. н. с. каф. микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова

⁴ – магистрант РГУНХ имени В.И.Вернадского; e-mail: tam.kashira@gmail.com

Грибы *Colletotrichum coccodes* и *C. nigrum* – опасные патогены картофеля и томата. В работе в лабораторных условиях была проведена оценка роста *Calendula officinalis* в двух типах стерильного субстрата – бедном (песок) и богатом питательными веществами (грунт «Агробалт садовый») – инокулированном пропагулами этих грибов. В контроле использовали неинокулированный субстрат. В обоих инокулированных субстратах отмечено поражение корней календулы *C. coccodes* и *C. nigrum* и образование на них типичных для этих видов грибов микросклероциев. Симптомов поражения надземной части растений (листьев и стеблей) не выявлено. Рост календулы при выращивании в стерильном грунте угнетался обоими видами грибов. На рост растений в песке присутствие пропаг *C. coccodes* и *C. nigrum* не влияло. Прорастание семян в присутствии инокулюма тестируемых грибов как в песке, так и в грунте происходило быстрее. Такая закономерность свидетельствует о стимулирующем эффекте вторичных метаболитов грибов на первых этапах роста и развития растений, причем этот эффект был сильнее выражен на песке. Поражаемость календулы *C. coccodes* и *C. nigrum* показывает, что она может служить резерватом инфекции этих грибов, в связи с чем ее не следует использовать в качестве сидеральной или промежуточной культуры в картофельных и томатных севооборотах при развитии антракноза или черной пятнистости клубней на поле.

Ключевые слова: *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum nigrum*, фитопатогенные грибы, болезни растений, *Calendula officinalis*, субстрат, сидеральная культура.

Calendula officinalis (календула, ноготки, pot marigold) – перспективное лекарственное и декоративное растение, которое можно выращивать во всех природно-климатических зонах России [1–3]. В сельскохозяйственной практике *C. officinalis* используется в севооборотах для борьбы с нематодой [4]. На приусадебных участках ее нередко выращивают как сидеральную культуру после картофеля и томата, а иногда и вместе с ними в междурядьях.

Род *Colletotrichum* Corda (Sordariomycetes, Glomerellales, Glomerellaceae) включает в себя широко распространенные виды, способные как к паразитическому, так и к сапротрофному образу жизни. К роду *Colletotrichum* относятся виды *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes и *C.*

nigrum (Ellis & Halst.), вызывающие поражение картофеля и томата [5, 6]. *C. coccodes* способен повреждать не только клубни картофеля, но и другие части растения-хозяина – корни, столоны, стебли, листья и плоды [7, 8]. Также он известен и как патоген других пасленовых культур, в частности перца и баклажана [9]. Борьба с *C. coccodes* затруднительна, так как поскольку он способен сохраняться в виде склероциев и мицелия в почве и на растительных остатках [10], а также в хранилище на семенных клубнях в течение длительного периода времени.

Из литературы известны антибактериальные и антимикотические свойства экстрактов календулы, которые используются как в медицине, так и для защиты растений [11–14]. Мы предположили, что антимикотическое действие вторичных метаболитов календулы может быть эффективным

* Исследование выполнено в рамках тем НИР 121041300098-7 и 121042600177-3 (номера ЦИТИС).

1. Характеристика использованных в работе штаммов грибов

Штамм	Вид	Место выделения, растение-хозяин	Депонированные в Genbank NCBI сиквенсы специфичных последовательностей ДНК
C18U(G)PT4	<i>C. coccodes</i>	Приморский край, клубень картофеля (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	OP718500 ITS* OP743753 gaphd OP743815 act OP743882 gs
C17K(K)TF5-2	<i>C. nigrum</i>	Краснодарский край, плод томата (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	OP718492 ITS OP743745 gaphd OP743808 act OP743875 gs

* ITS – регион ДНК ITS1-5,8S-ITS2, gaphd – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, act – актин, gs – глутамин-синтетаза.

в борьбе с почвообитающими фитопатогенными грибами, в том числе с *C. coccodes* и *C. nigrum*.

Для оценки перспектив использования календулы в борьбе с патогенами картофеля и томата рода *Colletotrichum* прежде всего необходимо оценить ее поражаемость этими грибами. Из литературных источников известно, что *C. officinalis* поражается возбудителем мучнистой росы *Podosphaera xanthii* [15], ботритиоза *Botrytis cinerea* [16], антракноза *Colletotrichum carthami* (= *Gloeosporium carthami*) [17, 18], альтернариоза *Alternaria* sp. [19]. Сведений о заболеваниях календулы лекарственной, вызванных грибами *C. coccodes* и *C. nigrum*, нам найти не удалось.

В данной работе была поставлена задача оценить поражаемость растений календулы фитопатогенными для картофеля и томата штаммами *C. coccodes* и *C. nigrum* в лабораторных условиях.

Методика. Эксперименты проводили в лаборатории кафедры земледелия и агроэкологии факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова при искусственном освещении на растениях календулы лекарственной *C. officinalis*, сорт Кальта [20]. В качестве субстрата использовали коммерческие упаковки грунта «Агробалт садовый» (ГК «Агробалт-трейд», Россия) и песка (смесь фракций 0,1–0,4 мм и 0,5–1,0 мм в равных долях,

ГК «Галеон», Россия). Песок и грунт стерилизовали автоклавированием (две стерилизации по 30 мин при 1 атм. с промежутком между стерилизациями 1 сут.).

Штаммы *C. coccodes* C18U(G)PT4 и *C. nigrum* C17K(K)TF5-2 были взяты из коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ (табл. 1). Дополнительная информация об этих штаммах приведена в статье Ярмеевой с соавторами [5].

Культуры грибов выращивали в стерильных условиях в чашках Петри на твердой питательной среде сусло-агар в течение 14 суток при температуре 24°C. Содержимое чашки гомогенизировали в миксере, полученную смесь склероциев и спор гриба вместе с агаризованной средой вносили в подготовленный субстрат и тщательно перемешивали. В качестве контроля использовали субстрат с таким же количеством чистой агаризованной среды без гриба. Подготовленным субстратом двух типов (грунт и песок) заполняли пластиковые вазоны размером 13×9×8,5 см, в каждый из которых высевали по 18 семян календулы. Опыт проводили в 3 повторностях (всего 18 вазонов, по 9 для каждого типа субстрата) (рис. 1).

Растения выращивали в климатической камере при уровне освещенности 8000 люкс, фотопе-



Рис. 1. Растения календулы на 15-е сутки эксперимента: слева – в песке, справа – в грунте. 54 посаженных семени (3 повторности по 18 семян) для каждого варианта опыта.

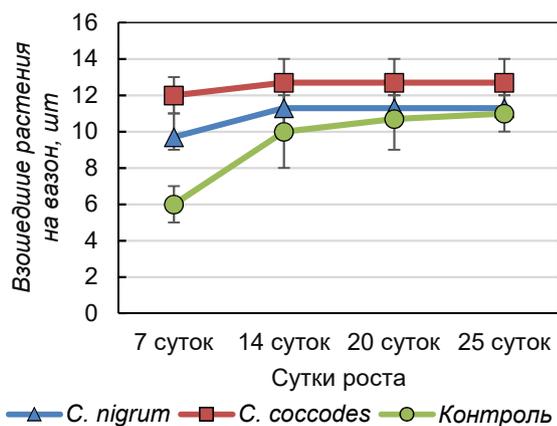


Рис. 2. Всхожесть растений календулы в грунте. Планки погрешностей показывают диапазон между максимальным и минимальным значением показателя из трех повторностей.

риодизме 16:8 (день:ночь), температуре воздуха 24°C и влажности 60 %. Продолжительность эксперимента составила 25 суток до появления 4-го листа растения. Показатели всхожести и высоты растений отмечали на 7-е; 14-е; 20-е и 25-е сутки. Анализ корней и надземной части растений на пораженность *C. coccodes* и *C. nigrum* проводили на 25-е сутки роста. Корни растений тщательно отмывали от остатков субстрата и просматривали с использованием светового бинокулярного микроскопа Leica DM500 при увеличении 10× – 40×. Съемку проводили с использованием прилагающихся к микроскопу камеры (Leica ICC50) и программного обеспечения.

Учет биомассы проводили на 25-е сутки. У извлеченных из субстрата растений тщательно отмывали корни, после чего все растение просматривали на присутствие очагов болезни (язвы, пятна, гнили, склероции и др.). После просмотра

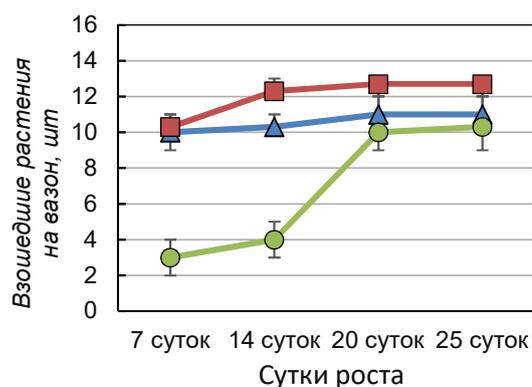


Рис. 3. Всхожесть растений календулы в песке. Условные обозначения см. рис.2.

на пораженность растения высушивали в сушильном шкафу в течение 5 ч при 80°C.

Результаты и обсуждение. Динамика роста растений в разных вариантах эксперимента имела существенные отличия (рис. 2, 3). В грунте на 7-е сутки выращивания в варианте с инокуляцией *C. coccodes* взошли в среднем на вазон 12 семян из 18 посаженных (67%), с инокуляцией *C. nigrum* – 54%, в контроле без гриба – 33%. На песке прослеживалась та же тенденция – в обоих вариантах с инокуляцией грибами взошли 56% семян, в контроле – 15%.

Через 14 суток выращивания в варианте с грунтом всхожесть достигла максимума (57% в контроле, 63% в варианте с инокуляцией *C. nigrum*, 70% в варианте с *C. coccodes*) и практически не изменялась в последующие 11 суток роста. В варианте с песком в емкостях, инокулированных *C. nigrum* и *C. coccodes*, на 14-е сутки роста всхожесть составила 57% и 69% соответственно и не изменялась в последующие 11 суток роста. В контроле всходы появлялись существенно позже и на 14-е сутки было зафиксировано всего 22% взошед-

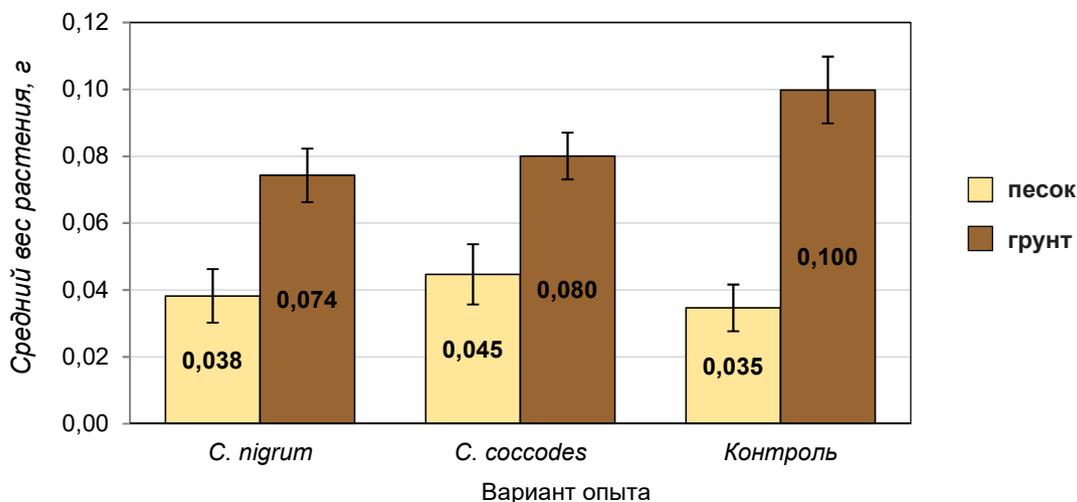


Рис. 4. Сухая биомасса календулы в разных условиях выращивания, 25-е сутки роста. Планки погрешностей – ошибка среднего при доверительной вероятности 0,95.

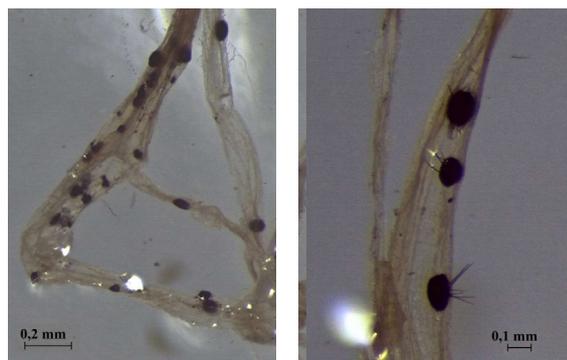


Рис. 5. Склероции гриба *C. coccodes* на поражённых корнях растений календулы. Просмотр и съемку проводили с использованием светового бинокулярного микроскопа Leica DM500, камера Leica ICC50, увеличение 10× – 40×.

ших семян; на 20-е сутки проросли 55% семян, на 25-е сутки – 57%.

Такая закономерность свидетельствует о стимулирующем эффекте вторичных метаболитов грибов на первых этапах роста и развития растений, причем этот эффект был сильнее выражен на песке (как обедненном питательными веществами субстрате). Из литературы известно, что *Colletotrichum gloeosporioides* способен производить растительный гормон ауксин (индол-3-уксусная кислота), стимулирующий рост растений, *in planta* во время биотрофной и некротрофной фаз инфекции [21]. Штамм *C. fructicola*, выделенный из растений кофе, был способен производить ауксин *in vitro* при росте на жидкой питательной среде [22].

По мере роста растений в грунте отмечалось угнетение роста растений и уменьшение итоговой воздушно-сухой биомассы на зараженных вариантах по сравнению с контролем. При анализе растений, выращенных в песке, такой закономерности не было выявлено. При этом анализ показал, что во всех вариантах средний вес растений календулы, выращенных в грунте, был достоверно выше, чем у выращенных в песке (рис. 3).

Микроскопирование растений календулы показало, что корни части растений (около 20%), выращенных как в песке, так и в почве, были поражены грибами *C. coccodes* и *C. nigrum* (рис. 5). На них были обнаружены многочисленные микросклероции темного цвета, размером 150–230 мкм, как правило, несущие на своей поверхности щетинки [23, 24]. Так как по морфологии *C. coccodes* и *C. nigrum* не различаются [5], из обнаруженных склероциев были выделены чистые культуры, для которых была проведена амплификация с видоспецифичными праймерами с последующим секвенированием. Полученные последовательности были идентичны последовательностям тех изо-

лятов грибов, которые были внесены в вазоны. На контрольных растениях признаков поражения отмечено не было. Поражений надземной части (листьев и стеблей) не было выявлено ни у одного протестированного растения из всех вариантов опыта.

Заключение. По результатам проведенных нами исследований установлено, что корни растений календулы лекарственной поражаются фитопатогенными грибами *C. coccodes* и *C. nigrum*. Таким образом, календула может служить резерватом инфекции этих патогенных грибов, которые будут сохраняться на ее растительных остатках при запахивании в почву. Поэтому ее не следует использовать в качестве сидеральной или промежуточной культуры в севооборотах с культурой картофеля или томата при развитии антракноза или черной пятнистости клубней на поле.

Литература:

1. Загульменников В.Б., Дмитрук С.Е., Загульменникова Т.Н. и др. Возделывание лекарственных растений в условиях Западной Сибири и Центрального Казахстана. – Томск: НТЛ, 2001. – 196 с.
2. Исмагилов Р.Р., Костылев Д.А. Календула. – Уфа: БГАУ, 2000. – 102 с.
3. Шорин Н.В., Крикливая А.Н., Верховых А.Ю. Продуктивность лекарственного сырья и семян календулы лекарственной сорта Компактная в условиях лесостепной зоны Омской области // Молодой ученый. – 2015. – Т. 89. – № 9. – С. 786–791.
4. Вельмисева Е. Н. Разработка технологических приемов повышения урожайности календулы (*Calendula officinalis* L.) в условиях лесостепи Среднего Поволжья: Автореферат дисс. канд. с.-х. наук. – Пенза, 2014. – 20 с.
5. Yarmeeva M., Kutuzova I., Kurchaev M., Chudinova E., Kokaeva L., Belosokhov A., Belov G., Elansky A., Pobedinskaya M., Tsindeliiani A., Tsvetkova Yu., Elansky S. *Colletotrichum* species on cultivated *Solanaceae* crops in Russia // Agriculture. – 2023. – V. 13. – № 3. – 511. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13030511>.
6. Belov G.L., Belosokhov A.F., Kutuzova I.A., Statsyuk N.V., Chudinova E.M., Alexandrova A.V., Kokaeva L.Y., Elansky S.N. *Colletotrichum coccodes* in potato and tomato leaves in Russia // Journal of Plant Diseases and Protection. – 2018. – V. 125 – № 3. – P. 311–317. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13030511>
7. Ingram J., Johnson D. A. Colonization of potato roots and stolons by *Colletotrichum coccodes* from tuberborne inoculum // American Journal of Potato Research. – 2010. – V. 87 – P. 382–389. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12230-010-9144-5>
8. Nitzan N., Evans M., Cummings T., Dennis A., Johnson D.A., Batchelor D.L., Olsen C., Haynes K.G., Brown C.R. Field resistance to potato stem colonization by the black dot pathogen *Colletotrichum coccodes* // Plant Disease. – 2009. – V. 93. – P. 1116–1122. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-93-11-1116>
9. Fungal Databases. Available online: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldbdatabases> (accessed on 10 June 2022).

10. Dillard H.R., Cobb A.C. Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil // Plant Disease. – 1998. – V. 82. – № 2. – P. 235–238. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis.1998.82.2.235>.
11. Schoss K., Glavač N.K., Koce J.D., Anžlovar S. Supercritical CO₂ plant extracts show antifungal activities against crop-borne fungi // Molecules. – 2022. – V. 27. – № 3. – P. 1132. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27031132>
12. Mohamed A.E., El-Moaty A.H. Antifungal activity of *Achillea santolina* L. and *Calendula officinalis* L. essential oils and their constituents against fungal infection of liver as complication of cyclophosphamide therapy // Journal of Essential Oil Bearing Plants. – 2017. – P. 1030–1043. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1362998>.
13. Arora D., Rani A., Sharma A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula* // Pharmacognosy reviews. – 2013. – V. 7, Issue 14. P. 179–187. DOI: <https://doi.org/10.4103%2F0973-7847.120520>
14. Efstratiou E., Hussain A.I., Nigam P.S., Moore J.E., Ayub M.A., Rao J.R. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as gram-negative and gram-positive clinical pathogens // Complementary Therapies in Clinical Practice. – 2012. – V. 18. – № 3. – P. 173–176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2012.02.003>
15. Garibaldi A., Gilardi G., Gullino M.L. First report of powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* on *Calendula officinalis* in Italy // Plant disease. – 2008. – V. 92. – № 1. – P. 174. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-92-1-0174c>.
16. Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Franco Ortega S., Gullino M.L. First report of botrytis blight caused by *Botrytis cinerea* on *Calendula officinalis* in Italy // Plant disease. – 2017. – V. 101. – № 1. – P. 254. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1016-PDN>.
17. Sato T, Moriwaki J, Misawa T. Molecular re-identification of strains of the *Colletotrichum acutatum* species complex deposited in the NIAS genebank and morphological characteristics of its member species // Japan Agricultural Research Quarterly. – 2013. – V. 47. – P. 295–305. <http://www.jircas.affrc.go.jp/>
18. Uematsu S., Kageyama K., Moriwaki J. Sato T. *Colletotrichum carthami* comb. nov., an anthracnose pathogen of safflower, garland chrysanthemum and pot marigold, revived by molecular phylogeny with authentic herbarium specimens // Journal of General Plant Pathology. – 2012. – V. 78. – P. 316–330. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0397-3>
19. Zhao L., Luo H., Cheng H., Gou Y.-N., Zhi-He Yu Z.-H., Deng J.-X. New species of large-spored alternaria in section porri associated with compositae plants in China // Journal of Fungi. – 2022. – V. 8. – № 6. – P. 607. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof8060607>.
20. Левандовский Г.С. Ноготки лекарственные сорт Кальта / Вопросы лекарственного растениеводства. – М.: ВИЛР, 1980. – С. 43–45.
21. Maor R., Haskin S., Levi-Kedmi H., Sharon A. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. Aeschynomene // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 1852–1854. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1852-1854.2004>.
22. Numponsak T., Kumla J., Suwannarach N., Matsui K., Lumyong S. Biosynthetic pathway and optimal conditions for the production of indole-3-acetic acid by an endophytic fungus, *Colletotrichum fructicola* CMU-A109 // PLoS ONE. – 2018. – V. 13. – № e0205070. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205070>.
23. Zornitsa B. S., Rossitza M. R., Karov I., Kovacevik B., Manova V. I., Ralitsa G. G. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum coccodes* isolated from pepper cultivated in Bulgaria and Macedonia // Journal Natural Science, Matica Srpska Novi Sad. – 2013. – № 124. – P. 249–261. DOI: <http://dx.doi.org/10.2298/ZMSPN1324249S>
24. Liu F, Cai L., Crous P.W., Damm U. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum* // Mycologia. – V. 105 (4). – P. 844–860. DOI: <https://doi.org/10.3852/12-315>.

Kutuzova I.A., Khusnetdinova T.I., Elansky S.N., Chepurnykh A.D.

INFLUENCE OF FUNGI OF THE GENUS *COLLETOTRICHUM* ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF *CALENDULA OFFICINALIS*

The fungi Colletotrichum coccodes and C. nigrum are dangerous pathogens of potato and tomato crops. In this work, the growth of Calendula officinalis was assessed in laboratory experiments in two types of sterile substrate – poor (sand) and rich in nutrients (“Agrobalt sadovyi”) – inoculated with propagules of these fungi. An uninoculated substrate was used as a control. In both inoculated substrates, damage to the roots of calendula by C. coccodes and C. nigrum and the formation of microsclerotia typical of these fungal species were noted. No symptoms of damage to the above-ground parts of plants were identified. The growth of calendula in the soil was inhibited by both types of fungi. The presence of C. coccodes and C. nigrum propagules did not affect the growth of plants in sand. However, seed germination in the presence of inoculum of the tested fungi both in sand and in soil occurred faster. This pattern indicates the stimulating effect of secondary metabolites of fungi in the first stages of plant growth and development, and this effect was more pronounced on sand. The susceptibility of calendula to C. coccodes and C. nigrum shows that it can serve as a reserve for infection of these fungi, and therefore it should not be used as a green manure or intermediate crop in potato and tomato crop rotations with strong development of anthracnose or black spot in the field.

Keywords: *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum nigrum*, phytopathogenic fungi, plant diseases, *Calendula officinalis*, substrate, green manure culture.