



## **METAL RESISTANCE AND TOLERANCE TO TEMPERATURE STRESS OF PLANTS INOCULATED WITH ENDOPHYTE *CYLINDROCARPON MAGNUSIANUM* WOLLENW.**

**Bukharina Irina\*, Islamova Nadezhda**

Udmurt State University, Izhevsk, Russia

Received: 5. 5. 2020

Revised: 12. 7. 2020

Published: 20. 11. 2020

Inoculations of *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw. endotrophic micromycete and inoculant reactions to the action of heavy metal salts in the substrate (for *Solanum lycopersicum* L.) and the effect of high temperatures (for *Poa pratensis* L.) were studied. The experimental design included inoculation with the culture of the fungus and populations of the fungus adapted to the action of the stress factor. Then, inoculated plants were grown under control conditions and on substrates with the addition of different concentrations of zinc, copper, lead and chromium salts, or under conditions of temperature stress. We have not revealed a stimulating effect that increases the resistance of plants to the action of salts of heavy metals during inoculation of plants with a control population of the fungus. When using non-biogenic chemical elements, adaptive plant reactions associated with the content of photosynthetic pigments in the leaves and the formation of plant biomass were significantly manifested when plants were inoculated with adapted populations of the fungus *C. magnusianum* on substrates with the addition of chromium and lead salts. Under these conditions, a more intense development of fungal infection in plant roots was observed, in contrast to the use of the control fungal population. High temperatures led to significant changes in the content of ascorbic acid, photosynthetic pigments in the leaves, the distribution of plastic material between the aerial part and the root system of plants in inoculated plants. These reactions are adaptive. The facts obtained indicate the most effective partnership of the fungus *C. magnusianum* and the root system of plants under conditions extreme for plant life.

**Keywords:** *Cylindrocarpon magnusianum*; fungi; heavy metals; inoculation; biochemical indices

\*Corresponding author: Irina Bukharina, Universitetskaya 1, 426034 Izhevsk, Russia

✉ [buharin@udmlink.ru](mailto:buharin@udmlink.ru)

## Введение

В настоящее время в научном сообществе повысился интерес к изучению роли консортивных связей растений с корневыми микромицетами. Определенные успехи достигнуты в изучении роли эндомикоризы и ее самой распространенной формы – арбускулярной микоризы (АМ), которая характерна для большинства современных филогенетических групп растений, представлена во всех биомах земного шара (Wilkinson, 2001). Она формируется грибами, принадлежащими к подотделу *Glomeromycotina* отдела *Mucoromycota* (Yurkov et al., 2018). Но использование АМГ в растениеводстве ограничено, что является следствием их облигатной симбиотрофии (Ijdo et al., 2011).

В связи с этим особый интерес вызывает изучение роли других групп корневых микромицетов эндофитов и их отдельных представителей в формировании механизмов устойчивости у высших растений. Исторически, были выделены две группы эндофитов (*Clavicipitaceous* (C) и *Nonclavicipitaceous* (NC)) на основе филогении и признаков жизненного цикла (Rodriguez et al., 2009; El-Samad and El-Hakeem, 2019). В целом эта разнородная группа грибов может оказывать сильное воздействие на растительные сообщества посредством обеспечения устойчивости растений к абиотическому и биотическому стрессам. Особый интерес представляют исследования роли эндофитов в формировании металлрезистентности растений, включая сельскохозяйственные культуры (Rodriguez et al., 2009; Ikram et al., 2018; El-Samad and El-Hakeem, 2019; Surbhi et al., 2019; Bilal et al., 2020), причем в отношении особо опасных для растений химических элементов (Ali et al., 2019; Bilal et al., 2019; Li et al., 2019; Sharma et al., 2019; Hou et al., 2020). Ряд исследований направлен на исследование возможности применения микромицетов в качестве гербицидов (Boyette et al., 2016; Boyette et al., 2018; Meepagala et al., 2019; Sobowale, 2019).

Одним из перспективных микромицетов является эндофит *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw. (Sogonov and Velikanov, 2004; Amaral et al., 2009; Bukharina and Islamova, 2016; Bukharina et al., 2019; Bukharina et al., 2019a). Установлено, что его метаболиты могут быть использованы в борьбе с нематодами (Amaral et al., 2009), он способен расти в условиях высокого содержания нефтепродуктов в почве (Sogonov and Velikanov, 2004; Amaral et al., 2009). В серии авторских экспериментов, проведенных с *C. magnusianum*, установлено, что культура этого гриба способна выдерживать действие высокого осмотического давления, сохраняя рост культурального мицелия. А опыты с инокулированными данным грибом растениями показали возможность его использования в качестве агента повышения солеустойчивости и термостойкости растений (Bukharina and Islamova, 2016; Bukharina et al., 2019; Bukharina et al., 2019a).

Целью наших исследований являлось изучение влияния инокуляции культурой гриба *C. magnusianum* на формирование адаптивных реакций растений к действию солей тяжелых металлов в субстрате (на примере тестовой культуры томата *Solanum lycopersicum* L.) и к действию температурного стресса (на примере мятлика лугового (*Poa pratensis* L.)).

## Материал и методика

### Материал исследования

Культура *C. magnusianum* выделена из корневой системы древесных растений (*Acer negundo* L. хорошего жизненного состояния), длительно произрастающих в условиях городских почв с высоким содержанием солей тяжелых металлов (примагистральные посадки, санитарно-защитная зона ОАО „Ижсталь“, г. Ижевск, Удмуртия). Гриб культивируется на питательной среде вне корневой системы растений. Видовая принадлежность гриба установлена методами микроскопирования и молекулярного анализа ДНК в лаборатории Лейбницкого института овощных и декоративных культур (г. Берлин) (Bukharina et al., 2016).

### Методы исследования

Согласно схеме эксперимента подготовлены популяции гриба, адаптированные к субстратам с разными концентрациями солей тяжелых металлов (ТМ), мг/л: А0 – контрольный; А1 – на субстрате с  $Zn_{100}$ ; А2 –  $Cu_{50}$ ; А3 –  $Cu_{100}$ ; А4 –  $Cu_{150}$ ; А5 –  $Pb_{10}$ ; А6 –  $Pb_{50}$ ; А7 –  $Cr_{2,5}$ ; А8 –  $Cr_{10}$ . Мицелиальные диски культуры гриба ( $\varnothing = 5$  мм) были перенесены на пентозо-декстрозную агаризированную среду (PDA medium) с внесенными, согласно расчетным концентрациям, солями ТМ и инкубировались в течение двух недель в климатической камере «BinderKBWF720» при температуре + 25 °С. Затем были подготовлены суспензионные культуры этих популяций (содержание спор – 3 млн. шт./мл; фрагментов мицелия – 200 шт./мл) и проведена инокуляция растений методом полива сеянцев в период пикировки. Для приготовления суспензионных культур гриба в стерильный картофельный бульон с декстрозой (Potato Dextrose Broth) были внесены мицелиальные диски адаптированных популяций гриба и инкубировались в течение 10 дней в термо-шейкере-инкубаторе (температура +25 – 27 °С, вращение 60 оборотов/мин (Решение РОСПАТЕНТа о выдаче патента на изобретение, заявка №2019112511/10(024247) от 2.04.2020г. ).

Опыт включал варианты:

1. инокулированные томаты (инокуляция контрольным изолятом А0) выращивались на субстратах с разным содержанием солей тяжелых металлов, мг/л: В0 – контрольный – без ТМ; В1 –  $Zn_{100}$ ; В2 –  $Cu_{50}$ ; В3 –  $Cu_{100}$ ; В4 –  $Cu_{150}$ ; В5 –  $Pb_{10}$ ; В6 –  $Pb_{50}$ ; В7 –  $Cr_{2,5}$ ; В8 –  $Cr_{10}$ ;
2. томаты, инокулированные популяциями грибов, адаптированными к тяжелым металлам (А1 – А8), выращивались на субстратах без внесения (В0) и с внесением солей ТМ (В1 – В8).

Повторность вариантов опыта четырехкратная. Субстрат представлял собой смесь торфа низкой зольности и песка 1 : 2. Растения выращивали в климатической камере «BinderKBWF720» при соблюдении оптимальных условий культуры томата (влажность субстрата 75 %, освещенность 20 000 лк (16 ч в сутки), температура воздуха днем – 23 °С, ночью – 19 °С). Использовали карликовый сорт томата

«Балконное чудо». Растения выращивали в течение 3 месяцев до стадии начала плодоношения.

Для изучения влияния инокуляции на устойчивость газонных культур к температурному стрессу помимо использования культуры гриба были подготовлены популяции гриба, предварительно адаптированные к действию высоких температур (33 – 37 °С). Опыт включал варианты: инокулированные растения (A1 – культура гриба, A2 – адаптированная популяция гриба, A0 – контроль, без инокуляции) выращивались в условиях оптимального режима температур (B0) и при высоких температурах (B1). Растения выращивались в климатической камере: освещенность 20 000 лк 16 ч в сутки; температура воздуха днем – 25 °С, ночью – 22 °С (оптимальный режим температур); температура воздуха днем – 37 °С, ночью – 33 °С (экстремальный режим температур). Повторность вариантов опыта четырехкратная. Субстрат представлял собой смесь торфа низкой зольности и песка 1:2.

По завершении эксперимента была проведена оценка развития грибов эндофитов в корнях методом световой микроскопии (Shtark and Labutova, 2014). Оценка устойчивости растений проведена на основе: содержания нитратов в листьях – ионометрическим методом (ГОСТ 29270-95); биомассы и процентного содержания сухого вещества в надземной части и корневой системе растений весовым методом (ГОСТ 28561-90); фотосинтетических пигментов в листьях среднего яруса (хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды) спектрофотометрическим методом в ацетоновых экстрактах (поглощение 662, 644 и 440,5 нм, соответственно), расчет концентрации пигментов проведен по уравнениям Холма-Веттштейна.

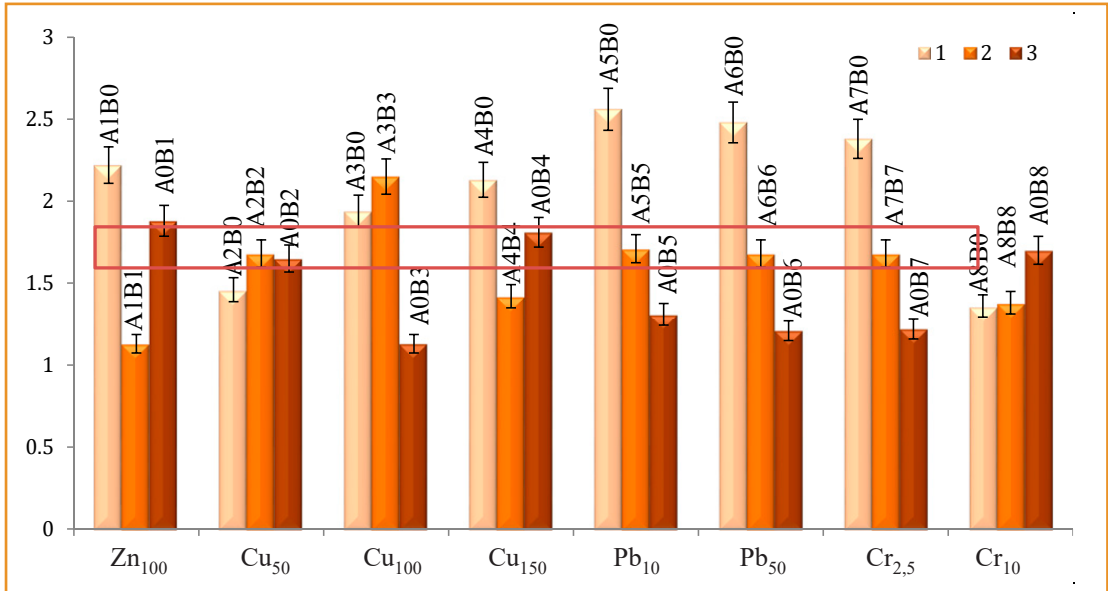
### **Статистическая обработка**

Математическую обработку материалов осуществляли с применением статистического пакета «Statistica 6.0» методами описательной статистики. Достоверные различия установлены при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и их обсуждение**

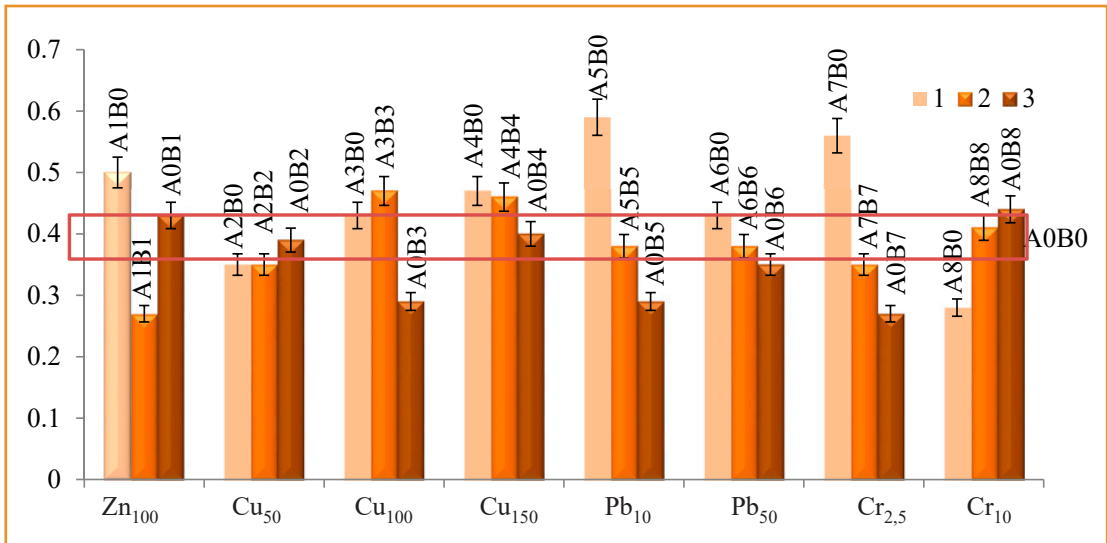
Анализ результатов показал (Рисунки 1 – 3), что во всех вариантах с внесением цинка содержание пигментов в листьях растений имело общие закономерности: инокуляция растений контрольной популяцией (A0) при выращивании на субстрате с цинком не повлияла на содержание фотосинтетических пигментов; инокуляция растений адаптированными популяциями при выращивании на контрольном субстрате (B0) вызвала достоверное увеличение содержания хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов, а при выращивании на субстрате с цинком, наоборот, наблюдалось значительное, почти в два раза, снижение содержания пигментов. Что касается других изучаемых показателей (Таблица 1), то инокуляция контрольной популяцией при выращивании растений на субстрате с цинком привела к достоверному снижению содержания сухого вещества в корневой системе растений. Инокуляция адаптированными популяциями гриба вызвала достоверное снижение надземной биомассы растений (при выращивании на контрольном субстрате) и не повлияла

на изучаемые параметры растений при культивировании на субстрате с внесением цинка.



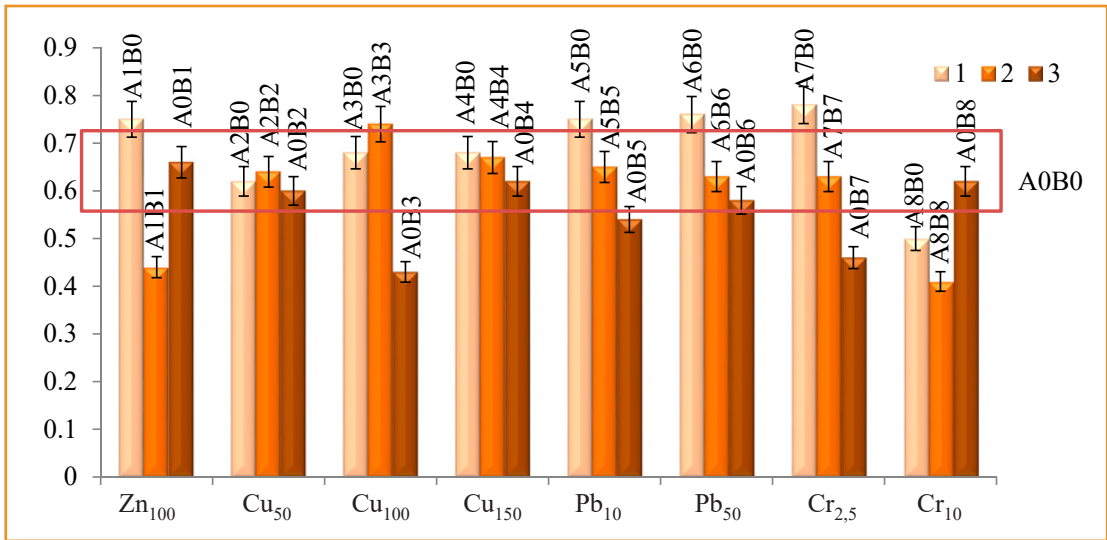
**Рисунок 1** Содержание хлорофилла *a* в листьях инокулированных растений томата в условиях разных концентраций тяжелых металлов в субстрате  
1 – популяция гриба (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + субстрат без тяжелых металлов (B0); 2 – популяция гриба (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + субстрат с внесением солей тяжелых металлов, мг/л (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); 3 – контрольная популяция (A0) + субстрат с внесением солей тяжелых металлов мг/л (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); A0B0 – контрольная популяция гриба на субстрате без внесения тяжелых металлов (красным прямоугольником обозначен доверительный интервал средних значений показателя для данного варианта)

**Figure 1** The content of chlorophyll *a* in the leaves of inoculated tomato plants under conditions of different concentrations of heavy metals in the substrate  
1 – fungus population (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + substrate without heavy metals (B0); 2 – fungus population (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + substrate with heavy metals, mg/l (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); 3 – control population of fungi (A0) + substrate with heavy metals (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); A0B0 – control population of fungi + substrate without heavy metals (the red box indicates the confidence interval of the average values of the indicator for this option). On the Y-axis – Content of chlorophyll *a*, mg/g; on the X-axis – Content of heavy metals in the substrate, mg/l



**Рисунок 2** Содержание хлорофилла *b* в листьях инокулированных растений томата в условиях разных концентраций тяжелых металлов в субстрате  
1 – популяция гриба (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + субстрат без тяжелых металлов (B0); 2 – популяция гриба (A1– Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + субстрат с внесением солей тяжелых металлов, мг/л (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); 3 – контрольная популяция (A0) + субстрат с внесением солей тяжелых металлов мг/л (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); A0B0 – контрольная популяция гриба на субстрате без внесения тяжелых металлов (красным прямоугольником обозначен доверительный интервал средних значений показателя для данного варианта)

**Figure 2** The content of chlorophyll *b* in the leaves of inoculated tomato plants under conditions of different concentrations of heavy metals in the substrate  
1 – fungus population (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + substrate without heavy metals (B0); 2 – fungus population (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + substrate with heavy metals, mg/l (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); 3 – control population fungi (A0) + substrate with heavy metals (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); A0B0 – control population fungi + substrate without heavy metals (the confidence interval of the average values of the indicator for this option). On the Y-axis – Content of chlorophyll *b*, mg/g; on the X-axis – Content of heavy metals in the substrate, mg/l



**Рисунок 3** Содержание каротиноидов в листьях инокулированных растений томата в условиях разных концентраций тяжелых металлов в субстрате  
1 – популяция гриба (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + субстрат без тяжелых металлов (B0); 2 – популяция гриба (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + субстрат с внесением солей тяжелых металлов, мг/л (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); 3 – контрольная популяция (A0) + субстрат с внесением солей тяжелых металлов мг/л (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); A0B0 – контрольная популяция гриба на субстрате без внесения тяжелых металлов (красным прямоугольником обозначен доверительный интервал средних значений показателя для данного варианта)

**Figure 3** The content of carotenoids in the leaves of inoculated tomato plants under conditions of different concentrations of heavy metals in the substrate  
1 – fungus population (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + substrate without heavy metals (B0); 2 – fungus population (A1 – Zn<sub>100</sub>; A2 – Cu<sub>50</sub>; A3 – Cu<sub>100</sub>; A4 – Cu<sub>150</sub>; A5 – Pb<sub>10</sub>; A6 – Pb<sub>50</sub>; A7 – Cr<sub>2,5</sub>; A8 – Cr<sub>10</sub>) + substrate with heavy metals, mg/l (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); 3 – control population fungi (A0) + substrate with heavy metals (B1 – Zn<sub>100</sub>; B2 – Cu<sub>50</sub>; B3 – Cu<sub>100</sub>; B4 – Cu<sub>150</sub>; B5 – Pb<sub>10</sub>; B6 – Pb<sub>50</sub>; B7 – Cr<sub>2,5</sub>; B8 – Cr<sub>10</sub>); A0B0 – control population fungi + substrate without heavy metals (the red box indicates the confidence interval of the average values of the indicator for this option). On the Y-axis – Content of carotenoids, mg/g; on the X-axis – Content of heavy metals in the substrate, mg/l

Отмечены высокие показатели развития грибной инфекции *C. magnusianum* в корневой системе растений в варианте контрольная популяция/Zn<sub>100</sub> (Таблица 1), при использовании же адаптированных популяций грибная инфекция была менее развита, особенно в варианте Zn<sub>100</sub>/Zn<sub>100</sub>.

В вариантах с Cu<sub>100</sub> установлено увеличение содержания хлорофиллов *a* и *b* при использовании адаптированных популяций, в то время как инокуляция контрольной популяцией, наоборот, привела к достоверному резкому снижению содержания пигментов. В вариантах с максимальным содержанием меди (Cu<sub>150</sub>) мы не выявили изменений в содержании каротиноидов, но использование адаптированных популяций привело к увеличению содержания хлорофиллов.



Таблица 1 Биологические показатели инокулированных растений томата в условиях эксперимента  
Table 1 Biological indicators of inoculated tomato in experimental conditions

Варианты опыта: популяция (А)/ субстрат (В)	Показатели				Развитие грибной инфекции		
	биомасса (г)		содержание сухого вещества (%)		частота встречаемости (%)	интенсивность (%)	
	надземная часть	корни	надземная часть	корни	нитратов (мг/100 г)		
Контроль/Zn <sub>100</sub>	29,37 ±2,23*	4,70 ±0,28	12,83 ±0,67	7,85 ±0,33↓	3 890,43 ±159,98	86,7	4,3
Контроль/Cu <sub>50</sub>	25,54 ±0,80↓**	3,81 ±0,24	13,01 ±1,99	5,32 ±1,96↓	4 327,69 ±144,6↑	80,0	4
Контроль/Cu <sub>100</sub>	24,31 ±1,86	4,40 ±0,30	12,64 ±0,02	13,79 ±3,80↑	5 326,66 ±110,4↑	86,7	4,3
Контроль/Cu <sub>150</sub>	27,60 ±0,70	3,63 ±0,24	12,14 ±0,89	13,29 ±1,13↑	4 308,72 ±298,07	53,6	2,7
Контроль/Pb <sub>10</sub>	24,51 ±1,28	3,88 ±0,35	8,85 ±0,50↓	10,58 ±2,01	4 321,20 ±258,40	93,3	4,7
Контроль/Pb <sub>50</sub>	28,81 ±0,39	3,81 ±0,07	10,02 ±0,86↓	8,75 ±1,38	5 014,62 ±466,07	93,3	4,7
Контроль/Cr <sub>2,5</sub>	26,87 ±0,35	3,30 ±0,14↓	11,74 ±1,87	8,89 ±1,79	4 415,13 ±331,23	40,0	2
Контроль/Cr <sub>10</sub>	25,58 ±0,45↓	4,72 ±0,28	11,59 ±0,98	7,75 ±0,18↓	3 213,16 ±96,82↓	40,0	2
Zn <sub>100</sub> /контроль	25,58 ±0,73↓	3,84 ±0,12	14,92 ±2,32	9,35 ±1,41	3 476,33 ±325,75	60,0	3
Zn <sub>100</sub> /Zn <sub>100</sub>	27,80 ±0,64	4,72 ±0,45	14,95 ±1,23	11,19 ±2,20	3 585,72 ±606,07	33,3	1,7
Cu <sub>50</sub> /контроль	23,96 ±1,63	2,16 ±0,18↓	10,99 ±1,14	14,78 ±2,82	3 365,41 ±72,51	100,0	5
Cu <sub>50</sub> /Cu <sub>50</sub>	29,68 ±1,05	2,13 ±0,23	14,10 ±1,64	15,22 ±2,97	4 638,21 ±346,8↑	66,7	3,3
Cu <sub>100</sub> /контроль	19,82 ±0,40↓	2,30 ±0,15↓	10,91 ±1,64	13,17 ±2,43	4 837,86 ±206,82	93,3	4,7
Cu <sub>100</sub> /Cu <sub>100</sub>	35,29 ±0,25↑	2,39 ±0,69	12,67 ±0,82	12,68 ±2,45	3 534,60 ±99,78	100,0	5
Cu <sub>150</sub> /контроль	27,99 ±0,81	1,93 ±0,04↓	9,44 ±1,79	16,10 ±3,80	3 058,14 ±25,50↓	86,7	4,3
Cu <sub>150</sub> /Cu <sub>150</sub>	24,16 ±1,12	2,23 ±0,18	12,26 ±1,21	13,25 ±2,73	4 487,60 ±103,3↑	86,7	4,3
Pb <sub>10</sub> /контроль	32,66 ±2,01	2,98 ±0,15↓	13,67 ±1,92	10,24 ±0,65	3 356,96 ±241,51	73,3	3,4
Pb <sub>10</sub> /Pb <sub>10</sub>	26,30 ±0,87	2,36 ±0,22	11,41 ±1,09	11,71 ±1,01	4 488,58 ±102,6↑	66,7	3,3
Pb <sub>50</sub> /контроль	21,88 ±1,31↓	1,55 ±0,10↓	12,39 ±1,36	10,98 ±1,16	3 986,02 ±82,59	86,7	4,3



Продолжение таблицы 1  
Continuation of table 1

Варианты опыта: популяция (А)/ субстрат (В)	Показатели				Развитие грибной инфекции		
	биомасса (г)		содержание сухого вещества (%)		содержание нитратов (мг/100 г)	частота встречаемости (%)	интенсивность (%)
	надземная часть	корни	надземная часть	корни			
<b>Pb<sub>50</sub>/Pb<sub>50</sub></b>	28,16 ±1,30	2,49 ±0,36	12,92 ±1,16	10,01 ±1,17	4 229,96 ±177,36	86,7	4,3
<b>Ct<sub>2,5</sub>/контроль</b>	21,59 ±2,04↓	1,92 ±0,08↓	12,24 ±0,26	11,38 ±1,85	4 384,27 ±195,22	73,3	3,4
<b>Ct<sub>2,5</sub>/Ct<sub>2,5</sub></b>	29,54 ±0,09↑	2,50 ±0,01↑	13,16 ±0,61	9,52 ±1,49	4 161,79 ±494,02	73,3	3,4
<b>Ct<sub>10</sub>/контроль</b>	16,36 ±0,94↓	1,56 ±0,15↓	13,12 ±1,98	14,17 ±2,00	5 188,76 ±622,04	80,0	4
<b>Ct<sub>10</sub>/Ct<sub>10</sub></b>	27,30 ±0,26↑	2,06 ±0,22	14,23 ±2,73	11,90 ±1,12	3 583,89 ±471,03	80,0	4
<b>Контроль/контроль</b>	29,30 ±0,70	5,44 ±0,63	15,33 ±2,02	9,46 ±0,15	3 693,55 ±87,76	60,0	3

Примечания. \* – указано среднее значение показателя ± стандартное отклонение; \*\* показано достоверное отличие от контроля: увеличение ↑ или уменьшение ↓ показателя ( $p < 0,05$ ). Контроль – исходная, неадаптированная к ТМ популяция (соответствует А0 на рисунках 1 – 3) и субстрат без металлов (соответствует В0 на рисунках 1 – 3). А – адаптированные популяции гриба, выращенные на агаровых субстратах с внесением разных концентраций солей тяжелых металлов (мг/л) (соответствует А1 – А8 на рисунках 1 – 3). В – субстраты с разным содержанием солей тяжелых металлов (мг/л) (соответствует В1 – В8 на рисунках 1 – 3)

Результаты анализа других изучаемых параметров растений показали, что инокуляция растений контрольной популяцией гриба привела к росту содержания нитратов в листьях в вариантах субстратов  $Cu_{50}$  и  $Cu_{100}$ , а также к увеличению процентного содержания сухого вещества в корневой системе растений в вариантах  $Cu_{100}$  и  $Cu_{150}$ . Это согласуется с данными о влиянии инокуляции на растения при воздействии ТМ, связанной с изменением архитектуры корневой системы и накоплением общего азота (Hou et al., 2020). Использование адаптированных популяций гриба при культивировании инокулированных растений на контрольном субстрате привело к снижению биомассы корневой системы, а в варианте  $Cu_{150}$  – и к снижению содержания нитратов в листьях. При инокуляции адаптированными популяциями гриба на субстратах с внесением  $Cu_{50}$  и  $Cu_{150}$  отмечен достоверный рост содержания нитратов в листьях, а при  $Cu_{100}$  – увеличение надземной биомассы растений.

Наиболее интенсивно грибная инфекция формировалась при использовании адаптированных популяций  $Cu_{100}$  и  $Cu_{150}$ . Максимальное развитие грибной инфекции отмечено в варианте  $Cu_{100}/Cu_{100}$ .

Особый интерес вызвали результаты вариантов опыта с использованием небιοгенных химических элементов (хрома и свинца). При инокуляции растений контрольной популяцией гриба и при культивировании на субстрате  $Pb_{10}$  наблюдалось достоверное снижение хлорофиллов *a* и *b*, на субстрате  $Pb_{50}$  – хлорофилла *a*, при этом достоверного снижения содержания каротиноидов не наблюдалось.

Использование адаптированных популяций гриба при выращивании растений на В0 вызвало увеличение содержания всех изучаемых пигментов, а при выращивании на субстратах с внесением солей свинца достоверных изменений по сравнению с контролем не выявлено.

Инокуляция растений контрольной популяцией гриба привела к достоверному снижению процентного содержания сухого вещества в надземной части растений. При использовании адаптированных популяций и при выращивании растений на контрольном субстрате отмечено снижение биомассы корневой системы, а при культивировании растений на субстратах с  $Pb_{10}$  и  $Pb_{50}$  биомасса и содержание сухого вещества достоверных изменений не имели, но при этом отмечен рост содержания нитратов в листьях.

Во всех вариантах со свинцом грибная инфекция в корневой системе растений имела высокие показатели развития, наибольшие – в вариантах Контроль/ $Pb_{10}$ ,  $Pb_{50}$  и  $Pb_{10}$ / $Pb_{50}$ /контроль.

В вариантах с хромом инокуляция растений контрольной популяцией при культивировании в субстрате с  $Cr_{2,5}$  привела к достоверному снижению содержания пигментов в листьях, а в субстрате с  $Cr_{10}$  – уже нет.

Инокуляция растений адаптированными популяциями гриба при их культивировании на контрольных субстратах имела различия: при  $Cr_{2,5}$  вызвала достоверный рост в содержании фотосинтетических пигментов, а при  $Cr_{10}$ , наоборот,

достоверное снижение их содержания. При культивировании растений на субстрате с внесением Cr<sub>2,5</sub> достоверных изменений не наблюдалось, и лишь при внесении Cr<sub>10</sub> наблюдалось снижение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов, при отсутствии достоверных различий с контролем в содержании хлорофилла *b*.

При инокуляции растений контрольной популяцией гриба и культивировании на субстрате с Cr<sub>10</sub> мы наблюдали снижение показателей надземной биомассы, процентного содержания сухого вещества в корневой системе растений и нитратов в листьях. Интерес представляют результаты вариантов с использованием инокуляции растений адаптированными популяциями гриба: при культивировании растений на контрольных субстратах мы наблюдали снижение показателей биомассы надземной части и корневой системы растений, но когда растения культивировались на субстратах с внесением хрома, наоборот, отмечен рост биомассы растений.

В вариантах с хромом использование адаптированных популяций гриба привело к наиболее высоким показателям развития грибной инфекции в корне растений, причем максимальным – при наиболее высоком содержании хрома в субстрате (вариант Cr<sub>10</sub>/Cr<sub>10</sub>).

Результаты проведенных нами исследований с использованием небактериальных опасных для жизнедеятельности растений химических элементов согласуются с результатами наших исследований, проведенных в течение ряда лет (Bukharina and Islamova, 2016; Bukharina et al., 2019; Bukharina et al., 2019a) и мнением ряда научных публикаций о своеобразной форме партнерства эндотрофных грибов с корневой системой растений (Bukharina et al., 2016; Bilal et al., 2019; Li et al., 2019; Hou et al., 2020): защитное действие грибов наиболее эффективно проявляется в условиях неблагоприятных для жизнедеятельности растений.

Результаты эксперимента по влиянию температурного стресса казали (Таблица 2), что в условиях оптимального режима через 2 недели после начала эксперимента, инокулированные растения отличались более высокими показателями содержания аскорбиновой кислоты в листьях по сравнению с контрольными не инокулированными растениями. У них отмечено достоверное снижение содержания хлорофилла *b* в листьях, существенное перераспределение пластического материала: увеличение надземной биомассы и снижение биомассы корневой системы ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2** Показатели биомассы и содержания сухого вещества инокулированных растений мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) в условиях разных температурных режимов культивирования

**Table 2** Biomass and dry matter of inoculated meadow bluegrass plants (*Poa pratensis* L.) under different temperature conditions of cultivation

Вариант опыта	Биомасса (г)		Содержание сухого вещества в надземной части (%)
	надземная часть	корни	
<b>Температура 22 – 25 °С</b>			
Контроль (В0)	3,30 ±0,05	28,19 ±0,80	49,8 ±0,2
	3,22 – 3,38	26,92 – 29,45	49,6 – 50,1
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>	4,80 ±0,01	25,01 ±0,66	51,2 ±1,4
	4,78 – 4,81	23,96 – 26,07	49,1 – 53,4
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i> (АП)	4,75 ±0,04	13,98 ±0,38	51,8 ±1,3
	4,69 – 4,81	13,37 – 14,58	49,7 – 53,9
<b>Температура 33 – 37 °С</b>			
Контроль (В0)	нет данных	нет данных	нет данных
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>	нет данных	15,15 ±0,76 13,93 – 16,36	нет данных
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i> (АП)	нет данных	16,13 ±0,48 15,36 – 16,90	нет данных

Примечания: \* – указано среднее значение показателя ± стандартное отклонение, доверительный интервал среднего значения показателя ( $p < 0,05$ ); АП – адаптированная популяция

**Таблица 3** Биохимические показатели инокулированных растений мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) в условиях разных температурных режимов культивирования

**Table 3** Biochemical parameters of inoculated meadow bluegrass plants (*Poa pratensis* L.) under different temperature conditions of cultivation

Вариант опыта	Содержание аскорбиновой кислоты (мг/100 г)	Содержание фотосинтетических пигментов (мг/г)		
		хлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>b</i>	каротиноиды
<b>Температура 22 – 25 °С</b>				
Контроль (В0)	*143,01 ±2,41	3,235 ±0,081	2,961 ±0,269	0,661±0,022
	139,19 – 146,84	3,105 – 3,364	2,532 – 3,390	0,626 – 0,695
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>	161,49 ±2,09	3,198 ±0,094	0,977 ±0,066	0,691 ±0,026
	158,16 – 164,81	3,049 – 3,347	0,872 – 1,081	0,649 – 0,733
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i> (АП)	165,06 ±3,67	3,082 ±0,023	0,615 ±0,017	0,783 ±0,065
	159,21 – 170,90	3,045 – 3,199	0,588 – 0,642	0,680 – 0,886
<b>Температура 33 – 37 °С</b>				
Контроль (В0)	400,72 ±6,23	4,349 ±0,019	1,250 ±0,083	1,589 ±0,014
	390,81 – 410,62	4,319 – 4,379	1,118 – 1,382	1,566 – 1,612
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>	218,14 ±0,46	4,652 ±0,250	1,042 ±0,063	1,554 ±0,017
	217,41 – 218,87	4,254 – 5,050	0,942 – 1,142	1,526 – 1,581
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i> (АП)	383,66 ±5,03	5,697 ±0,058	1,673 ±0,076	1,271 ±0,033
	375,66 – 391,66	5,605 – 5,789	1,552 – 1,794	1,219 – 1,323

Примечания: \* – указано среднее значение показателя ± стандартное отклонение, доверительный интервал среднего значения показателя ( $p < 0,05$ ); АП – адаптированная популяция

При культивировании в условиях температурного стресса у инокулированных растений по сравнению с контрольными достоверно снижалось содержание аскорбиновой кислоты в листьях, при этом у растений, инокулированных адаптированными популяциями гриба, содержание хлорофиллов было существенно выше, а каротиноидов – ниже по сравнению с контрольными растениями. Инокуляция адаптированными популяциями оказалась наиболее эффективной в условиях температурного стресса. После полутора месяцев культивирования растений в условиях высоких температур контрольные растения погибли, у инокулированных растений также наблюдалось отмирание надземной части, но при этом корневая система растений сохранила свою жизнеспособность.

### Выводы

Инокуляция растений контрольной популяцией гриба привела к снижению содержания фотосинтетических пигментов и биомассы, таким образом не способствовала формированию адаптивных реакций у растений. Инокуляция растений адаптированными популяциями имела положительный эффект: для Zn<sub>100</sub> – при культивировании растений на контрольном субстрате; для вариантов Cu<sub>100</sub> и Cu<sub>150</sub> – как на контрольном, так и на субстратах с внесением меди; для всех вариантов с внесением солей хрома и свинца – на субстратах с внесением тяжелых металлов. Инокуляция мятлика лугового адаптированными популяциями гриба при культивировании в условиях температурного стресса, привела к сохранению жизнеспособности корневой системы растений при отмирании надземной части в отличие от гибели не инокулированных растений. Эти факты свидетельствуют о наиболее эффективном партнерстве гриба *C. magnusianum* и растений в условиях стресса. Грибная инфекция в корнях растений во всех вариантах опыта была хорошо развита, а использование адаптированных к действию солей хрома изолятов *C. magnusianum* при дальнейшем культивировании растений на субстратах с внесением солей хрома стимулировало развитие грибной инфекции в корневой системе растений.

### Благодарность

Работа выполнена при поддержке гранта в рамках Соглашения между Министерством высшего образования и науки Российской Федерации и Министерством образования Словацкой Республики о сотрудничестве в области науки и образования, 2020 г.

### Литература

- ALI, A., BILAL, S., KHAN, A.L., MABOOD, F., AL-HARRASI, A., LEE, I.-J. 2019. Endophytic *Aureobasidium pullulans* BSS6 assisted developments in phytoremediation potentials of *Cucumis sativus* under Cd and Pb stress. In *Journal of plant interactions*, vol. 14(1), p. 303–313. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1633428>
- AMARAL, D.R., OLIVEIRA, D.F., CAMPOS, V.P., DE CARVALHO, D.A., NUNES, A.S. 2009. Effect of plant and fungous metabolites on *Meloidogyne exigua*. In *Ciencia e Agrotecnologia*, vol. 33, p. 1861–1865. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000500021>

- BILAL, S., SHAHZAD, R., KHAN, A.L., AL-HARRASI, A., KIM, C.K., LEE, I.-J. 2019. Phytohormones enabled endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 protects *Glycine max* L. from synergistic toxicity of heavy metals by hormonal and stress-responsive proteins modulation. In *Journal of Hazardous Materials*, vol. 379, 120824. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120824>
- BILAL, S., SHAHZAD, R., IMRAN, M., JAN, R., MIN, K., LEE, I.-J. 2020. Synergistic association of endophytic fungi enhances *Glycine max* L. resilience to combined abiotic stresses: Heavy metals, high temperature and drought stress. In: *Industrial Crops & Products*, vol. 143(2020), 111931, p. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111931>
- BOYETTE, C.D., HOAGLAND, R.E., STETINA, K.C. 2016. Efficacy Improvement of a Bioherbicidal Fungus Using a Formulation-Based Approach. In *American Journal of Plant Sciences*, vol. 7(16), p. 2349–2358. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.716206>
- BOYETTE, C. D., HOAGLAND, R. E., STETINA, K. C. 2018. Hot water treatment enhances the Bioherbicidal Efficacy of a fungus. In *American Journal of Plant Sciences*, vol. 9(10), p. 2063–2076. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.910150>
- BUKHARINA, I., FRANKEN, PH., KAMASHEVA, A., VEDERNIKOV, K., ISLAMOVA, N. 2016. About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment. In *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, vol. 7(4), p. 1386–1394.
- BUKHARINA, I.L., ISLAMOVA, N.A. 2016. Issledovanie predelov ustojchivosti mikroskopicheskikh gribov i formirovanie kollekcii perspektivnyh izolyatov [Study of the stability limits of microscopic fungi and the formation of a collection of promising isolates]. In *Mat. godichnoe sobranie obshchestva fiziologov rastenij Rossii „Signal’nye sistemy rastenij: ot receptora do otvetnoj reakcii organizma“*. SbP., p. 355–356. [In Russian].
- BUKHARINA, I.L., ISLAMOVA, N.A., ZHAVAD, A.F., ABDULLAH, M.R., LEBEDEVA, M.A., SHASHOV, L.O. 2019a. Osobennosti formirovaniya metallrezistentnosti pri inokulyacii tomatu mikromicetom *Cylindrocarpon magnusianum* [Features of the formation of metal resistance during inoculation of tomato with micromycete *Cylindrocarpon magnusianum*]. In *Estestvennye i tekhnicheskie nauki*, vol. 10(136), p. 105–112. <https://doi.org/10.25633/ETN.2019.10.15> [In Russian].
- BUKHARINA, I.L., ISLAMOVA, N.A., ZHAVAD, A.F., LEBEDEVA, M.A., SHASHOV, L.O. 2019. Vliyanie inokulyata *Cylindrocarpon Magnusianum* na formirovanie adaptivnyh reakcij rastenij k stressovym faktoram. [The effect of the inoculum *Cylindrocarpon magnusianum* on the formation of adaptive responses of plants to stress factors]. In *Agrarnaya Rossiya*, no 12, p. 26–32. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2019-12-26-32> [In Russian].
- EL-SAMAD, H.M., EL-HAKEEM, K. N.S. 2019. Strategy role of mycorrhiza inoculation on osmotic pressure, chemical constituents and growth yield of maize plant grown under drought stress. In *American Journal of Plant Sciences*, vol. 10(6), p. 1102–1120. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.106080>
- HOU, L., YU, J., ZHAO, L., HE, X. 2020. Dark septate endophytes improve the growth and the tolerance of *Medicago sativa* and *Ammopiptanthus mongolicus* under cadmium stress. In *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, p. 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03061>
- IJDO, M., CRANENBROUCK, S., DECLERCK, S. 2011. Methods for large-scale production of AM fungi: past, present and future. In *Mycorrhiza*, vol. 21, p. 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0337-z>
- IKRAM, M., ALI, I.N., JAN, G., JAN, F.G., RAHMAN, I.U., IQBALI, A., HAMAYU, M. 2018. IAA producing fungal endophyte *Penicillium roqueforti* Thom., enhances stress tolerance and nutrients uptake in wheat plants grown on heavy metal contaminated soils. In *Plos one*, vol. 29, p. 2–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208150>
- LI, X., ZHANG, X., WANG, X., YANG, X., CUI, Z. 2019. Bioaugmentation-assisted phytoremediation of lead and salinity co-contaminated soil by *Suaeda salsa* and *Trichoderma asperellum*. In *Chemosphere*, 224(2019), 716e725, p. 716–725. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.184>
- MEEPAGALA, K.M., CLAUSEN, B.M., JOHNSON, R.D., WEDGE, D.E., DUKE, S.O. 2019. A Phytotoxic and Antifungal Metabolite (Pyrichalasin H) from a Fungus Infecting *Brachiaria eruciformis* (Signal
-

- Grass). In *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, vol. 8(3), p. 115–128. <https://doi.org/10.4236/jacen.2019.83010>
- RODRIGUEZ, R.J., WHITE, J.F., ARNOLD, A.E., REDMAN, R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. In *New Phytologist*, vol. 182, p. 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- SHARMA, V.K., LI, X., WU, G., BAI, W., PARMAR, S., WHITE, JR. J.F., LI, H. 2019. Endophytic community of Pb-Zn hyperaccumulator *Arabis alpina* and its role in host plants metal tolerance. In *Plant Soil*, vol. 437, p. 397–411. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03988-0>
- SHTARK, O.YU., LABUTOVA, N.M. 2014. Tradicionnye metody raboty s arbuskulyarno-mikoriznymi gribami [Traditional methods of working with arbuscular mycorrhizal fungi]. SPb: GNU VNIISKHM, 44 p. [In Russian].
- SOBOWALE, A.A. 2019. Probable effects of dual Inoculation of maize (*Zea mays*) stem with *Fusarium verticillioides* and certain *Trichoderma* Species on fumonisin content of maize seeds. In *American Journal of Plant Sciences*, vol. 10(5), p. 752–759. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.105055>
- SOGONOV, M.V., VELIKANOV, L.L. 2004. Soil microfungi from alpine and subnival ecosystems of the Northwestern Caucasus. In *Mikologiya i Fitopatologiya*, vol. 38(3), p. 50–58.
- SURBHI, D.S., VARMA, A., CHOUDHARY, D.K., BAHUGUNA, R.N., NATH, M. 2019. Biopriming with *Piriformospora indica* ameliorates cadmium stress in rice by lowering oxidative stress and cell death in root cells. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 186(2019), 109741, p. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109741>
- WILKINSON, D.M. 2001. At cross purposes In *Nature*, vol. 412(6846), p. 485. <https://doi.org/10.1038/35087676>
- YURKOV, A.P., KRYUKOV, A.A., GORBUNOVA, A.O., KOZHEMYAKOV, A.P., STEPANOVA, G.V., MACHS, E.M., RADIONOV, A.V., SHISHOVA, M.F. 2018. Molekulyarno-geneticheskaya identifikaciya gribov arbuskulyarnoj mikorizy. [Molecular genetic identification of arbuscular mycorrhizal fungi]. In *Ekologicheskaya genetika*, vol. 16(2), p. 11–23. <https://doi.org/10.17816/ecogen16211-23> [In Russian].