

ХИМИЯ CHEMISTRY

УДК 579.64

Шпота Е.Л.,
научный сотрудник
Шпота Е.Л.,
илимий кызматкер
Shpota E.L.
scientific researcher

Гуцалюк Н.В.,
научный сотрудник
Гуцалюк Н.В.,
илимий кызматкер
Gutsalyuk N.V.
scientific researcher

Джуманазарова А.З.,
доктор химических наук, профессор,
Джуманазарова А.З.,
химия илимдеринин доктору, профессор
Dzhumanazarova A.Z.
doctor of chemical sciences, professor

*Институт Химии и фитотехнологии НАН КР
КР УИАнын Химия жана фитотехнология институту
Institute of Chemistry and fitotechnology NAS KR*

**ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *TRICHODERMA* НА АНТАГОНИЗМ
К *FUSARIUM SP.* ИЗ ПОРАЖЕННОГО СУХОЙ ГНИЛЬЮ КАРТОФЕЛЯ**

**КАРТОШКАНЫН КУРГАК ЧИРИГИНДЕГИ *FUSARIUM SP.* ГА
TRICHODERMA ТУКУМУНДАГЫ МИКРОМИЦЕТТЕРИНИН
АНТАГОНИЗМИН ИЗИЛДӨӨ**

**STUDY OF MICROMYCETES OF THE GENUS *TRICHODERMA*
FOR ANTAGONISM TO *FUSARIUM SP.* FROM POTATOES AFFECTED
BY DRY ROT**

Аннотация. С целью разработки биофунгицида против фузариоза картофеля были протестированы на антагонизм к *Fusarium sp.* 12 микромицетов рода *Trichoderma*, выделенных из разных древесных грибов. Фузарий был выделен из поражённого сухой гнилью картофеля. Для определения антагонизма каждого изолята триходермы к фузарию применялся метод «двойных культур» - выращивание триходермы совместно с фузарием в чашках Петри на агаре. Определены быстро растущие и подавляющие *Fusarium sp.* изоляты триходермы.

Аннотация. Картошканын фузариозуна каршы биофунгицидди иштеп чыгуу үчүн ар кандай дарак козу карындарынан бөлүнүп алынган *Trichoderma* тукумундагы 12 микромицеттер текшерилген. Фузарий кургак чириген картошкадан бөлүнүп алынган. Триходерманын ар бир изолятынын фузарийге антагонизмин аныктоо үчүн «кош культуралар» ыкмасы колдонулду – триходерманы фузарий менен бирге Петри табакчаларында агарда өстүрүү. Тез өсүүчү жана *Fusarium sp.* басуучу триходерма изоляттары аныкталган.

Abstract. In order to develop a biofungicide against potato Fusarium, 12 micromycetes of the genus *Trichoderma* isolated from various wood fungi were tested for antagonism to *Fusarium sp.* Fusarium was isolated from potatoes affected by dry rot. To determine the antagonism of each trichoderm isolate to fusarium, the method of “double cultures” was used - growing trichoderm together with fusarium in Petri dishes on agar. Fast-growing and suppressing *Fusarium sp.* trichoderm isolates were identified.

Ключевые слова: антагонизм, патоген, *Trichoderma*, *Fusarium*.

Негизги сөздөр: антагонизм, патоген, *Trichoderma*, *Fusarium*.

Keywords: antagonism, pathogen, *Trichoderma*, *Fusarium*

В настоящее время в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами в почве и на растениях, а также для ускорения компостирования широко используются биопрепараты на основе микромицетов рода *Trichoderma*, которые быстро размножаются в условиях культуры, выделяют множество активных веществ, антибиотиков, ряд гидролитических ферментов. Виды триходермы не вызывают заболеваний у растений, животных и человека, так как являются сапрофитами - могут размножаться только на мёртвых растительных остатках или других грибах.

Род *Trichoderma* широко изучался на способность противостоять растительным патогенным грибам, и его механизмы биоконтроля включают более высокую скорость роста по сравнению с патогеном, выработку антибиотиков для конкуренции за питательные вещества и жизненное пространство с патогенами, микопаразитизм с выработкой ферментов, разрушающих клеточную стенку патогенов и способность индуцировать защитную систему растений [1].

В связи с тем, что микромицеты этого рода из разных мест обитания могут иметь особые свойства, важной задачей является поиск новых местных штам-

мов *Trichoderma* и создание на их основе эффективных биопрепаратов.

Картофель широко используется в Кыргызстане как продукт питания, но большей частью продовольственный картофель повреждён грибом-микромицетом фузарием, вызывающим гниль клубней в хранилищах, где происходит заражение от больных клубней, инфицированных ещё в поле. При хранении на клубнях картофеля развивается фузариозная сухая гниль, достигая максимума к концу периода хранения. При высадке заражённых клубней происходит инфицирование новых растений. При сильном распространении фузариоз может снизить урожайность картофеля на 40 %. Биологические методы защиты растений на основе биопрепаратов стали популярны во всём мире благодаря возможности контролировать развитие заболеваний без применения средств химической защиты или значительном их сокращении [1].

Цель данной работы – исследование местных изолятов триходермы на скорость роста и оценка их антагонистических свойств по отношению к фузарию, выделенного из картофеля. В перспективе рассматривается применение полученных

антагонистов в создании безопасных био-фунгицидов, которые могут быть использованы для обработки клубней в картофелехранилищах и почвы под картофель для уменьшения рисков заражения фузариозом.

Методы исследования

Изолят фузария *Fusarium sp.* был выделен из поражённого сухой гнилью клубня картофеля. Изоляты триходермы получены из древесных грибов и первоначально отобраны по скорости роста на агаре Чапека. Принадлежность изолятов к родам фузариум и триходерма выросших на агаре Чапека определялась под микроскопом по характерным для этих родов строению конидиеносцев и конидий.

Для определения антагонистической активности по отношению к *Fusarium sp.* все отобранные изоляты триходермы выращивались в двойной культуре с фузариумом на агаре Чапека и картофельном агаре (PDA) при комнатной температуре +20 °С (первая серия опытов) и при температуре от +13°С до +17 °С на PDA (вторая серия опытов). Стерилизация сред проводилась в автоклаве 30 минут при давлении 1 атмосфера.

В чашки Петри диаметром 9 см с агаром с помощью микробиологической петли наносились диаметрально противоположно споры и частички мицелия – фузария с одной стороны и триходермы – с другой. Далее проводилось сравнение роста фузария и культур 12 изолятов триходермы на агаре Чапека и PDA.

Результаты и обсуждение

Деление культур триходермы по механизмам подавления фузария.

Изоляты триходермы по мере роста при температуре +20°С (первая серия опытов) показали отличия в механизме подавления

фузария, по которым мы смогли предварительно разделить их на две группы (таблица 1).

1-я группа изолятов триходермы (левая половина таблицы 1) быстро подавляла развитие фузария, конкурируя за питательные вещества и пространство и нарастая на колонию фузария. На обратных сторонах чашек видно, что жёлто-коричневые колонии фузария значительно меньше, чем колонии фузария второй группы.

2-я группа культур триходермы (правая половина таблицы 1) проявила ярко выраженный микопаразитизм. Культуры этой группы изолятов триходермы нарастали на колонии фузария, но не сильно подавляли его рост. Фузариум продолжал развиваться и после захвата триходермой его колонии, образуя белый мицелий вокруг, что особенно хорошо видно через три недели культивирования.

Развитие культур при разных температурах

Сравнение 12 культур триходермы первой (растущих при температуре +20°С) и второй (при температурах от +13 до +17°С) серий опытов показало значительное отставание в скорости роста всех культур при пониженных температурах по сравнению с ростом в более тёплых условиях.

Рост фузария и триходермы при +20°С начинался на вторые сутки. При этой температуре рост всех культур был интенсивный, и на 10-е сутки все культуры триходермы заняли пространства своих чашек, ограничивая рост фузария, но по-разному подавляя его. Наибольшую скорость роста показал изолят №2, который через 3 дня после инокуляции занял более 90% чашки Петри. На рисунке 1 показана разница в росте этого изолята при разных температурах.

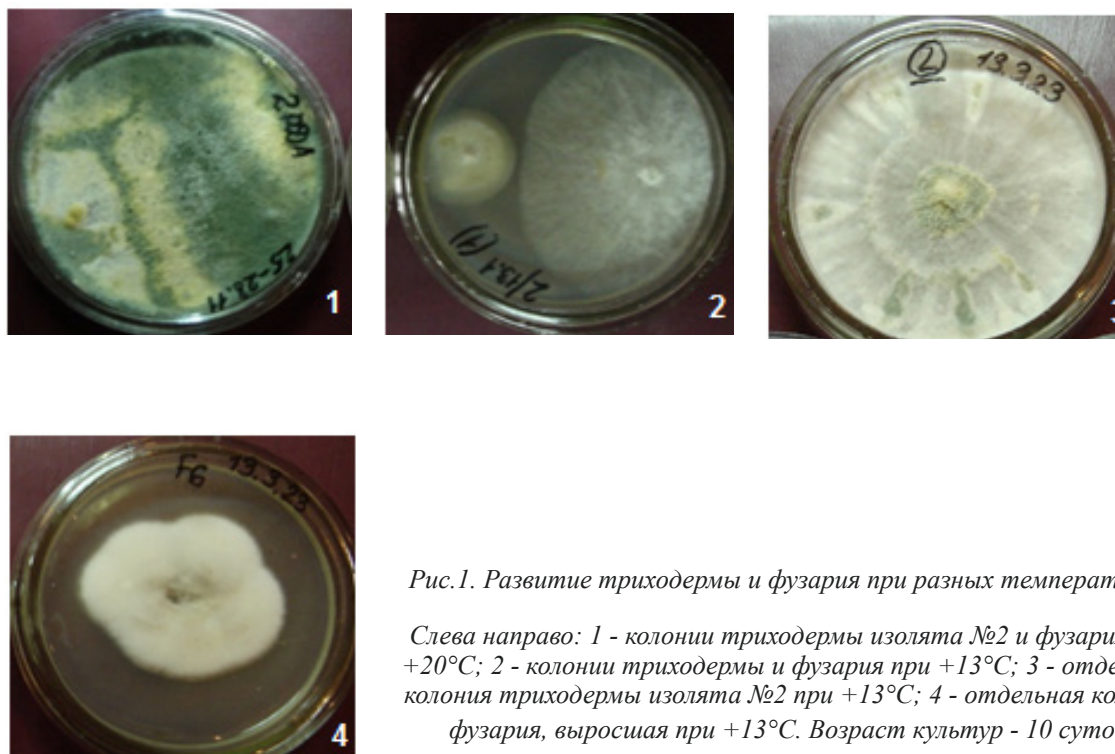


Рис.1. Развитие триходермы и фузария при разных температурах.

Слева направо: 1 - колонии триходермы изолята №2 и фузария при +20°C; 2 - колонии триходермы и фузария при +13°C; 3 - отдельная колония триходермы изолята №2 при +13°C; 4 - отдельная колония фузария, выросшая при +13°C. Возраст культур - 10 суток.

Триходерма образует конидии белого, зелёного, жёлтого цветов по мере их созревания. При температуре +13°C (вторая серия опытов) рост всех культур стал заметен на третьи сутки. На 10-е сутки в чашках с культурами изолятов 1-й группы вырос

радиальный рыхлый мицелий триходермы. Наибольшую скорость роста и при пониженной температуре показала культура изолята №2 (рис.1). Культуры триходермы изолятов 2-й группы при +13°C образовали более плотные колонии меньшего диаметра (рис.2).

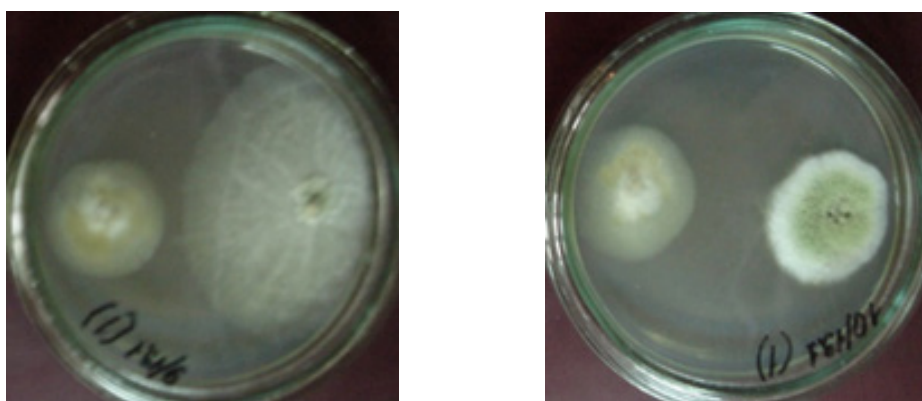
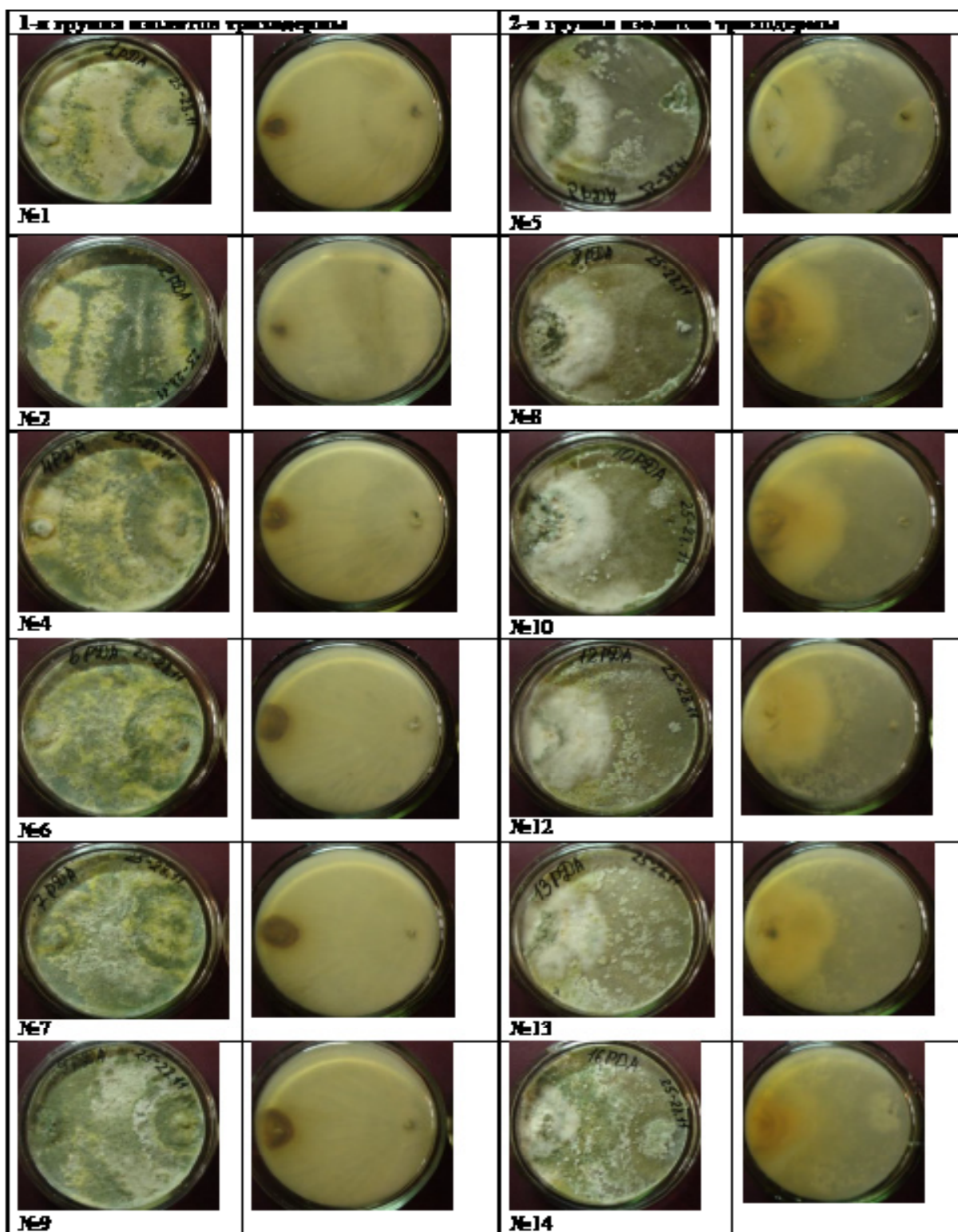


Рис.2. Колонии фузария и триходермы в культурах: 1-й группы - изолят №9 и 2-й группы - изолят №10 (фото справа). Фузариий растёт по левые стороны чашек. +13°C возраст культур -10 суток.

Различия между двумя группами триходермы по характеру подавления фузария стали особенно видны через три недели

культивирования. В таблицах 1 и 2 представлены фото 25-суточных культур изолятов триходермы и фузария, растущих при разных температурах (две серии опытов).

Таблица 1. Две группы двойных культур изолятов триходермы с разным механизмом подавления фузария рост при +20 °С. Возраст – 25 суток



При росте культур от +13 °С до +17°С на 25 сутки отличия между двумя группами изолятов триходермы также стали более чёткими (таблица 2). Как и при +20°С, 1-я

группа изолятов триходермы показала более быстрый рост по сравнению со 2-й группой. В 1-й группе, впереди растущей триходермы проявлялась быстро зарастающая прозрачная зона подавления.

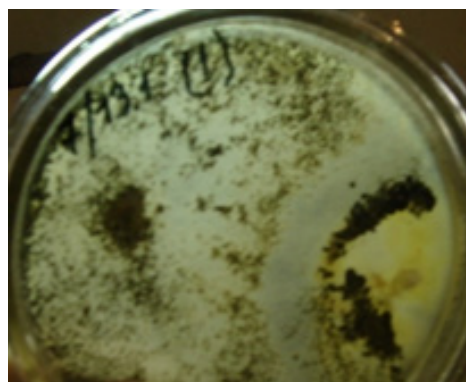


Рис.3 Проявление прозрачной зоны подавления при пониженных температурах у изолята триходермы №7. Слева – 17 суток. Справа – 40 суток





В культуре изолята №7 дольше чем у остальных культур оставалась прозрачная зона подавления роста, возможно за счёт выделения микотоксинов. В других культурах эта зона исчезала быстрее, зарастая мицелием триходермы. Сходные результаты указаны в работах [2, 3].

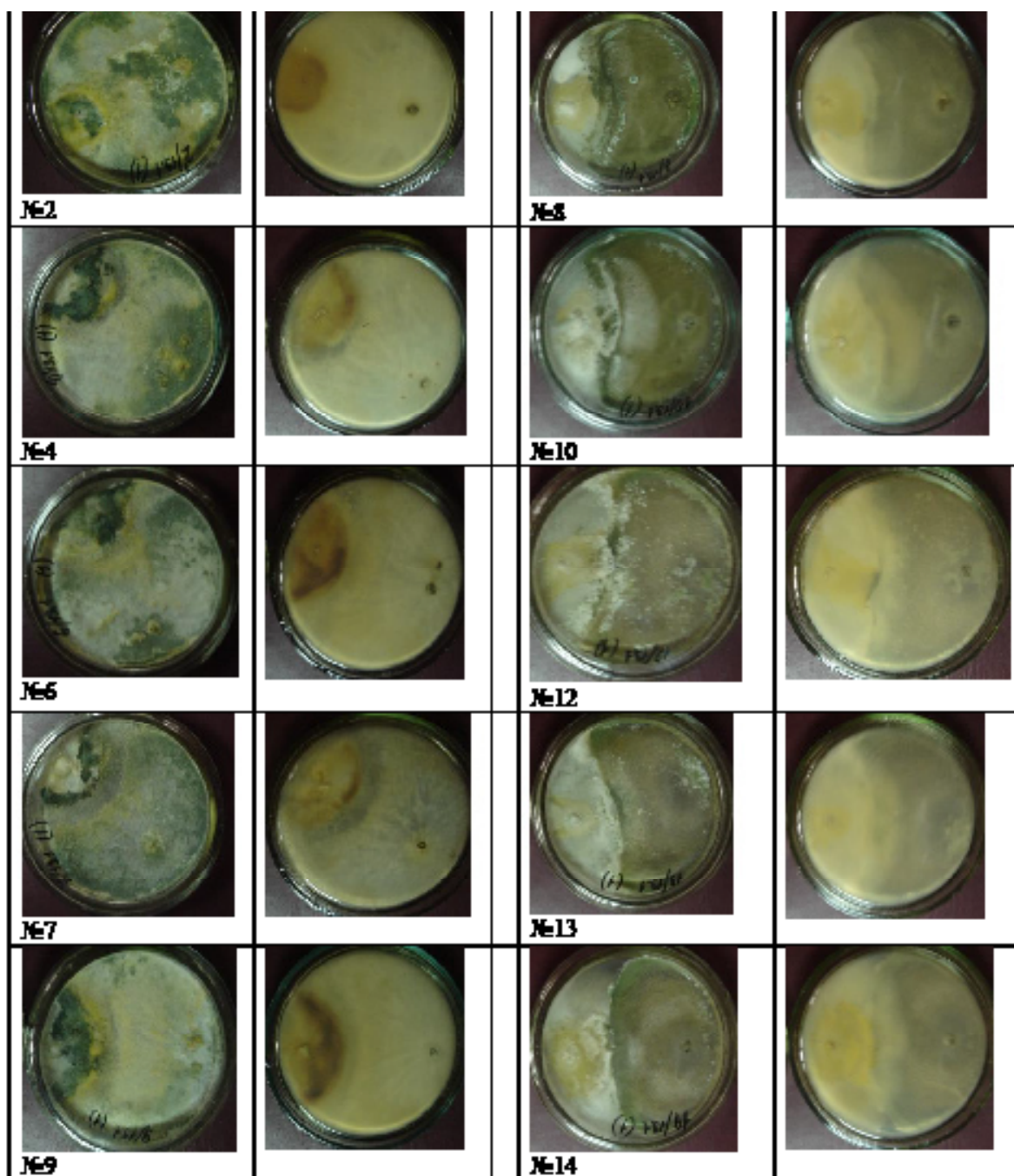
Кроме того, наблюдалось более сильное, чем при +20°С зарастание колоний фузария зелёными конидиями, что видно по левые стороны чашек.

Изоляты триходермы 2-й группы при пониженных температурах также показали отличия в развитии и подавлении фузария по сравнению с ростом при +20°С. В та-

блице 2 (правая половина) представлены фото, показывающие, что триходерма росла на границе колонии фузария, образуя полосы разной ширины и интенсивности у представленных культур. Изолят №5 показал прозрачную полосу подавления, более выраженную, чем у других изолятов этой группы, и наиболее сильно подавлял рост фузария. Другие изоляты триходермы этой группы (№8,10,12,13,14) фузарий подавляли не полностью, происходил его дальнейший рост за пределами колонии, но с меньшей интенсивностью, чем при +20°С. Колонии фузария на всех фото расположены на левой стороне чашек Петри, триходерма – на правой.

Таблица 2. Две группы разных культур изолятов триходермы с разными механизмами подавления фузария рост при +13, +17 С. Возраст – 25 суток

1-я группа изолятов триходермы		2-я группа изолятов триходермы	
			
№1		№5	



Быстрый рост изолятов *Trichoderma* даёт преимущество в подавлении роста патогенов, конкурируя за пространство и питательные вещества еще до того, как они выделяют микотоксины, что было характерно для 1-й группы изолятов при +20°C. Обильное образование конидий, наблюдаемое в чашках Петри - это свидетельство микопаразитизма, который является одним из механизмов подавления у видов *Trichoderma* sp. [3].

Из многочисленных исследований известно, что виды *Trichoderma* обычно используют множество механизмов биоконтроля для подавления растительных патогенных грибов [4].

Заключение

Проведённые исследования показали, что быстро растущие изоляты триходермы обладают преимуществом в подавлении фу-

зария, так как побеждают в конкуренции за питательные вещества и пространство. Чем выше температура, тем быстрее развивается триходерма и подавляет развитие фузария. Самое быстрое развитие было у изолята №2 при всех температурах и соответственно – наилучшее подавление фузария.

При пониженных температурах проявились способности культур изолятов 1-й группы выделять микотоксины (образовывать зоны подавления фузария).

Один изолят триходермы 2-й группы (№5) подавлял рост фузария при пониженных температурах, образуя интенсивную полосу зелёных конидий на границе с фузарием после выделения микотоксинов (прозрачная зона). При +20°C этот же изолят проявил микопаразитизм, но слабо подавлял развитие фузария, как и остальные изоляты этой группы.

Литература

1. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. Ф.К.Алимова. – Казань: Казанский государственный университет им.В.И.Ульянова-Ленина, – 2006. – 209с.
2. Бекмаханова Н.Е., Момбекова Г. А., Шемшура О.Н., Сейтбатталова А.И. Вестник КазНУ. Серия биологическая. №3 (65). –2015. –179-183с.
3. Ann Jhudeil C. Santos, Cynthia C. Divina¹, Federico G. Pineda¹ and Lani Lou Mar A. Lopez. International Journal of Agricultural Technology –2017. Vol. 13(7.3): – 2539-2548.
4. Dugassa et al. Alemayehu Dugassa¹, Tesfaye Alemu and Yitbarek Woldehawariat BMC Microbiology (2021) 21:115.

Культуры триходермы у подавляющего большинства исследователей выращивались в термостатах при температуре 25°C или выше. Нами проведены исследования роста триходермы при более низких и меняющихся температурах в комнатных условиях, более близким к природным условиям весной и осенью. Кроме того, низкие температуры в картофелехранилищах требуют для биоконтроля фузариоза штаммов триходермы, способных развиваться при пониженных температурах. Температура влияет на развитие триходермы в большей степени, чем на развитие фузария, используемого в данных экспериментах.

Мы пришли к заключению, что выделенные нами изоляты триходермы используют разные механизмы подавления фузария при разных температурах роста.