

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ДВУХ ВИДОВ ГРИБА *TRICHODERMA* В ОТНОШЕНИИ ПАТОГЕНОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Светлана НИКОЛАЕВА, Аркадий НИКОЛАЕВ, Виктория ШУБИНА

*Институт генетики, физиологии и защиты растений АН Молдовы*

### ACȚIUNEA COMPARATIVĂ A DOUĂ SPECII DE *TRICHODERMA* ASUPRA AGENȚILOR FITOPATOGENI AI CULTURILOR AGRICOLE ÎN CONDIȚII *IN VITRO*

În articol sunt prezentate date privind interacțiunea dintre *Trichoderma harzianum* și *Trichoderma lignorum* (câte două izolate de fiecare specie) și agenții patogeni ai culturilor agricole. Speciile de *Trichoderma* în condiții *in vitro* limitează creșterea agenților patogeni, schimbă structura coloniilor lor, urmată de popularea parțială sau totală a acestora.

Izolatul de *Fusarium* din rădăcina vătămată de sfeclă limitează creșterea tuturor izolatelor de *Trichoderma*, modificând culoarea coloniilor lor din verde în galbenă. În mod similar acționau asupra coloniilor de *Trichoderma* antibioticii de *Bacillus subtilis*.

**Cuvinte-cheie:** *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, fitopatogeni, caracter de interacțiune.

### COMPARATIVE ACTION OF TWO *TRICHODERMA* SPECIES AGAINST PHYTOPATHOGENS OF AGRICULTURAL CROPS UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Data on nature of interaction *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma lignorum* (on two isolates of each species) with pathogens of agricultural crops are submitted. *Trichoderma* species in the *in vitro* conditions have limited growth of pathogens, changed structure of their colonies, in whole or in part occupying them. *Fusarium* sp. isolate from the damaged root of sugar beet limited growth of all *Trichoderma* isolates, changed color of their colonies from green to yellow similar to action of *Bacillus subtilis*.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, phytopathogen, nature of the interaction.

В научной литературе накоплен обширный материал по применению биопрепаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в защите растений от болезней. Из всех биопрепаратов грибного происхождения биопрепараты на основе грибов рода *Trichoderma* применяются наиболее часто. Исследователями и практиками отмечается их высокий стимулирующий и защитный эффект на различных сельскохозяйственных культурах.

Весьма перспективно использование препаратов на основе грибов р. *Trichoderma* в борьбе с корневыми гнилями растений. Корневые гнили в настоящее время – это бич полей, занятых под зерновые, зернобобовые, овощные, технические и другие культуры. Особую опасность представляют фузариозные корневые гнили. Грибы рода *Fusarium* зачастую не специализированы, поэтому соблюдением лишь севооборотов не всегда можно решить проблему защиты культур от фузариозов. Однако большинство фузариумов способны продуцировать такие сильные фитотоксины, как фузариевая кислота, никотиновая и др. [2], а также антибиотики, которые могут подавлять микробы-антагонисты, присутствующие в почве или вносимые в нее с биопрепаратами.

Этиология корневых гнилей, особенно вызываемых видами фузариумов, очень сложна. В заражении могут принимать участие не один, а несколько патогенов. Между различными видами фузариумов возникает конкуренция, а складывающиеся условия выращивания культуры могут определить, какой из видов станет доминантным и, как следствие этого, – степень развития заболевания и характер его проявления.

В Ставропольском крае за 3 года (2009-2012) площади заражения пшеницы фузариозными корневыми гнилями увеличились в 4 раза [7]. Причину этого авторы видят в увеличении объемов обработки почвы по минимальным технологиям, в насыщении севооборотов зерновыми культурами, заделке соломы в почву и др.

На подсолнечнике в Краснодарском крае выделено 20 видов и разновидностей грибов рода *Fusarium* [1].

Фузариозный патогенный комплекс на ржи в Центральных регионах России (исследовано более 20 тысяч изолятов) включал 14 видов. С изменением климатических условий преобладал тот вид, для которого складывались более благоприятные условия [6].

Анализ образцов пораженных растений огурцов в тепличных хозяйствах Молдовы показал, что более чем в 70% образцов были выделены грибы рода *Fusarium* (восемь видов и шесть разновидностей). В хозяйствах с низкой агротехникой количество видов и разновидностей доходило до девяти и практически включало все обнаруженные в Молдове виды [4].

Наш многолетний опыт применения триходермина против фузариозной и белой гнили огурцов в различных тепличных хозяйствах Молдовы постоянно показывал высокий стимулирующий эффект от применения препарата и не всегда равнозначный защитный, что связано, по-видимому, с участием в патологическом процессе комплекса патогенов с неодинаковым характером взаимодействия патогенов и триходермы. Защитный эффект в большей степени проявлялся в хозяйствах с высокой агротехникой.

Вегетационные опыты и опыты в рассадных отделениях теплиц по подбору оптимальных доз триходермина показали, что с увеличением нормы внесения от 0,5 до 5 г / растение увеличивался стимулирующий эффект. Дальнейшее увеличение дозы препарата было нецелесообразным. На высоком инфекционном фоне фузариума дозы триходермина, оптимальные для условий стерильной почвы, усугубляли действие патогена [5]. И только при снижении инфекционного фона применение триходермина давало защитный эффект.

Микробиологический препарат триходермин, помимо использования непосредственно в защитных мероприятиях, может найти применение и в системе подготовки почвы – опрыскивании измельченных пожнивных остатков перед вспашкой, что приводит к разрушению покоящихся стадий возбудителей болезней и превращению органических веществ в легкоусваиваемую форму. По данным российских исследователей внесение 6 литров триходермина на гектар по своему действию равноценно внесению 10-15 т органических удобрений.

**Материал и методы исследования.** В условиях *in vitro* заложен опыт с антагонистами рода *Trichoderma*: *T. harzianum* (два изолята), *T. lignorum* (два изолята), патогенами родов *Fusarium* (два изолята), *Alternaria* (один изолят), *Rhizoctonia* (один изолят), *Sclerotinia* (один изолят), *Phytophthora* (один изолят) и культурами *Bacillus subtilis* (два изолята).

Использован метод встречных культур. Отдельно были взяты чашки Петри с патогенами и четырьмя изолятами триходермы. Все взятые тест-культуры являются патогенами растений, а грибы рода триходерма и бактерии *Bacillus subtilis* – известные антагонисты, нашедшие применение в качестве продуцентов микробиологических фунгицидов.

Культуры патогенов и грибов-антагонистов высевали по шаблону в диаметрально противоположные точки чашки Петри на расстоянии 5 мм от края чашки и 80 мм между культурами. Контролем служили культуры грибов-антагонистов и фитопатогенов, высеянные порознь. Учеты проводили на 3-и, 5-е и 7-е сутки роста. Отмечали линейный рост культур патогенов и антагонистов (радиус в мм), их внешний вид и характер взаимодействия. Среда – картофельно-сахарозный агар (КСА). Температура культивирования 26°C. Опыт закладывали в трехкратной повторности. Данные обрабатывали с помощью программ Microsoft Office Excel.

**Результаты исследований.** Из шести взятых патогенов три можно отнести к быстрорастущим, а три – к медленно растущим. Так, на седьмые сутки культивирования радиус колонии *R. solani* составил 72,7±2,7 мм, *S. sclerotiorum* – более 80 мм, *P. infestans* уже на третьи сутки заняла всю поверхность среды (более 80 мм). В то же время на 7-е сутки роста радиус колонии *A. alternata* достиг 31,7±1,7 мм, *F. oxysporum* var. *orthoceras* – 43,0±0 мм, *F.sp.* – 22,0±1,0 мм.

Скорость роста всех четырех изолятов триходермы была близкой, хотя изолят *Tr.harzianum* 1 по скорости линейного роста несколько уступал другим изолятам (через 5 суток роста радиус его колонии составлял 54,5 ± 1,5 мм против 75,3 ± 1,5 мм у *Tr. harzianum* 2; 67,0±3,5 мм – у *Tr. lignorum* 2; 70,7±1,8 мм – у *T.lignorum* 1.

На 7-е сутки культивирования все культуры полностью заселили поверхность питательной среды в чашках Петри.

Результаты анализа взаимодействия антагонистов и фитопатогенов для большей наглядности сведены в таблицу.

Все четыре изолята триходермы в условиях *in vitro* ограничивали рост всех использованных патогенов. Из таблицы видно, что представители *T.harzianum* проявили антагонистические свойства в большей степени, чем *T. lignorum*, а внутри вида изолят *T. harzianum 2* был активнее, чем *T. harzianum 1*, а *T. lignorum 2* – более активным, чем *T.lignorum 1*.

Таблица

Характер взаимодействия гриба *Trichoderma* с патогенами растений

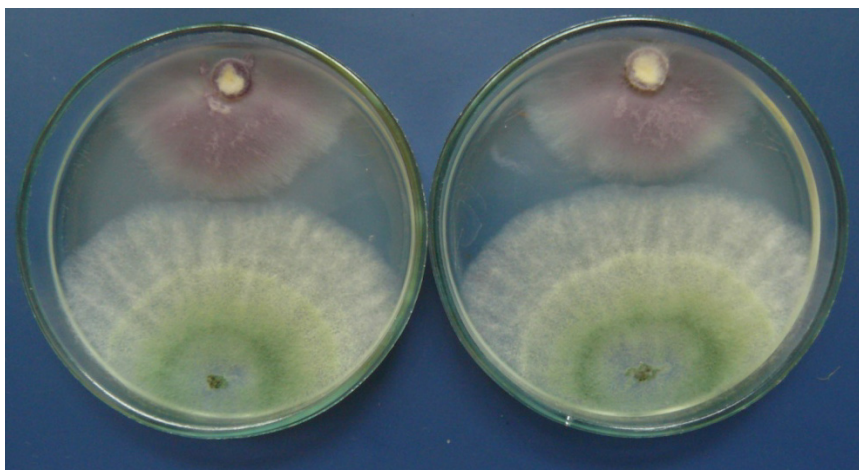
Патоген	Вид и штамм триходермы			
	<i>Trichoderma harzianum</i>		<i>Trichoderma lignorum</i>	
	<i>Trichoderma harzianum - 1</i>	<i>Trichoderma harzianum - 2</i>	<i>Trichoderma lignorum - 1</i>	<i>Trichoderma lignorum - 2</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	D (100%)	D (100%)	C	D (60%)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	B	C	C	C
<i>Phytophthora infestans</i>	B	D (100%)	D (40%)	D (100%)
<i>Alternaria alternata</i>	B	B (80%)	A	A
<i>Fusarium oxysporum var. orthoceras</i>	B	D (100%)	A	A
<i>Fusarium sp.</i> (из корнеплода свеклы)	E	E	E	E

Условные обозначения:

- A – ограничение роста патогена без изменения внешнего вида колонии;
- B – ограничение роста патогена с изменением внешнего вида (колония как бы «прижата» – *Fusarium oxysporum*, *Alternaria*, или «пропитана» водой – *Phytophthora infestans*);
- C – ограничение роста с изменением внешнего вида колонии (на стыке колоний образование мицелиального валика – *Sclerotinia sclerotiorum*, или ярко выраженной темной полосы – *Rhizoctonia solani*);
- D – ограничение роста патогена, заселение колонии патогена триходермой (% заселения);
- E – ограничение роста патогена, наличие зоны задержки роста между колониями патогена и антагониста, вызванное патогеном.

Различные патогены по-разному реагировали на триходерму. Изоляты фузариума труднее подавлялись триходермой по сравнению с другими патогенами, что неоднократно отмечалось нами в предыдущих опытах.

Неоднозначно вели себя одни и те же изоляты триходермы в отношении двух изолятов *Fusarium* – *F. oxysporum var. orthoceras*, выделенного из томата, и *F. sp.*, выделенного из пораженного гнилью корнеплода сахарной свеклы (рис.1 и рис.2).

Рис.1. *Fusarium* из томата и *T.harzianum*.

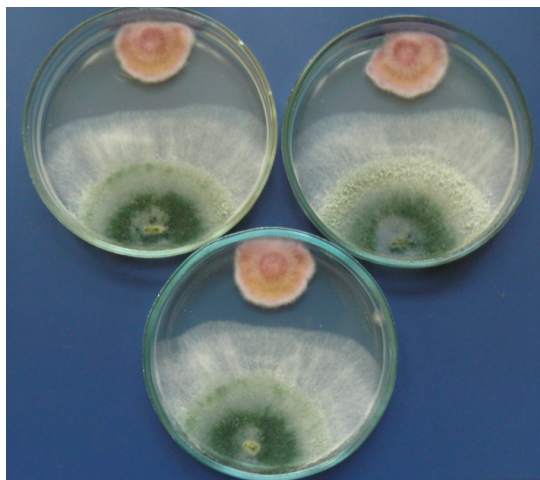


Рис.2. *Fusarium* из сахарной свеклы и *T.harzianum*.

Неоднозначная реакция разных видов грибов р.*Fusarium* на действие микробов-антагонистов отмечена и другими исследователями [3]. Так, испытание в условиях *in vitro* 3-х культур *Bacillus subtilis* (продуцентов биопрепаратов Алирин Б, фитоспорин и бактофит), одной культуры *Pseudomonas fluorescens* и 2-х культур *Ps. aureofaciens* (продуцентов биопрепаратов Планриз и Гаупсин) в отношении 4-х видов грибов рода *Fusarium*, патогенов пшеницы, показало, что все 6 опытных штаммов бактерий практически не оказывали никакого антагонистического действия только на рост *Fusarium graminearum*.

Обращает на себя внимание факт наличия зоны задержки роста между колонией *F. sp.* и всеми четырьмя изолятами триходермы. Характер зоны свидетельствует о том, что зона – результат действия не триходермы, а фузариума.

Со временем эта зона несколько уменьшилась. Впоследствии *T.harzianum* 2 заселяла колонию *F. sp.*; но при этом изменялся цвет колонии триходермы: из изумрудной она становилась желтой (рис.3). С таким явлением мы встречались, когда триходерма попадала в неблагоприятные для нее условия, например – в случае затрудненной аэрации при наработке триходермина на сыпучих средах в местах соприкосновения полиэтиленовой пленки, поддерживающей влажность в камере с зерном. Такое явление отмечалось также в ответ на диффузию в среду антибиотических веществ, продуцируемых *B. subtilis*. Эти изменения носили фенотипический характер, так как после переноса желтого фрагмента колонии на обычную питательную среду вырастала колония характерного для изолята зеленого цвета.

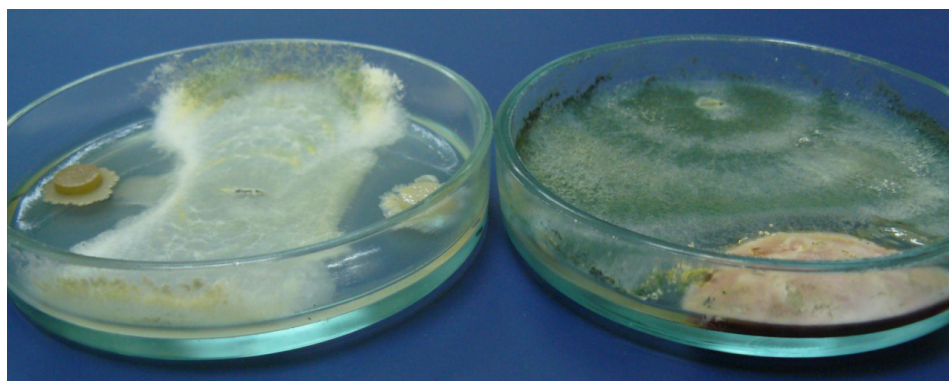


Рис.3. *T. harzianum* и *Bacillus subtilis*.

Ранее мы уже наблюдали, что фузариумы могли нарастать на колонии триходермы, подрастать под них, но не отмечали наличия стерильных зон между колониями фузариума и триходермы, вызванных действием фузариума. По-видимому, изолят *Fusarium sp.*, выделенный из корнеплода сахарной свеклы, продуцирует антифунгицидные вещества, задерживающие рост всех испытанных изолятов триходермы.

**Выводы**

Изоляты *Trichoderma harzianum* и *Trichoderma lignorum* ограничивали линейный рост всех патогенов. *T.harzianum*-2 проявила защитные свойства в наибольшей степени.

*Fusarium sp.*, выделенный из корнеплода сахарной свеклы, проявил антагонистические свойства по отношению ко всем изолятам триходермы, ограничивая их рост и вызывая изменение цвета колонии из зеленого в желтый, аналогично действию антибиотических веществ *Bacillus subtilis*.

Комплексом агротехнических мероприятий необходимо снижать общую инфекционную нагрузку, а в качестве продуцента биопрепарата подбирать изолят, активный в отношении наиболее агрессивного патогена.

**Библиография:**

1. АСАТУРОВА, А.М. Испытание опытных образцов новых биопрепаратов против возбудителей фузариоза на подсолнечнике. В сб.: *Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию ВНИИБЗР. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем»*. 21-24 сентября, 2010 г. Краснодар, 2010, Вып.6., с.457-461.
2. БИЛАЙ, В.И. *Фузариозы*. Киев: Наукова думка, 1977. 443 с.
3. ВЕЗЕНКО, О.В. Антагонистическая активность штаммов-продуцентов биопрепаратов по отношению к грибам-фитопатогенам зерновых культур. В: *Интегрированная защита растений: стратегия и тактика: Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию со дня организации РУП «Институт защиты растений»*. Минск, 5-8 июля 2011 г. Несвиж, 2011, с.171-175.
4. МАРЖИНА, Л.А., НИКОЛАЕВА, С.И., ХАРБУР, М.В. Фузариозы огурцов в защищенном грунте и возможные меры борьбы с ними. В сб. *Микробиологический метод борьбы с болезнями и вредителями растений*. Кишинев: Штиинца, 1984, с.64-69.
5. НИКОЛАЕВА, С.И., ХАРБУР, М.В. Применение триходермина в борьбе с корневыми гнилями огурцов. В сб.: *Болезни сельскохозяйственных культур и их антагонисты*. Кишинев: Штиинца, 1982, с.41-46.
6. ОВСЯНКИНА, А.В. Фузариозный патогенный комплекс на ржи. В: *Защита и карантин растений*, 2004, №8, с.43.
7. СТАМО, П.Д., КУЗНЕЦОВА, О.В. Применение фунгицидов должно быть рациональным. В: *Защита и карантин растений*, 2012, №2, с.5-8.

Prezentat la 11.11.2014