

На правах рукописи

САДЫКОВА Вера Сергеевна

**ЭКОЛОГИЯ ГРИБОВ РОДА TRICHODERMA (PERS: Fr.) БАССЕЙНА
РЕКИ ЕНИСЕЙ, ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И
ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

Специальности:

03.02.12 – Микология

03.01.06. – Биотехнология

(в том числе бионанотехнологии)

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени доктора
биологических наук

Москва - 2012

Работа выполнена на кафедре химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного технологического университета (г. Красноярск) и кафедре микологии и альгологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научные консультанты:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова А.Н. Лихачев
доктор биологических наук, зав. кафедрой микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова А.В. Кураков

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой биохимии ФГБОУ «Казанский государственный университет» имени В.И. Ленина Ф.К.Алимова
доктор биологических наук, руководитель секции коллекции культур ГНЦА М.В. Бибикова
доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии РХТУ имени Д.Г. Менделеева Н.Б. Градова

Ведущая организация:

ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный аграрный университет»

Защита состоится 2012 г в аудитории М-1 в ч. мин. на заседании диссертационного совета Д 501.001.46 в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, ГСП – 2, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет
Факс – (095) 939–3970.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

Автореферат разослан

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

М. В. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Изучение биологии, филогении, распространения, а также ряд аспектов, связанных с механизмами биоконтроля, биосинтеза ферментов и антибиотиков микромицетами рода *Trichoderma*, благодаря их широкому применению в практике, к настоящему времени изучен достаточно подробно (Сейкетов, 1972; Александрова, 2000; Алимова, 2005; Samuels, 1996; 2006). Однако, несмотря на множество исследований, потенциал грибов рода *Trichoderma* не только не исчерпан, но и не до конца раскрыт. К настоящему времени практически отсутствуют данные, связанные с исследованием их аллелохимического воздействия на микробиоту, простейших, беспозвоночные и растения. Установлено, что виды этого рода синтезируют более 200 биологически активных веществ (Rejzo, 2008) и могут успешно применяться в медицине и сельском хозяйстве. Недостаточная изученность биохимического состава видов рода *Trichoderma* не дает возможности безопасного использования их биомассы в кормопроизводстве и других отраслях народного хозяйства и медицины.

Описание видов, распространенных на территории России, касается лишь европейской ее части, сведения о видовом составе *Trichoderma* на территории азиатской части России, в частности, в Сибири, малочисленны. Изучению видов на территории бассейна реки Енисей, протяженность которого составляет более 3 тыс. километров, посвящено небольшое число работ (Якименко, 1996; Прудникова, 2000; Громовых, 2002). Эти исследования носят направленный характер поиска штаммов-продуцентов биопрепаратов защиты растений. На территории бассейна реки Енисей, охватывающей три климатических пояса: арктический, субарктический и умеренный, в которых расположены восемь природных лесорастительных зон, полномасштабные исследования видов рода *Trichoderma* и оценки их экологической значимости не проводились. Не исследована молекулярно-генетическая диагностика видов рода *Trichoderma*, распространенных на территории бассейна реки Енисей.

Целенаправленный поиск видов, обладающих регуляторной активностью по отношению к организмам из разных таксонов, как и выявление среди них продуцентов для биотехнологических производств невозможен без четкого представления об их распространении в экосистемах и проявления функциональных свойств в этих условиях. Созданные коллекции, на основе новых активных штаммов, могут быть потенциалом для отбора штаммов грибов рода *Trichoderma* и использования их в различных сферах биотехнологии, сельского хозяйства и растениеводства.

Цель работы – исследование разнообразия и гетерогенности видов рода *Trichoderma* в наземных экосистемах бассейна реки Енисей и оценка возможности их использования в биотехнологии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- характеристика видового состава и распространения грибов рода *Trichoderma* в различных компонентах наземных экосистем бассейна р. Енисей;
- создание коллекции культур микромицетов рода *Trichoderma*
- изучение гетерогенности видов рода *Trichoderma* (по культурально-морфологическим свойствам, температуре, аэрации, потреблению субстратов, антибиотической активности, чувствительности к тяжелым металлам)
- исследование вегетативной совместимости моноспоровых штаммов рода *Trichoderma*;

Исследование возможности использования штаммов рода *Trichoderma* в биотехнологии:

- поиск штаммов рода *Trichoderma* с высокой антагонистической активностью к фитопатогенным грибам для создания биопрепарата для защиты растений;
- скрининг штаммов, стимулирующих рост хвойных и злаковых растений и идентификация соединений, ответственных за этот эффект;
- изучение биодеструкции растительных субстратов отобранными штаммами при твердофазном культивировании для биотехнологии получения биофунгицидов и усовершенствования технологии вермикомпостирования;
- оценка активности штаммов рода *Trichoderma* к патогенным и условно-патогенным бактериям для создания препаратов, ускоряющих элиминацию этих организмов из почв и органических остатков (компостах)
- испытание полученных опытных образцов биофунгицидов и вермикомпостов против возбудителей болезней хвойных и злаковых растений на естественных и искусственных инфекционных фонах.

Скрининг штаммов по биохимического состава (содержание белка, аминокислотного и липидного состава) мицелия штаммов рода *Trichoderma* для использования как компонента селенсодержащих кормовых добавок.

Изучение противоопухолевой активности штаммов рода *Trichoderma* для отбора продуцентов противоопухолевых препаратов.

Научная новизна. В результате масштабных инвентаризационных исследований ненарушенных лесных почв и агроценозов бассейна реки Енисей составлен список видов *Trichoderma*, среди которых *T. citrinoviride*, *T. hamatum* и *T. atroviride* отмечены впервые. Показано, что возникающие внутривидовые группировки у видов рода *Trichoderma* выполняют роль краевых популяций, осуществляющих освоение новых субстратов и эколого-трофических ниш. Установлена высокая пластичность аэробного и анаэробного метаболизма, что обеспечивает специализацию к субстратам и поддержание численности видов рода *Trichoderma* в различных лесорастительных зонах бассейна реки Енисей. Показано, что неполная изоляция группировок снижает возможность образования гетерокарионов, что в конечном итоге, приводит к морфологическим, культуральным и биохимическим различиям клонов.

В области фундаментальной биотехнологии исследование дает исходный материал для инвентаризации рода *Trichoderma* и теоретического обоснования методов направленного поиска и скрининга промышленно важных штаммов микроорганизмов. Показано, что популяции грибов рода *Trichoderma* являются природным резервуаром для поиска штаммов-продуцентов биологически активных соединений, эффективных для контроля широкой группы организмов: фитопатогенных грибов, условно-патогенных и патогенных бактерий, опухолевых клеток, а также оказывающих влияние на рост высших растений. Стабильность культурально-морфологических признаков является критерием отбора штаммов-продуцентов для получения целевых продуктов в биотехнологии.

Впервые установлена ростстимулирующая активность у выделенных штаммов рода *Trichoderma* в отношении растений и каллусов злаковых и хвойных, связанная со способностью синтезировать вещества ауксиновой природы (индолилуксусную кислоту); отобраны перспективные штаммы для получения биопрепаратов, рекомендованные для стимулирования роста и защиты растений от корневых гнилей, вызываемых фитопатогенами из родов *Alternaria*, *Bipolaris* и *Fusarium*.

В результате исследований биологической активности метаболитов и экстрактов из спор и мицелия штаммов рода *Trichoderma* в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и линий опухолевых клеток изучен механизм токсического действия и даны рекомендации для использования активных штаммов как продуцентов биологически активных противоопухолевых соединений.

Исследован биохимический состав биомассы и культуральной жидкости штаммов *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. koningii* и *T. viride*. Изучено влияние селена на накопление биомассы штаммов рода *Trichoderma* при поверхностном и глубинном культивировании и показана возможность их использования для получения кормовых добавок.

Основные защищаемые положения:

1. Лесные подстилки, верхние горизонты почв и корневые системы древесных растений – ведущие факторы в формировании видового состава и численного пула грибов *Trichoderma*. Представители этого рода предпочитают растительный опад, богатый лигноцеллюлозной органикой, их численность падает в более глубоких горизонтах почв, а также в ризосфере растений, особенно древесных.

2. Абиотические факторы (температура, аэрация, влажность) и субстратная специфичность определяют доминирование определенных видов и популяций рода *Trichoderma*.

3. Качественная популяционная структура видов характеризуется значительной физиологической пластичностью и представляет собой мозаику клонов, с различными типами совместимости, скорости роста, спороношения, антибиотической активности и конкурентоспособности. В большинстве случаев виды представлены агрегатами гетерогенных популяций с разным проявлением частот культурально-морфологических типов.

4. Популяции грибов рода *Trichoderma* являются природным резервуаром для поиска штаммов-продуцентов биологически активных соединений, эффективных для контроля широкой группы организмов: фитопатогенных грибов, условно-патогенных и патогенных бактерий, опухолевых клеток, а также оказывающих влияние на рост высших растений.

Практическая значимость работы. Создана коллекция штаммов рода *Trichoderma*, проведен скрининг штаммов, имеющих потенциальную ценность для производства биопрепаратов стимулирования роста и защиты растений: *T. asperellum* «Mg-6» (ВКПМ F-878 и *T. harzianum* «M99/5» (ВКПМ F-888); вермикомпостов: *T. asperellum* «Mg-97» (ВКПМ F-675); кормовых добавок: *T. asperellum* штамм «ТН-5» и противоопухолевых соединений: *T. asperellum* Т-310 (ВКМ F4340D), *T. harzianum* TV4-1 (ВКМ F4341D) и *T. harzianum* M99/51 (ВКПМ F- 1027).

Показана возможность использования штаммов *T. asperellum* «Mg-6» и *T. harzianum* «M99/5» для переработки отходов предприятий деревообрабатывающей и гидролизной промышленности. Подобран рациональный растительный субстрат для твердофазного культивирования продуцентов. Разработана в лабораторных условиях технология получения биопрепарата Триходермин-М. Нарботана опытная партия биопрепаратов с титром $3.5 \cdot 10^9$ КОЕ/г антагонистически активных штаммов и проведены опытно-производственные испытания биопрепаратов на сеянцах хвойных в лесном питомнике и культурах злаковых растений. Показано положительное влияние биопрепаратов на увеличение урожайности злаков и выход здоровых сеянцев в питомнике.

Апробация работы. Материалы работы докладывались и обсуждались на 1 –м конгрессе микологов России.- Москва, 2002; XIV Congress of European Mycologists, Ялта, 2003; XI съезде Русского ботанического общества «Ботанические исследования в Азиатской России» Новосибирск-Барнаул, 2003; 75 th Anniversary Meeting Canadian Phytopathology Society, Ottawa, 13-16 June, 2004; 9 th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, April 6-8, Vienna, Austria, 2006; 2-й рос. конф. «Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока», 2006; International Symposium “EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme”, June 5-9, 2006, St.-Petersburg; IX Всероссийском популяционном семинаре «Особь и популяция - Стратегия жизни», 2-7 октября, 2006 , Уфа; Международной школы-конференции "Генетика микроорганизмов и биотехнология" посвященной 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна 28 ноября - 1 декабря, Пущино, 2006; 4 Съезда Общества Биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 5 - 7 декабря, Пущино, 2006; International symposium “Best practice in disease, pest and weed management”, 10-12 May, Berlin, 2007; Международной научной конференции «Современные средства, методы и технологии защиты растений». – Новосибирск, 2008; 5 съезде биотехнологов России. – Москва, 2008; VII Международной конференции «Проблемы лесной фитопатологии и микологии», Пермь, 7-13 сентября 2009; Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов», проходившей в рамках Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 15 - 17 марта, Москва, 2010; Всероссийская конференция «Биологически активные вещества», посвященная 90-летию М.С. Егорова, 29-30 ноября, Москва, 2011.

Работа выполнена при финансовой поддержке следующих грантов: РФФИ-офи – №06-04-08040-офи «Создание высокопродуктивных, устойчивых к патогенам форм хвойных растений в культуре *in vitro*, на основе современных достижений в области половой репродукции голосеменных»; РНП.2.2.3.1.2466 Министерства образования и науки РФ «Развитие гербарной коллекции и музея культур грибов Средней Сибири как базы для научно-образовательного процесса»; РФФИ "Енисей" – №090498008 «Биологический контроль биотехнологии сокультивирования хвойных в культуре *in vitro* с биопрепаратами рода *Trichoderma* и *Streptomyces*»;

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 65 печатных работ, в том числе 15 статей в журналах, рекомендованных ВАК. Экспериментальные данные, представленные в диссертации, получены лично соискателем и опубликованы в соавторстве с сотрудниками, работавшими совместно с автором в процессе выполнения исследований.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 8 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Общий объем диссертации ... страниц (основной текст ... страниц, приложение ... страницы). Диссертация содержит ... рисунков и ... таблиц. Список литературы включает в себя ... источников, из них ... на иностранных языках.

Личный вклад автора. Основная работа по получению материала, обобщению результатов и формулированию выводов выполнена лично автором. В выделении отдельных изолятов *Trichoderma* и фитопатогенов, а также полевых испытаниях принимали участие д.б.н., проф. Громовых Т.И., к.б.н., доц. Прудникова С.В., к.б.н., доц. Литовка Ю.А., к.б.н. Заика Н.А., к.б.н. Сенашова В.С. В организации полевых исследований на базе КрасНИИСХ принимали участие д.б.н. Зобова Н.В., на

базе Института Леса им. В.Н. Сукачева д.б.н. Третьякова И.Н., ГУ «Мининский лесхоз» Гребинник Г.В.

Молекулярно-генетические исследования изолятов *Trichoderma* проводились при активной помощи заведующего лабораторией микологии г. Оттава Дж. Биссетта, сотрудника Института химической инженерии в Вене, д.б.н. Дружининой И.А, изолятов фитопатогенных грибов при активной помощи заведующего лабораторией фитопатологии Дж. Лазаровича г. Лондона (Канада), токсикологическую оценку экстрактов спор и мицелия проводили по методу разработанной в МГУПБ под руководством к.б.н. Е.Г. Черемных, оценку полученной пищевой добавки проводили на установке «Искусственный желудок».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цели и задачи исследований, показаны научная новизна и практическая ценность результатов работы.

1 Обзор исследований грибов рода *Trichoderma*: систематика, распространение и биология видов, практическое использование

Целенаправленный поиск видов грибов, обладающих регуляторной активностью в отношении организмов из разных таксонов как в природной среде, так при их интродукции в агросистемы, а также выявление среди них продуцентов, способных синтезировать те или иные биологически активные вещества, не возможен без четкого представления об их распространении в экосистемах, особенностей эколого-трофических ниш и проявления функциональных свойств в этих условиях. В равной мере это относится и к представителям рода *Trichoderma*, которые, входя гетеротрофный блок микроорганизмов, влияют на почвообразовательные процессы, улучшая структуру почвы, участвуя в образовании гумуса за счет биоконверсии и минерализации растительных остатков и регуляции комплекса микробиоты почв, ограничивая развитие фитопатогенных видов. Доминирование грибов *Trichoderma* в микробоценозах связано с реализацией в экосистемах различных типов гетеротрофного и биотрофного взаимодействий с микробиотой и макробиотой (путем паразитизма и даже оппортунистического эндофитизма, и способностью разрушать органический материал и сохранять супрессивность почв).

С момента первого описания этого рода в 1794 г по 1969 г было дано морфологическое описание 8 агрегатов рода *Trichoderma*, за последующие 20 лет (к 1991 г) число описанных видов возросло до 27. В эру молекулярно-генетического анализа наблюдается критический пересмотр старой систематики *Trichoderma*, основанной на морфологических критериях. В результате количество видов *Trichoderma* к 2002 г возросло до 46. Мультигенный филогенетический анализ позволили выявить 88 видов *Trichoderma* к 2005 г. С помощью компьютерной программы Barcode к началу 2006 г. определено 110 видов. Предполагается, что в ближайшие годы количество видов *Trichoderma* может достигнуть 130 и более.

В настоящее время исследования рода *Trichoderma* идут параллельно по трем направлениям: (а) биоразнообразие и распространение в различных регионах биосферы, (б) скрининг видов, перспективных для биотехнологии из новых выделенных и описанных изолятов *Trichoderma* и (в) разработка методологии быстрой и правильной идентификации и построения филогенетического древа рода

Trichoderma /Hypocrea.

2 Объекты и методы исследований

Объекты исследований. В работе использовали созданную коллекцию видов грибов рода *Trichoderma*, состоящую из 611 штаммов, выделенных из почв различных лесорастительных зон на территории бассейна реки Енисей, плодовых тел, образцов растительного материала и семян растений. Штаммы поддерживаются в коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова и Центре биотехнологии и микологии СибГТУ.

Оценку антагонистической активности штаммов рода *Trichoderma* проводили с использованием тест-культур фитопатогенов злаков: *Alternaria sp.*, *B. bicolor*, *B. ellisii*, *B. nodulosa*, *B. zeaе*, *F. chlamydosporum*, *F. heterosporum*, *F. sambucinum*, *F. solani* и *F. sporotrichioides* из коллекции Центра биотехнологии и микологии СибГТУ.

В качестве тест-объектов для определения ростстимулирующей активности были использованы семена и каллусы: лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb), сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour), сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), пшеницы линии «КС-1554», пшеницы яровой линии «КС-1607», ячменя сорта «Красноярский-80». Эксплантатами для индукции каллуса злаковых служили незрелые зародыши семян ячменя и пшеницы, для хвойных растений использовали незрелые зиготические зародыши элитных деревьев-доноров.

Анализ противоопухолевой активности проводили на линиях клеток: асуитной карциномы Эрлиха, HaCaT – кератиноциты человека; НЕК 293Т-клетки эмбриональной почки человека и K562- линия клеток хронической миелоидной лейкемии. Анализ антибактериальной активности проводили на условно-патогенных бактериях из коллекции КрасГМА (23 штамма) и резистентных госпитальных стафилококках (11 штаммов), выделенных из больных людей из коллекции Института Проблем Севера СО РАН. Биотестирование на токсичность проводили на двух тест-объектах простейших: *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*.

Методы исследования

Образцы почвы отобраны в соответствии с правилами отбора проб для микробиологического анализа (Методы ... , 1991). Выделение изолятов грибов рода *Trichoderma* из образцов почв, ризосферы, ризопланы корней и филлопланы, растительных остатков, плодовых тел макромицетов проводили в 1997 – 2008 гг. на территории бассейна реки Енисей по методу Д.Г. Звягинцева (Звягинцев, 1990). Идентификацию штаммов рода *Trichoderma* проводили по культурально-морфологическим (Александрова с соавт., 2001; Chaverri et al., 2003; Samuels, 2003) и генетическим признакам (Druzhinina et al., 2005). Морфологическую идентификацию проводили по следующим признакам: строение репродуктивных органов, очертание спор, размеры мицелия (методом сканирующей электронной микроскопии). Для подтверждения видовой принадлежности проводили генетическую идентификацию под руководством к.б.н., Тухбатовой Р.Э., за что автор выражает ей благодарность. Исследовались участки ядерной рДНК, содержащий ITS1 и 2 и ген *tef1*. Результаты секвенирования фрагмента гена *tef1* обрабатывали при помощи пакета программ Lasergene 5.03 (DNASTAR, Inc., США). Для анализа секвенсных хроматограмм использовали программу SeqMan и дальнейшим выравниванием последовательностей и экспорта их в формате GCG с использованием программы MegAlign. Молекулярную идентификацию нуклеотидных последовательностей проводили с

использованием программы TrichoMark – TrichoBLAST.

Моноспоровые культуры грибов получали методом разведения конидиальной суспензии на жидких питательных средах с добавлением глицерина (Лихачев, 1994). О стабильности моноспоровых и исходных штаммов судили по их разделению на культурально-морфологические типы (КМТ) и появлению секторов при росте на чашках Петри. Цвет колоний определяли по шкале А.С. Бондарцева (1953). Вегетативную совместимость моноспоровых клонов изучали парным сращиванием колоний на чашках Петри на среде Чапека, с последующим микроскопированием пограничной зоны между колониями. Характер проявления реакций при визуальной оценке и микроскопировании сравнивали с описаниями, приведенными у Ю.Т. Дьякова и А.В. Долговой (1995).

Изучение способности к анаэробному росту проводили в анаэроостатах (“BioMerieux Co”, Франция), в которых инкубировали культуры в течение 7–10 сут в анаэробных условиях при 25°C. Анаэробноз создавали с помощью газовых анаэробных пакетов “GENbox anaer”, который контролировали индикаторами на основе резазурина (“Oxoid Limited”, Англия). Активность спиртового брожения определяли у штаммов, проявивших способность к росту в условиях анаэробноза на жидкой минеральной среде. Содержание спирта определяли в культуральной жидкости методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе модели Chrom 3700 с пламенно-ионизационным детектором, колонка SOVPOLE (1,5 м) и Parapac Q (0,5 м), газ носитель - аргон, температура колонки 160 °C и 130 °C, испарителя 240 °C, детектора 250 °C.

Интенсивность утилизации органических соединений определяли методом Biolog Phenotype MicroArray (PM) system (Tanzer *et al.*, 2003; Druzhinina, 2006; Кожевин и др., 2008).

Оптimum роста при различных температурах определяли путем культивирования на сусло-агаре. Температурный режим культивирования задавали в пределах 4-х градаций: 15-20, 20-25, 25-30 и 30-35 °C.

Оценку влияния тяжелых металлов на рост штаммов *Trichoderma* проводили на твердых и жидких средах, содержащих различные концентрации от 0,01 до 10 ммоль меди, цинка, кадмия, свинца. Оценку остаточного содержания ТМ в растворах проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе Agilent 7500 Series ICP-MS.

Антагонистические свойства штаммов рода *Trichoderma*, в отношении фитопатогенных микромицетов, оценивали по показателям гиперпаразитической и антибиотической активности. Изучение антибиотической активности проводили методом лунок и перпендикулярных штрихов (Егоров, 2005).

Антибактериальную активность компонентов, выделенных из культуральной жидкости, и экстрактов мицелия штаммов оценивали методом лунок (Егоров, 2005) на условно-патогенных бактериях из коллекции КрасГМА и резистентных госпитальных стафилококках, выделенных из больных людей из коллекции Института Проблем Севера СО РАН.

Противоопухолевую активность компонентов, выделенных из культуральной жидкости, и экстрактов спор штаммов изучали *in vitro* на 4-х линиях опухолевых клеток. Фильтраты культуральной жидкости и экстракты из спор штаммов рода *Trichoderma* тестировали на линиях опухолевых клеток, предоставленных лабораторией клеточных взаимодействий ИБХ РАН. Для выявления у исследуемых

образцов противоопухолевой активности проводили анализ цитостатичности *in vitro* с помощью МТТ теста и оценку проапоптотической активности. Анализ фракционного состава активных компонентов культуральной жидкости проводили с помощью жидкостного хроматографа "Shimadzu" (Япония) на колонке с обращенной фазой Perkin Elmer C18 (250x4,6 мм, 5мкм) в градиенте ацетонитрила 0-100% в 0,1% трифторуксусной кислоте при скорости потока 1,5 мл/мин. и длине волны 214 нм.

Оценку токсичности исследуемых штаммов в отношении простейших проводили по методу Е.Г. Черемных(2005), состоящего из трех последовательных этапов. На первом этапе оценивали выживаемость тест-объектов инфузорий *Paramecium caudatum* в водных и ацетоновых экстрактах мицелия и спор и культуральных фильтратах. На втором этапе проводили оценку токсичности на тест-объектах *Tetrahymena pyriformis*. На третьем этапе исследований подбирали нетоксичную концентрацию и увеличивали время экспозиции объекта с использованием обеих популяций простейших.

Ростстимулирующее действие метаболитов штаммов рода *Trichoderma* изучали по показателям энергии прорастания и всхожести семян с использованием метода влажных камер (ГОСТ 13056.5-76). Оценку стимуляции роста каллусов злаков и хвойных растений проводили путем их культивирования с добавлением метаболитов грибов при постоянном освещении и температуре 20-24°C, длительность каждого пассажа составляла 40 суток. Пролиферацию каллусных культур проводили на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 1% и 3% концентрации фильтратов культуральной жидкости штаммов *Trichoderma* в питательную среду. Содержание индолилуксусной кислоты в культуральной жидкости штаммов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе KNAUER на колонке Zorbax с диаметром 4,6 мм, длиной 250 мм, заполненной обращенным фазовым сорбентом SB-C18 зернением 5 мкм. В качестве элюента использовали раствор ацетонитрила с 2 % уксусной кислотой в соотношении (1:4). Детектирование осуществляли при λ 280 нм. ИУК определяется в диапазоне от 0 до 5 мг/л ($r=0,9998$), со стандартным отклонением пика 3,5 % ($n=6$).

Изучение биохимического состава биомассы и метаболитов грибов рода *Trichoderma* проводили по классическим методам. Общее количество белка определяли по методу Кьельдаля (Емельянова, 1976); аминокислотный состав - на автоматическом аминокислотном анализаторе А0326V2 (Кнауер, Германия), общее содержание триптофана изучали спектрофотометрическим методом, разработанным в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, содержание липидов с их последующим разделением на нейтральные, глико - и фосфолипиды – по методу Блайя и Дайера (Кейтс, 1975).

Концентрацию селена в мицелии грибов рода *Trichoderma* измеряли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (атомно-абсорбционный спектрометр «Квант-ЗЭТА»). Процедуру минерализации проб в аналитических автоклавах проводили в соответствии с МУК 4.1.985-00. Токсикологическую оценку мицелия проводили на установке «Искусственный желудок», разработанной в МГУПБ.

Твердофазное культивирование грибов рода *Trichoderma* проводили на растительных субстратах: коре пихты исходной и после различных химических обработок, коре лиственницы; гидролизном лигнине, вегетативной части топинамбура исходного и после водной экстракции. Определение химического состава сырья после биодеструкции проводили по общепринятым в химии растительного сырья методикам (Химия древесины, 1994).

Полевые испытания биопрепаратов на основе активных штаммов проводили на посевах *Pinus sibirica* в Мининском лесном питомнике, расположенном на территории Мининского опытного лесного хозяйства (56°10'с.ш., 92°42'в.д). Эффективность действия препарата в агроценозе проводили на пшенице линии «КС-1554» и ячмене сорта «Красноярский-80» оценивали после сбора урожая по следующим параметрам: масса 1000 зерен, высота растений, продуктивная кустистость, количество зерен в колосе, количество растений к уборке, урожайность. Для оценки влияния внесения биопрепаратов на микробиоту почв использовали методы, разработанные Д.Г. Звягинцевым (1991) и Й. Сэги (1983).

Эксперимент проводили в трех-пяти повторностях. Статистическую обработку результатов экспериментов и оценку достоверности различий проводили по критерию Стьюдента для уровня вероятности не менее 95% с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 8.0.

3 Распространение видов *Trichoderma* на территории бассейна реки Енисей

3.1 Распространение и видовой рода *Trichoderma*

В настоящей работе исследовали почвы всех лесорастительных зон территории бассейна реки Енисей, имеющие аграрную значимость для сельскохозяйственных нужд и лесовосстановления. Исследование подстилки и целинных и окультуренных почв ризосферы хвойных в трех климатических поясах (арктическом, субарктическом и умеренном) позволило выделить 587 штаммов как материала для дальнейших исследований и оценки биоразнообразия и значимости видов рода *Trichoderma*. В конечном итоге было проведено исследование 374 образцов восьми типов целинных и окультуренных почв.

Для установления экологических мест обитания видов рода *Trichoderma* особое внимание было уделено исследованию 53 партий семян хвойных (урожая 1999-2009 гг.), собранных на территории Красноярского края и республик Хакасия и Тыва, и 64 партий семян злаков (урожая 2000-2009 гг.), выращенных в исследуемых агроценозах. Обследованию подлежали также плодовые тела макромицетов, собранные на территории Красноярского края и Республики Тыва и имеющие визуальное поражение микромицетами. В период с 1997 по 2010 гг. нами было выделено 620 изолятов *Trichoderma*, которые и послужили основным материалом для исследования биологических свойств и оценки видового разнообразия.

Как показали наши исследования, представители рода *Trichoderma* встречаются в почвах всех исследуемых климатических зонах, включая самые северные широты до 65° с.ш.. Самая высокая встречаемость изолятов *Trichoderma* отмечена в целинных и почвах и почвах лесных питомников. Антропогенные ландшафты агроценозов злаков характеризовались снижением частоты встречаемости и видового разнообразия *Trichoderma*. Из комплекса исследованных антропогенных ландшафтов исключение составляли почвы Маганского и Мининского лесных питомников. Этот факт, вероятно, связан с интродукцией в течение ряда лет популяции биоконтрольных штаммов *Trichoderma* в составе биофунгицидов для борьбы с грибными заболеваниями сеянцев хвойных.

При идентификации изолятов с помощью культурально-морфологических и молекулярно-генетических методов в почвах 3-х климатических зон идентифицировано 8 видов. Среди видов, ранее не обнаруженных на исследуемой территории оказались: *T. citrinoviride* Bissett, *T. hamatum* (Bon) Boner и *T. atroviride* Koning. (таблица 1). Исследование частоты встречаемости видов *Trichoderma*

установлено, что наиболее распространенным и часто встречающимся оказался вид *T. asperellum* - 235 выделенных изолятов, что составило 37,9 % от общего числа выделенных. Представители этого вида были выделены практически из всех образцов, при этом большинство выделенных изолятов этого вида являются почвенными.

Таблица 1 - Список видов и количество изолятов грибов рода *Trichoderma*, выделенных на территории бассейна реки Енисей

Вид	Количество изолятов	
	% от общего числа	Число изолятов
<i>Trichoderma</i> sect. <i>Trichoderma</i>		
<i>T. asperellum</i> Samuels, Lieckfelt et Nirenberg	37,9	235
Группа <i>T. viride</i> Pers, Fr.	10,5	65
<i>T. hamatum</i> (Bon) Boner	3,8	24
Группа <i>T. koningi</i> Oudemans et Koning	4,2	26
<i>Trichoderma</i> sect. <i>Pachybasium</i>		
<i>T. harzianum</i> Rifai	26,1	162
<i>Trichoderma</i> sect. <i>Longibrachiatum</i>		
<i>T. citrinoviride</i> Bissett	8,5	53
<i>T. longibrachiatum</i> Rifai	5,2	32
<i>T. atroviride</i>	3,7	23
Общее число выделенных изолятов	620	

На втором месте по распространенности был вид *T. harzianum*, доля изолятов которого составила 26,1 % от общего числа. Изоляты этого вида также преимущественно выделялись из целинных и антропогенных почв, подстилки, но не были обнаружены на семенах злаковых и хвойных растений, листьях и шишках. Доля *T. viride* составляет 10,5 % всех исследуемых изолятов, причем, большинство выделялись из подстилки, лесного опада, образцов гниющей древесины и ризосферы корней. Следует отметить, что этот вид не встречался в антропогенных почвах и агроценозах. Часть изолятов этого вида были выделены из плодовых тел.

Виды из секции *Longibrachiatum* находятся на четвертом месте по распространенности и численной характеристике, доля *T. citrinoviride* составила 8,5 %, а *T. longibrachiatum* – 5,2 % от общего количества. Изоляты этих видов также выделены из богатых органикой субстратов: подстилки, верхних горизонтов целинных почв и плодовых тел. Далее по распространенности следуют группа видов *T. koningii* (4,2 %), изоляты которой были обнаружены в верхних горизонтах целинных почв, гниющей древесине, а также хвои, шишек и корневой системы живых деревьев. Самыми малочисленными по количеству и распространению были изоляты видов *T. hamatum* (3,8 %) и *T. atroviride* (3,7 %), предпочитающие более глубокие почвенные горизонты.

Можно проследить некоторые закономерности по распределению некоторых видов в разных климатических зонах. Так, вид *T. asperellum* имеет широкий диапазон распространения и присутствует как в почвах северных, так и южных областей, однако редко выделяется в южных районах, в лещных биоценозах Тывы и Хакасии. Вид *T. atroviride* встречался в основном в холодных климатических условиях Эвенкии, а в более южных областях встречаемость этого вида снижается. Виды *T. hamatum*, *T. citrinoviride*, *T. harzianum* имеют широкий диапазон распространения, однако их находки немногочисленны в северных почвах, а со снижением широты их численность увеличивается.

Анализ исследуемых почв показал, что наибольшее разнообразие видов обнаружено в целинных почвах и наименьшее в антропогенных ландшафтах. Уменьшение видового разнообразия в антропогенных ландшафтах и агроценозах отмечено ранее и для других микромицетов (Марфенина, 2004). Среди типичных видов агроценозов нами обнаружено только пять: *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningi* и *T. viride*. В почвах агроценозов и лесопитомников не были найдены виды *T. atroviride*, *T. longibrachiatum* и *T. citrinoviride*.

Таблица 2 – Встречаемость видов рода *Trichoderma* в почвах лесорастительных зон бассейна реки Енисей

№ п/п	Вид	Пространственная частота, (%)	Временная частота, (%)	Число изолатов	Значимость вида
Зона тундры					
1.	<i>T. asperellum</i>	3.9	9.6	3	случайный
Зона лесотундры					
1.	<i>T. asperellum</i>	4.1	6.8	2	случайный
2.	<i>T. atroviride</i>	5.0	17.0	9	случайный
Северная тайга					
1.	<i>T. asperellum</i>	11.4	19.0	12	случайный
2.	<i>T. atroviride</i>	7.9	17.2	4	случайный
3.	<i>T. longibrachiatum</i>	10.4	12.9	2	случайный
Средняя тайга					
1.	<i>T. asperellum</i>	59.1	62.9	51	типичный доминирующий
2.	<i>T. atroviride</i>	3.4	7.0	2	случайный
3.	<i>T. longibrachiatum</i>	7.6	15.0	3	случайный
4.	<i>T. koningii</i>	33.5	38.7	13	типичный редкий
Южная тайга					
1.	<i>T. asperellum</i>	65.8	82.6	47	типичный доминирующий
2.	<i>T. atroviride</i>	2.7	6.4	5	случайный
3.	<i>T. citrinoviride</i>	33.2	42.0	16	типичный частый
4.	<i>T. hamatum</i>	3.4	7.5	4	случайный

5	<i>T. harzianum</i>	62.6	77.7	34	типичный доминирующий
6	<i>T. koningii</i>	4.7	10.4	5	случайный
7	<i>T. longibrachiatum</i>	3.5	9.7	5	случайный
8	<i>T. viride</i>	32.8	38.9	17	типичный частый
Травяные леса с островами лесостепи					
1.	<i>T. asperellum</i>	58.5	64.0	56	типичный доминирующий
2	<i>T. atroviride</i>	6.0	12.5	2	случайный
3	<i>T. citrinoviride</i>	23.4	47.8	16	типичный редкий
4	<i>T. hamatum</i>	7.2	12.0	7	случайный
5	<i>T. harzianum</i>	56.4	68.6	41	типичный доминирующий
6	<i>T. koningii</i>	6.5	11.4	7	случайный
7	<i>T. longibrachiatum</i>	18.6	31.4	18	типичный редкий
8	<i>T. viride</i>	45.1	55.7	21	типичный частый
Островные лесостепи					
1.	<i>T. asperellum</i>	67.0	75.0	56	типичный доминирующий
2	<i>T. atroviride</i>	4.7	8.0	1	случайный
3	<i>T. citrinoviride</i>	35,7	52,0	26	типичный частый
4.	<i>T. hamatum</i>	5.0	17.0	7	случайный
5.	<i>T. harzianum</i>	33.6	49.1	28	типичный частый
6.	<i>T. koningii</i>	18.7	31.2	11	типичный редкий
7	<i>T. longibrachiatum</i>	16.2	30.3	11	типичный редкий
8	<i>T. viride</i>	30.4	37.6	22	типичный частый
Влажная подтайга и горно-черневая темнохвойная тайга					
1.	<i>T. asperellum</i>	35.0	55.1	22	типичный частый
2	<i>T. citrinoviride</i>	3.8	22.2	3	случайный
3	<i>T. hamatum</i>	8.7	16.3	6	случайный
4	<i>T. harzianum</i>	23.6	46.7	10	типичный редкий
5	<i>T. koningii</i>	5.5	13.0	3	случайный
6	<i>T. longibrachiatum</i>	4.6	11.5	3	случайный
7	<i>T. viride</i>	33.2	42.0	9	типичный частый

3.2 Влияние абиотических факторов на рост и развитие грибов рода *Trichoderma*

Структура популяции грибов, в зависимости от характеристики биологических свойств входящих в них клонов, включая их генетическую и адаптивную изменчивости, под воздействием факторов среды определяется широтой нормы реакции, сохранению жизнеспособностью и доминирования в данных условиях. На популяцию видов действует комплекс экологических и биотических факторов, который формирует клоны, с определенными физиолого-биохимическими свойствами, способностью адаптации к определенным условиям обитания.

Представители видов рода *Trichoderma* не очень требовательны к условиям окружающей среды, однако они имеют оптимальные границы условий температуры и влажности для своего развития и нормальной жизнедеятельности (Thodore & Panda, 1995). Влажность, температурный, световой режим, доступность органических и минеральных питательных веществ могут ускорять или замедлить процессы роста *Trichoderma*, а также определять переход от стадии покоя к вегетативному росту и формированию репродуктивных структур (Лугаускас, 1988; Kubota, 1995).

Влияние температуры на рост и развитие штаммов *Trichoderma*.

Доминирование и динамика развития определенных видов грибов *Trichoderma* в различных экосистемах подвержены сезонным колебаниям и во многом определяются влиянием температуры. Как показали наши исследования, для сибирских изолятов восьми исследуемых видов температурный диапазон, при котором штаммы способны расти и осуществлять спороношение, находится в пределах от 10 до 35 °С. Большинство штаммов являются типичными мезофиллами, оптимум температуры для развития представителей разных видов колеблется от 20 до 25 °С. Для некоторых штаммов вида *T. hamatum* отмечен лучший рост при температуре 10 °С (средний диаметр колоний штаммов до 40 мм). При повышении температуры свыше 25 °С ингибируется рост изолятов вида *T. koningii*, а низкие температуры ингибируют рост штаммов вида *T. citrinoviride*. Согласно нашим исследованиям, психрофильные штаммы, способные расти при температуре 5 – 10 °С обнаружены среди представителей видов *T. asperellum*, *T. viride* и *T. atroviride*, в основном это были штаммы, выделенные из почв северных территорий Красноярского края и Эвенкии. Таким образом, установлено, что виды рода *Trichoderma*, типичные для холодных географических районов, имеют более низкий температурный оптимум для роста, чем виды теплых климатических районов. Максимальный показатель величины диаметра, являющийся результатом более высокой скорости роста при температуре 10 °С, характерен для штаммов вида *T. atroviride*, которые были выделены из тундровых почв Эвенкии, где среднегодовые температуры воздуха не превышают 0 – 5 °С.

Для штаммов видов *T. asperellum* и *T. viride* также характерна тенденция преобладания изолятов, выделенных из умеренных и относительно холодных районов и растущих при низких значениях температуры. В то время как утверждать такую закономерность для других видов этого рода неправомерно. Среди изученных изолятов вида *T. citrinoviride* психрофильных штаммов обнаружено не было, все исследуемые представители этого вида способны расти при температуре только выше 15 °С. Изоляты видов *T. longibrachiatum* и *T. citrinoviride* являются типичными мезофиллами с оптимумом роста 25 °С. Однако среди исследованных представителей этих видов, а также вида *T. hamatum* встречались также термотолерантные изоляты, способные расти при температуре выше 35 °С. Внутривидовая вариабельность по способности роста и развития наиболее отчетливо проявляется при высоких и низких значениях температуры – 30 - 35 °С и 10 °С.

Влияние кислорода на рост штаммов *Trichoderma* разных видов.

Большую часть выделенных видов *Trichoderma* традиционно относят к облигатным аэробам. Вместе с тем, в природе эти грибы часто встречаются в местообитаниях с ограниченной обеспеченностью кислородом, что может способствовать преобладанию определенной популяции или видов в условиях с пониженным содержанием кислорода, как в затопляемых почвах, так и в растительных остатках. Для поддержания жизнедеятельности в таких условиях

микровицеты, по-видимому, переходят к брожению. Имеются единичные сообщения о росте в анаэробных условиях и сбраживанию органических субстратов для отдельных представителей рода *Trichoderma* (Лаврентьев и др., 2008; Кураков и др., 2011). Исследования по влиянию такого важного экологического фактора, как доступный кислород, на развитие микровицетов рода *Trichoderma* может способствовать пониманию преобладания определенной популяции или видов в условиях с пониженным содержанием кислорода, как в затопляемых почвах, так и в растительных остатках.

Для оценки влияния кислорода нами была изучена возможность роста в анаэробных условиях штаммов *Trichoderma*, принадлежащих к 8 видам, выделенным из разных эколого-трофических ниш. Как показали наши исследования, грибы рода *Trichoderma* способны расти в анаэробных условиях с образованием субстратного и воздушного мицелия. Однако в таких условиях не было отмечено формирование репродуктивных органов и спороношения (таблица 3). М.В. Горленко показано, что снижение аэрации и недостаток освещенности тормозит как образование фиалид, так и сам процесс конидиогенеза, а также влияет на содержание липидов в покоящихся структурах (Горленко, 1982).

Следует отметить, что штаммы, способные к росту в анаэробных условиях, выявлены среди представителей всех исследуемых видов. Однако для штаммов вида *T. longibrachiatum* характерна большая чувствительность к недостатку кислорода, чем для штаммов других видов. Только два из 20 изученных штаммов этого вида способны были к слабому росту мицелия при отсутствии кислорода. При росте в анаэробных условиях они формировали нетипичный, более тонкий паутинистый воздушный мицелий.

У всех исследуемых штаммов обнаружена приуроченность места их обитания к способности роста в отсутствие кислорода. Так, штаммы, выделенные из плодовых тел макромицетов, пищеварительного тракта дождевого червя, гидроморфных почв и верховых болот, характеризовались активным ростом в анаэробных условиях. Активный рост был отмечен также для штаммов, выделенных из погребенных почв античного города Фанагории, взятых для сравнения в наших исследованиях. В то же время штаммы, изолированные из семян хвойных растений, в этих условиях не росли (таблица 3). Итак, способность роста в анаэробных условиях определяется не систематической принадлежностью гриба, а существенно варьирует среди штаммов одного вида.

Таблица 3 - Рост в анаэробных условиях штаммов рода *Trichoderma*

Вид	Число штаммов			
	Проведено	Радиальная скорость роста, мм/ч		
		0.01 – 0.05	0.05 – 0.10	>0.10
<i>T. asperellum</i>	55	10	8	7
<i>T. harzianum</i>	32	10	2	1
<i>T. viride</i>	35	8	4	2
<i>T. hamatum</i>	24	2	2	1
<i>T. koningii</i>	26	5	4	2
<i>T. longibrachiatum</i>	20	2	-	-
<i>T. citrinoviride</i>	25	3	3	2
<i>T. atroviride</i>	10	1	3	1

У штаммов, которые хорошо росли в условиях анаэробнозиса, была в дальнейшем исследована активность спиртового брожения. Как показали исследования, все протестированные штаммы на среде с глюкозой способны к спиртовому брожению, что позволяет их отнести к группе факультативных анаэробов. Анализ количества этанола при сбраживании глюкозы показал, что с относительно высокой и умеренной активностью спиртового брожения встречаются штаммы видов – *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. citrinoviride* и *T. koningii*. В большинстве случаев эффективность сбраживания глюкозы составляла у штаммов этих групп грибов 25-50 %. Умеренная активность спиртового брожения (накопление 0,2-0,6 % этанола к 4-7 суткам) обнаружена у большинства штаммов *T. asperellum*, эффективность сбраживания глюкозы у них составляла порядка 15-20 % на среде с 3 % глюкозы. Низкая бродильная активность у штаммов *T. hamatum*, *T. viride*, *T. atroviride*. Среди представителей *T. citrinoviride* и *T. koningii* обнаружены как активные штаммы, накапливающие около 1 % этанола и более, так и очень слабо сбраживающие глюкозу. Вместе с тем, среди изолятов, обладающих широким спектром гидролитических ферментов, видов *T. harzianum*, *T. asperellum* и *T. koningii* обнаружены штаммы с бродильной активностью, сопоставимой с таковой у мукоровых грибов-сахаролитиков. Максимальный уровень накопления этанола на более богатых по содержанию сахаров средах составил 3 – 5%, что сравнимо с продукцией этанола диких штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* КБП-3781 и *Hanseniасpora* sp. 1R (Кураков, Лаврентьев, 2008).

Влияние ионов тяжелых металлов на рост штаммов рода *Trichoderma*.

Исследовано влияние пяти металлов: цинк, свинец, медь, никель, кадмий на рост и продуктивность 42 штаммов *Trichoderma* на среде Чарека с добавлением соли металла в концентрациях 1 ммоль/л, 5 ммоль/л, 10 ммоль/л. Проведенные исследования показали избирательность действия различных металлов на рост штаммов на агаризованной среде при добавлении различных их концентраций. Добавление исследуемых металлов в концентрации 1 ммоль/л полностью ингибировало спороношение всех штаммов и формирование репродуктивных органов грибов (конидиеносцев и фиалид) на воздушном мицелии.

Наиболее токсичной из металлов оказалась медь; рост колоний всех штаммов *T. asperellum* и *T. citrinoviride* полностью прекращался при концентрации в среде 5 и 10 ммоль/л, а в концентрации 1 ммоль/л рост у разных штаммов этих видов снижался на 65 % и более в сравнении с контролем. Штаммы видов *T. longibrachiatum*, *T. atroviride* и *T. hamatum* не росли на среде с добавлением меди. Самым устойчивыми к высоким концентрациям меди оказались штаммы вида *T. harzianum*, способные расти при содержании меди в среде 5 ммоль/л. Диаметр колоний всех исследуемых штаммов на третьи сутки составлял от (5,3±0,9) до (15,8±2,7) мм, что в 5,6 раза меньше, чем в контроле. На втором месте по токсичности в отношении исследуемых штаммов всех видов был никель. При добавлении никеля в количестве 10 ммоль/л рост всех штаммов полностью ингибировался. В концентрации 1 ммоль/л скорость роста штаммов снижалась от 20 до 45 % у штаммов видов *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. koningii* и на 45-55 % у штаммов вида *T. hamatum*. По результатам оценки влияния металлов на рост штаммов гриба рода *Trichoderma* на агаризованных средах были отобраны штаммы для дальнейшего исследования продуктивности их при жидкофазном глубинном культивировании, с различным содержанием солей металлов.

Особенности спектра утилизации органических веществ изолятов вида *Trichoderma*

Исследование широты спектра потребления органических веществ разными видами и штаммами *Trichoderma* может способствовать пониманию преобладания тех или иных популяций и видов в разных эколого-трофических зонах, а также обеспечить выделение конкурентноспособных изолятов из определенных экониш. Анализ спектра утилизации 23 субстратов методом мультисубстратного тестирования показал внутри и межвидовые различия по физиологическим профилям потребления субстратов. Результаты дискриминантного анализа (рисунок 1) выявили межвидовые различия по степени усваиваемости соединений. Наибольшая специфика в утилизации отмечена для штаммов видов *T. hamatum* и *T. longibrachiatum*, которые характеризуются более узким спектром в сравнении с остальными видами и ограниченной способностью усваивать спирты и аминокислоты.

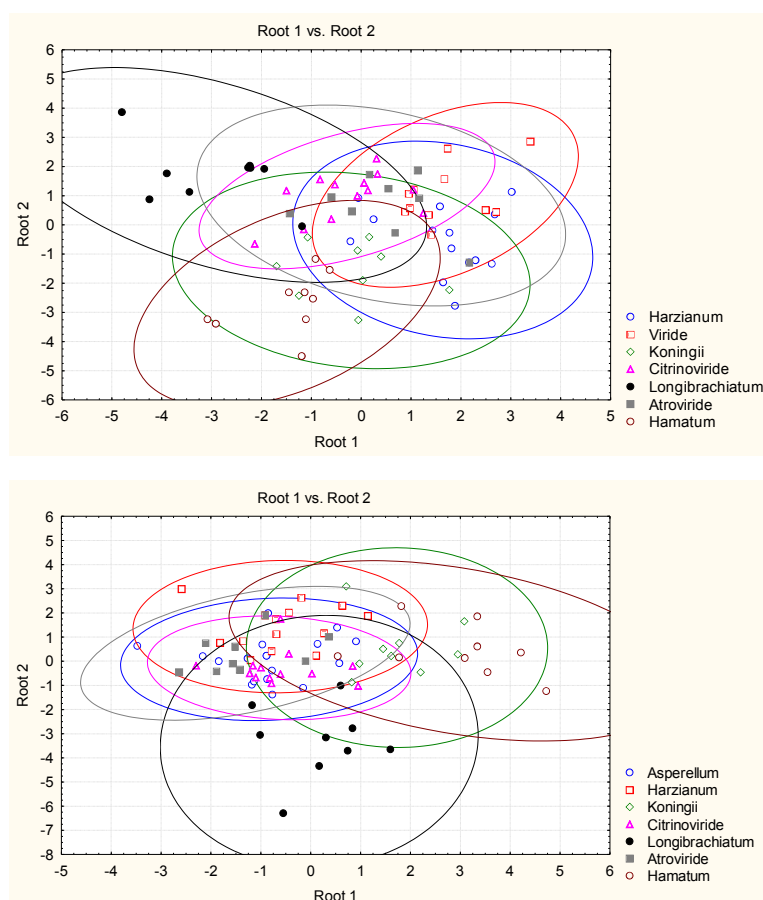


Рисунок 1. Дискриминантный анализ спектров потребления 23 субстратов грибами 5 видов рода *Trichoderma* (эллипсы ограничивают область с вероятностью $p=0.95$)

На основе данных потребления субстратов методом кластеризации, штаммы разделяются на две группы вне зависимости от их видовой принадлежности. В первую группу преимущественно вошли штаммы, выделенные из почв, во второй кластер вошли штаммы, изолированные из плодовых тел макромицетов, образцов растительных остатков и семян хвойных и злаковых растений. Для штаммов, вошедших во второй кластер, характерно более интенсивное потребление сахаров, что, вероятно, может быть связано с их обитанием в условиях более богатых углеводными соединениями, чем почва. Таким образом, при исследовании выборки штаммов обнаружены как межвидовые различия в способности к утилизации

определенных субстратов, так и различия, связанные с природным местом обитания изолята.

3.3 Гетерогенность популяции изолятов вида *Trichoderma*

Отражение широкой пластичности грибов проявляется и в нестабильности признаков, свойственной представителям разных систематических групп грибов. Один из самых широко используемых критериев для выявления внутривидовой дифференциации микромицетов является сравнительный анализ культурально-морфологических признаков при их росте в условиях *in vivo* и *in vitro*. На их основе у ряда фитопатогенных грибов удалось установить наличие культурально-морфологических типов (КМТ), коррелирующих с проявлением патогенности, токсинообразования. Это четко прослеживается у ржавчинных грибов, возбудителя ложной мучнистой росы хмеля, “томатной” и “картофельной” рас фитофторы и у многих других фитопатогенных грибов. Для сапротрофов и, в частности, для рода *Trichoderma* такие исследования практически не проводились.

Нами были исследованы 124 гетерогенных изолята, выделенные из разных эколого-трофических ниш, и принадлежащие к восьми видам рода *Trichoderma*. Для каждого из диких штаммов было выделено по 15 моноспоровых изолятов, отличающихся стабильными культурально-морфологическими признаками. В зависимости от видовой принадлежности было установлено от двух до четырех стабильных культурально-морфологических типа (КМТ), причем большинство штаммов (65%) принадлежало ко второму культурально-морфологическому типу. Процентное соотношение между остальными типами распределялось следующим образом: клоны, относящиеся к первому КМТ составили 4,7 % для *T. harzianum* и 14,2 % для *T. asperellum*. Клоны третьего и четвертого типа составляли 13,3 и 16,3 % для *T. harzianum* и 22,6 и 21,8 % для *T. asperellum* соответственно (таблица 4).

Таблица 4 – Культурально-морфологические типы колоний изолятов видов рода *Trichoderma*

Вид	Количество гетероспоровых изолятов	Количество моноспоровых клонов	Соотношение культурально-морфологических типов (%)			
			I	II	III	IV
<i>T. asperellum</i>	15	150	14,2	41,4	22,6	21,8
<i>T. hamatum</i>	15	150	7,2	67,4	10,6	14,8
<i>T. harzianum</i>	15	150	4,7	65,7	13,3	16,3
<i>T. citrinoviride</i>	15	150	5,8	55,8	38,4	-
<i>T. longibrachiatum</i>	15	150	11,5	55,2	33,3	-
<i>T. viride</i>	15	150	-	64,9	-	35,1
<i>T. atroviride</i>	10	100	-	42,3	-	57,7
<i>T. koningii</i>	15	150	-	61,8	-	38,2
Примечание: «-» - вид не представлен						

Для моноспоровых культур видов *T. citrinoviride* и *T. longibrachiatum* установлено три КМТ: первый, второй и третий. Гетероспоровые популяции этих

видов в большей степени также были представлены вторым КМТ. Сравнительный анализ гетероспоровых популяций видов секции *Rufa* и видов *T. viride*, *T. atroviride* и *T. koningii*, позволил выделить только два культурально-морфологических типа: второй и четвертый.

Эколого-географические особенности регионов также влияют на проявление частот культурально-морфологических типов в популяциях грибов (Дьяков, 1998). В ряде случаев удается установить корреляцию групп КМТ с образованием антибиотиков и токсинов. Установлено, что клоны второго культурально-морфологического типа вида *T. asperellum* характеризовались высокой антибиотической активностью к фитопатогенным грибам, в сравнении с изолятами других КМТ (Садыкова, 2003; Махова, 2003).

3.4 Вегетативная совместимость моноспоровых штаммов *Trichoderma*

Популяции грибов представляют собой мозаику клонов, одним из изолирующих механизмов которых является различные реакции проявления вегетативной совместимости. Клоны, имеющие общие гены вегетативной совместимости, способны к генетическим обменам и образуют вегетативно-совместимые группы, эволюционирующие при бесполой фазе развития независимо друг от друга, что обеспечивает их внутривидовую и внутриволюционную дивергенцию.

Сравнение общих частот реакций совместимости и несовместимости у выделенных изолятов и их моноспоровых штаммов всех видов показало, что для разных видов *Trichoderma* характерны различные пропорции реакций совместимости и несовместимости. Для видов, представляющих собой полифилетические группы, характерен сдвиг в сторону реакций несовместимости: для *T. koningii* (40,4 %), *T. viride* (54,9 %) и *T. harzianum* (45,8 %). Вегетативная несовместимость наиболее четко проявляется у контрастных по культуральным признакам штаммов. При парном сращивании исходных изолятов различного происхождения выявлен широкий спектр проявления реакции вегетативной несовместимости с преобладанием «бордюра» и «ограничения роста». Причем только для этих трех видов характерна реакция «барраж» при сращивании штаммов, выделенных из разных мест обитания. При сращивании гетероспоровых изолятов этих видов с моноспоровыми клонами преобладает реакция несовместимости типа бордюра – у 68 % изолятов, барраж отмечается у 3 % изолятов. Среди типов реакций вегетативной совместимости преобладают валик и проникновение.

Сравнение общих частот реакций совместимости и несовместимости для видов *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. hamatum* указывает на наличие тенденции относительного сдвига в сторону реакций смешанного типа и вегетативной совместимости, что отражает однородность состава этих видов в сравнении с популяциями *T. koningii*, *T. viride* и *T. harzianum*. Для видов *T. longibrachiatum* и *T. citrinoviride* характерно преобладание смешанных реакций и реакции типа валик.

Следует отметить, что совместимость моноспоровых клонов одного происхождения (выделенных из одного географического региона) зависит от его принадлежности к культурально-морфологическому типу. Так, например, клоны второго КМТ с другими типами давали реакции бордюра или ограничения роста колонии, а при сращивании между собой наблюдали реакции вегетативной совместимости. Для клонов других культурально-морфологических типов такая корреляция выражена более слабо, однако отмечено, что при сращивании клонов третьего и второго типа с четвертым всегда наблюдали реакции «бордюра» или

«ограничение роста» последних. Отсутствие анастомозов между субстратными гифами и ограничение роста колоний, по-видимому, можно объяснить продуцированием биологически активных веществ в питательную среду.

Для штаммов, проявляющих данные типы реакций, характерно проявление высокой антибиотической активности в отношении взятых тест объектов. Различия по антибиотической активности в природных условиях являются одним из признаков, обеспечивающих вегетативную совместимость грибов, совместимые клоны образуют локальные популяции или субпопуляции (Дьяков, Долгова, 1995) .

Эти данные указывают на значительную гетерогенность изолятов по изучаемому признаку. Гетерогенная несовместимость прекращает образование гетерокарионов между адаптированными и, вероятнее всего, генетически разными штаммами. По мере снижения варибельности гриба, за счет выявления моноспоровых культур происходит относительный сдвиг реакций в сторону смешанного типа. Вероятно, адаптация к разным эконишам предопределяет соотношения ядерного состава гетерокарионов, что поддерживается стабилизирующим отбором. Возникающие внутривидовые группировки у рода *Trichoderma*, вероятно, как и в случае обособления клонов у фитопатогенных грибов, выполняют роль краевых популяций, осуществляющих освоение новых субстратов и эколого-трофических ниш. При этом даже неполная изоляция снижает возможность образования гетерокарионов и повышает специализацию к субстрату, что в конечном итоге приводит к морфологическим, культуральным и биохимическим различиям клонов.

Глава 4 Биологическая активность грибов рода *Trichoderma*

На основании анализа стабильности культурально-морфологических признаков и антибиотической активности для исследования биологической активности было отобрано 42 моноспоровых штамма 8 видов рода *Trichoderma*, выделенных из разных эколого-трофических ниш и относящихся к второму культурально-морфологическому типу.

Антагонистическая активность штаммов *Trichoderma* в отношении фитопатогенных грибов родов *Fusarium*, *Bipolaris* и *Alternaria*

Одним из главных ограничений для использования препаратов на основе грибов-антагонистов рода *Trichoderma* для защиты растений является зависимость их эффективности от типа почвы, гидротермических факторов, состава микробиоты, сортовых особенностей культур, а также экологической ниши, где будет функционировать продуцент. В этом случае целесообразно использование местных штаммов грибов рода *Trichoderma*, как наиболее приспособленных к конкретным почвенно-климатическим условиям в отношении доминирующих в Сибири видов возбудителей болезней растений из родов *Fusarium*, *Bipolaris* и *Alternaria*.

Оценка гиперпаразитической активности показала как гетерогенность штаммов в пределах одного вида, так и межвидовые различия по степени активности изолятов *Trichoderma* в отношении фитопатогенных микромицетов. Все виды *Bipolaris* и *Alternaria* чувствительны к микромицетам рода *Trichoderma*, тогда как виды рода *Fusarium* оказались более устойчивыми к антагонистам.

Гиперпаразитическая активность в отношении штаммов фитопатогенов достоверно различалась у всех штаммов *T. asperellum*. Максимальную активность в отношении изолятов *Bipolaris* и *Alternaria* проявили штаммы «Mg-6» и «30»; другие штаммы этого вида «ТН-5», «ТН-7», «ТН-11» и «119» проявляли минимальную активность в отношении тех же фитопатогенов. Самыми активными штаммами в

отношении всех изолятов *Fusarium* оказались штаммы *T. asperellum* «119», «Mg-6» и «Mg-97» и *T. citrinoviride* «ТН-4».

Максимальную антибиотическую активность в отношении *Alternaria* и *Bipolaris* проявили штаммы *T. koningii* «ТСЛ-06» и «ТСГ», *T. asperellum* «31» и «119», в отношении *Fusarium* – *T. asperellum* «Mg-6» и *T. koningii* «ТСЛ-06». Штаммы *T. asperellum* «Mg-97», «ТН-5», «ТН-7», «ТН-11», *T. citrinoviride* «МК» и «ТН-4», *T. harzianum* «M99/5» антибиотического действия в отношении всех фитопатогенов *Alternaria*, *Bipolaris* и *Fusarium* не показали.

Анализ активности штаммов рода *Trichoderma* в отношении комплекса видов *Bipolaris* и *Alternaria* методами кластерного анализа показал, что по набору вышеуказанных признаков все штаммы, вне зависимости от видового происхождения, разделяются на два кластера (рисунок 2А).

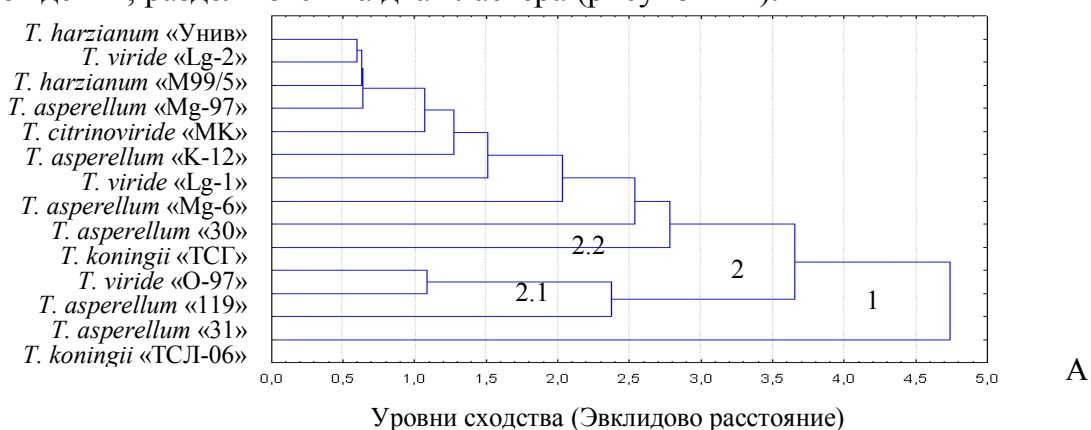


Рисунок 2 – Кластерный анализ антагонистической активности в отношении фитопатогенов родов *Bipolaris* и *Alternaria* (А); рода *Fusarium* (Б)

К первому кластеру был отнесен штамм *T. koningii* «ТСЛ-06», который проявил высокую гиперпаразитическую и максимальную антибиотическую активность в отношении всех видов *Bipolaris* и *Alternaria*. Второй кластер разделился на два подкластера: в первый подкластер объединились три штамма: *T. asperellum* «31» и «119» и *T. viride* «О-97», характеризующиеся средней гиперпаразитической, но высокой антибиотической активностью в отношении большинства штаммов видов *Bipolaris* и *Alternaria*. Во второй подкластер объединены все остальные штаммы рода *Trichoderma*.

Анализ активности штаммов рода *Trichoderma* в отношении комплекса видов *Fusarium* позволил условно разделить штаммы-антагонисты на три кластера (рисунок 2Б). В первый кластер вошли два штамма *T. asperellum* «Mg-6» и *T. koningii* «ТСЛ-

Об», характеризующиеся высокой гиперпаразитической и антибиотической активностью по сравнению с другими штаммами. Второй кластер объединил четыре штамма *T. harzianum* «M99/5», *T. asperellum* «K-12», *T. viride* «Lg-2» и «Lg-1», в третий кластер вошли все остальные штаммы, которые проявляли выборочную активность в отношении некоторых видов *Fusarium*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что штаммы состоят из клонов с разной антибиотической активностью, что обуславливает необходимость селекции активных штаммов по отношению к набору штаммов-возбудителей болезней растений.

Противоопухолевая активность штаммов рода *Trichoderma*

Первые упоминания о противоопухолевых свойствах этих грибов были сделаны А.М. Безбородовым, выделившим заразовую кислоту, которая является сильным ингибитором фермента ФТП-азы, и может выступить в качестве потенциальных противораковых лекарств (А.М. Безбородов, 1969). Впоследствии рядом авторов были установлены и другие группы активных веществ, таких как триходермаиды – модифицированные дипептиды, выделенные из морского штамма *T. virens*. Виридиофунгины были изолированы из *T. viride* и содержали как структурный элемент лимонную кислоту. Известны их формы А–С, А1–4, В2 и Z2, которые оказывают цитотоксический эффект на опухолевые клетки. Триходеноны и циклопептановые производные, изолированные из культуры *T. harzianum*, паразитирующей на *Halichondria okadai*, обладают цитотоксическим эффектом на линии опухолевых клеток. В этой связи виды *Trichoderma* могут представлять особый интерес, так как являются потенциальным дешевым биологическим ресурсом для получения препаратов-иммуномодуляторов и новых противоопухолевых антибиотиков.

В результате первичной оценки цитопатической активности в отношении клеток асцитной карциномы Эрлиха было отобрано 10 активных штаммов, шесть из которых принадлежат к виду *T. asperellum* (MG-97, TH-5, TH-7, TH-11, MG-6, 30 и 31), штамм M-99/51 – вид *T. harzianum*; (Tv4-1 и Tv4-2) – вид *T. citrinoviride*; Lg-1 – вид *T. viride* и ТСЛ-06-вид *T. koningii*.

Штаммы, проявившие цитостатический эффект в отношении карциномы Эрлиха затем оценивали на трех линиях клеток: HaCaT- кератиноциты человека; НЕК 293Т-клетки эмбриональной почки человека и К562- линия клеток хронической миелоидной лейкемии. Первичный скрининг проводили на наличие цитотоксической активности метаболитов и споровых экстрактов штаммов гриба рода *Trichoderma* на различных линиях опухолевых клеток *in vitro*. У штаммов, проявивших цитотоксической активности метаболитов грибов рода *Trichoderma*, исследовали их проапоптотическую активность и действие на клеточный цикл опухолевых клеток.

Клетки культивировали 72ч с различными концентрациями культуральных жидкостей. Результаты эксперимента представлены в виде зависимости индекса ингибирования, от концентрации исследуемых препаратов. В том случае, если ИИ>0, то наблюдается подавление роста или лизис клеток за счет действия препарата. При ИИ<0 наблюдается стимуляция роста клеток. Высокую цитотоксическую активность была отмечена у трех штаммов: TV4-1, M99/51 и 310 в отношении всех линий опухолевых клеток. Культуральная жидкость TV4-1обладала невысоким индексом ингибирования в отношении всех трех линий опухолевых клеток, а Тсл-06(Г) оказала незначительный подавляющий эффект на клетки К562 и JurKaT. Выраженной цитотоксической активностью обладает только культуральные жидкости TV4-1,

M99/51 и 30, что подтвердилось на трех клеточных линиях НЕК 293Т, JurKaТ и K562 (рисунок 3).

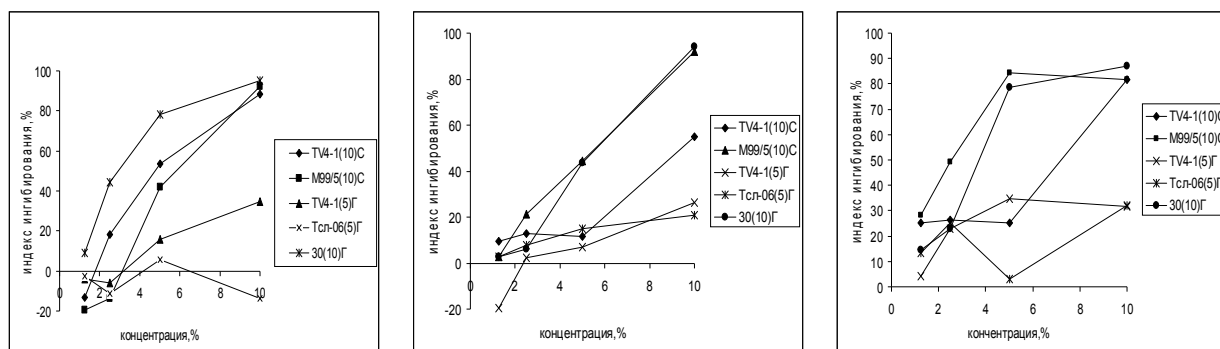


Рисунок 3 – Зависимость индекса ингибирования от концентрации культуральных жидкостей штаммов *Trichoderma* на линии клеток НЕК 293Т (а), на линии клеток K562 (б), на линии клеток JurKaТ(в) при инкубации 72ч

Особый интерес представляют исследования противоопухолевой активности экстрактов спор грибов рода *Trichoderma*. Для чего проводили анализ цитотоксической активности экстрактов из спор гриба *Trichoderma*, полученных методом холодной и горячей экстракции на линии клеток HaCaT при инкубировании 72ч, который показал, что небольшой активностью в отношении опухолевых клеток обладают экстракты спор штаммов M99/51 и Lg-1.

В результате проведенных экспериментов по анализу цитотоксичности и апоптоза установили, что значительную активность в отношении трех клеточных линий НЕК 293Т, JurKaТ и K562 среди 10 исследованных проявляют штаммы Tv4-1, M99/51 и 30. При этом одним из механизмов действия этих препаратов является индукция апоптоза поздней стадии, что подтвердилось на четырех линиях клеток: K562, TNP-1 и 8866-05 и A431. Полученные результаты показывают, что одним из механизмов действия культуральных фильтратов *Trichoderma* на опухолевые клетки может являться индукция апоптоза поздней стадии (20ч).

Проведенные анализы противоопухолевой активности 10 штаммов *Trichoderma* показали, что метаболиты культуральных фильтратов трех штаммов M99/51, TV4-1 и 310 обладают высокой цитотоксической активностью и универсальностью действия, что подтвердилось на линиях опухолевых клеток НЕК 293Т, JurKaТ и K562. Метаболиты культуральных фильтратов активных штаммов TV4-1, M99/51 и 310 вызывают индукцию апоптоза поздней стадии, но не оказывают влияния на жизненный цикл опухолевых клеток. На наш взгляд, более целесообразно выделять соединения из культуральных фильтратов, а не из экстрактов спор грибов рода *Trichoderma*. По результатам проведенных исследований, представленных в данной работе, были депонированы во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов штаммы *T. asperellum* T-310 (ВКМ F4340D) и *T.harzianum* Rifai TV4-1 (ВКМ F4341D) как продуценты противоопухолевых соединений. Штамм *T.harzianum* M99/51 депонирован во Всероссийской коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ F- 1027).

Оценка токсичности штаммов рода *Trichoderma* в отношении простейших

Для того чтобы рекомендовать тот или иной штамм в качестве продуцента биопрепарата или для биосинтеза активных антимикробных или противоопухолевых веществ, а также дальнейшего регламентирования биотехнологического штамма, обязательна оценка его токсичности. Биотестирование, проведенное на двух тест-

объектах: *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis* показало, что штаммы имеют различную токсичность в отношении простейших. Так, самую высокую токсичность показали споровые экстракты и мицелиальные жидкости штаммов 30, 310, ТН-7, ТН-11. Пробы штаммов Тсл-06, М-99/5 и М-99/51 оказались мало токсичными. Для штаммов Мг-6 и Тv-4-2 малотоксичными оказались экстракты мицелиаля, а культуральная жидкость и споровые экстракты нетоксичны. Среднюю токсичность также показали экстракты мицелия штаммов 30, 310, горячий споровый экстракт Тv -4-1 и культуральные фильтраты и экстракты спор и мицелия штамма Lg – 1 (таблица 6). При увеличении разведения токсичность всех экстрактов снижалась, и в разведении 1:8 все пробы кроме экстрактов спор и мицелия штамма ТН-7 были нетоксичны. Следует отметить, что экстракты особо токсичных штаммов, таких как ТН-7 и ТН-11 лизировали клетки инфузорий в течение 10-15 минут после внесения. В то время как экстракты Тсл-06 и М-99/5 не оказывали никакого воздействия на их жизнеспособность.

У штаммов *Trichoderma asperellum* самыми токсичными оказались экстракты спор штаммов ТН-7 и ТН-11. Штамм ТН-7 является самым токсичным из всех 12 исследуемых штаммов. Его культуральный фильтрат и экстракты спор не теряют полностью свою токсичность даже при разведении 1:8, в то время как экстракты мицелия нетоксичны уже при разведении 1:2. Экстракты мицелия и спор штаммов ТН-5 и Мг-6 были малотоксичны, а экстракты спор – нетоксичны для инфузорий даже без разведения. Для штаммов 30 и 310 характерна умеренная токсичность.

Экстракты мицелия показали сравнительно низкую токсичность относительно споровых экстрактов. Так, у штамма 30, споровый экстракт которого без разведения приводил к 100%-й гибели популяции *Paramecium caudatum*, экстракт мицелия показал в 2 раза меньшую токсичность. Для штаммов ТН-7 и ТН-11, споровые экстракты которых лизировали клетки, экстракты мицелия приводили к гибели всего 30-50 % и 70-80 % популяции соответственно.

Таблица 6 – Значение критерия токсичности штаммов рода *Trichoderma* на *Paramecium caudatum*

Штаммы рода <i>Trichoderma</i>	Значение критерия токсичности экстрактов спор и мицелия штаммов рода <i>Trichoderma</i>				
	Холодный экстракт спор	Горячий экстракт спор	Холодный экстракт мицелия	Горячий экстракт мицелия	Культуральный фильтрат
<i>T. asperellum</i> 30	0,99	0,99	0,55	0,55	0,99
<i>T. asperellum</i> 310	0	0	0,55	0	0,50
<i>T. asperellum</i> Мг-6	0,9	0,8	0,8	0,7	0,7
<i>T. asperellum</i> ТН-5	1	0,6	1	1	0,8
<i>T. asperellum</i> ТН-7	0	0	0	0	0
<i>T. asperellum</i> ТН-11	0	0	0	0	0
<i>T. citrinoviride</i> Тv-4-2	1	1	0,8	0,7	1
<i>T. citrinoviride</i> Тv-4-1	0	0,5	0,3	0,5	0
<i>T. viride</i> Lg-1	0,5	0,3	0,8	0,5	0,5
<i>T. konigii</i> Тсл-06	1	1	1	1	1
<i>T. harzianum</i> М-99/5	1	1	1	1	1
<i>T. harzianum</i> М-99/51	1	1	1	1	1

Для всех исследуемых штаммов был проведенный анализ влияния на прирост популяции *Tetrahymena pyriformis*, который выявил различия между штаммами в пределах одного вида. Значительный прирост популяции *Tetrahymena pyriformis* отмечен на всех пробах штаммов Tv -4-1, Tv -4-2, ТН-5, а также холодных экстрактах мицелия и культуральных жидкостях штаммов Mg-6, 30 и ТН-7. Наибольшую биологическую активность проявляли горячие споровые экстракты трех штаммов ТН-5 и Mg-6 *T. asperellum*, а также Tv4-2 *T. citrinoviride*. Среди холодных экстрактов самыми активными оказались экстракты *T. asperellum* штаммов ТН-7 и 30. Холодный экстракт штамма ТН-7 по коэффициенту прироста выше, чем горячий в 3,2 раза, а у штамма 30, почти в 2 раза. Это дает основания полагать, что эти штаммы грибов синтезируют биологически активные вещества; в случае со штаммами 30 и ТН-7 эти вещества являются термолабильными.

Таким образом, оценка токсичности показала, что биологическая активность определяется не столько видовой принадлежностью штамма, а в большей степени его вариабельностью в пределах вида.

5 Ростстимулирующая активность штаммов рода *Trichoderma*

Положительное влияние биологически активных компонентов, продуцируемых видами *Trichoderma*, на ростовые показатели растений, отмечено на многих промышленно значимых зерновых культурах и древесных видах, однако это зависит от применяемого штамма (Harman и др., 2004; Romano, 2008). Оценка действия на рост растения может способствовать отбору продуцентов препаратов с комплексным воздействием – как стимуляторов роста и как антагонистов фитопатогенных грибов. В связи с этим, использование биопрепаратов на основе этих грибов может быть расширено, если в качестве одного из главных факторов отбора для штамма определить их способность оказывать стимулирующее действие на рост растения.

На основе кластерного анализа по антагонистической активности были отобраны 8 штаммов рода *Trichoderma* и проведены исследования их ростстимулирующих свойств в отношении семян злаковых и хвойных растений.

Исследования показали, что штаммы рода *Trichoderma*, в зависимости от видовой принадлежности, оказывают как стимулирующий, так и ингибирующий эффект на энергию прорастания и всхожесть и биометрические показатели проростков семян злаков. Все изоляты вида *T. asperellum* в различной степени оказывают ингибирующее действие. Штаммы *T. koningii* «ТСЛ-06», *T. koningii* «ТСГ» и *T. harzianum* «М99/5» проявляют достоверную стимулирующую активность по сравнению с контролем. Остальные исследуемые штаммы не оказывали достоверного действия на энергию прорастания и всхожесть семян. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о различном действии штаммов рода *Trichoderma* на показатели всхожести и энергии прорастания семян злаков, что необходимо учитывать при их отборе для использования в биоконтроле.

Для установления истинного ростстимулирующего эффекта используемого антагониста необходимо исключить присутствие фитопатогенов при выращивании растений. С этой целью удобно использование культуры каллусов. Для оценки действия штаммов использовали растворы метаболитов в культуральной жидкости штаммов рода *Trichoderma* с концентрацией 1, 3, 5 и 10 %. Результаты исследования представлены на рисунке 4. При внесении в культуру каллусов ячменя культуральной жидкости штаммов в концентрации 5 и 10 % все каллусы погибали, что свидетельствует о токсическом действии активных компонентов грибов при их высокой концентрации. При внесении культуральной жидкости 1 и 3 % отмечено

нейтральное или стимулирующее действие.

Максимальный стимулирующий эффект на каллусы ячменя сорта «Красноярский-80» оказали метаболиты штамма *T. harzianum* «M99/5»: прирост каллуса при внесении культуральной жидкости с концентрацией 1 % был в 3,6 раза, а с концентрацией 3 % – в 3 раза выше, чем в контроле. Обработка каллусов ячменя метаболитами штамма *T. koningii* «ТСЛ-06» с концентрациями 1 % и 3 % так же способствовала увеличению их роста.

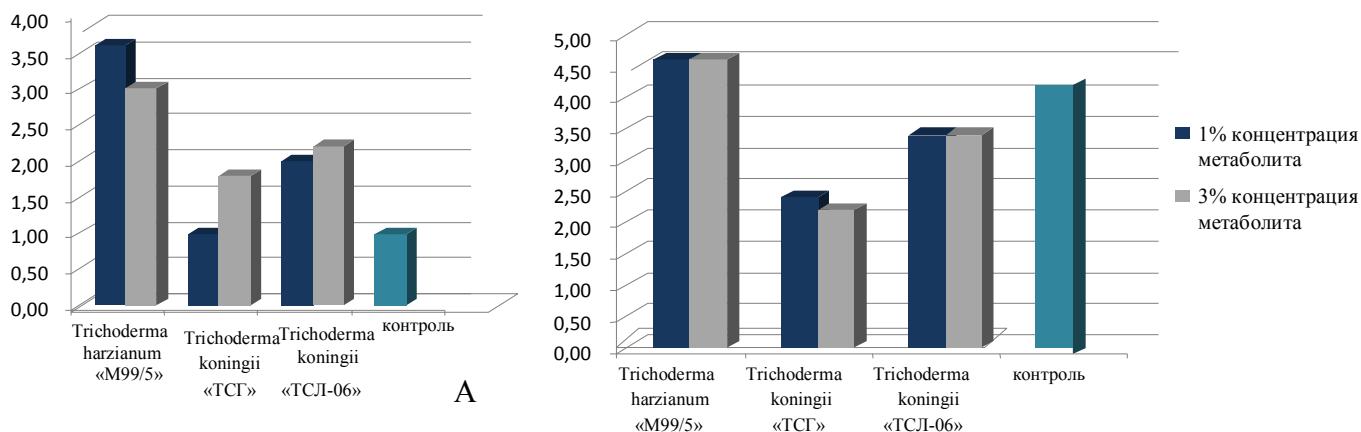


Рисунок 4 – Объем каллусов ячменя «Красноярский-80» (А) и каллуса пшеницы сорт «КС-1607» (Б) при обработке метаболитами штаммов рода *Trichoderma*

Метаболиты культуральной жидкости штамма *T. koningii* «ТСГ» стимулировали рост каллусов только при 3 %-й концентрации. Внесение в культуру каллусов пшеницы культуральной жидкости штаммов *T. koningii* «ТСЛ-06» и «ТСГ» оказывало ингибирующее действие: прирост каллусов даже в количестве 1 и 3 % был ниже, чем в контрольном варианте, а при более высоких концентрациях каллусы погибали. При внесении метаболитов штамма *T. harzianum* «M99/5» в культуру каллусов в концентрации 1 и 3 % отмечено слабое стимулирующее действие, а при более высоких концентрациях каллусы погибали. По результатам проведенных исследований на семенах и каллусах злаковых растений установлено, что биологически активные компоненты отобранных разных штаммов-антагонистов могут избирательно влиять на разные виды растений, оказывая как стимулирующее, так и ингибирующее действие.

Исследования стимулирующего эффекта штаммов рода *Trichoderma* на хвойных видах показали, что обработка семян лиственницы сибирской и сосны обыкновенной метаболитами штамма *T. asperellum* «Mg-6» стимулировала как всхожесть, так и энергию прорастания в сравнении с контролем. Обработка метаболитами культуральной жидкости штамма *T. harzianum* «M99/5» увеличивала энергию прорастания и всхожесть семян всех исследуемых видов хвойных растений.

Достоверное стимулирующее влияние метаболитов штамма *T. harzianum* «M99/5» установлено при обработке каллусов всех трех испытываемых хвойных видов (рисунок 5). Наибольший стимулирующий эффект был достигнут при обработке каллусов лиственницы сибирской. Средняя масса каллуса через 40 суток культивирования, оказалась в 1.5 раза больше по сравнению с контролем. При обработке каллусов сосны сибирской объем превышал контрольный в 1.3 раза.

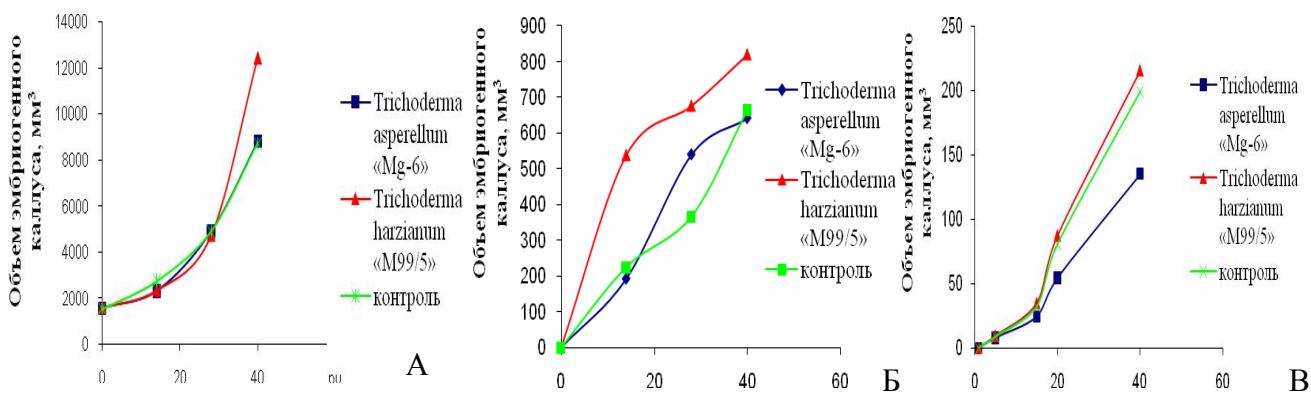


Рисунок 5 – Динамика роста эмбрионного каллуса лиственницы сибирской (А), сосны сибирской (Б) и сосны обыкновенной (В) при обработке метаболитами *T. asperellum* «Mg-6» и *T. harzianum* «M99/5».

Исследования показали, что в течение всего периода культивирования каллусов метаболиты штамма *T. harzianum* «M99/5» оказывали ростстимулирующее действие и на каллусы сосны обыкновенной, однако к концу культивирования прирост опытного каллуса достоверно не отличался от контрольного.

При введении в питательную среду метаболитов штамма *T. asperellum* «Mg-6» на определенном этапе роста была отмечена стимуляция роста каллуса лиственницы сибирской и сосны сибирской, тогда как к концу культивирования объем опытных и контрольных вариантов каллусов достоверно не различался. При обработке каллусов сосны обыкновенной штамм *T. asperellum* «Mg-6» достоверно снижал их прирост в 1.5 раза в сравнении с контролем. Из этого следует, что при использовании этого штамма в биоконтроле можно ожидать только эффект подавления фитопатогенных микромицетов, но не ростостимулирующее действие на сеянцы.

Вторичные метаболиты *Trichoderma* могут действовать подобно механизму действия ауксинов, у которых оптимальная стимуляция роста наблюдается при низких концентрациях (10^{-5} и 10^{-6} М), при ингибирующем эффекте в более высоких дозах. В то же время в результате наших исследований оказалось, что метаболиты штамма *Trichoderma harzianum* «M99/5» предположительно оказывают еще и непосредственный ростстимулирующий эффект, который отмечен на каллусных культурах. Полученные вышеизложенные данные свидетельствуют о непосредственном стимулирующем эффекте штаммов *Trichoderma harzianum* «M99/5» и *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» на рост растений, в связи с чем, представляло интерес определить наличие в культуральной жидкости штаммов специфических соединений - ауксинов, которые синтезируют отобранные штаммы-антагонисты.

Как показал анализ образцов культуральной жидкости, индолилуксусную кислоту синтезируют штаммы *Trichoderma harzianum* «M99/5» и *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06», но не синтезируют штаммы *Trichoderma asperellum* «Mg-6» и *Trichoderma koningii* «ТСГ». Определение ИУК в динамике позволило установить, что количество синтезируемой в культуральной жидкости штамма *Trichoderma harzianum* «M99/5» на 3 сутки обнаруживается в следовых количествах, а на 5 сутки и 7 сутки составляет 0.68 и 0.76 мкг/мл соответственно. При дальнейшем культивировании штамма количество ИУК не увеличивается. В культуральной жидкости штамма *Trichoderma*

koningii «ТСЛ-06» ИУК на 3 сут культивирования не обнаружено, а на 5 и 7 сутки штамм синтезирует в количестве 0.36 и 0.47 мкг/мл соответственно.

Таким образом, можно утверждать, что ростстимулирующее действие связано с биосинтезом ИУК штаммами рода *Trichoderma*, что убедительно подтверждается в опытах на каллусных культурах. Однако различия в действии метаболитов культуральной жидкости штаммов связаны с концентрацией ИУК, что существенно влияет на прирост каллусной ткани. Так, при введении культуральной жидкости штаммов рода *T. harzianum* «М99/5» и *T. koningii* «ТСЛ-06» в концентрации 10 % в питательной среде для выращивания каллусной ткани количество ИУК составило 0.076 и 0.047 мкг/мл соответственно. Такие количества ИУК приводят к ингибирующему эффекту, а при введении культуральной жидкости с концентрацией 1 и 3 %, соответствующих более низкому содержанию ИУК, оказывают стимулирующее действие на прирост каллусов ячменя. Однако такое количество ИУК не оказывает достоверного действия на рост каллусов пшеницы. Ингибирующее действие штамма *T. koningii* «ТСГ» следует объяснять действием других токсических соединений в культуральной среде штамма.

Стимулирующее действие метаболитов *T. asperellum* «Мg-6» на семена хвойных возможно достигается активацией иммунитета растения и подавления внутрисеменной инфекции. Тогда как метаболиты штамма *T. harzianum* «М99/5» и *T. koningii* «ТСЛ-06» оказывают еще и непосредственный ростстимулирующий эффект за счет биосинтеза специфических соединений.

6. Оценка возможности получения кормовых добавок на основе биомассы мицелия грибов рода *Trichoderma*

Способность видов рода *Trichoderma* утилизировать широкий набор субстратов, технологичность, сравнительно высокая скорость роста и низкая токсичность в отношении растений и животных предполагают возможность их использования, наряду с традиционными для этого рода отраслями биотехнологии, для разработки кормовых добавок и БАД. Для рекомендации микромицетов как продуцентов кормовых препаратов и БАДов обязательным условием является определение белков и липидов в биомассе, как наиболее ценных компонентов, принимающих участие в важнейших функциях организма.

Для определения общего содержания белка грибов рода *Trichoderma* использовали биомассу и культуральную жидкость штаммов *T. asperellum* «Мg-6», «ТН-5», «ТН-7» и «ТН-11», *T. harzianum* «М99/5», *T. koningii* «ТСЛ-06» и «ТСГ», *T. viride* «Lg-1» и «Lg-2».

Исследования показали, что наибольшее количество белка содержится в биомассе штаммов *T. asperellum* «ТН-11» и «ТН-5», «М99/5» *T. harzianum* и «ТСЛ-06» *T. koningii*, которое составило 22.43 и 21.88%, 20.14% и 18.50%, соответственно. Эти же штаммы грибов рода *Trichoderma* накапливали белок и в культуральной жидкости от 1.26 до 1.54% (таблица 7). Сравнительная оценка аминокислотного состава мицелия штаммов показала, что в исследуемых образцах общее содержание аминокислот составляет от 14.91 до 21.77% от сухого веса. Общее количество незаменимых для сельскохозяйственных животных и птицы аминокислот от общей суммы аминокислот в чистой культуре мицелия штаммов «Мg-6», «ТН-5», «ТН-7» и «ТН-11» вида *T. asperellum* и *T. harzianum* «М99/5» составляет 54.12; 56.87; 60.13 и 57.58% соответственно. Причем среди незаменимых аминокислот в мицелии исследуемых штаммов преобладают такие как лизин, аргинин и лейцин, лимитированные в растительных кормах для животных.

Липиды, наряду с белками, занимают важное место среди биологически активных веществ, причем их ценность тем выше, чем больше в их составе важных в биологическом отношении фосфолипидов (Феофилова, 2008, 2009).

Исследования липидной фракции штаммов показали, что общее содержание липидов в биомассе микромицетов рода *Trichoderma* составляет от 4.21 до 13.57%. Сравнительный анализ определения доли общих липидов в биомассе изучаемых микромицетов показал, что наибольшее их количество содержат штаммы вида *T. asperellum* – «ТН-11», «Mg-6», «ТН-7» и «ТН-5» от 10.99 до 13.57% (таблица 7).

В составе липидов биомассы и культуральной жидкости микромицетов рода *Trichoderma* преобладают гликолипиды, на втором месте нейтральные, затем фосфолипиды. Наибольшее содержание гликолипидов отмечено у штаммов вида *T. asperellum* – «Mg-6», «ТН-5» и «ТН-11» (71.07, 72.79 и 68.06% от общей фракции соответственно).

Таблица 7 - Содержание белков и липидов в биомассе и метаболитах грибов рода *Trichoderma*, %

Штаммы	Белки		Липиды	
	Биомасса	Культуральная жидкость	Биомасса	Культуральная жидкость
<i>Trichoderma asperellum</i> «Mg-6»	16.43±0.65	0.57±0.05	13.13±0,48	1.36±0,01
<i>Trichoderma asperellum</i> «ТН-5»	21.88±0.71	1.38±0.03	10.99±0,17	0.88±0,15
<i>Trichoderma asperellum</i> «ТН-7»	17.71±0.58	0.71±0.03	12.70±0,63	0.50±0,01
<i>Trichoderma asperellum</i> «ТН-11»	22.43±0.79	1,26±0.03	13.57±0,42	0.57±0,05
<i>Trichoderma harzianum</i> «M99/5»	20.14±0.78	1.41±0.12	4.92±0,12	0.40±0,11
<i>Trichoderma koningii</i> «ТСЛ-06»	18.50±0.84	1.54±0.25	8.79±0,14	0.21±0,01
<i>Trichoderma koningii</i> «ТСГ»	15.17±0.55	0.22±0.03	4.21±0,48	1.82±0,07
<i>Trichoderma viride</i> «Lg-1»	16.33±0.67	0.44±0.11	6.91±0,23	1.83±0,02
<i>Trichoderma viride</i> «Lg-2»	15.67±0.50	0.37±0.03	4.38±0,56	1.63±0,02

Нейтральные липиды в значительном количестве были обнаружены в биомассе штаммов *T. koningii* «ТСЛ-06» (35.53%), *T. harzianum* «M99/5» (33.83%). Наибольшее содержание фосфолипидов выявлено у штаммов *T. asperellum* «ТН-7» и *T. viride* «Lg-1» (18.55 и 18.38%).

По результатам исследования количества белков и липидов в биомассе грибов *Trichoderma* были отобраны 4 штамма, перспективных для получения кормовых препаратов: *T. asperellum* «ТН-5» «ТН-7» и «ТН-11», *T. harzianum* «M99/5» которые были оценены на взаимодействие с селеном в дальнейших исследованиях.

Обогащение микроэлементами сред при культивировании грибов может стать перспективным источником получения кормовых добавок, содержащих органические формы селена в мицелии. Проведенные исследования по влиянию селена на прорастание спор штаммов *Trichoderma* показали, что они обладают различной чувствительностью к изменению концентрации селена в среде. При концентрациях элемента в среде 15 мг/л прорастаемость спор достоверно не отличалась от контроля, при концентрации 20 мг/л имело место стимулирование роста грибов, а доза 25 мг/л достоверно ингибировала прорастание спор. Добавление селена в количестве 20 мг/л приводило к подавлению или задержке роста штаммов в условиях стационарного культивирования без перемешивания. При глубинном культивировании токсическое действие селена в концентрации проявлялось слабее и снижение урожая биомассы не

было отмечено для всех исследуемых штаммов. Для штамма *T. asperellum* «ТН-5» установлено увеличение выхода биомассы по сравнению с контролем на 1.2% (таблица 8).

Таблица 8 - Накопление биомассы штаммами *Trichoderma* при глубинном культивировании на 10 сутки, г а.с.в.

Штаммы	Контроль	Концентрация селена, 20 мг/л
<i>Trichoderma asperellum</i> «ТН-5»	4.38±0,10	5.28±0,12
<i>Trichoderma asperellum</i> «ТН-7»	3.49±0,09	3.88±0,08
<i>Trichoderma asperellum</i> «ТН-11»	3.80±0,09	3.89±0,09
<i>Trichoderma harzianum</i> «М99/5»	4.97±0,11	4.81±0,11

Проведенные исследования показали, что при содержании селена 20 мг/л в среде в условиях стационарного культивирования без перемешивания штаммы накапливали от 10.76 до 27.43 мкг/г сухой биомассы. В условиях глубинного культивирования наибольшее количество селена накапливалось в мицелии штамма «ТН-5» *Trichoderma asperellum* и составляло 937.5 мкг/г (таблица 9).

Таблица 9 - Содержание селена в биомассе штаммов рода *Trichoderma* при глубинном культивировании, мкг/г

Штаммы	Контроль	Концентрация селена, 20 мг/л
<i>Trichoderma asperellum</i> «ТН-5»	0,48	937,5
<i>Trichoderma asperellum</i> «ТН-11»	0,65	805,3
<i>Trichoderma harzianum</i> «М99/5»	0,06	334,3

С помощью установки искусственный желудок было установлено, что биомасса мицелия отобранного штамма «ТН-5» *T. asperellum* с селеном и без селена не является токсичной и может быть использована в качестве кормовой селеносодержащей добавки.

Для выполнения дальнейшей задачи использования мицелия штамма *Trichoderma asperellum* «ТН-5» в кормопроизводстве необходимо было сделать разработку белково-витаминной добавки для кормления сельскохозяйственной птицы. В связи с этим в исследованиях использовали мицелий штамм *Laetiporus sulphureus*: «МЗ-22»(ВКМ-) и функциональный мясной протеин, которые по своим характеристикам больше всего подходили для создания кормовой добавки.

С учётом степени переваримости белка компонентов, проводили расчёт белкового модуля полученной кормовой добавки. Расчёт рецепта рациона для цыплят-бройлеров с использованием кормовой добавки проводили по специальной программе во ВНИТИП.

Рецепт рассчитывали для цыплят-бройлеров первого и второго периода кормления. Программа расчёта учитывает рекомендации по суточным потребностям организма цыплёнка-бройлера соответствующей возрастной категории в питательных элементах и рассматривает следующие параметры: количество сырого протеина, количество сырого жира, количество сырой клетчатки, зольность, количество незаменимых аминокислот (лизина, метионина, цистина, метионина+цистина, треонина, триптофана). Результатом работы программы является рецепт, в котором указаны массовые соотношения всех рассматриваемых компонентов рациона.

Таблица 10 – Фактический аминокислотный скор компонентов кормовой добавки.

Аминокислота	Функциональный мясной протеин, %	Мицелий штамма «MZ-22» <i>Laetiporus sulphureus</i> , %	Мицелий штамма «ТН-5» <i>Trichoderma asperellum</i> , %
Гистидин	89	153	156
Изолейцин	110	119	144
Лейцин	96	90	117
Лизин	113	85	100
Метионин+Цистин	69	28	80
Фенилаланин+Тирозин	73	104	163
Треонин	75	121	109
Триптофан	34	166	196
Валин	91	168	140

Аминокислотный скор по триптофану у штамма «ТН-5» *Trichoderma asperellum* (566) значительно превышает таковой показатель у функционального мясного протеина (34), что является положительным фактором при составлении кормовой добавки. Скор по сумме аминокислот метионин+цистин составляет 80 (таблица 10). Именно в этих аминокислотах может аккумулироваться селен. Все это дает основание полагать, что мицелий штамма может быть с успехом использован при разработке кормовой добавки для бройлеров. Следует также указать, что мицелий этого штамма уступает по скору только в отношении аминокислот треонина и валина в мицелии штамма «MZ-22» *L. sulphureus*.

В соответствии с проведенными исследованиями совместно с сотрудниками ВНИТИП был разработан рецепт рациона с использованием кормовой добавки в виде мицелия двух продуцентов *L. sulphureus* штамм «MZ-22» и *T. asperellum* штамм «ТН-5».

7. Твердофазное культивирование грибов рода *Trichoderma* на растительных субстратах

Успех использования биологического метода защиты растений зависит не только от подбора высокоэффективного штамма рода *Trichoderma*, но и в равной мере от качества полученного биопрепарата на его основе. Твердофазным способом биопрепараты получают на отходах агропромышленного комплекса. Перспективным является расширение сырьевой базы для производства биопрепаратов наиболее распространенных отходов деревообрабатывающей промышленности, которые при внесении одновременно улучшают структуру почв. Для подбора дешевых и экологически чистых субстратов была проведена оценка способности биодеструкции отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности штаммами грибов рода *Trichoderma* (*T. asperellum* «Mg-6», *T. koningii* «ТСЛ-06» и *T. harzianum* «M99/5») отобранными по антагонистической и ростстимулирующей активности для производства биопрепаратов.

При росте на исследуемых растительных субстратах образуются конидиеносцы с конидиями, форма и размеры которых не отличаются от органов бесполого спороношения, формирующихся при росте на стандартных питательных средах. Однако титр данных штаммов различается. Так, наибольший выход КОЕ штамма *T. asperellum* «Mg-6» отмечен на коре пихты исходной, выход спор составил $3.5 \cdot 10^9$,

топинамбуре исходном – $3,4 \cdot 10^9$ и коре пихты после экстракции изопропанолом – $3,22 \cdot 10^9$ (таблица 11). Предварительная химическая обработка различными органическими растворителями либо не повышает степень доступности сырья для деструкции штаммов, либо оказывает ингибирующий эффект на рост грибов. Таким образом, для наработки препарата можно использовать отходы без предварительной химической обработки.

Таблица 11 - Титр (КОЕ/г) штаммов рода *Trichoderma* на растительных субстратах на 15 сутки культивирования

Субстрат	<i>T. asperellum</i> «Mg-6»	<i>T. harzianum</i> «M99/5»	<i>T. koningii</i> «ТСЛ-06»
Гидролизный лигнин	$1.60 \cdot 10^8$	$2.00 \cdot 10^7$	$2.90 \cdot 10^7$
Кора лиственницы после CO ₂ -экстракции	$3.30 \cdot 10^7$	$1.10 \cdot 10^7$	$2.60 \cdot 10^7$
Кора пихты:			
- исходная	$3.50 \cdot 10^9$	$1.33 \cdot 10^9$	$1.24 \cdot 10^9$
- после экстракции гексаном	$4.00 \cdot 10^8$	$0.90 \cdot 10^8$	$0.50 \cdot 10^8$
- после экстракции горячей водой	$3.00 \cdot 10^8$	$7.80 \cdot 10^7$	$6.50 \cdot 10^8$
- после экстракции изопропанолом	$3.22 \cdot 10^9$	$5.30 \cdot 10^8$	$5.10 \cdot 10^8$
- после экстракции холодной водой	$2.86 \cdot 10^9$	$3.00 \cdot 10^8$	$3.60 \cdot 10^8$
Топинамбур:			
- исходный	$3.40 \cdot 10^9$	$2.20 \cdot 10^9$	$2.70 \cdot 10^9$
- после водной экстракции	$1.90 \cdot 10^8$	$2.10 \cdot 10^8$	$3.70 \cdot 10^8$

Скрининг штаммов для получения биологических препаратов на растительных субстратах должен определяться не только их антагонистической активностью, но и способностью усваивать при твердофазном культивировании используемый субстрат. В дальнейшем была исследована степень биодеструкции грибами рода *Trichoderma* трех субстратов: гидролизный лигнин, коре пихты и вегетативной части топинамбура. О результатах эффективности воздействия ферментативного комплекса штаммов рода *Trichoderma* на лигноуглеводные субстраты судили по изменению целлюлозных и лигниновых компонентов, а также накоплению гуминовых веществ (таблицы 13 и 14).

Наибольшей степени деструкции подвергались компоненты коры пихты. Из всех исследуемых субстратов максимальное снижение легкогидролизуемых и трудногидролизуемых полисахаридов отмечено при росте штамма *T. asperellum* «Mg-6» на коре пихты, при этом количество легкогидролизуемых полисахаридов по сравнению с исходным сырьем уменьшилось в 1.3 раза, трудногидролизуемых полисахаридов – в 1.7 раза.

При росте штамма *T. harzianum* «M99/5» содержание легкогидролизуемых и трудногидролизуемых полисахаридов снижалось на 16% на гидролизном лигнине, на 24% на топинамбуре и на 27% на коре пихты. При росте штамма *T. koningii* «ТСЛ-06» содержание легкогидролизуемых и трудногидролизуемых полисахаридов на тех же субстратах снижалось на 19%, 20% и 32%, соответственно.

Процесс деструкции лигноуглеводного комплекса сопровождается образованием гуминовых веществ. Наши исследования показали, что образование гуминовых кислот отмечено у всех штаммов на трех типах субстратов, однако их количество зависит от типа субстрата и самого продуцента. Наибольшее количество гуминовых веществ отмечено в результате культивирования штамма «Mg-6» *T. asperellum* на

коре пихты и составило 11.8%.

Таблица 13 - Химический состав коры пихты исходной до и после биодеструкции %, а.с.с.

Показатели	До биодеструкции	После биодеструкции штаммами		
		<i>T. asperellum</i> «Mg-6»	<i>T. harzianum</i> «M99/5»	<i>T. koningii</i> «ТСЛ-06»
Легкогидролизуемые полисахариды	16.70	13.22	12.70	14.27
Трудногидролизуемые полисахариды	20.80	12.20	14.54	11.16
Сумма полисахаридов	37.50	25.42	27.24	25.43
Лигниновые вещества	43.50	47.30	46.40	48.20
Гуминовые вещества	-	11.80	8.90	5.70
Белок	3.29	3.93	3.85	3.62
Зола	8.50	4.40	5.10	4.30

При культивировании штамма *T. asperellum* «Mg-6» на гидролизном лигнине снижение содержания лигниновых веществ было более значительно по сравнению с другими штаммами, что можно объяснить его более высокой фенолоксидазной активностью (Махова, 2003).

Таблица 14 - Химический состав гидролизного лигнина до и после биодеструкции %, а.с.с. с учетом убыли массы

Показатели	До биодеструкции	После биодеструкции штаммами		
		<i>T. asperellum</i> «Mg-6»	<i>T. harzianum</i> «M99/5»	<i>T. koningii</i> «ТСЛ-06»
Легкогидролизуемые полисахариды	2.98	1.58	1.21	1.42
Трудногидролизуемые полисахариды	9.52	9.08	9.22	8.76
Сумма полисахаридов	12.50	10.66	10.43	10.18
Лигниновые вещества	71.05	63.09	68.54	69.23
Гуминовые вещества	-	11.32	10.90	1.80
Белок	2.79	3.31	3.53	3.26
Зола	7.40	4.40	5.10	5.62

Таким образом, по совокупности показателей для получения биопрепарата были рекомендованы кора пихты в качестве субстрата и штаммы *T. asperellum* «Mg-6» и *T. harzianum* «M99/5» как продуценты. Предпосылками для использования коры пихты в качестве сырья для производства биопрепарата являются ее высокий гумусообразующий потенциал и максимальная доступность для ферментативной системы продуцентов.

Исследования, проведенные в лабораторных условиях, позволили разработать технологию получения биопрепарата Триходермин-М на основе штаммов *T. asperellum* «Mg-6» и *T. harzianum* «M99/5».

8. Оценка эффективности использования биопрепаратов и вермикомпостов на основе штаммов грибов рода *Trichoderma*

Испытания биопрепарата триходермина в полевых условиях

Опытные партии биопрепаратов Триходермин-М в виде порошка были наработаны и испытаны на посевах пшеницы сорта «КС-1554» и ячменя сорта «Красноярский-80» на Мининском опытно-производственном поле КНИИСХ и на территории Мининского лесного питомника на посевах *Pinus sibirica* L.

Исследование влияния биопрепарата на урожай злаковых культур показало, что для ячменя достоверное увеличение в сравнении с контролем наблюдается по трем показателям из шести (количество зерен в колосе, растений к уборке, урожайность), а для пшеницы по двум (количество зерен в колосе и масса 1000 зерен). Оценка внутренней инфекции семян полученного урожая злаковых, выращенных при использовании препарата Триходермин-М, показала уменьшение внутренней инфекции фитопатогенами в 1,3 раза в опыте с пшеницей и в 2 раза в опыте с ячменем по сравнению с контрольными семенами.

Исследование состава микрофлоры почвы при посеве злаковых показало, что при использовании биопрепарата Триходермин-М происходят изменения количественного отношения состава микроорганизмов. При посевах пшеницы и ячменя по сравнению с исходной почвой, как в контроле, так и в случае применения биопрепарата, наблюдается значительное увеличение количества аммонификаторов в почве, при этом их количество в присутствии препарата Триходермин-М на 25% выше, чем в контроле. Численность азотфиксаторов к концу сезона уменьшается, при внесении биопрепарата наблюдается уменьшение на 10% по сравнению с контролем.

Обработка посевов сосны сибирской биопрепаратом повысила число всходов на 25,6 % и выход сеянцев 1-го года на 35,7 % от контроля. Исследование состава микрофлоры почвы при посеве сосны сибирской показало, что, как в контрольном варианте, так и в присутствии триходермина, по сравнению с исходной почвой происходит уменьшение аммонификаторов на 18 и 39 %, соответственно. При использовании препарата численность азотфиксаторов тоже уменьшается, а актиномицетов увеличивается на 42 %.

Сравнение комплексов микромицетов, заселяющих почвы, до и после обработки триходермином, позволило установить, что они различаются как по богатству видов, так и по частоте встречаемости. Наибольшее видовое разнообразие характерно для комплекса микромицетов прикорневой зоны пшеницы и ячменя, выращенной в контроле. Доминирующее положение среди сапротрофов занимали грибы, относящиеся к родам *Penicillium* и *Aspergillus*. Наиболее существенные изменения в структуре комплекса микромицетов прикорневой зоны пшеницы и ячменя были обнаружены при обработке триходермином. Отмечено уменьшение видового разнообразия грибов, что свидетельствует о глубине сдвигов видового состава микоценоза. Резко снизилась популяционная плотность возбудителей корневых гнилей родов *Alternaria* и *Bipolaris*. После обработки триходермином посевов сосны сибирской отмечено уменьшение популяционной плотности возбудителей заболеваний растений рода *Fusarium*, снизилась не только частота встречаемости в структуре сообщества, но и их жизнеспособность. Таким образом, интродуцированные штаммы изменяют структуру микобиоты, подавляя фитопатогены и увеличивая долю сапротрофных групп организмов.

Оценка действия полученных вермикомпостов на рост растений и подавление фитопатогенных грибов в условиях закрытого грунта

Проведенная оценка отдельного действия полученного ранее вермикомпоста, а также с добавлением фитопатогенов и штамма МГ/6 *Trichoderma asperellum* на развитие огуречной рассады при выращивании их в условиях теплицы, показала, что добавление биоконтрольного штамма как в сертифицированный вермикомпост, так и в полученный биогумус оказывает достоверный стимулирующий эффект на рост и развитие растений. Количество нормально вегетирующих растений на 14 сутки вегетации было максимально при внесении *T. asperellum* и составило 100 %, в вариантах совместного внесения с фитопатогенами - 90 %, а в контроле только 75 %. В вариантах выращивания огурцов с внесением фитопатогенных грибов гибель растений достигала 40 % и более.

Добавление в исходные субстраты перед вермикомпостированием штамма-антагониста и препарата «Триходермин – М» положительно влияло на рост, накопление биомассы и темпы формирования половозрелых особей в популяции червей *E. fetida*. Биомасса дождевых червей возрастала при вермикомпостировании в течение 42 суток в контрольном варианте с 40,0 до 51,2 г/кг (на 28 %) переработанного субстрата, а с инокуляцией микромицетов до 57,06 г/кг (на 43 %) с *Trichoderma asperellum* и до 58,14 г/кг с триходермином – М (на 45%). Доля половозрелых особей дождевых червей также выше при вермикомпостировании субстратов с внесением антагонистов, чем в контрольном варианте (таблица 15).

Таблица 15 - Накопление биомассы червей *E. fetida* при предлагаемом способе вермикомпостирования

Варианты опыта	Вес червей, г на 1 кг субстрата			
	0 сут	7 сут	14 сут	42 сут
Контроль без внесения грибов	40,0	51,44±3,6	50,06±3,5	51,2±3,6
Вермикомпостирование с <i>T. asperellum</i>	40,0	55,12±2,9	56,74±2,7	57,06±5,7
Вермикомпостирование с препаратом «Триходермин – М»	40,0	54,22±4,6	56,52±2,4	58,14±2,7

Уже через 17 суток вермикомпостирования их доля в популяции *E. fetida* составляла 45-50%, а в контроле 31-40%. Количество коконов, отложенных дождевыми червями при вермикомпостировании, было выше на 15-25% при предлагаемом способе по сравнению с контролем. Соотношение численности в пределах разных возрастных групп в контроле и опытных вариантах свидетельствует о положительном стимулирующем влиянии микромицетов рода *Trichoderma* на развитие червей. Численность половозрелых особей в этом варианте была максимальной на протяжении всего процесса вермикомпостирования, что свидетельствует об их хорошем развитии.

Итак, добавление штаммов-антагонистов позволяет эффективнее осуществлять переработку органических отходов (сократить время), повысить продукцию дождевых червей и долю в ней половозрелых особей и получать биопрепарат, обладающий повышенным супрессивным действием к фитопатогенам и ростстимулирующим - на растения.

Оценка способности адсорбции тяжелых металлов биомассой штаммов *Trichoderma*

Во многих работах было показано что, грибы рода *Trichoderma* могут быть весьма устойчивы к промышленным загрязнениям окружающей среды. Так, например, при сравнении микобиоты загрязненных и экологически чистых местообитаний в Марокко выяснилось, что *T. koningii* встречается только в наиболее неблагоприятных местах. Грибы рода *Trichoderma* способствуют очищению воды и почв не только разлагая сложные органические загрязнители, но и адсорбируя и накапливая ионы металлов, в том числе и токсичных. Так, например, аккумуляция цинка, кадмия и ртути голодающим и неголодающим мицелием *T. harzianum* происходит в широких пределах pH среды. Наибольшее количество накапливается в неголодающем мицелии при pH 6,5 (50 mmol kg⁻¹), однако при низких значениях pH накопление металлов может быть даже больше. *T. viride* способна накапливать кобальт в мицелии и конидиях (Frank et al., 1993a, 1993b).

В наших исследованиях по ряду параметров были отобраны три штамма, обладающие хорошим ростом и способностью расти на твердых средах с высоким, превышающим ПДК содержанием тяжелых металлов для которых исследовался рост и адсорбция металлов в условиях глубинной культуры.

В результате проведенных исследований роста трех штаммов в условиях глубинной культуры установлено, что микроорганизмы обладают неодинаковой чувствительностью к повышению концентрации металлов в среде. Увеличение содержания токсических металлов приводит к заметному подавлению роста штаммов при глубинном культивировании (таблица 16). Достоверное угнетение роста отмечено для меди, никеля и свинца, в концентрации 5 ммоль/л эти металлы полностью ингибировали рост всех трех штаммов.

Таблица 16 – Накопление биомассы штаммами *Trichoderma* при глубинном культивировании на 7 сутки,

Биомасса (г/л) при культивировании на средах с содержанием металлов						
Штамм	Me	контроль	0,1ммоль/л	1 ммоль/л	3 ммоль/л	5 ммоль/л
<i>T. asperellum</i> 310	Zn	7,15±0,15	8,25±0,15	4,90±0,51	3,10±0,66	2,45±0,65
	Cd	7,15±0,15	5,80±0,66	4,45±1,21	2,30±0,96	1,92±0,17
	Cu	7,15±0,15	1,90±0,30	0,60±0,60	0	0
	Pb	7,15±0,15	4,25±0,15	4,40±0,21	0	0
<i>T. harzianum</i> M 99/5	Zn	8,05±0,15	6,35±0,23	7,75±0,46	8,80±0,69	2,0±0,24
	Cd	8,05±0,15	2,70±0,11	2,35±0,03	1,0±0,07	0
	Cu	8,05±0,15	1,95±0,76	0,40±0,01	0	0
	Pb	8,05±0,15	3,35±0,12	2,65±0,07	1,30±0,07	0,15±0,01
<i>T. koningii</i> ТСЛ-06	Zn	9,25±0,15	7,75±0,21	6,70±0,23	7,75±0,24	2,15±0,12
	Cd	9,25±0,15	5,40±0,14	2,90±0,15	2,65±0,09	1,15±0,09
	Cu	9,25±0,15	3,70±0,08	1,40±0,03	0	0
	Pb	9,25±0,15	3,75±0,09	2,35±0,07	0,15±0,05	0

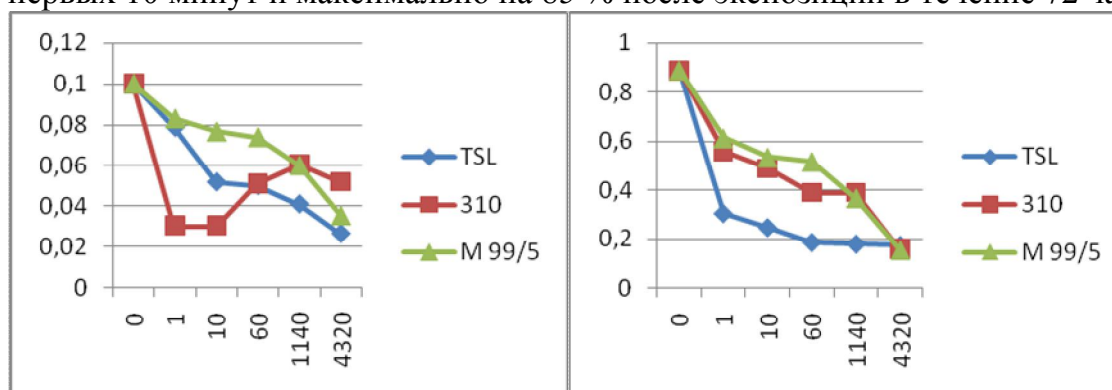
При содержании меди 1 ммоль/ л среды у всех штаммов наблюдали окрашивание пеллетов в голубой или синий цвета, очевидно в связи связывания ионов меди Cu(II) клеточной стенкой грибов. Подобный эффект окрашивания мицелия в голубой цвет для *N. crassa* был отмечен Суббаринян с соавторами (1989) и

синий для *T. viride* Онанде с соавторами (2003). Согласно их предположениям голубоая окраска мицелия была обусловлена связыванием ионов меди белками клеточной стенки.

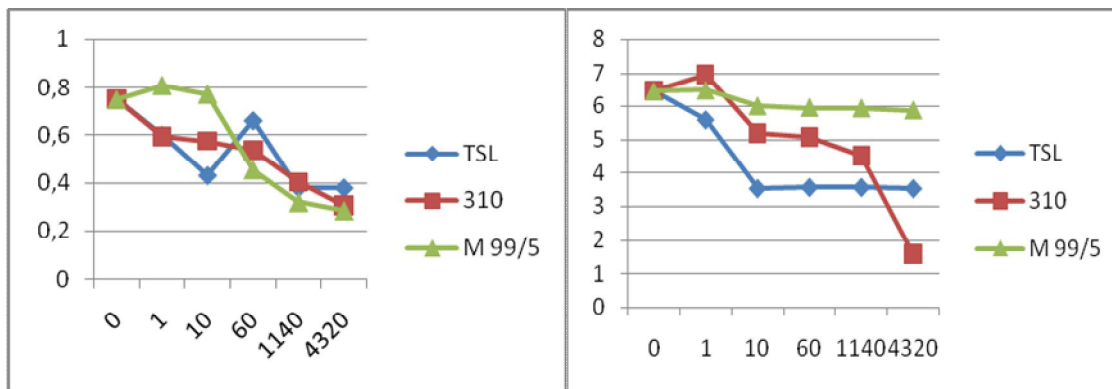
Концентрация 3 ммоль/л никеля и свинца практически полностью подавляла рост штаммов, а концентрации от 0,1 до 1 ммоль достоверно снижают прирост биомассы штаммов в 3,2 и 4,1 раза для штамма ТСЛ-06 и 4,2 раза для штамма 310 в сравнении с контролем. Наиболее устойчивым штаммом способным расти при концентрациях свинца и свинца от 0,1 до 1 ммоль оказался штамм М 99/5, однако при содержании свинца 1 ммоль/л среды урожай биомассы снижался в 79 раз в сравнении с контролем. Токсическое действие кадмия и цинка проявляется значительно слабее, а для цинка отмечен незначительный стимулирующий эффект в концентрациях 0,1 ммоль/л для штамма 310.

В ранних исследованиях в области биосорбции ионов тяжелых металлов использовались живые клетки микроорганизмов. Однако, у мертвых и инактивированных клеток, показали многочисленные исследования, была та же самая или еще более высокая способность к адсорбции металлических ионов, в сравнении с живыми клетками этого же вида или штамма. Тем временем мертвые клетки могут иметь преимущество, например отсутствие влияния рН среды или высокой концентрации ионов металла на адсорбирующую способность микроорганизма, и т.д. Поэтому, исследования в области биосорбции, вовлекающие предварительно инактивируемую биомассу, доминируют в последние годы (Малик, 2004).

Исследовали адсорбцию четырех металлов инактивированной биомассой трех штаммов в концентрациях: медь и свинец 0,1 и 1 мг/л раствора и кадмий и цинк 1 и 10 мг/л раствора. Максимальной степенью сорбции всех изученных металлов обладал штамм ТСЛ-06 *T. koningii* (рисунки 6-9). При экспозиции мицелия штамма в растворы содержание металлов снижается: для кадмия – 2,16 раз при концентрации 1 мг/л и 4,16 раз при концентрации 10 мг/л (рисунок 8); кроме того наблюдается значительное связывание меди мицелием, ее концентрация в растворе уменьшается в 3,15 раз при концентрации 1 мг/л до 10 раз при концентрации 0,1 мг/л (рисунок 9). Из литературных данных известно, что сорбция ионов меди (II) возрастает при увеличении времени нахождения сорбента и снижением концентрации меди в растворе (Singh et al., 2010). Концентрация свинца снижается на 50 % в течение первых 10 минут и максимально на 85 % после экспозиции в течение 72 часов.

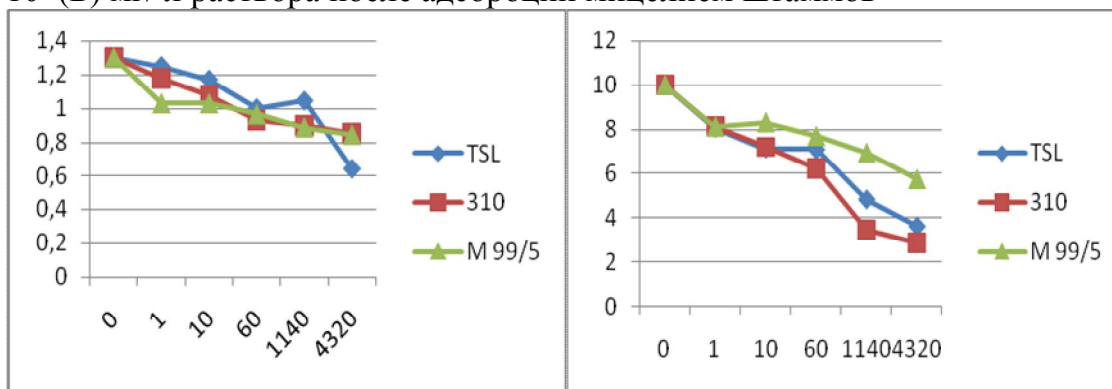


А Б
Рисунок 6. Остаточное содержание свинца в растворе при концентрациях 0,1(А) и 1 (Б) мг/ л раствора после адсорбции мицелием штаммов



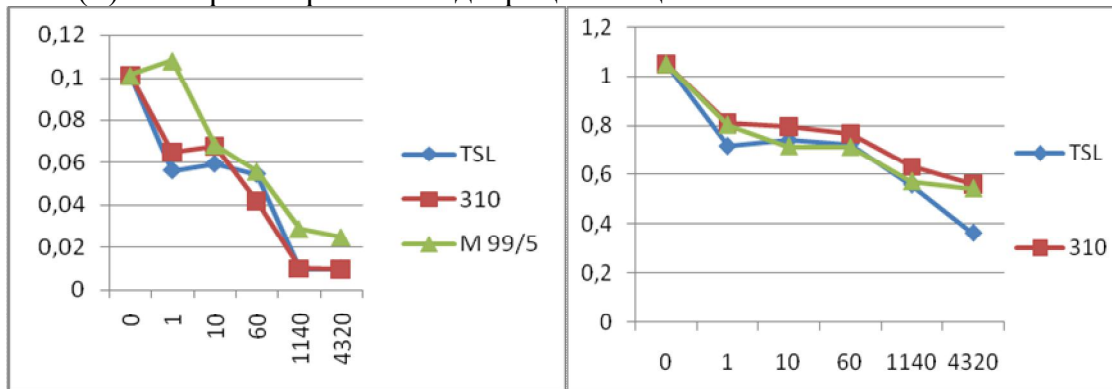
А Б

Рисунок 7. Остаточное содержание цинка в растворе при концентрациях 1 (А) и 10 (Б) мг/ л раствора после адсорбции мицелием штаммов



А Б

Рисунок 8. Остаточное содержание кадмия в растворе при концентрациях 1(А) и 10 (Б) мг/ л раствора после адсорбции мицелием штаммов



А Б

Рисунок 9. Остаточное содержание меди в растворе при концентрациях 0,1(А) и 1 (Б) мг/ л раствора после адсорбции мицелием штаммов

Наиболее значительно все штаммы адсорбируют свинец. Так, в варианте, где его содержание в растворе составляет 1мг/л, за первые 10 минут всеми исследуемыми штаммами адсорбируется от 35 до 50 % металла, а к концу содержание ионов свинца в растворе снижается в 3 - 4,5 раза, а его остаточное содержание в растворе не превышает 20 % от первоначальной концентрации (рисунок б). Это согласуется с данным индийских ученых (Singh et al., 2010), показавшими, что при использовании инактивированной биомассы способность штамма *T. viride*, выделенного из загрязненных почв, сорбировать ионы Pb(II) и Cd(II) возрастает при

повышении их концентрации в растворе. При насыщении раствора дальнейшая аккумулятивная способность снижается. При этом аккумулятивная способность исследуемого штамма к адсорбции свинца сопоставима с рекомендованным штаммом *T. viride*, используемым в биореакторе для очистки сточных вод, в Индии (Singh et al., 2010). В растворах, содержащих металлы в количестве 1 мг/л, вне зависимости от исследуемого штамма, адсорбция происходит быстрее и снижение концентрации их более значительное.

Таким образом, исходя из полученных результатов, штамм ТСЛ-06 можно рекомендовать в качестве адсорбента для сточных вод, загрязненных такими тяжелыми металлами как свинец, кадмий, никель.

ВЫВОДЫ

1. На основании многолетнего изучения микобиоты установлено, что грибы рода *Trichoderma* являются типичными представителями на территории бассейна реки Енисей. С использованием культурально-морфологических и молекулярно-генетических методов идентифицировано 8 видов: *T. asperellum* Samuels, *T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers, Fr., *T. citrinoviride* Bissett, *T. hamatum* (Bon) Boner, *T. atroviride* Koning. В ядро доминантных видов входят: *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. citrinoviride*. Среди видов, ранее не описанных на исследуемой территории, обнаружены: *T. citrinoviride*, *T. hamatum* и *T. atroviride*.

2. Природными резервуарами сохранения численности и видового разнообразия видов рода *Trichoderma* являются целинные лесные почвы, где частота встречаемости составляет более 60 %. Антропогенные ландшафты характеризуются резким снижением пространственной и временной частоты встречаемости (0-7%) и видового разнообразия (менее 4- 5 видов).

3. Природные популяции *Trichoderma* гетерогенны и характеризуются высокой степенью полиморфизма. Абиотические факторы (температура, аэрация, влажность) и субстратная специфичность определяют доминирование определенных видов и популяций рода *Trichoderma*. Впервые установлена способность к анаэробному росту и брожению у видов *Trichoderma*, способствующая отбору определенных клонов в местообитаниях с ограниченной обеспеченностью кислородом.

4. Качественная популяционная структура видов *Trichoderma* представляет собой мозаику клонов с различным типом совместимости, скорости роста, интенсивности спороношения, отношения к субстрату и конкурентоспособности.

5. Популяции грибов рода *Trichoderma* являются природным резервуаром для поиска штаммов-продуцентов биологически активных соединений, эффективных для контроля широкой группы организмов: фитопатогенных грибов, условно-патогенных и патогенных бактерий, опухолевых клеток, а также оказывающих влияние на рост высших растений. Стабильность культурально-морфологических признаков является критерием отбора штаммов - продуцентов для получения целевых продуктов в биотехнологии.

6. Исследование активных компонентов культуральной жидкости и экстрактов мицелия выявило наличие веществ непептидной природы, оказывающих цитотоксическое действие на опухолевые клетки (вызывающих индукцию позднего

апоптоза и влияющих на клеточный цикл) и ингибирующих рост патогенных грамположительных бактерий. По результатам проведенных исследований отобраны штаммы: *T. asperellum* T-310 (ВКМ F4340D) и *T.harzianum* TV4-1 (ВКМ F4341D) как продуценты противоопухолевых соединений и штамм *T.harzianum* M99/51 - продуцент противоопухолевых и антимикробных веществ (ВКПМ F- 1027).

7. Преобладающим типом взаимоотношения местных изолятов *Trichoderma* является положительное воздействие на растения, связанное с активацией иммунного ответа растения-хозяина в ответ на воздействие фитопатогенных грибов при интродукции микромицетов-антагонистов и прямого ростстимулирующего действия за счет синтеза специфических соединений.

8. Показаны механизмы ростстимулирующего действия антибиотически активных штаммов на различные виды растений и культуры тканей. Впервые установлено, что виды *T. asperellum* и *T. koningii* способны синтезировать вещества ауксиновой природы, стимулирующие рост растений. Отобраны перспективные штаммы *T. asperellum* «ТСЛ-06» и *T. harzianum* «M99/5», синтезирующие индолилуксусную кислоту в количестве 0,249 и 0,051 мг/л.

9. Составлены экологические обоснования скрининга и интродукции грибов-антагонистов в агроэкосистемы, способствующие повышению уровня экологической безопасности. Предложены штаммы - продуценты биопрепаратов - *T. asperellum* штамм Mg-6, *T. harzianum* M-99/5.

10. Изучение закономерностей роста, ферментативной активности, спорообразования на различных лигноцеллюлозных субстратах в условиях твердофазного культивирования позволило определить основные показатели продуктивности и разработать технологический регламент на получение биопрепарата Триходермин-М.

11. Испытание опытных партий биопрепарата показали его эффективность в защите от фитопатогенов злаков и хвойных, повышении продуктивности ячменя и пшеницы, снижения инфекции урожая новой репродукции, а также увеличение выхода здоровых семян сосны сибирской. Основными критериями экологической эффективности следует считать снижение численности фитопатогенных микромицетов при сохранении ядра доминирующих сапротрофных видов и положительную направленность почвообразовательного процесса.

12. С целью регуляции жизнедеятельности популяций калифорнийских червей и защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов разработана ускоренная технология вермикомпостирования с использованием штаммов *T. asperellum* «Mg-6» и *T. harzianum* «M99/5», обладающих ростстимулирующими и антибиотическими свойствами.

13. На основе изучения биохимического состава мицелия показана возможность использования штаммов грибов рода *Trichoderma* в качестве продуцентов кормового препарата и отобраны культуры, перспективные для получения БАД. Качественный состав аминокислот белка мицелия штаммов характеризуется наличием незаменимых аминокислот: лизина, триптофана, аргинина и лейцина, лимитированного в растительных кормах, используемых для птиц. Общее содержание липидов в биомассе микромицетов рода *Trichoderma* составляет от 4.21 до 13.57%. В составе липидов биомассы и культуральной жидкости микромицетов рода *Trichoderma*

преобладают гликолипиды.

14. Исследовано влияние селена на рост и продуктивность штаммов грибов рода *Trichoderma*, определены условия культивирования штаммов и оптимальная доза селена в питательной среде. На основании сравнительной оценки влияния селена на продуктивность биомассы грибов отобран штамм «ТН-5» *T. asperellum*, биомасса которого не является токсичной и может быть использована в качестве кормовой селенсодержащей добавки, при выращивании на жидкой среде с содержанием селена 20 мкг/л. Получена селенсодержащая кормовая добавка с содержанием белка не менее 22%, селена 93.75 мг/г и определена ее перевариваемость, обеспечивающая активность пепсина 0.213 ТЕ. Разработан рецепт рациона цыплят-бройлеров с использованием кормовой добавки в виде мицелия двух продуцентов *Laetiporus sulphureus* штамм «MZ-22» и *Trichoderma asperellum* штамм «ТН-5».

15. Показана возможность использования мицелия штаммов грибов рода *Trichoderma* для адсорбции тяжелых металлов из растворов. Мицелий штамма «ТСЛ-06», рекомендован в качестве адсорбента для сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами свинец, кадмий, никель или для комплексной очистки загрязненных почв совместно с фиторемедиантами.

Основные публикации по теме работы

Статьи в рецензируемых журналах

1. Рязанова Т.В., Громовых В.С., Махова Е.Г., Громовых Т.И., Чупрова Н.А. Пути поиска новых штаммов – продуцентов биопрепаратов для защиты сеянцев хвойных// Химия растительного сырья, Барнаул, 2001. С. 34 – 38
2. Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Громовых В.С., Махова Е.Г. Эффективность использования *Trichoderma asperellum* (штамм МГ-97) и влияние на развитие фузариоза на сеянцах *Larix sibirica*// Микология и фитопатология, 2002, том 36, вып. 4.- С. 70-76
3. Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Садыкова В.С., Габидулина И.Г. Биологические свойства нового штамма *Streptomyces lateritius* 19-97 М, перспективного для использования в растениеводстве// Биотехнология, №5. 2005.-С. 35-40
4. Кураков А.В., Прохоров И.С., Костина Н.В., Махова Е.Г., Садыкова В.С. Стимуляция грибами азотфиксации в дерново-подзолистых почвах// Почвоведение. Т.39, № 9, 2006. - С.1075 – 1081
5. Садыкова В.С., Ковалева Г.К., Чижмотря Н.М., Гаврилова А.Г., Новицкий И.А. Антимикробная активность грибов рода *Trichoderma* и *Trametes* в отношении условно-патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*// Сибирский медицинский журнал. Т.66, № 8, 2006.- С. 17 – 20
6. Садыкова В.С., Громовых Т.И., Кураков А.В., Лихачев А.Н. Перспективы создания новых форм биопрепаратов на основе сибирских биоконтрольных штаммов грибов рода *Trichoderma*// Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. Т.2. № 4, 2006 – С. 20-21
7. Kurakov A.V., Makhova E.G., Sadykova V.S., Prokhorov I.S., Kostina N.V. Stimulation of nitrogen fixation in soddy-podzolic soil with fungi// Eurasian soil science. Т.39 № 9, 2006. – С.968 - 974
8. Садыкова В.С., Громовых Т.И., Лихачев А.Н., Кураков А.В., Ушанова В.М. Биологическая активность сибирских штаммов *Trichoderma* как фактор отбора для создания биопрепаратов защиты растений нового поколения // Биотехнология,

№ 6. 2007 – С. 12 – 17

9. Садыкова В.С., Громовых Т.И., Гайдашева И.И., Ушанова В.М. Перспективы получения биопрепарата для защиты сеянцев хвойных путем твердофазного культивирования штамма 19/97 M STREPTOMYCES LATERITIUS SVESCHNIKOVA// Хвойные бореальной зоны XXXXIV, № 4-5, 2007. - С. 482 – 486

10. Гайдашева И.И., Садыкова В.С., Бондарь П.Н., Зобова Н.В., Громовых Т.И. Перспективы использования новых биопрепаратов для защиты злаков в Средней Сибири // Вестник КрасГАУ. – 2008. – №1(22). – с. 74-78;

11. Третьякова И.Н., Садыкова В.С., Носкова Н.П., Бондарь П.Н., Гайдашева И.И., Громовых Т.И., Иваницкая А.С., Ижболдина М.В., Барсукова А.В. Ростстимулирующая активность штаммов рода *Streptomyces* и *Trichoderma* и перспективы их использования для микроклонального размножения хвойных // Биотехнология. – 2009. – №1. – с. 39-44;

12. Садыкова В.С., Бондарь П.Н. Перспективы использования грибов рода *Trichoderma* в защите злаков от корневых гнилей в Сибири // Вестник КрасГАУ. – 2010. – №2(41). – с. 34-39;

13. Садыкова В.С., Лихачев А.Н., Бондарь П.Н. Ограничение развития комплекса возбудителей корневых гнилей ячменя антагонистами рода *Trichoderma* // Микология и фитопатология. – Т.44, Вып.6, 2010.– С. 556-562.

14. Кураков А.В., Хидиров К.С., Садыкова В.С., Звягинцев Д.Г. Способность к анаэробному росту и активность спиртового брожения у микроскопических грибов// Прикладная биохимия и микробиология. Т.47 №2, 2011.- С. 1-7

15. Садыкова В.С., Громовых Т.И. Устойчивость возбудителей корневых гнилей ячменя к химическим и биологическим фунгицидам // Доклады РАСХН № 2, 2011. – С.12-18

16. Sadykova V.S., Gromovykh T.I. Resistance of barley root rot pathogens to chemical and biological fungicides// Russian Agricultural Sciences, Vol. 37, No. 2, 2011.- pp. 126–129

17. Садыкова В.С., Громовых Т.И., Казеннова Д.В., Черемных Е.Г. Перспективы получения кормовой добавки на основе селенсодержащего мицелия грибов рода *Trichoderma* // Доклады РАСХН № 1, 2012. – С.

18. Садыкова В.С., Сидяков А.М., Громовых Т.И., Бондарь П.Н. Оценка ростстимулирующей активности штаммов грибов рода *Trichoderma* на каллусах злаков // Вестник РАСХН № 2, 2012. – С. 32-37

Монографии

Biological Control: a global perspective (глава «Control of Root Diseases with *Trichoderma* spp. in Forest Nurseries of Central Siberia») /edited by C. Vincent et al, CABI, 2007. - P.177 – 203.

Материалы, опубликованные в сборниках Всероссийских и Международных сборниках конференций, съездов, конгрессов

1. Tulpanova V., Shmarlovskaya S., Gromovykh V., Makhova H. Strains of *Trichoderma* Benefit for Biological Control Seedling Pathogen.// On Methyl Bromide Alternatives And Emmision Reductions: Ann. Int. Research Conf.- San-Diego, 1999. - P.38-1-38-5.

2. Шилкина Е.А., Гукасян В.М., Громовых В.С., Коссинская И.С., Андреева О.Н. Оценка устойчивости сеянцев хвойных к фузариозному полеганию в лесопитомниках Средней Сибири// Методы оценки состояния и устойчивости лесных экосистем: Материалы докл. межд. сов.- Красноярск, 1999.- С.70-71.

3. Садыкова В.С., Строй Л.А. Перспективы создания биопрепаратов на основе штаммов *Trichoderma* с использованием гидролизного лигнина// Всероссийская конференция «Биотехнология – сельскому хозяйству», С – Пб., 2001. – С. 54 – 57
4. Садыкова В.С., Лихачев А.Н., Махова Е.Г. Внутривидовая изменчивость гриба *Trichoderma asperellum* G.Samuels//1 –й конгресс микологов России.- Москва, 2002. – С.220
5. Садыкова В.С., Лихачев А.Н., Махова Е.Г. Моноспоровый анализ видов рода *Trichoderma*//Всероссийская конференция - Пенза, 2002. – С. 171-173.
6. Zaika N.A., Gromovykh T.I. Sadykova V.S. Ecological aspects of use of active strains *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* in biological monitoring of conifer seedlings// XIV Congress of European Mycologists, Yalta, 2003.-P. 42.
7. Садыкова В.С., Кураков А.В., Махова Е.Г. Отбор штаммов для создания препарата по защите сеянцев хвойных от фузариозной инфекции корней// Научные труды МБЦ МГУ, 2003. – 69 – 76
8. Садыкова В.С., Лихачев А.Н., Рязанова Т.В. Изменчивость *Trichoderma asperellum* и отбор штаммов для использования в интегрированной системе защиты хвойных пород от фузариоза// XI съезд Русского ботанического общества. Ботанические исследования в Азиатской России. Новосибирск-Барнаул, 2003. т.1. – С.58 – 60
9. Sadykova V.S., Likhachev A.N., Gromovykh T.I. Biological control of *Fusarium* spp. In forest nurseries of Central Siberia// Shaping the Future Abstract 75 th Anniversary Meeting Canadian Phytopathology Society, Ottawa, 13-16 June, 2004.- P. 45
10. Sadykova V.S., Likhachev A.N., Ryazanova T.V. Control of *Fusarium* species with *Trichoderma asperellum* in combination with organic compounds to coniferous seedlings in Central Siberia// Abstract of 9 th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, April 6-8, Vienna, Austria, 2006.- P.18
11. Садыкова В.С., Бондарь П.Н., Громовых Т.И. Внутривидовая изменчивость грибов рода *Trichoderma* в Средней Сибири // Всероссийская конференция «Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока», Т.1, 2006.- С. 190 – 193
12. Sadykova V.S. Development of biopreparations on the base of biocontrol *Trichoderma* strain on plant compounds of technogenic sphere// The International Symposium “EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme”, June 5-9, 2006, St.-Petersburg
13. Садыкова В.С., Лихачев А.Н. Вегетативная совместимость фитопатогенных видов *Botrytis michelli* и сапротрофных *Botrytis carnea* Schumach и *Trichoderma asperellum* Samuels// IX Всероссийский популяционный семинар «Особь и популяция - Стратегия жизни», 2-7 октября, 2006 , Уфа.- С. 225 – 230
14. Садыкова В.С., Лихачев А.Н., Кураков А.В. Биология и гетерогенность популяций грибов - фактор, определяющий отбор штаммов видов рода *Trichoderma* для биоконтроля // Труды Международной школы-конференции "Генетика микроорганизмов и биотехнология" посвященной 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна 28 ноября - 1 декабря, Пушино, 2006.- С.162 - 164
15. Садыкова В.С., Лихачев А.Н., Кураков А.В. Перспективы создания новых форм биопрепаратов на основе сибирских биоконтрольных штаммов *Trichoderma*// 4 Съезд Общества Биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 5 - 7 декабря, Пушино, 2006. - С. 223 – 225

16. Садыкова В.С., Чижмотря Н.М., Ковалева Г.К. Антимикробная активность грибов рода *Trichoderma* в отношении условно-патогенных микроорганизмов//5 Всероссийский конгресс по медицинской микологии «Успехи медицинской микологии» Т. IX, 2007. - 187 – 189
17. Садыкова В.С., Лихачев А.Н. Установление комплекса признаков-тестов по отбору антагонистов для биоконтроля фитопатогенов (на примере грибов рода *Trichoderma*)// Сборник научных трудов «Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты». РАЕН. Вып.16, М.2007. с.33-47
18. Sadykova V.S., Likhachev A.N., Gromovykh T.I., Kurakov A.V. Development of new forms of biopreparation on the basis of biocontrol *Trichoderma* strains by using wooden residuals// International symposium “Best practice in disease, pest and weed management”, 10-12 May, Berlin, 2007.- P. 42-44
19. Sadykova V.S. The use of active strains of *Trichoderma* and *Streptomyces* in biological monitoring of coniferous seedlings// International symposium “Best practice in disease, pest and weed management”, 10-12 May, Berlin, 2007.- P. 71-74
20. Садыкова В.С., Бондарь П.Н., Рязанова Т.В., Ушанова В.М. Оценка возможности использования сибирских штаммов *Trichoderma* для создания биопрепаратов защиты растений // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Лесной и химический комплексы – проблемы и решения». – Красноярск, 2007. – Т. 2 – с. 7-11;
21. Садыкова В.С., Ковалева Г.К. Противоопухолевые свойства макро и микромицетов Средней Сибири// Современная микология России. Тезисы докладов II конгресса микологов России. М.: Изд-во «Национальная академия микологии». – 2008. – С. 82
22. Садыкова В.С., Бондарь П.Н., Савицкая А.Г. Оценка возможности использования сибирских штаммов *Trichoderma* для создания биопрепаратов защиты растений // Тезисы докладов второго съезда микологов России. Современная микология в России. – Москва, 2008. – с. 122
23. Садыкова В.С., Громовых Т.И., Третьякова И.Н., Бондарь П.Н., Носкова Н.Е. Антагонистическая и ростстимулирующая активность штаммов родов *Trichoderma* и *Streptomyces* и перспективы их использования в биоконтроле // Материалы 5 съезда биотехнологов России. – Москва, 2008. – с. 286-288
24. Бондарь П.Н., Садыкова В.С., Ушанова В.М., Савицкая А.Г. Биотехнологические аспекты отбора активных штаммов *Trichoderma* для создания препаратов защиты растений // Материалы международной научной конференции «Современные средства, методы и технологии защиты растений». – Новосибирск, 2008. – с. 30-34;
25. Садыкова В.С., Лихачев А.Н. Индикация функциональных групп микромицетов на опаде ряда травянистых и древесных пород// Сборник материалов VII Международной конференции «Проблемы лесной фитопатологии и микологии», Пермь, 7-13 сентября 2009. -С.120-124
26. Кураков А.В., Садыкова В.С., Хидиров К.С., Супина О.А. Анаэробный рост и образование этанола грибами-деструкторами целлюлозных субстратов// Сборник материалов VII Международной конференции «Проблемы лесной фитопатологии и микологии», Пермь, 7-13 сентября 2009. -С.114-118
27. Садыкова В.С., Громовых Т.И., Третьякова И.Н. Создание биопрепаратов биологического контроля и стимуляции роста растений.// Материалы Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология:

экология крупных городов», проходившей в рамках Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 15 - 17 марта, 2010 г.) - М.: ЗАО «Экспо - биохим – технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. - 2010. - С. 163

28. Громовых Т.И., Кузнецова Л.С., Садыкова В.С. Коллекция культур макро и микромицетов как база для образовательного процесса и создания современных биотехнологий // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. - 2010. - 1 1. - С. 246.

29. Бондарь П.Н., Громовых Т.И., Садыкова В.С. Ростстимулирующая активность сибирских штаммов рода *Trichoderma* в отношении злаковых растений // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2010. - 1. - с. 89.

30. Садыкова В.С., Свирщевская Е.В., Громовых Т.И., Зубарева Е.С. Антимикробная и противоопухолевая активность штаммов рода *Trichoderma*//«Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее», 27-29 января 2011.- С.47-49

31. Лихачев А.Н., Садыкова В.С. Эколого-трофические ниши и функциональные свойства грибов рода *Trichoderma* - основа для мониторинга и практического использования // Сборник статей 5-й Междунар. научно-практ. конф. «Мониторинг экологически опасных промышленных объектов и природных экосистем», Пенза, 2011 – С.142 - 152

Изобретения и патенты

1. Громовых Т.И., Шмарловская С.В., Тюльпанова В.А., Садыкова В.С. Штамм гриба *Trichoderma* sp. МГ-97, используемый для защиты сеянцев хвойных от фузариозов. Патент на изобретение №2171580. М.10.08.2001 г.- 13 с.

2. Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Садыкова В.С. Штамм актиномицета *Streptomyces lateritius* 19-97 М, используемый для стимуляции роста и защиты сеянцев хвойных от возбудителей болезней, вызываемых грибами родов *Fusarium*, *Alternaria*. Патент на изобретение № 2261902. М. 10.10.2005г. – 12 с.

3. Кураков А.В., Садыкова В.С. Способ вермикомпостирования. Патент на изобретение. Приоритет от 12.05.2011 г. – 17 с.