УДК 632.952

Д. А. Шарипова (асп.)[1], М. А. Ветрова (асп., инж.)[1], Я. А. Масютин (асп., инж.)[1], А. А. Новиков (зав.лаб.)[1], П. А. Гущин (с.н.с, дир.)[1,2], В. А. Винокуров (зав.каф.)[1]

Исследование антагонизма различных штаммов грибов рода *Trichoderma* и грибковых фитопатогенов

[1]Российский государственный университет нефти и газа имени И. М. Губкина, кафедра физической и коллоидной химии
[2] Некоммерческое партнерство «Технопарк Губкинского университета»
119991, г. Москва, Ленинский просп., д. 65, корп. 1, тел. (499) 2339589, e-mail: gubkin.biotech@gmail.com, guschin.p@mail.ru

D. A. Sharipova[1], M. A. Vetrova[1], Ya. A. Masyutin[1], A. A. Novikov[1], P. A. Gushchin[1,2], V. A. Vinokurov[1]

Investigation of the different *Trichoderma* strains antagonistic action against phytopathogenic fungi

[1]Gubkin Russian State University of Oil and Gas,
[2] Non-profit organization «Gubkin University Technopark»
65, Leninskii pr., 119991, Moscow, Russia; ph. +7 (499) 2339589, e-mail: gubkin.biotech@gmail.com, guschin.p@mail.ru

Исследован антагонизм грибов рода *Trichoderma* и различных фитопатогенных грибов. Наибольшую фунгицидную активность среди испытанных штаммов проявляют *T. flavofuscum* DSM3500 и *T. virens* DSM1963. Активность этих штаммов, по всей видимости, основана на выделении фунгицидных метаболитов, что определяет перспективность использования указанных штаммов в качестве биофунгицидов.

Ключевые слова: биоконтроль; *Trichoderma*; фитопатогены; фунгициды.

Antagonistic interaction of *Trichoderma* fungi with various phytopatogen fungi is studied. *T. flavofuscum* DSM3500 and *T. virens* DSM1963 are the most active suppressors of phytopatogen growth among the tested type strains of *Trichoderma* genus. Activity of these strains is probably based on the metabolites secreted, thus promising their usage as biofungicides.

Key words: biocontrol; fungicides; phytopatogen; *Trichoderma*

Грибы рода *Trichoderma* способны колонизировать корневую систему растений, вступая в авирулентный симбиоз с растениями и вызывая устойчивость растений к грибковым инфекциям. При этом наблюдается образование жизнестойких долгоживущих колоний на поверхности корней растений и внутри эпидермиса. Грибы рода *Trichoderma* вырабатывают ряд метаболитов, повышающих резистентность растений по отношению к грибковым инфекциям, чем и объясняется отсутствие патогенности *Trichoderma* spp. по отношению к растениям [1]. Механизмы защиты растений при внесении грибов рода *Trichoderma* в почву не исчерпываются индукцией резистентности: известно, что некоторые виды *Trichoderma* вырабатывают замещенные пироны — окрашенные соединения, проявляющие фунгицидную активность за счет связывания с клеточной стенкой других грибов и уменьшения ее проницаемости [2], что подтверждается, в том числе, увеличением фунгицидной активности синтетических пиронов с увеличением длины алкильных заместителей [3]. Кроме того, грибы *Trichoderma* выделяют ферменты, разрушающие клеточную стенку грибов, а некоторые штаммы проявляют гиперпаразитизм — активно проникают своими гифами внутрь гифов фитопатогенных грибов и подавляют их рост. При этом антагонизм грибов *Trichoderma* и грибов-фитопатогенов детально исследован лишь для нескольких видов: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. asperelloides* [4].

Дата поступления 14.11.13

В нашей работе было проведено исследование антагонизма типовых штаммов *T. reesei* DSM768, *T. virens* DSM1963, *T. flavofuscum* DSM3500, *T. koningii* DSM63059 и грибов-фитопатогенов *Botrytis cineria* DSM877, *Fusarium solani* DSM1164, *Alternaria solani* DSM2947, *Cladosporium cucumerinum* DSM62122.

Экспериментальная часть

Все штаммы микроорганизмов были получены из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ). Микроорганизмы культивировались на рекомендованных по документации DSMZ средах при температурах, указанных для каждого штамма на сайте коллекции. Перед постановкой экспериментов по совместному культивированию проводилось не более трех пересевов культур. Эксперименты по совместному культивированию проводились на чашках Петри на глюкозно-картофельном агаре, в качестве инокулята использовались споры микроорганизмов. Двойные культуры инкубировались при температуре 24 °С, за исключением двойных культур, включающих *Alternaria solani* DSM2947, которые инкубировались при 20 °С. Использовались два варианта засева культур: в лунки на противоположных сторонах чашки и засев фитопатогена «газоном» по всей поверхности чашки с одновременным засевом грибов *Trichoderma* в лунку в центре чашки. Все опыты проводились в трех повторностях, эквивалентный диаметр зоны задержки роста рассчитывали как среднее арифметическое двух взаимно перпендикулярных диаметров по аналогии с [5]. Световая микроскопия выполнялась на микроскопе Leitz Orthoplan, оснащенном фазово-контрастным объективом с увеличением 40Ч и камерой Nikon DS-Fi1c.

Обсуждение результатов

Использованные культуры грибов рода *Trichoderma* проявляют различные антагонистические свойства по отношению к типовым культурам фитопатогенных микроорганизмов, как видно из различных значений диаметра зоны задержки роста фитопатогенов. При росте контрольных культур *T. flavofuscum* DSM3500 отмечается желтое окрашивание агара вблизи мицелия, что, по-видимому, связано с выделением окрашенных производных пиронов, проявляющих фунгицидные свойства [6]. Интересно, что наибольшие зоны ингибирования роста фитопатогенов наблюдались для штаммов *T. flavofuscum* DSM3500 и *T. virens* DSM1963, что подтверждает гипотезу о противогрибковом действии *T. flavofuscum* DSM3500 за счет выделения фунгицидных производных пиронов. У штамма *T. virens* DSM1963 выделение пиронов не сопровождается образованием их окрашенных производных или же механизм противогрибкового действия в данном случае основан скорее на выделении в среду ферментов, разрушающих клеточную стенку фитопатогенов. Культуры *T. reesei* DSM768 и *T. koningii* DSM63059 образовывали значительно меньшую зону задержки роста фитопатогенов, что может быть связано либо с контактным механизмом фунгицидной активности (гиперпаразитизм), либо с меньшим выделением подавляющих рост грибов метаболитов. Любопытным исключением является взаимодействие культур *T. koningii* DSM63059 и *Cladosporium cucumerinum* DSM62122: при совместном культивировании наблюдается стимулирование роста фитопатогена, как показано на рис. 1.

Среди исследованных культур наибольшую фунгицидную активность проявляют *T. flavofuscum* DSM3500 и *T. virens*

Таблица 1

Диаметр зоны задержки роста культуры 1 (среднее значение и погрешность определены по результатам трех параллельных опытов, в качестве погрешности приводится среднее квадратичное отклонение)

Культура 1	Диаметр зоны задержки роста культуры 1, мм, при использовании в качестве культуры 2 следующих штаммов			
	DSM63059	DSM768	DSM1963	DSM3500
DSM877	10.3±4.6	10.5±1.9	22.0±1.8	47.8±9.1
DSM2947	7.0±1.8	9.5±1.3	30.7±9.6	72.2±2.5
DSM1164	2.75±1.0	15.0±4.1	35.75±9.8	53.3±7.9
DSM62122	*	8.75±1.7	49.8±15.5	50.0±13.4

**рост культуры 2 не наблюдается; вся чашка покрыта газоном культуры 1, как показано на рисунке 1*

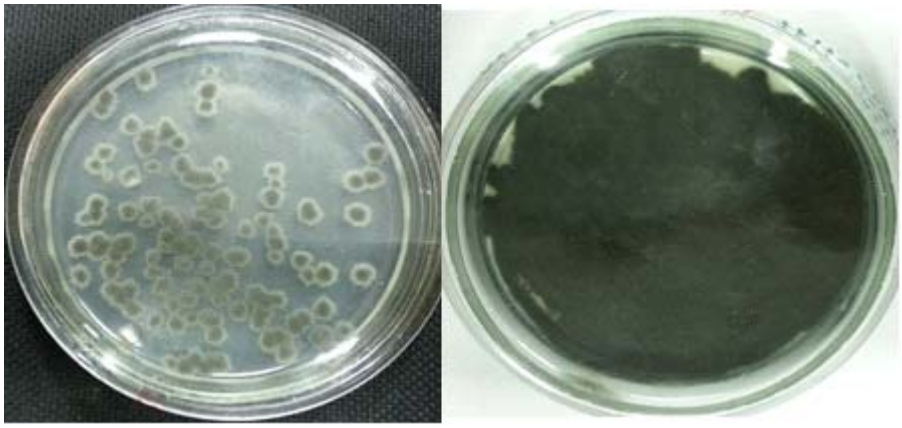

Рис. 1. Рост культуры Cladosporium cucumerinum DSM62122 в отсутствие (слева) и в присутствии культуры T. koningii DSM63059 (справа)

DSM1963, выделяющие в среду метаболиты, подавляющие рост возбудителей грибковых инфекций огурцов и томатов: *Botrytis cineria* DSM877, *Fusarium solani* DSM1164, *Alternaria solani* DSM2947 и *Cladosporium cucumerinum* DSM62122. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования видов *T. flavofuscum* и *T. virens* для получения противогрибковых препаратов как в виде живых культур, так и в виде экстрактов мицелия.

Литература

1. Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. // Nature Reviews, Microbiology.— 2004.— V.2.— P.43.
2. Susi P., Aktuganov G., Himanen J. and Korpela T. // Journal of environmental management.— 2011.— V.92.— P.1681.
3. Chattapadhyay T. K., Dureja P. // Journal of agricultural and food chemistry.— 2006.— V.54.— P.2129.
4. Atanasova L., Crom S. L., Gruber S., Coulpier F., Seidl-Seiboth V., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. // BMC genomics.— 2013.— V.14.— P.121.
5. Gowacka A., Bednarek-Gejo A., Trojanowska D., Mianowany M., Budak A. // Acta Mycologica.— 2012.— V.47.— P.27.
6. Rubio M. B., Hermosa R., Reino J. L., Collado I. G., Monte E. // Fungal Genetics and Biology.— 2009.— V.46.— P.17.

References

1. Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. *Nature Reviews, Microbiology*. 2004. V.2. P.43.
2. Susi P., Aktuganov G., Himanen J. and Korpela T. *Journal of environmental management*. 2011. V.92. P.1681.
3. Chattapadhyay T. K., Dureja P. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006. V.54. P.2129.
4. Atanasova L., Crom S. L., Gruber S., Coulpier F., Seidl-Seiboth V., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. *BMC genomics*. 2013. V.14. P.121.
5. Gowacka A., Bednarek-Gejo A., Trojanowska D., Mianowany M., Budak A. *Acta Mycologica*. 2012. V.47. P.27.
6. Rubio M. B., Hermosa R., Reino J. L., Collado I. G., Monte E. *Fungal Genetics and Biology*. 2009. V.46. P.17.

Исследование проводится в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 гг». Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования Российской Федерации (Государственный контракт № 14.512.11.0076).