

УДК 632.937:632.4

## СПЕКТР АНТИФУНГАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *TRICHODERMA VIRENS* MILLER, GIDDENS AND FOSTER НА ПАТОГЕНЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Татьяна ЩЕРБАКОВА

Институт Генетики, Физиологии и Защиты Растений, Молдова

**Abstract.** The paper presents the results of the laboratory investigations of the inhibition effect of the liquid biofungicide Gliocladin-SC, prepared on the base of live cells of the antagonistic fungus *Trichoderma*-based Miller, Giddens and Foster strain 3X, against the pathogen fungi, causative agents of the agricultural crops diseases. The influence of the biopreparation was determined by the method of diffusion in agar. The metabolites contained in the biopreparation suppress the pathogens development and create sterile zones of growth inhibition. The preparation can have wide application spectrum for the agricultural crops protection against a wide range of dangerous plant disease agents – fungi from the genus *Fusarium* and the species *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilia cinerea*, *M.fructigena* etc.

**Key words:** Biofungicide; Agricultural crops; Antagonism; Metabolites; Fungicide activity; Phytopathogenic fungi.

**Реферат.** Представлены результаты лабораторных исследований ингибирующего действия жидкого биофунгицида Gliocladin-SC, созданного на основе живых клеток гриба-антагониста *Trichoderma virens* Miller, Giddens and Foster штамм 3X на патогенные грибы, вызывающие болезни сельскохозяйственных культур. Действие биопрепарата определяли методом диффузии в агар-агар. Метаболиты, содержащиеся в биопреparate, ингибируют развитие патогенов, образуя стерильные зоны подавления роста. Препарат может иметь широкий спектр применения в защите сельскохозяйственных культур от особо вредоносных возбудителей болезней – грибов рода *Fusarium*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilia cinerea*, *M.fructigena* и др.

**Ключевые слова:** Биофунгицид; Сельскохозяйственные культуры; Антагонизм; Метаболиты; Фитопатогенные грибы; Фунгицидная активность.

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений мероприятий по рациональному использованию природных ресурсов является развитие биотехнологий микробных средств защиты растений от болезней и вредителей, в качестве альтернативы применению пестицидов. Основой этих препаратов являются живые культуры микроорганизмов и продукты их метаболизма. Особо важное практическое применение в биологическом контроле болезней растений отводится микроскопическим грибам, и ведущую роль занимает род *Trichoderma* Pers. ex Fr. Грибы этого рода располагают рядом механизмов антагонистического действия, и одним из них является антибиоз – микробный антагонизм, при котором выделяемые микроорганизмами биологически активные вещества (БАВ) подавляют развитие других видов. Они могут воздействовать непосредственно на возбудителей – приостанавливать их рост, нейтрализовать токсины, вызывать лизис клеточных оболочек на поверхности растения хозяина или внутри растительных тканей. Метаболиты легко всасываются внутрь семян и органов растений через оболочки, нейтрализуя инфекцию и повышая иммунитет. (Howell, C., Stipanovic, R. 1995; Howell, C. 2006; Mastouri, F. et al. 2010). Грибы *Trichoderma* являются оппортунистическими, авирулентными растительными симбионтами, а производимые ими вещества вызывают реакции локальной или системной резистентности, и это объясняет отсутствие у них патогенности для растений (Harman, G. et al. 2004).

Многие грибы-антагонисты фитопатогенов могут проявлять полифункциональную биологическую активность: фунгицидную, бактерицидную, фиторегуляторную – это стимуляция роста и развития, повышение урожайности, улучшение биохимических показателей плодов, что дает им право занимать ведущее место в качестве агентов биологического контроля фитопатогенов (Новикова, И. 2005; Harman, G.E. 2011).

Целью настоящих исследований являлось изучение спектра фунгицидного действия разработанного нами жидкого биологического препарата Gliocladin-SC в отношении возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур. Биопрепарат внесен в Государственный регистр средств фитосанитарного назначения и средств, повышающих плодородие почвы Республики Молдова под номером 08-02-0406 в 2015 году (Moșoi, V. et al. 2016). Действующее вещество биопрепарата – гриб-антагонист фитопатогенов *Trichoderma virens* Miller, Giddens and Foster, штамм 3X.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в 2015-2018 гг. в лабораторных условиях в Институте генетики, физиологии и защиты растений Республики Молдова. Объектом исследований являлся биологический препарат Gliocladin-SC, разработанный в лаборатории Фитопатологии и биотехнологии института. Материалом служили чистые культуры патогенных грибов, выделенные из пораженных растений, корней и семян пшеницы, подсолнечника, кукурузы, сои, гороха, капусты, плодов семечковых и косточковых культур. Выделение патогенов проводили общепринятыми в микробиологии методами (Бёхтер, И. и др. 1987).

Антагонистическую активность гриба-продуцента *T.virens* 3X определяли методом двойных культур. Линейным методом учитывали радиус колоний патогена и антагониста, зону нарастания и стерильную зону отсутствия роста (Егоров, Н.С. 2004). Фунгицидную активность биопрепарата Gliocladin-SC оценивали в отношении патогена *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary., возбудителя белой гнили; возбудителей фузариозных комплексов корневых гнилей – *Fusarium oxysporum* Schl., *F.culmorum* Sacc, *F.graminearum* Shwabe., *F.verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (syn. *F.moniliforme* J. Sheld), *F.solani* Ap. et Woll, *F.sporotrichiella* Bilai, *F.gibbosum* App. et Woll.; изолятов *Fusarium* sp., выделенных из кукурузы. Тест-объектами служили патогены, выделенные из капусты – *Rhizoctonia solani* Kuhn., *Thielaviopsis basicola* (Berk. and Broome) Ferraris, *Fusarium* sp.; из плодов черешни выделены и протестированы *Botrytis cinerea* Pers. и *Monilia cinerea* Bonod.; из плодов айвы – *Monilia fructigena* (Pers.) Pers. Опыты были проведены в чашках Петри на агаризованных питательных средах методом диффузии в агар-агар с использованием бумажных дисков и металлических цилиндров (Егоров, Н.С. 2004). Агаровую пластинку засеивали суспензией спор возбудителя, посев мицелиальных грибов, не образующих спороношения, проводили агаровыми блоками, заросшими культурой патогена. В центр помещали стерильный бумажный диск (цилиндр), пропитанный биопрепаратом Gliocladin-SC, в контроле диск пропитывали водой, а в цилиндр препарат вносили стерильной пипеткой. Инкубировали при температуре, оптимальной для патогенов. В случаях проявления биопрепаратом антифунгальной активности, между диском и культурой патогена должна образоваться стерильная зона задержки роста.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В задачи исследований входило выделение патогенных грибов, возбудителей болезней сельскохозяйственных культур из плодов и пораженных частей растений, определение антагонистической активности гриба *T.virens* – продуцента биопрепарата по отношению к патогенам методом двойных культур и их тестирование на чувствительность к биопрепарату Gliocladin-SC.

Совместное культивирование *T.virens* и грибов *Fusarium* в двойной культуре при оптимальной температуре 23-25°C показало высокую антагонистическую активность *T.virens*, гриб в разной степени колонизировал каждого из патогенов в течение 10-12 дней. Радиусы колоний *Fusarium* составляли 28-36 мм, тогда как *T.virens* заселял большую часть агаровой пластинки с радиусами колоний 53-64 мм. Зоны нарастания продуцента на колонии составляли от 5 мм до 31 мм. Полная колонизация *Monilia cinerea* и *M.fructigena* отмечена через 7-8 суток, *B. cinerea*, *R.solani* и *Alternaria* sp. – через 8-9 суток. Не отмечено колонизации патогена *T.basicola* (табл. 1).

В исследованиях, проведенных ранее (Щербакова, Т. 2013), было определено, что в двойной культуре *T.virens* и патогена *S.sclerotiorum* при разных температурных режимах отмечены разные механизмы антагонистического взаимодействия – микопаразитизм и антибиоз. При встречном росте культур при температуре 23-25°C на шестые сутки происходило смыкание колоний, к одиннадцатому дню *T.virens* полностью колонизировал патоген, проявляя микопаразитический характер антагонизма. При температуре 13-15°C антагонист проявил другой механизм биоконтроля – антибиоз. В этом случае радиус колонии *T.virens* составлял 23-25 мм, колонии *S.sclerotiorum* – 45 мм, между ними образовалась стерильная зона отсутствия роста, равная 20-25 мм (образование БАВ). Полученные данные согласуются с работами других исследователей, которые отмечают высокую адаптивность грибов *Trichoderma* к различным стрессовым факторам, в зависимости от условий (температура, влажность, субстрат и др.) штаммы, лишённые одного механизма, быстро адаптируются и используют другой механизм биоконтроля (Алимова, Ф.К. 2006; Howell, C.R. 2006).

Таблица 1. Антагонистическое действие продуцента *T.virens* и биопрепарата Gliocladin-SC на возбудителей болезней растений

№	Фитопатоген	Радиус колонии патогена, мм	Радиус колонии <i>T.virens</i> , мм	Зона нарастания, мм	Стерильная зона, мм
1	<i>Alternaria</i> sp.,	26,0±2,3	64,0±1,2	26,0±0,6	0
2	<i>Botrytis cinerea</i>	32,0±0,6	58,0±1,1	32,0±0,9	31,8±0,3
3	<i>Fusarium oxysporum</i>	28,7±0,6	61,3±1,3	12,7±0,7	42,0±0,7
4	<i>F. culmorum</i>	36,7±0,3	53,3±0,6	15,8±0,6	21,0±0,7
5	<i>F. graminearum</i>	32,4±0,6	57,6±0,7	10,3±0,5	20,0±0,4
6	<i>F. gibbosum</i>	29,4±0,5	60,6±0,9	5,3±0,3	9,8±0,7
7	<i>F. solani</i>	26,0±0,3	64,0±0,65	26,0±0,3	11,5±0,3
8	<i>F. sporotrichiella</i>	31,5±0,3	58,5±0,7	31,5±0,6	60,0±0,8
9	<i>F. verticillioides</i>	34,5±0,5	55,5±0,7	17,7±0,9	18,8±0,3
10	<i>Fusarium</i> sp.4	32,6±0,8	57,4±0,5	13,3±0,7	4,2±0,3
11	<i>Fusarium</i> sp.5	33,9±0,9	56,1±0,9	30,0±0,9	11,0±0,4
12	<i>Fusarium</i> sp.11	35,3±0,9	54,7±1,1	18,5±0,9	11,5±0,7
13	<i>Fusarium</i> sp.13	28,7±1,1	61,3±1,3	21,3±0,7	5,2±0,3
14	<i>Monilia cinerea</i>	32,0±0,3	58,0±0,5	32,0±0,3	32,5±0,65
15	<i>M. fructigena</i>	23,5±0,6	66,5±0,8	23,5±0,3	65,3±0,82
16	<i>Rhizoctonia solani</i>	39,0±0,5	51,0±1,1	39,0±1,2	19,7±3,2
17	<i>Thielaviopsis basicola</i>	29,6±0,9	60,3±1,3	0	5,8±0,5
18	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	38,7±1,3	51,3±0,9	38,7±0,7	45,0±1,6

В результате проведенных исследований было установлено, что гриб *T.virens* является активным антагонистом выделенных нами фитопатогенов, на агаризованных средах в разной степени колонизирует патогены при оптимальной температуре для своего развития, обладает способностью проявлять разные механизмы антагонистического взаимодействия.

На следующем этапе исследований определяли антифунгальную активность биопрепарата Gliocladin-SC, созданного на основе гриба *T.virens* в отношении изучаемых фитопатогенов, проводили тестирование методом диффузии в агар.

Патоген *S.sclerotiorum* известен как возбудитель белой гнили или склеротиниоза. Он вызывает значительные потери урожая подсолнечника, сои, гороха, фасоли, льна, зеленых и овощных культур (в условиях закрытого грунта) и др. Исследования антифунгальной активности биопрепарата Gliocladin-SC в отношении *S.sclerotiorum*, выделенного из прикорневой части стебля подсолнечника, показали высокую чувствительность гриба к препарату, диаметр стерильной зоны подавления роста был равен 45 мм (табл. 1, рис. 1, а).

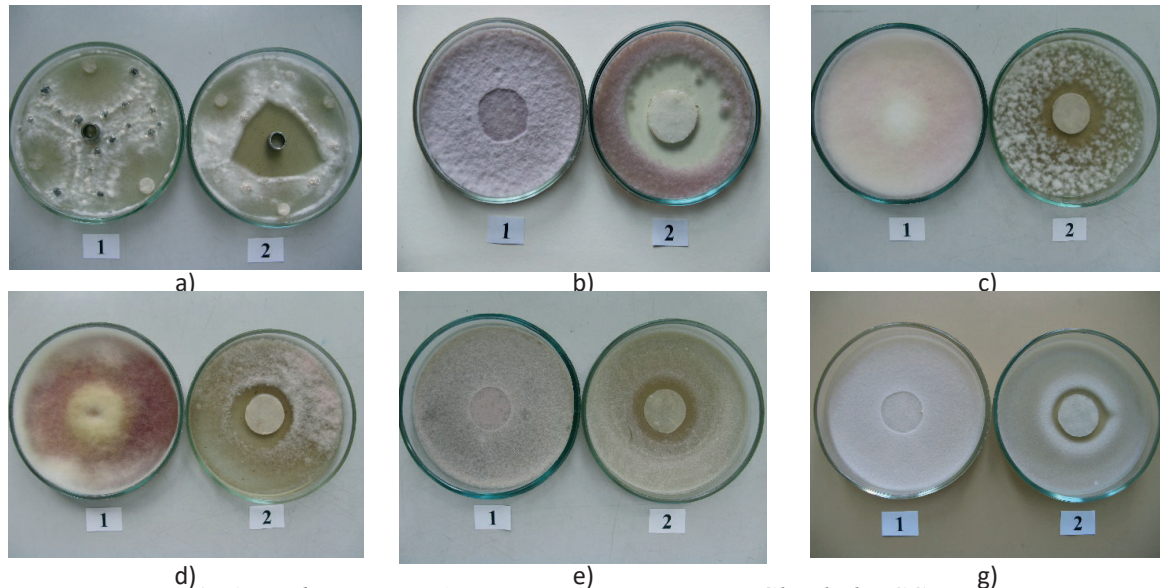
Из грибов рода *Fusarium* доминирующим видом фузариозных корневых гнилей пшеницы в Молдове является патоген *F.oxysporum* (Лупашку, Г. и др. 2011), который выделен из корней пшеницы. При определении антифунгального действия биопрепарата зона подавления роста патогена составила 42 мм, (табл. 1, рис. 1, b).

Выделенный из зерна пшеницы *F.graminearum* под влиянием биологически активных веществ препарата Gliocladin-SC, заметно замедлял рост, газон был представлен отдельными колониями, по сравнению с контролем, где отмечен интенсивный рост мицелия, сплошной газон и начало окрашивания культуры в розовый цвет. Зона подавления роста составила 20 мм (табл. 1, рис 1, c).

Действие биопрепарата на патоген *F.culmorum*, выделенный из корней пшеницы, также проявлялось в замедленном развитии, начало роста отмечено на 2 дня позже, чем в контроле, слабое развитие мицелия наблюдалось весь период культивирования, диаметр зоны подавления роста составил 21 мм (табл. 1, рис 1, d).

Гриб *F.verticillioides* выделен из зерна сахарной кукурузы, под влиянием биопрепарата отмечено замедление скорости роста на 3-4 дня и отсутствие характерной окраски, по сравнению с контролем, где колония приобрела сиреневый оттенок, зона подавления роста составила 18,8 мм. Изоляты *Fusarium* sp.4, sp.5, sp.11 и sp.13, выделенные из растений кукурузы, также были чувствительны к биопрепарату Gliocladin-SC, зоны подавления роста составляли от 4,2 мм до 11,5 мм. (табл. 1, рис. 1, e, g).





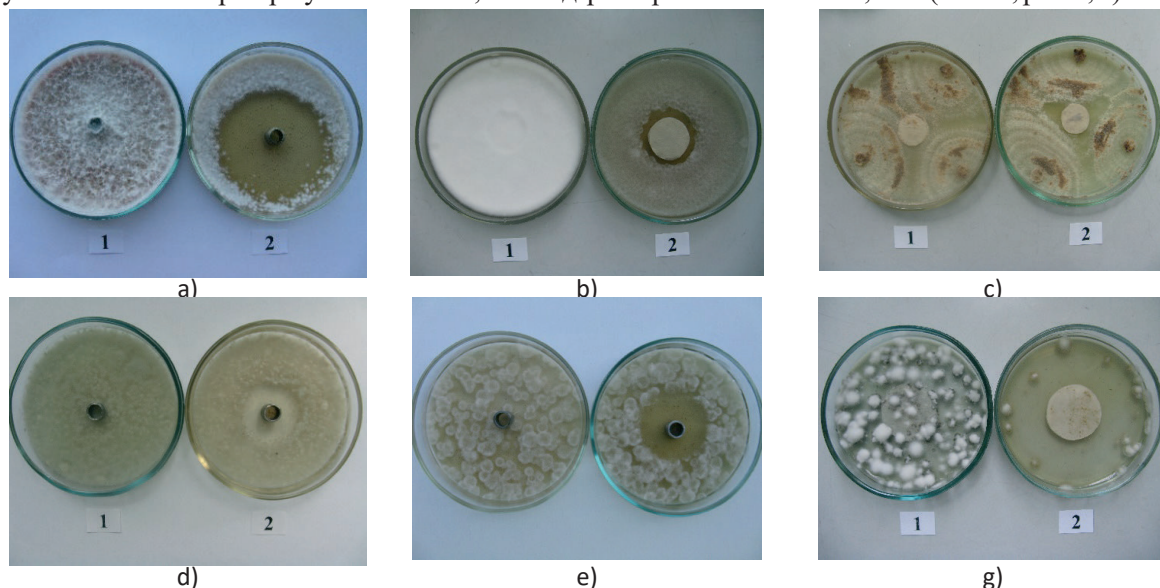
**Рисунок 1.** Антифунгальное действие биопрепарата Gliocladin-SC на патогены с образованием зон подавления роста: а) – *Sclerotinia sclerotiorum*, б) – *Fusarium oxysporum*, с) – *F. graminearum*, д) – *F. culmorum*, е) – *F. verticillioides*, г) – *Fusarium sp.5* 1 – контроль, 2 – опыт (метод диффузии в агар-агар)

Из семян сои выделен патоген *F.sporotrichiella*, способный вызвать 100%-е поражение проростков сои на инфекционном фоне (лабораторный эксперимент). Под влиянием биопрепарата начало роста мицелия отмечено на 3-4 дня позже, чем в контроле, зона подавления роста составила 60 мм (табл. 1, рис. 2, а).

Зона задержки роста гриба *F.solani*, выделенного из корней сои равна 11,5 мм (рис. 2, б).

Гриб *R.solani* выделен из рассады капусты, пораженной черной ножкой, он наносит большой ущерб рассадным культурам, вызывая послевсходовое полегание сеянцев. Патоген проявлял чувствительность к препарату с зоной задержки роста 19,7 мм (рис. 2, с).

Возбудитель серой гнили – патогенный гриб *B.cinerea* выделен из плодов черешни, вызывает многочисленные заболевания сельскохозяйственных культур – серая гниль винограда, земляники, лука, гороха, пасленовых, citrusовых. Хозяйственный ущерб особенно велик при хранении корнеплодов и капусты. Патоген чувствителен к биопрепарату Gliocladin-SC, зона задержки роста составила 31,8 мм (табл. 1, рис. 2, д).



**Рисунок 2.** Антифунгальное действие биопрепарата Gliocladin-SC на патогены с образованием зон подавления роста: а) – *Fusarium sporotrichiella*, б) – *F.solani*, с) – *Rhizoctonia solani* д) – *Botrytis cinerea*, е) – *Monilia cinerea*, г) – *M.fructigena* 1 – контроль, 2 – опыт (метод диффузии в агар-агар)

Возбудители монилиоза плодовых культур патогены *Monilia cinerea* и *M. fructigena* выделены из пораженных плодов. Для косточковых – черешни, вишни, сливы, абрикоса, персика возбудителем болезни является гриб *M. cinerea*, для семечковых – яблони, груши, айвы источник инфекции – *M. fructigena*. При тестировании биопрепарата Gliocladin-SC в отношении этих патогенов диаметр стерильной зоны отсутствия роста для *M. cinerea* составил 32,5 мм, для *M. fructigena* – 65,3 мм (рис. 2, е, г).

Патогенный гриб *Alternaria* sp., выделенный из пораженных плодов перца овощного сладкого, чувствительности к биопрепарату не проявил, образования стерильных зон не происходило.

## ВЫВОДЫ

Гриб *T. virens*, продуцент биологического препарата Gliocladin-SC, является активным антагонистом фитопатогенов – возбудителей болезней растений. На агаризованных питательных средах в разной степени колонизирует патогены. Он обладает способностью проявлять разные механизмы антагонистического взаимодействия. При оптимальной температуре для своего развития проявляет микопаразитический характер антагонизма, при пониженных температурах (13-15°C) – антибиоз. Биологический препарат Gliocladin-SC на основе живых клеток гриба *T. virens* оказывает антифунгальное действие в отношении особо вредоносных патогенных грибов, поражающих большой круг полевых, овощных, плодовых культур – грибов рода *Fusarium* – возбудителей комплексов корневых гнилей, *S. sclerotiorum* – возбудителя склеротиниоза, *B. cinerea* – возбудителя серой гнили, *Monilia cinerea* и *M. fructigena* – возбудителей монилиоза плодовых культур и др. Метаболиты, содержащиеся в биопрепарате, ингибируют развитие патогенов, образуя стерильные зоны подавления роста. Препарат может иметь широкий спектр применения в защите сельскохозяйственных культур.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. АЛИМОВА, Ф.К. (2006). Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в сельском хозяйстве. В: АГРО XXI, nr. 4-6, с. 18-21. ISSN 2073-2732.
2. БЭХТЕР, И. и др. (1987). Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. Москва: Агропромиздат. 224 с.
3. ЕГОРОВ, Н.С. (2004). Основы учения об антибиотиках. Москва: Наука. 528 с. ISBN 5-211-04669-2.
4. ЛУПАШКУ, Г.А., САШКО, Е.Ф., ГАВЗЕР, С.И. (2011). Взаимодействия растений пшеницы с возбудителями корневой гнили. В: Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в XXI веке, т. 4, ч. 1, с. 101-106. ISBN 978-5-901695-48-7.
5. НОВИКОВА, И.И. (2005). Биологическое обоснование создания и применения полифункциональных биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: дисс. ... д-ра биол. наук. СПб. 755 с.
6. ЩЕРБАКОВА, Т. (2013). Биотехнология производства и применения биопрепарата на основе гриба *Trichoderma virens* для защиты сои от корневых гнилей: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Кишинэу. 30 с.
7. HARMAN, G.E. et al. (2004). *Trichoderma species* – opportunistic, avirulent plant symbionts. In: Nature Reviews Microbiology, vol. 2(1), pp. 43-56. ISSN 1740-1526.
8. HARMAN, G.E. (2011). Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. In: New Phytologist, vol. 189, nr. 3, pp. 647-649. ISSN 0028-646X.
9. HOWELL, C.R., STIPANOVIC, R.D. (1995). Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: Antibiosis. In: Phytopathology, vol. 85, nr. 4, pp. 469-472.
10. HOWELL, C.R. (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. In: Phytopathology, vol. 96, nr 2, pp. 178-180. ISSN 0031-949X.
11. MASTOURI, F., BJORKMAN, T., HARMAN, G.E. (2010). Seed treatments with *Trichoderma harzianum* alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. In: Phytopathology, vol. 100(11), pp. 1213-1221. ISSN 0031-949X.
12. MOȘOI, V. et al., alcăt. (2016). Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizantilor, permise pentru utilizare în Republica Moldova. Chișinău. 424 p. ISBN 978-9975-56-306-2.

Data prezentării articolului: 29.03.2019

Data acceptării articolului: 03.05.2019