

**АНАЛИЗ СКРИНИНГА АБОРИГЕННЫХ ШТАММОВ-АНТАГОНИСТОВ
TRICHODERMA SPP. ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
В БИОТЕХНОЛОГИЯХ КОНТРОЛЯ НОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
ЯБЛОНИ И ВИНОГРАДА В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ**

Юрченко Е.Г., канд. с.-х. наук, **Якуба Г.В.,** канд. биол. наук,
Насонов А.И., канд. биол. наук, **Савчук Н.В.,** канд. с.-х. наук,
Астапчук И.Л., канд. биол. наук, **Буровинская М.В.,** аспирант

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский
федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)*

Реферат. Приведены данные первичного скрининга аборигенных штаммов-антагонистов *Trichoderma* spp. из коллекции лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов ФГБНУ СКФНЦСВВ к возбудителю корневой гнили яблони (*Fusarium sporotrichioides* Sherb.) и возбудителям инфекционного усыхания генеративных органов винограда (*F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, *F. oxysporum* Schlecht.) методом двойных культур. Среди 7 штаммов *Trichoderma* spp., выделенных из агроценозов яблони, наибольшую активность проявили три штамма, обладающие двойным механизмом действия – конкуренцией за питательную среду и фунгицидный паразитический антагонизм. Ещё у двух штаммов обнаружены фунгистатический антибиотический антагонизм и фунгистатический алиментарный антагонизм. У двух остальных штаммов-антагонистов показали конкурентные взаимоотношения за среду. Из 5 штаммов *Trichoderma* spp., выделенных из ампелоценозов, высокой конкурентной активностью обладало четыре штамма, два – выраженными микопаразитическими свойствами; в большей или меньшей степени все штаммы проявили антагонистическую активность. В качестве наиболее активного антагониста установлен один штамм.

Ключевые слова: Гниль корней яблони, усыхание генеративных органов винограда, грибы рода *Fusarium*, *Trichoderma*, патогены, антагонизм, встречные культуры

Summary. The data of primary screening of native antagonist strains of *Trichoderma* spp. from the collection of the laboratory of biotechnological control of phytopathogens and phytophages of the Federal State Budget Scientific Institution NCFSCHVW to the causative agent of apple root rot (*Fusarium sporotrichioides* Sherb.) and pathogens of infectious drying of the generative organs of grapes (*F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, *F. oxysporum* Schlecht.) by the method of dual culture. Among the 7 strains of *Trichoderma* spp., isolated from apple agroecosystems, the highest activity was shown by three strains with a dual mechanism of action – competition for a nutrient medium and fungicidal parasitic antagonism. Fungistatic antibiotic antagonism and fungistatic alimentary antagonism were found in two more strains. The other two antagonist strains showed competitive relationships for the medium. Four strains of the 5 strains of *Trichoderma* spp., isolated from ampeloceneses, had high competitive activity, two had pronounced mycoparasitic properties; to a greater or lesser extent, all strains showed antagonistic activity. One strain was identified as the most active antagonist.

Key words: Root rot of apple tree, drying of generative organs of grapes, fungi of the genus *Fusarium*, *Trichoderma*, pathogens, antagonism, cross crops

Введение. В последние годы на юге России особую опасность для таких важных сельскохозяйственных многолетних культур как яблоня и виноград представляют грибы рода *Fusarium* Link (1809), установленные в качестве возбудителей новых вредоносных заболеваний: корневой гнили (яблони) и усыхания генеративных органов (винограда), которые ослабляют проводящие органы, могут вызвать значительное снижение урожая [1] и даже полную гибель растения [2-3]. Наиболее распространенным возбудителем на яблоне

является *F. sporotrichioides* Sherb. [4], на винограде – *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, *F. oxysporum* Schlecht. [1]. Для снижения вредоносности патогенов рода *Fusarium* необходимо проведение комплекса мероприятий, включающего в том числе биологический метод.

Известно, что агрессивные расы патогенов обладают в благоприятных условиях более высоким коэффициентом размножения, но отличаются меньшей устойчивостью к неблагоприятным условиям среды. Эффективность микробиологического метода во многом определяется выбором микроорганизмов-антагонистов, способных обеспечить защиту в течение вегетационного периода. Одними из естественных антагонистов грибов рода *Fusarium* являются грибы рода *Trichoderma* Pers. (1801), которые являются космополитами и встречаются во всех типах почв. На основе этих грибов создана группа биопрепаратов – триходерминов [5].

Большинство исследователей во всем мире отмечают высокую эффективность грибов рода *Trichoderma* в подавлении многих возбудителей болезней растений, в том числе и из рода *Fusarium* [5-8]. В условиях теплицы была оценена [9] эффективность использования конидий гриба *T. harzianum* Rifai в борьбе с возбудителем фузариозного увядания дыни *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. Как показали опыты, внесенный в почву гриб-антагонист *T. lignorum*, как в питомнике, так и в полевых условиях значительно ограничивал развитие черной корневой гнили томата [10]. В литературе представлены результаты исследований антагонистической активности грибов *Trichoderma* sp. по отношению к доминирующим корнеобитающим фитопатогенам овощных культур, выделенных на территории Беларуси и Азербайджана. Установлено, что для большинства изученных штаммов антагонистов характерен смешанный тип антагонистического действия с выраженным фунгистатическим алиментарным, антибиотическим и территориальным антагонизмом. Исследователями были отобраны штаммы *Trichoderma* sp. IZR F-183 и *Trichoderma* sp. IZR F-186 с высоким показателем ингибирования роста фитопатогенов и полифункциональным механизмом антагонистической активности [11].

Предпринимаются попытки выделения штаммов грибов из рода *Trichoderma* в качестве эффективных продуцентов биопрепаратов для борьбы с болезнями винограда. Так в исследованиях группы ученых из Таиланда (Soytong K. et al., 2005) штаммы *Trichoderma harzianum* PC01, *T. hamatum* PC02 показали высокую антимикотическую активность *in vitro* в отношении возбудителя антракноза винограда патогенного штамма *Colletotrichum gloeosporioides*. Применение биопрепаратов на основе штаммов *Trichoderma* в полевых опытах на 5 сортах винограда значительно снизили заболеваемость антракнозом листьев, побегов и ягод винограда на всех сортах по сравнению с химическим контролем [12].

Анализ литературных источников показал, что род *Trichoderma* имеет большой потенциал для использования в интегрированной защите яблони и винограда. В связи с этим, а также вследствие отсутствия зарегистрированных микробиопрепаратов для контроля фузариозной корневой гнили яблони и фузариозного усыхания соцветий/гроздей винограда, поиск штаммов антагонистов для биотехнологического контроля данных заболеваний является актуальным.

Цель исследования: в условиях *in vitro* изучить антимикотическую активность штаммов рода *Trichoderma* в отношении возбудителей корневой гнили яблони и усыхания генеративных органов винограда.

Объекты и методы исследований. Исследования проведены в 2021 г. в лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов ФГБНУ СКФНЦСВВ. Объектами исследований являлись моноспоровые штаммы возбудителя корневой гнили яблони *Fusarium sporotrichioides*, возбудителей инфекционного усыхания генеративных органов винограда *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, а также штаммы из рода *Trichoderma* sp.

В работе было изучено 12 штаммов рода *Trichoderma sp.*; 7 - выделенных из промышленных насаждений яблони I/1, II/4, II/2, II/3.1, II/3.2, XIV/5 и XIV/6; и 5 - выделенных из промышленных насаждений винограда Т-213, Т-338, Т-404/1, Т-441/1, Т-503, которые отличались по морфолого-культуральным признакам.

Активность штаммов рода *Trichoderma* в отношении грибов *Fusarium* определяли методом встречных (двойных) культур при совместном сращивании на среде КГА (картофельно-глюкозный агар). Посев двойных культур производили одновременно уколом, в трехкратной повторности. Через 7-10 суток инкубации при температуре 25 °С отмечали рост патогена и антагониста в процентах (%) от площади чашки Петри (конкуренция за площадь питания), наличие или отсутствие зон задержки роста патогена в результате синтеза гидролитических ферментов или веществ антибиотической природы (стерильная зона, мм), нарастания антагониста на колонию патогена (гиперпаразитическая зона, см²). Стандартом для штаммов, выделенных из агроценозов яблони, служил препарат Трихоцин, СП (титр 10¹⁰ КОЕ/г *Trichoderma harzianum*, штамм Г-30 ВИЗР), зарегистрированный против корневых гнилей на ряде сельскохозяйственных культур. Контроль в обеих группах – монокультура тест-объекта. Все процедуры проводили в стерильных условиях.

Для описания типов взаимоотношений между грибами использовали классификацию Пестинской [6] и шкалу Джонсона и Карла в модификации и дополнении Алимовой [5].

Обсуждение результатов. Все изученные штаммы *Trichoderma spp.* характеризовались различной антагонистической активностью по отношению к тестируемым культурам микопатогенов. В результате проведенных исследований были установлены разные типы взаимоотношений между ними.

Яблоня. Из 7-ми испытанных штаммов наибольшую антагонистическую активность по отношению к возбудителю *F. sporotrichioides* показали три штамма рода *Trichoderma*: I/1, II/2, II/4; площадь зарастания среды у этих штаммов составила 85-100 %. Они обладали двойным механизмом действия – конкуренцией за питательную среду и фунгицидным паразитическим антагонизмом (табл. 1, рис. 1).

У штамма II/2 была установлена антагонистическая активность в степени 5 баллов по модифицированной шкале Джонсона и Карла, покрыв мицелием на 10-е сутки эксперимента культуру гриба *F. sporotrichioides* полностью, что свидетельствует об очень высоком гиперпаразитизме – VSH (very strong hyperparasitism). Для других двух штаммов антагонистическая активность составила 4 балла и была высокой. Остальные антагонисты имели площадь зарастания ниже 80 % и имели различные механизмы взаимодействия с тест-культурой.

У штамма XIV/5, как и у стандарта, обнаружен фунгистатический антибиотический антагонизм, то есть ингибирование роста колонии патогена происходит на расстоянии под воздействием антибиотических веществ, с образованием между ними пустой – «стерильной» – зоны. У штамма II/3.2 установлен фунгистатический алиментарный антагонизм, который выражается в остановке роста колонии патогена при контакте с колонией антагониста, а также в нарастании последнего на патоген. Культура патогена под действием этих штаммов-антагонистов и остальных, кроме штамма XIV/6, изменяла свои морфолого-культуральные характеристики, отмечалось почти полное отсутствие развития воздушного мицелия. Возможно, это указывает на гибель мицелия тест-объекта в результате контакта с антибиотическим веществом антагониста. Как отмечает Рудаков О.Л. [6], многие микофильные виды *Trichoderma* относятся к настоящим некротрофам и могут осваивать хозяина только после того, как вызовут некроз его клеток. Штамм XIV/6 характеризовался низким микопаразитизмом, и антифунгальная активность составила 1 балл – происходило обоюдное подавление при контакте, после соприкосновения колоний рост обоих организмов прекращался.

Таблица 1 – Площадь зарастания поверхности питательной среды мицелием штаммов рода *Trichoderma* и *F. sporotrichioides*

Вариант опыта	Площадь зарастания поверхности питательной среды, %		Размер «стерильной» зоны, мм
	антагонистом	патогеном	
<i>F. sporotrichioides</i> (контроль)	-	80	-
Конкуренция за площадь питания+гиперпаразитизм			
Трихоцин, СП (стандарт)	78	20	4
XIV/5 <i>Trichoderma</i> sp.	70	26	10
XIV/6 <i>Trichoderma</i> sp.	73	35	2
II/3.1 <i>Trichoderma</i> sp.	73	33	0
II/3.2 <i>Trichoderma</i> sp.	69	35	0
I/1 <i>Trichoderma</i> sp.	89	11	0
II/4 <i>Trichoderma</i> sp.	85	15	0
II/2 <i>Trichoderma</i> sp.	100	0	0

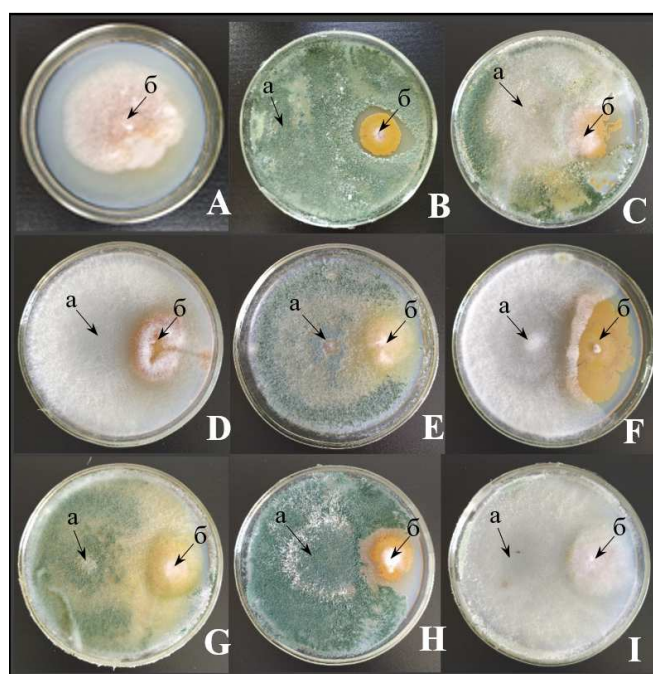


Рис. 1. Антагонистическая активность штаммов грибов из рода *Trichoderma* к возбудителя корневой гнили яблони *Fusarium sporotrichioides* через 10 суток культивирования на среде КГА: А – *F. sporotrichioides* (чистая культура патогена); В – препарат Трихоцин, СП; С – I/1 *Trichoderma* sp.; D – II/2 *Trichoderma* sp.; E – II/3.1 *Trichoderma* sp.; F – II/3.2 *Trichoderma* sp.; G – II/4 *Trichoderma* sp.; H – XIV/5 *Trichoderma* sp.; I – XIV/6 *Trichoderma* sp.; а – антагонист; б – патоген.

Необходимо отметить, что зафиксированные нами взаимоотношения между патогенными штаммами *F. sporotrichioides* и штаммами *Trichoderma* sp. отмечались рядом исследователей: к возбудителю фузариоза сои *F. sporotrichiella* var. *poae* наибольшую эффективность показали 5 штаммов [6], максимальную конкурентную способность за площадь питания проявил штамм *T. koningii*. [7]. Микромицет *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg проявил антибиотическую активность по отношению к токсинообразующим штамму *F. sporotrichioides* [5].

Виноград. Оценку антагонистической активности аборигенных штаммов *Trichoderma* sp. проводили в первую очередь в отношении наиболее агрессивного штамма из комплекса усыхания соцветий/гроздей винограда – *Fusarium proliferatum* F-41/1 (табл. 2).

Таблица 2 – Антагонистическая активность аборигенных штаммов *Trichoderma* spp. к возбудителю фузариозного усыхания генеративных органов винограда *Fusarium proliferatum* F-41/1, при температуре 25 °С на картофельно-сахарозном агаре, на 10-е сутки культивирования

Исследуемый штамм	Площадь зарастания поверхности питательной среды				K1, мм	K2, см ²
	Антагонистом		Патогеном			
	см ²	%	см ²	%		
<i>F. proliferatum</i> F-41/1 (контроль)	-	-	63,6	100,0	-	-
Конкуренция за площадь питания+антибиоз						
T-441/1	47,7	75,0	15,9	25,0	5,1	0
Конкуренция за площадь питания+гиперпаразитизм						
T-404/1	54,1	85,0	9,5	15,0	0	0,7
Конкуренция за площадь питания						
T-213	47,7	75,0	15,9	25,0	0	0
T-338	43,8	70,0	19,8	30,0	0	0
T-503	50,9	80,0	12,7	20,0	0	0

Примечание: K1 – размер стерильной зоны; K2 – площадь гиперпаразитической зоны

В отношении патогенного штамма F-41/1 *Fusarium proliferatum* все аборигенные штаммы *Trichoderma* spp. (T-213, T-338, T-404/1, T-441/1, T-503) проявили антагонистическую активность, наибольшую отметили у T-213 (рис. 2).

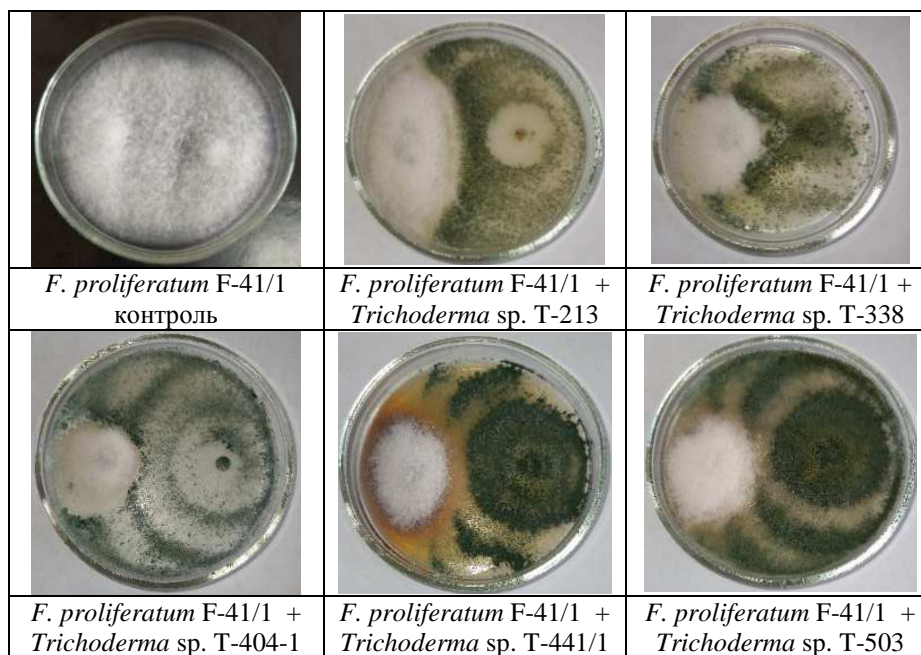


Рис. 2. Антагонистическая активность штаммов грибов из рода *Trichoderma* к возбудителю фузариозного усыхания генеративных органов винограда (*F. proliferatum* изолят F-41/1) через 10 суток культивирования на картофельно-сахарозном агаре: слева – патоген, справа – антагонист

Установлено, что в отношении штамма *F. oxysporum* F-117 штаммы антагонистов проявили большую активность, чем в отношении штамма *F. proliferatum* F-41/1 (табл. 3, рис. 3).

Таблица 3 – Антагонистическая активность аборигенных штаммов *Trichoderma* spp. к возбудителю фузариозного усыхания генеративных органов винограда *Fusarium oxysporum* F-117, при температуре 25 °С на картофельно-сахарозном агаре, на 10-е сутки культивирования

Исследуемый штамм	Площадь зарастания поверхности питательной среды				К1, мм	К2, см ²
	Антагонистом		Патогеном			
	см ²	%	см ²	%		
<i>F. oxysporum</i> F-117 (контроль)	-	-	63,6	100,0	-	-
Конкуренция за площадь питания+ гиперпаразитизм+антибиоз						
T-503	50,9	80,1	12,7	19,9	12,0	5,7
Конкуренция за площадь питания+гиперпаразитизм						
T-338	55,9	88,0	7,7	12,0	0	2,3
T-404/1	60,5	95,2	3,1	4,8	0	2,5
T-441/1	53,5	84,1	10,1	15,9	0	4,0
Конкуренция за площадь питания+антибиоз						
T-213	57,2	90,0	6,4	10,0	5,2	0

Примечание: К1 – размер стерильной зоны; К2 – площадь гиперпаразитической зоны.

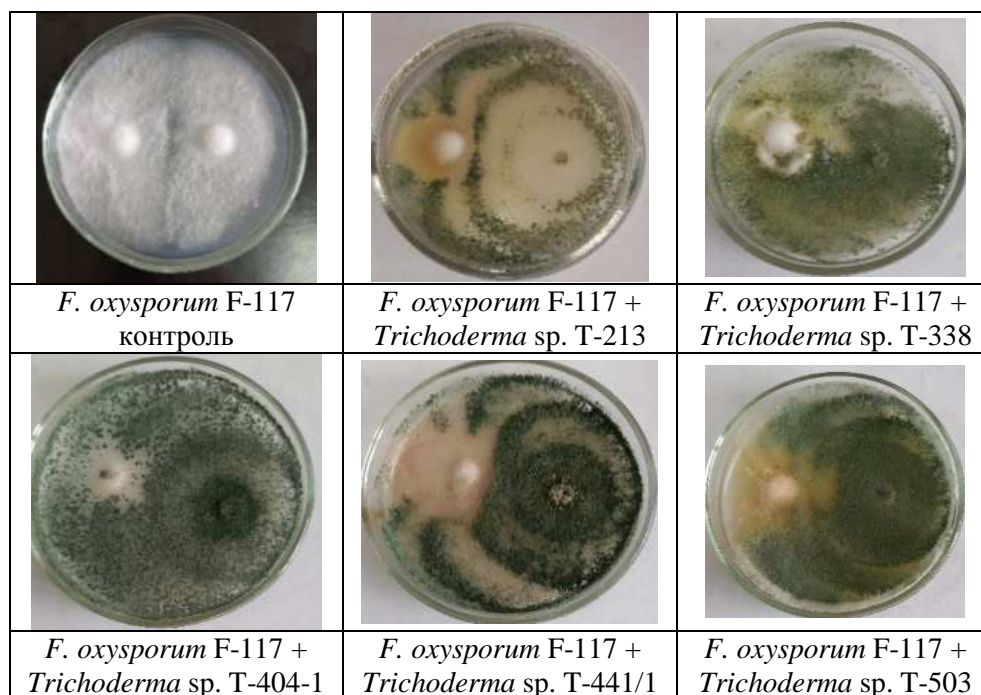


Рис. 3. Антагонистическая активность штаммов грибов из рода *Trichoderma* к возбудителю фузариозного усыхания генеративных органов винограда (*F. oxysporum* изолят F-117) через 10 суток культивирования на картофельно-сахарозном агаре: слева – патоген, справа – антагонист

При изучении активности аборигенных штаммов рода *Trichoderma* в подавлении роста культур микопатогенов, выделенных из ампелоценозов, установлено, что степень активности одних и тех же штаммов-антагонистов может варьировать в зависимости от вида возбудителя в пределах одного рода патогенных микромицетов (*Fusarium* spp.). Подавление роста колоний патогенов *F. proliferatum* 41/1 и *F. oxysporum* F-117. происходило на основе нескольких механизмов действия или их сочетаний. Двойной механизм отмечен у штамма Т-404/1 в отношении *F. proliferatum* 41/1. Наибольшая активность в подавлении роста этого патогена отмечена у штаммов Т-404/1 и Т-503, площадь зарастания питательного субстрата этими штаммами составляла 85% и 80% соответственно. В отношении патогенного штамма *F. oxysporum* F-117 изучаемые штаммы *Trichoderma* spp. были наиболее активны. Их антимикотическая активность проявилась в сочетании конкуренции за площадь питания, гиперпаразитизме и антибиозе. Такой тройной механизм действия отмечен у штамма Т-503. Двойной механизм, на основе конкуренции за площадь питания и гиперпаразитизма был отмечен у штаммов Т-338, Т-404/1, Т-441/1; на основе конкурентной и антибиотической активности – у штамма Т-213. Наибольшая конкуренция за площадь питания выявлена у штаммов Т-338, Т-503, Т-404/1. Наибольшей антимикотической активностью в отношении возбудителей фузариозного усыхания генеративных органов винограда обладают штаммы *Trichoderma* spp. – Т-338, Т-404/1, и Т-441/1.

Выводы. В результате изучения паразитической активности аборигенных штаммов рода *Trichoderma* в отношении *F. sporotrichioides*, возбудителя нового вредоносного заболевания яблони в агроценозах юга России - корневой гнили, были отмечены как слабый, так и очень сильный микопаразитизм. В ходе первичного лабораторного скрининга из 7 коллекционных штаммов грибов-антагонистов рода *Trichoderma* по отношению к *F. sporotrichioides* были отобраны штаммы XIV/5 и I/1, которые проявили фунгистатический антибиотический антагонизм с образованием «стерильной» зоны и штамм II/2 с высоким гиперпаразитизмом. На последующих этапах работы предполагается продолжить исследования потенциальных биоагентов в лабораторных и полевых условиях. Обобщая полученные данные по скринингу антимикотической активности у аборигенных штаммов-антагонистов в отношении микопатогенов из рода *Fusarium*, возбудителей усыхания генеративных органов винограда, можно сделать вывод, что штаммы *Trichoderma* spp. Т-338 и Т-404/1 обладают выраженными микопаразитическими свойствами в отношении всех тест-культур патогенов; высокой конкурентной активностью обладает большинство исследованных штаммов (Т-338, Т-441/1, Т-404/1, Т-503); в большей или меньшей степени все штаммы проявили антагонистическую активность. Однако в качестве наиболее активного антагониста установлен штамм Т-441/1, который можно выделить в качестве перспективного для дальнейших исследований по разработке мер биоконтроля нового заболевания винограда – инфекционного усыхания соцветий/гроздей.

Литература

1. Юрченко Е. Г., Савчук Н.В., Буровинская М.В. Фузариозное усыхание генеративных органов винограда: особенности патогенеза и вредоносность // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2022. № 22 (4). С. 344-349. <http://magarachjournal.ru/index.php/magarach/article/view/188/140>.
2. Головин С.Е. Фитосанитарные проблемы в плодовом питомнике и пути их решения // Плодоводство и ягодоводство России. 2012. Т. 30. С. 328-337. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_17769996_86984994.pdf
3. Bodah, E. T. Root rot diseases in plants: a review of common causal agents and management strategies / E. T. Bodah // Agri Res & Tech: Open Access J. – 2017. – Vol. 5. – №. 3. – P. 555661. <http://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.05.555661>

4. Astatpchuk, I. Species diversity of root rot pathogens of apple tree of the genus *Fusarium* Link in Southern Russia / I. Astatpchuk, G. Yakuba, A. Nasonov // BIO Web of conferences. – EDP Sciences, 2020. – Vol. 21. – P. 00005. https://www.bio-conferences.org/articles/bioconf/full_html/2020/05/bioconf_bpp2020_00005/bioconf_bpp2020_00005.html
5. Попова А.Д., Садыкова В.С. Антагонистические свойства штаммов *Trichoderma asperellum* в отношении токсинобразующих грибов рода *Fusarium* // Международный научно-исследовательский журнал. 2014. №. 5-1 (24). С. 33-35. <http://research-journal.org/wp-content/uploads/2011/10/5-1-24.pdf>
6. Маслиенко Л. В., Курилова Д.А., Шипиевская Е.Ю., Асатурова А. М. Первичный скрининг штаммов грибов и бактерий антагонистов к возбудителю фузариоза сои // Масличные культуры. 2009. №. 1 (140). С. 114-119. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_12501305_30978066.pdf
7. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х., Даценко Л.А. Первичный скрининг штаммов антагонистов к возбудителю фузариоза льна масличного // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2019. № 78. С. 91-98. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=41032936>
8. Martínez-Álvarez, P. In vitro and in vivo interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum* / P. Martínez-Álvarez, F.M. Alves-Santos, J.J. Diez // Silva Fennica. – 2012. – Vol. 46(3). – P. 303–316. https://www.researchgate.net/publication/258875067_In_Vitro_and_In_Vivo_Interactions_between_Trichoderma_viride_and_Fusarium_circinatum
9. Bernal-Vicente, A. Increased effectiveness of the *Trichoderma harzianum* isolate T78 against *Fusarium* wilt on melon plants under nursery conditions / A. Bernal-Vicente, M. Ros, J.A.J. Pascual // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2009. – Vol. 89. – №. 5. – P. 827-833. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.3520>
10. Шаинидзе О.Т., Мурванидзе А.Д. Биологические методы борьбы против возбудителя черной корневой гнили томата // Евразийский союз ученых. 2016. №. 6-1 (27). С. 107-111. <https://cyberleninka.ru/article/n/biologicheskie-metody-borby-protiv-vozbuditelya-chernoy-kornevoy-gnili-tomata>
11. Войтка Д.В., Юзефович Е.К., Атакишиева Я.Ю. Скрининг антагонистической активности грибов р. *Trichoderma* по отношению к доминирующим корнеобитающим патогенам овощных культур, изолированным на территории Беларуси и Азербайджана // Защита растений. 2019. №. 43. С. 144-152. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_44053903_47328469.pdf
12. Soyong K., Srinon, W., Rattanacherdchai K., Kanokmedhakul S. Kanokmedhakul K. Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape // Journal of Agricultural Biotechnology. – 2005. -Vol. 1. – P. 33-41. <http://ijat-aatsea.com/pdf/Soyong%20page%2033-42.pdf>