**АНТАГОНИЗМ НОВЫХ ИЗОЛЯТОВ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA* ПО
ОТНОШЕНИЮ К ПАТОГЕНУ *ALTERNARIA* SP., ВЫДЕЛЕННОМУ ИЗ ОРЕХА
ГРЕЦКОГО**

Щербакова Т.И., Кручан Ш., Пынзару Б.В., Волощук Л.Ф.
Институт Генетики, Физиологии и Защиты растений Молдовы
e-mail: tscerb@gmail.com

Abstract. The research is aimed at studying the antagonistic relationships of five isolates of the genus *Trichoderma* fungi in relation to the *Alternaria* sp. fungus. The pathogen was isolated from diseased walnut leaves. In the work was used the method of double cultures on agar media. As a result,

the inhibition rate of *Alternaria* pathogen by *Trichoderma* fungi was determined. For isolate №3 the rate was 90%, for isolate №2 - 85%, isolate №4 inhibited the pathogen by 75%, isolate №1 - by 65%. Isolate №5 and strains *T.virens* and *T. lignorum* suppressed the growth of *Alternaria* by 40-50%.

Key words: antagonism, *Trichoderma* isolate, *Alternaria* pathogen, walnut

Введение

В первой половине вегетационного периода 2020 года, в силу сложившихся погодных условий, отмечено большое распространение и развитие грибов рода *Alternaria*. Они выделялись из многих однолетних и многолетних культур, дикорастущих растений, сорняков и насекомых-вредителей. Многие виды *Alternaria* вызывают пятнистости листьев, вредоносность которых проявляется в повреждении фотосинтетического аппарата растения и при сильном заражении приводят к существенным потерям урожая. Плесневение и гниение семян, плодов и корнеплодов – ещё один тип вреда, причиняемого видами *Alternaria*, приводит к ухудшению внешнего вида продукции и её выбраковке [1]. Виды *Alternaria* обладают способностью продуцировать более 70 токсинов, которые могут накапливаться в зараженной сельскохозяйственной продукции. Они играют важную роль в патогенности грибов и вызывают проблемы, связанные с безопасностью пищевых продуктов, поскольку некоторые из них особо опасны для людей и животных. Токсины *Alternaria* сохраняются в процессе переработки заражённых плодов и обнаруживаются, например, в томатной пасте, в томатном и яблочном соках, в красном вине и т.д. [2, 3].

В исследованиях последнего времени отмечается, что часто несколько микотоксинов *Alternaria* могут одновременно встречаться в загрязнённых пищевых продуктах и усиливать их общую токсичность [3].

Виды *Alternaria* в большинстве своём способны развиваться при умеренной температуре и наличии капельной влаги в виде дождей или обильных рос [1].

Для снижения развития и распространения грибов *Alternaria*, уменьшения их вредоносности и снижения пестицидной нагрузки, часто рекомендуют использовать биологические препараты для защиты растений на основе живых микроорганизмов, в том числе грибных биопрепаратов на основе *Trichoderma*. Наши исследования направлены на изучение антагонистического действия выделенных в этом году новых изолятов грибов *Trichoderma* по отношению к патогену *Alternaria* sp., выделенному из листьев грецкого ореха.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 5 изолятов грибов *Trichoderma*, выделенных из природных субстратов в 2020 году и изолят *Alternaria*, выделенный из листьев грецкого ореха. Также в экспериментах использовались штаммы *Trichoderma virens* CNMN-FD-13, 3X и *T.lignorum* CNMN-FD-14, M-10, продуценты биопрепаратов Gliocladin-SC и Trichodermin-SC, соответственно. Изоляты №1-3 и 5 выделены из разных почвенных субстратов произрастания ореха грецкого, №4 выделен из листьев ореха.

Антагонистическую активность изолятов *Trichoderma* по отношению к патогену *Alternaria* изучали методом встречных (двойных) культур на агаризованной сусло-агаровой питательной среде (пивное сусло-вода 1:1), повторность трехкратная. Культивировали при температуре 25°C, оптимальной для исследуемых грибов [4]. Радиус колоний измеряли ежедневно линейным методом (мм) от края посеянного блока к центру чашки, на 5-е сутки вычисляли показатель ингибирования патогена грибом *Trichoderma* (%). На 10-е сутки определяли тип взаимоотношений

изолятов *Trichoderma* и фитопатогена и оценивали в баллах степень нарастания антагониста на колонию патогена: 0 баллов – нарастания нет, 1 балл – антагонист занимает 25% площади колонии патогена, 2 балла – антагонист занимает 25-50% колонии патогена, 3 балла – антагонист занимает 51-75% колонии патогена, 4 балла – антагонист занимает 76-100% площади колонии патогена [5]. Проводили микроскопирование грибов в зонах смыкания колоний и зонах нарастания.

Результаты и обсуждения

Погодные условия в начале вегетационного периода являлись благоприятными для развития альтернариоза на большинстве культурных, дикорастущих и сорных растениях. Повышенная влагообеспеченность в мае, июне и июле – 263 мм выпавших осадков при норме 181 мм, а также температурные показатели в мае на 2,6⁰С ниже нормы, а в июне на 1,4⁰С выше нормы, способствовали развитию альтернариоза растений на однолетних и многолетних культурах [6]. Альтернариоз отмечен на томатах, сое, зерновых, подсолнечнике и др. Из пятен на листьях яблони, груши, вишни, черешни выделялись грибы *Alternaria*. Сильное альтернариозное поражение отмечено на можжевельнике, вплоть до гибели ветвей. Из пораженной листы ореха грецкого выделено в чистую культуру 2 среднеспоровых вида патогена и еще один крупноспоровый вид отмечен на коре дерева (при посевах на питательные среды формировались конидии среднего размера) (рис. 1).

Рис. 1. Фитопатогенный гриб *Alternaria*. а-б) – выделение патогена из листьев ореха грецкого и хвои можжевельника, с) – конидии и мицелий с листьев ореха, увеличение в 400 раз, d) – конидии с коры дерева ореха, увеличение в 400 раз

Однако погодные условия 2020 года были благоприятными и для грибов-антагонистов фитопатогенов, из природных субстратов выделялись аборигенные грибы рода *Trichoderma*. Антагонистические взаимоотношения выделенных изолятов и *Alternaria* определяли методом двойных (встречных) культур. Грибы *Trichoderma* являются быстрорастущими, в двойной культуре в течение четырех суток колонии изолятов № 1, 2, 3, 4 и штамм *T.lignorum* достигли размера 80×80 мм и заселили всю чашку. Изолят №5 и штамм *T.virens* максимально заселили чашку на пятые сутки. Размеры колонии *Alternaria* различались: в культуре с изолятом №3 радиус колонии патогена на 10-е сутки составил 2 мм, с изолятом № 2 – 3 мм, с изолятом № 4 – 5 мм. Изолят №1 позволил патогену вырасти на 7 мм, а №5 – на 12 мм. В культуре со штаммом *T.virens* радиус колонии патогена составил 10 мм, со штаммом *T.lignorum* – 11 мм (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1. Характеристика антагонистических взаимоотношений изолятов *Trichoderma* и патогена *Alternaria* в двойной культуре

Изолят, штамм	Радиус колоний грибов, мм Время измерения, сутки						Показатель ингибирования на 5-е сутки, %	Степень нарастания изолятов на патоген, балл
	1	2	3	4	5	10		
<i>Trichoderma</i> sp. 1	9	30	54	80	80	80	65	4
<i>Alternaria</i> sp.	0	2	5	7	7	7	0	
<i>Trichoderma</i> sp. 2	14	42	70	80	80	80	85	3
<i>Alternaria</i> sp.	0	2	3	3	3	3	0	
<i>Trichoderma</i> sp. 3	10	40	65	80	80	80	90	4
<i>Alternaria</i> sp.	0	2	2	2	2	2	0	
<i>Trichoderma</i> sp. 4	14	41	70	80	80	80	75	4
<i>Alternaria</i> sp.	0	4	5	5	5	5	0	
<i>Trichoderma</i> sp. 5	12	28	46	60	80	80	40	1
<i>Alternaria</i> sp.	0	6	10	12	12	12	0	
<i>T.virens</i> 3X	11	28	48	62	80	80	50	4
<i>Alternaria</i> sp.	0	3	8	10	10	10	0	
<i>T.lignorum</i> M-10	7	40	60	80	80	80	40	0
<i>Alternaria</i> sp.	0	6	10	11	11	11	0	
<i>Alternaria</i> sp.	0	6	10	15	20	46	0	-
Контроль								
HCP _{0,05}						18	23

Изолят №3

Изолят №5

Рис. 2. Изоляты *Trichoderma* в двойной культуре

а) – лицевая сторона чашек, б) – реверс, 10-й день роста

Показатель ингибирования патогена *Alternaria* грибом *Trichoderma* для изолята №3 составил 90%, для изолята №2 – 85%, изолят №4 ингибировал патоген на 75%, а №1 – на 65%. Изолят №5 и штаммы *T.virens* и *T.lignorum* подавляли рост *Alternaria* на 40-50% (табл. 1). На 10-е сутки проводили микроскопирование грибов в зонах смыкания колоний и зонах нарастания. В препаратах, приготовленных из зон смыкания культур, наблюдалось ингибирование мицелия, его утончение, деформация и разрушение (характерно для всех изолятов и штаммов). Образования конидий не отмечено. В зонах нарастания, ближе к стенке чашки успели образоваться конидии, но многие из них разрушались под воздействием метаболитов *Trichoderma* (рис. 3).

Рис. 3. Мицелий и конидии *Alternaria*, увеличение в 400 раз

а) – здоровый мицелий *Alternaria* в контроле, б) – разрушение мицелия и- с) – конидий под воздействием гриба *Trichoderma*

В результате проведенных исследований было определено, что изоляты *Trichoderma* №1, 2, 3, 4 и штамм *T.virens* проявляют фунгистатический алиментарный (односторонний) антагонизм, при котором происходит нарастание колонии гриба *Trichoderma* на поверхность колонии фитопатогена и патоген прекращает активный рост. Этот тип антагонизма особо выразительно проявился у изолята №3, когда в двойной культуре рост гриба *Alternaria* был направлен не к центру чашки, а в противоположную, к стенке, где оставалось 5-7 мм пространства. По-видимому, биологически активные вещества этого изолята диффундировали в питательную среду и воздействовали на патоген, прекращая его рост практически сразу после посева. Возможна активность летучих метаболитов изолята.

Изолят №5 также проявил фунгистатический алиментарный антагонизм, но в слабой форме. Штамм *T.lignorum* проявил территориальный антагонизм – обрастание колонии патогена благодаря высокой скорости роста. Нарастания на патоген не происходило, но его рост снижался.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что из пяти новых изолятов грибов рода *Trichoderma*, выделенных из субстратов произрастания ореха грецкого, четыре проявляют антагонизм к фитопатогенному грибу *Alternaria* sp., выделенному из пораженных листьев ореха. Изоляты могут быть использованы для разработки биологических средств защиты растений от альтернариоза.

Библиография

1. Ганнибал Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. Методич. пособие. С.-Петербург, 2011, 71 с.
2. Scott P.M., Lawrence G.A., Lau B. P.-Y. Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. J. Mycotoxin Research, 2006, Vol. 22 (2), p. 142–147.
3. Hyang Burm Lee, Patriarca A., Naresh Magan. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. J. Mycobiology, 43 (2), 2015, p. 93-106.
4. *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin
5. Comporota A. Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis-a-vis de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Agronomie. 1985, vol. 5, p. 613-620.

6. Поликсенова В.Д., Храмцов А.К., Пискун С.Г. Методические указания к занятиям по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов». Минск: БГУ, 2004, 36 с.
7. Pogoda i klimat. <http://www.pogodaiklimat.ru/archive.php>. (дата обращения 15.08.20).