
БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 981.2+579.64

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *COLLETOTRICHUM LUPINI* И *TRICHODERMA HARZIANUM* ПРИ СОВМЕСТНОМ РОСТЕ В КУЛЬТУРЕ

© И. Я. Нам, В. В. Заякин, М. С. Кобозева
I. Ya. Nam, V. V. Zayakin, M. S. Kobozeva

Interaction of *Colletotrichum lupini* and *Trichoderma harzianum* grown together

ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет им. акад. И. Г. Петровского»
241036, Россия, г. Брянск, ул. Бежицкая, д. 14. Тел.: +7 (919) 198-25-81, e-mail: vladimir.zajackin@yandex.ru

Аннотация. Методом встречного роста на чашках Петри изучали взаимодействие *Trichoderma harzianum* 18-ВИЗР, входящего в состав средств биологической защиты, и различающихся генетически и по скорости роста изолятов возбудителя антракноза люпина на двух средах – агаре Чапека и картофельно-глюкозном агаре (PDA). Скорость роста изолятов определяет положение точки встречи мицелиев и расстояние ингибирования роста от точек посева. Но взаимодействие по типу взаимной конкуренции наблюдалось только на картофельно-глюкозном агаре, а на агаре Чапека происходило взаимопроникновение мицелиев с образованием зоны смешанного роста грибных культур, особенно выраженной для быстрорастущих изолятов. Рост одного из медленно растущих изолятов 12ж полностью подавляется на среде PDA; на поверхности его колонии появляется спороношение *Trichoderma*, что может косвенно свидетельствовать о проявлении микопаразитизма. Наоборот другой медленно растущий изолят 48 успешно конкурирует с *Trichoderma*. Обнаруженный эффект усиления растительным экстрактом конкуренции и подавления роста изолятов патогена может иметь практическое значение для улучшения эффективности биопрепаратов.

Ключевые слова: *Trichoderma harzianum*, *Colletotrichum lupini*, антагонизм грибов, влияние питательной среды.

Abstract. Interaction of plant disease of biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* 18-VIZR with isolates of *Colletotrichum lupini* was investigated on two media – potato-dextrose agar (PDA) and Chapek agar. Speed of isolates mycelium growth determines the distance of *Trichoderma* and inhibits pathogen colony growth on PDA. On Chapek agar antagonistic interaction is much less intensive. After the contact of fungi colonies was observed formation of a zone of mixed growth of two myceliums, especially evident for the fast growing isolates. Slow growing isolate 12zh is fully inhibited by *Trichoderma* in PDA and its sporulation on the surface of the isolate colony may be an argument for mycoparasitism. On the contrary, another slow growing isolate 48 competes with *T. harzianum* very well, so, there was observed a zone without *Trichoderma* sporulation. The found effect of stimulation of fungi antagonistic interaction by potato extract might have a practical significance.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, *Colletotrichum lupini*, antagonism of fungi, the influence of substrate.

DOI: 10.22281/2307-4353-2019-1-49-53

Введение

Заболевание антракнозом, вызываемое в основном несовершенным грибом *Colletotrichum lupini* comb. nov., является главным фактором, сдерживающим люпиносеяние в России (Такунов, 1996). Поэтому борьба с этим заболеванием является одной из актуальных задач сельского хозяйства, направленной на решение проблемы дефицита кормового белка. Стандартным подходом к решению этой задачи является применение фунгицидов. Однако это приводит к загрязнению окружающей среды и быстрому появлению устойчивых форм патогенов (Тютчев, 2001; Кутузова и др., 2015). Альтернативой этому подходу является использование биологических средств защиты растений. В частности, в последние десятилетия активно изучаются и внедряются препараты на основе разных видов грибов рода *Trichoderma* (Benítez et al., 2004; Акрами, Шихлинский, 2010; Шарипова и др., 2013). Существуют также промышленные препараты на их основе. Целью нашей работы было изучить характер взаимодействия *Colletotrichum lupini* и *Trichoderma harzianum* в условиях культивирования на питательных средах.

Материалы и методы

Для работы были выбраны изоляты возбудителя антракноза люпина из собранной нами и частично охарактеризованной ранее коллекции, насчитывающей свыше 60 моноспоровых изолятов с четырёх видов люпина (*Lupinus albus* L., *L. angustifolius* L., *L. luteus* L., *L. polyphyllus* Lindl.) с территории России и Беларуси (Нам и др., 2018). Скорости роста грибных колоний могут иметь существенное значение для конкурентоспособности изолятов. Поэтому были выбраны по несколько изолятов из групп со средней, низкой и высокой скоростью роста, причем так чтобы изоляты в каждой группе имели существенные генетические различия (по предварительной оценке).

В качестве представителя рода *Trichoderma* использовали культуру промышленного штамма *Trichoderma harzianum* 18-ВИЗР, входящего в состав препарата Глиокладин.

Культивирование проводили на двух стандартных средах для выращивания грибов: агаре Чапека и картофельно-глюкозном агаре, которые рекомендуются в том числе и для культивирования грибов рода *Colletotrichum* (Cannon, 2012).

В работе использовали метод встречного роста грибов. Грибы высевали на определённом расстоянии с помощью агаровых блоков со стороной 2 мм. Отмечали линию первоначального соприкосновения колоний, растущих навстречу друг другу. Следили за динамикой дальнейшего роста колоний и определяли характер взаимодействия грибов. Опыты проводили в четырёх повторностях. На фотографиях (рис. 1, 2) представлены типичные результаты одной из повторностей.

Результаты и обсуждение

По результатам проведённого исследования, характер взаимодействия грибов зависит как от их скорости роста, так и от среды культивирования. На рис. 1, 2 по положению линий соприкосновения видно, что скорость роста *Trichoderma harzianum* существенно выше скорости роста *Colletotrichum lupini*, кроме самых быстрорастущих изолятов 1.4 и 52.2, первоначальный контакт с колониями которых наблюдался примерно на равном расстоянии от точек посева.

Медленнорастущие и, в меньшей степени, изоляты со средней скоростью роста постепенно обрастали мицелием *Trichoderma* с разных сторон. Но из двух медленнорастущих изолятов (48 и 12ж) только для изолята 48 наблюдается наличие на обеих средах широкой пограничной зоны между колониями, где отсутствует не только дальнейший рост *C. lupini*, но и полностью подавлено спороношение *T. harzianum*.

В этом случае можно говорить о взаимной конкуренции грибов и предположить, что изолят 48 *C. lupini* выделяет вещества, подавляющие на некотором расстоянии спороношение *T. harzianum*.

С изолятом 12ж ситуация другая – после контакта рост *C. lupini* полностью подавлен, но *T. harzianum* продолжает рост, и на поверхности колонии возбудителя антракноза со временем появляется спороношение *T. harzianum* (рис. 2).

Другие изоляты на картофельно-глюкозном агаре после контакта тоже полностью прекращают рост. При этом также прекращается рост *T. harzianum*, но прозрачные свободные от спороношения зоны полностью отсутствуют в случае быстрорастущих изолятов или слабо выражены в случае изолятов со средней скоростью роста (рис. 1). Образуются почти не меняющиеся со временем границы контакта колоний, расположение которых определяется относительной скоростью роста грибов.

На агаре Чапека характер взаимодействия грибных культур существенно отличается. После первоначального контакта обе колонии продолжают расти, хоть и с меньшей скоростью. Образуются зоны «пересечения», в которых наблюдается совместный рост грибов в смешанной культуре. Этот эффект наиболее сильно выражен для быстрорастущих изолятов, явно заметен у изолятов со средней скоростью роста и почти отсутствует у медленно растущих изолятов (рис. 1).

В зонах совместного роста образуется как мицелий *C. lupini*, в том числе воздушный (изолят 1.4), так и споры у *T. harzianum* (рис. 2). Из-за уменьшения подавления роста изолятов диаметр колоний несколько увеличивается, они становятся более симметричными. Это особенно хорошо заметно для изолята 10Б (рис. 2).

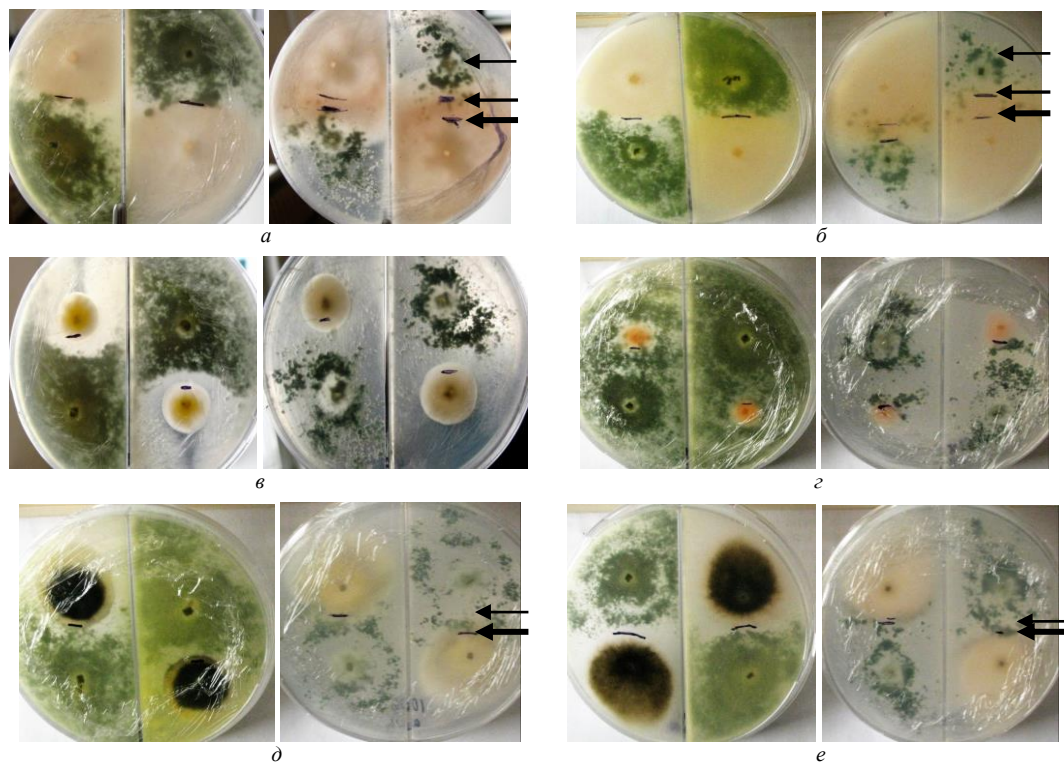


Рис. 1. Взаимодействие различных изолятов *C. lupini* и *T. harzianum* 18-ВИЗР на двух средах (обратная сторона чашек). Слева – картофельно-глюкозный отвар, справа – те же изоляты на агаре Чапека. а – быстрорастущий изолят 1.4, б – быстрорастущий изолят 52.2, в – медленно растущий изолят 48, г – медленно растущий изолят 12ж, д – изолят со средней скоростью роста 10Б, е – изолят со средней скоростью роста 4.2М. Штрихи на чашках и жирные стрелки указывают на линию первоначального соприкосновения колоний, стрелки средней жирности – положение границы колонии *C. lupini* через 4 дня после контакта, тонкие стрелки – положение границы колонии *C. lupini* через 9 дней.

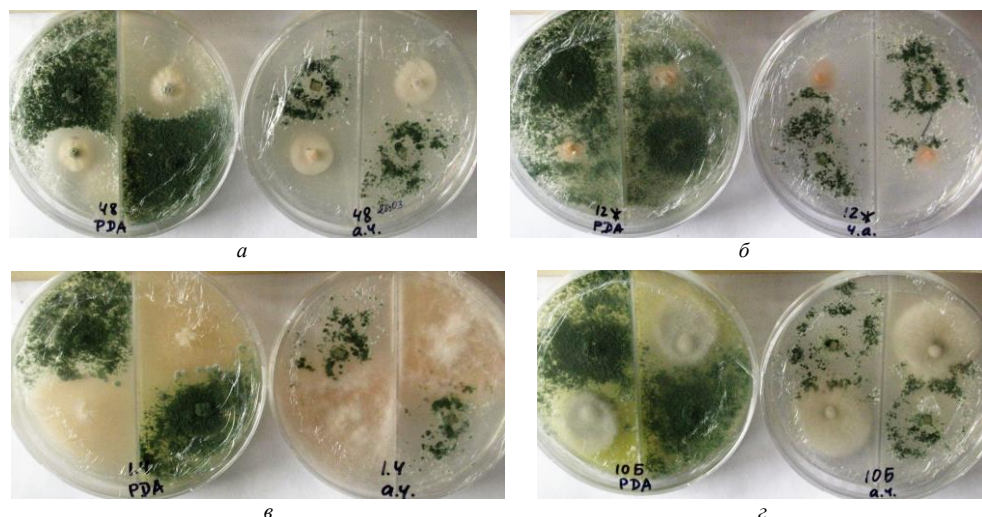


Рис. 2. Взаимодействие различных изолятов *C. lupini* и *T. harzianum* 18-ВИЗР на двух средах (верхняя сторона чашек). Слева – картофельно-глюкозный отвар, справа – те же изоляты на агаре Чапека. а – медленно растущий изолят 48, б – медленно растущий изолят 12ж, в – быстрорастущий изолят 1.4, г – изолят со средней скоростью роста 10Б. Остальные обозначения – те же, что для рис. 1.

Без специальных способов окраски проследить распространение мицелия *Trichoderma* на фоне колонии изолятов возбудителя антракноза затруднительно. Косвенно об этом можно судить только по появлению спороношения. Поэтому в качестве количественной оценки возможности совместного роста измеряли расстояние от линии первичного контакта до границы мицелия изолятов *C. lupini* на фоне колонии *Trichoderma* (табл.).

Таблица

Формирование зон совместного роста мицелия на разных средах.

Изолят	*Зона пересечения колоний на среде PDA, мм			Зона пересечения колоний на агаре Чапека, мм		
	Через 5 дней	Через 9 дней	Через 15 дней	Через 5 дней	Через 9 дней	Через 15 дней
1,4	–	≤1	1,62±0,11	4,12±1,03	18,80±0,79	27,50±0,88
52,2	–	≤1	1,50±0,88	3,25±0,45	13,00±2,30	27,50±1,50
48	–	1,88±0,12	2,01±0,67	≤1	3,50±0,17	11,00±0,67
12ж	–	≤1	1,00±0,33	≤1	3,75±0,83	7,38±0,28
10Б	–	≤1	1,00±0,33	≤1	8,12±0,36	16,50±0,88
4,2М	–	≤1	1,62±0,56	≤1	4,25±0,08	7,00±0,67

Примечание: * – измерялось от точки контакта до границы мицелия *C. lupini*.

Таким образом, по данным табл. и рис. 1 и 2, на среде Чапека наблюдается ослабление конкурентных взаимоотношений грибов-антагонистов. Такой тип взаимодействий *Trichoderma* с патогенами в литературе не обсуждался, как и влияние среды на резкую смену стратегии. Можно предположить, что экстракты растений (отвар картофеля) содержат индукторы, которые переключают грибы рода *Trichoderma* на другой тип конкурентных отношений, стимулируя тем самым их защитные свойства. Это согласуется с тем, что в присутствии отвара картофеля среда часто окрашивается в жёлтые тона за счёт выделений *Trichoderma* (рис. 1 и 2). Среди метаболитов, образуемых этими грибами, обнаруживается целый набор фунгицидных веществ, относящихся к разным классам по химическому строению, в том числе окрашенных (Rubio et al., 2009; Zeilinger et al., 2016). Помимо выделения веществ с антигрибковыми свойствами грибы рода *Trichoderma* могут взаимодействовать с корнями растений, заселять их поверхность и вступать с растениями в отношения с элементами симбиоза, что выражается в индукции системной устойчивости и стимуляции роста (Голованова и др., 2009; Валиулина, Голованова, 2011; Корнилова и др., 2011).

Уникальной отличительной особенностью грибов рода *Trichoderma* является их склонность к «гиперпаразитизму». Под этим термином понимается способность этих грибов в тесном контакте с гифами патогенных грибов питаться за их счёт, что обычно заканчивается уничтожением патогена. Таким свойством обладают многие представители рода, в том числе и *Trichoderma harzianum* (Шарипова и др., 2013; Atanasova et al., 2013). Выбор типа паразитизма или конкурентных взаимодействий зависит от штамма и вида *Trichoderma*, вида патогена, присутствия растения-хозяина.

В нашем случае такой тип взаимодействия при дальнейших исследованиях может быть выявлен только в случае изолята 12ж. По-видимому, при взаимодействии *Trichoderma harzianum* с грибами рода *Colletotrichum* более характерно проявление не паразитических, а конкурентных отношений (Sharma et al., 2017).

Контакт с растением, патогеном или хитином, имитирующим клеточную стенку гриба, инициирует синтез большого числа новых белков, в частности включающих регуляторные белки, ферменты ответственные за синтез фунгицидных веществ, гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки патогенов (Samolski et al., 2009; Atanasova et al., 2013). Наши данные хорошо согласуются с этими представлениями, поскольку растительный экстракт (отвар картофеля) явно переключает взаимодействие между грибами на другой тип.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке технологий применения биопрепаратов на основе *Trichoderma* для повышения их эффективности, например, с помощью добавок, стимулирующих конкурентные свойства биофунгицида.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-44-320985.

Список литературы

- Акрами М., Шихлинский Г. М. 2010. Способность комбинаций *Trichoderma harzianum* и *Trichoderma aperellum*, выделенных для борьбы с фузариозной гнилью гороха, в сравнении с влиянием *Trichoderma harzianum* // Устойчивое развитие горных территорий. № 4 (6). С. 45–48. [Akrami M., Shikhlinский G. M. 2010. Spособnost' kombinatsii *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma aperellum*, vydelennykh dlya bor'by s fuzarioznoi gnilyu gorokha, v sravnenii s vliyaniem *Trichoderma harzianum* // Ustoichivoe razvitie gornyykh territorii. № 4 (6). P. 45–48.]
- Валиулина А. Ф., Голованова Т. И. 2011. *Trichoderma* как агент защиты растений в условиях стресса // «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» – XIV Международная научно-практическая конференция. С. 415–417. [Valiulina A. F., Golovanova T. I. 2011. *Trichoderma* kak agent zashchity rastenii v usloviyakh stressa // «Problemy botaniki Yuzhnoi Sibiri i Mongolii» – XIV Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya. P. 415–417.]
- Голованова Т. И., Долинская Е. В., Сичкарук Е. А. 2009. Роль грибов рода *Trichoderma* в повышении урожайности пшеницы и ячменя // Вестник КрасГАУ. № 6. С. 53–58. [Golovanova T. I., Dolinskaya E. V., Sichkaruk E. A. 2009. Rol' gribov roda *Trichoderma* v povyshenii urozhainosti pshenitsy i yachmenya // Vestnik KrasGAU. № 6. P. 53–58.]
- Корнилова Н. А., Филиппов И. Г., Васильева А. В., Горюнова О. Б., Марквичев Н. С. 2011. Влияние продуктов метаболизма грибов рода *Trichoderma* на физиологические процессы роста и развития растений // Гавриш. № 4. С. 18–21. [Kornilova N. A., Filippov I. G., Vasil'eva A. V., Goryunova O. B., Markvichev N. S. 2011. Vliyaniye produktov metabolizma gribov roda *Trichoderma* na fiziologicheskie protsessy rosta i razvitiya rastenii // Gavrish. № 4. P. 18–21.]
- Нам И. Я., Заякин В. В., Шапко Ю. К., Кобозева М. С., Земскова Л. А., Новикова М. А. 2018. Коллекция изолятов возбудителя антракноза люпина *Colletotrichum lupini* comb. nov. и характеристика их роста in vitro // Бюллетень Брянского отделения Русского ботанического общества. № 2 (14). С. 43–49. [Nam I. Ya., Zayakin V. V., Shashko Yu. K., Kobozeva M. S., Zemskova L. A., Novikova M. A. 2018. Kolleksiya izolyatov vzbuditelya antraknoza lyupina *Colletotrichum lupini* comb. nov. i kharakteristika ikh rosta in vitro // Byulleten' Bryanskogo otdeleniya Russkogo botanicheskogo obshchestva. № 2 (14). P. 43–49.]
- Кутузова И. А., Григорович И. А., Побединская М. А., Белов Г. Л., Еланский С. Н. 2015. Устойчивость российских и европейских штаммов *Colletotrichum coccodes* к некоторым фунгицидам // Защита картофеля. № 1. С. 30–34. [Kutuzova I. A., Grigorovich I. A., Pobedinskaya M. A., Belov G. L., Elanskii S. N. 2015. Ustoichivost' rossiiskikh i evropeiskikh shtammov *Colletotrichum coccodes* k nekotorym fungitsidam // Zashchita kartofelya. № 1. P. 30–34.]
- Такунов И. П. 1996. Люпин в земледелии России. Брянск: Придесенье. 372 с. [Takunov I. P. 1996. Lyupin v zemledelii Rossii. Bryansk: Pridesen'e. 372 p.]
- Тютевев С. Л. 2001. Проблемы устойчивости фитопатогенов к новым фунгицидам // Вестник защиты растений. № 1. С. 38–53. [Tyuterev S. L. 2001. Problemy ustoichivosti fitopatogenov k novym fungitsidam // Vestnik zashchity rastenii. № 1. P. 38–53.]
- Шарипова Д. А., Ветрова М. А., Масютин Я. А., Новиков А. А., Гуцин П. А., Винокуров В. А. 2013. Исследование антагонизма различных штаммов грибов рода *Trichoderma* и грибовых фитопатогенов // Башкирский хим. журн. Т. 20. № 4. С. 83–85. [Sharipova D. A., Vetrova M. A., Masyutin Ya. A., Novikov A. A., Gushchin P. A., Vinokurov V. A. 2013. Issledovanie antagonizma razlichnykh shtammov gribov roda *Trichoderma* i gribovykh fitopatogenov // Bashkirskii khimicheskii zhurn. T. 20. № 4. P. 83–85.]
- Atanasova L., Crom S. L., Gruber S., Coulpier F., Seidl-Seiboth V., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma mycoparasitism* // BMC Genomics. 14 : 121. P. 1–15.
- Benítez T., Rincón A. M., Limón M. C., Codón C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains // International microbiology. № 7. P. 249–260.
- Cannon P. F., Damm U., Johnston P. R., Weir B. S. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions // Studies in Mycology. 73. P. 181–213.
- Rubio M. B., Hermosa R., Reino J. L., Collado I. G., Monte E. 2009. *Thctf1* transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity // Fungal Genetics and Biology. V. 46. P. 17–27.
- Samolski I., de Luis A., Vizcaino J. A., Monte E., Suárez M. B. 2009. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray // BMC Microbiol. 9 : 217. P. 1–14.
- Sharma V., Salwan R., Sharma P. N., Kanwar S. S. 2017. Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response // Int. Journ. of Biol. Macromolecules. V. 95. P. 72–79.
- Zeilinger S., Gruber S., Bansal R., Mukherjee P. K. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics // Fungal Biol. Rev. V. 30 : 2. P. 74–90.

Сведения об авторах

Нам Ирина ЯнГуковна,
д. б. н., профессор кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: iyanam1@yandex.ru

Заякин Владимир Васильевич
д. б. н., профессор кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: vladimir.zajackin@yandex.ru

Кобозева Марина Сергеевна
аспирант кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: bobunovamarina@mail.ru

Nam Irina YanGukovna
Sc. D. in Biology, Professor of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: iyanam1@yandex.ru

Zayakin Vladimir Vasil'evich
Sc. D. in Biology, Professor of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: vladimir.zajackin@yandex.ru

Kobozeva Marina Sergeevna
postgraduate of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: bobunovamarina@mail.ru