Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Московская гимназия на Юго-Западе №1543

Взаимодействие *Fusarium oxysporum* с микроорганизмами на экссудатах растений

Самородова Алевтина, Соколова Вера

Научный руководитель:

Николай Семёнович Марквичев

Москва 2016

Оглавление

Введение 2
Материалы и методы 4
Штаммы микроорганизмов 4
Среды 5
Метод определения фитопатогенности 5
Получение стерильных экссудатов огурца в лабораторных условиях 6
Метод выращивания огурца в чашках Петри 6
Метод определения взаимодействия микроорганизмов на стандартных питательных средах, и на средах, содержащих экссудаты растений 7
Обзор литературы 8
Строение корневой системы растений 8
Болезни огурца в закрытом грунте 8
Грибные заболевания 9
Субстраты, используемые для выращивания овощных культур в теплицах 9
Классификация методов защиты растений 10
Экссудаты растений 11
Результаты и их обсуждение 13
Определение вирулентности *F. oxysporum* по отношению к растениям огурца 13
Исследование роста огурца и способности секретирования экссудатов на агаризированной среде 19
Рост *Fusarium oxysporum* на агаризованной минеральной среде в присутствии живого растения 20
Проявление антагонистической активности *Trichoderma viride* по отношению к *Fusarium oxysporum* 24
Выводы 28
Список литературы 28

Введение

Уже многие годы специалисты ведут борьбу с возбудителями болезней растений. С каждым годом количество микроорганизмов, ставших фитопатогенными, растёт в связи с приобретением способности преодолевать защитные свойства живого растения. От этого сельское хозяйство несёт большие потери. Для успешной борьбы с болезнями растений необходимо своевременно выявить заболевания и верно идентифицировать

их возбудителей. Разработка методов диагностики заболеваний растений ведётся в смежных науках, таких, как молекулярная биология, биохимия и фитопатология.

К современным способам идентификации возбудителей грибных и бактериальных заболеваний относят их выделение в чистую культуру с последующим исследованием микробиологическими методами. Некоторые фитопатогены не могут развиваться *in vitro*. Поэтому необходима разработка нового метода идентификации микроорганизмов, обладающих фитопатогенными свойствами.

Патогенность - это способность быть причиной патологии (болезни, отклонения от нормы). Фитопатогенные микроорганизмы способны вызывать повреждения у заражённого растения. Также выделяют такое понятие, как вирулентность, количественный компонент патогенности. Под ней понимают степень патогенности определённого штамма микроорганизма, т.е. способность вызвать массовое поражение восприимчивых растений - эпифитотию. Чтобы избежать массового поражения, можно использовать химические средства защиты от фитопатогенов, но также можно разработать и биологические методы борьбы с фитопатогенами. Эти методы будут безопасней, экологичней и с большой вероятностью эффективней, что поможет нам сохранить урожай. Например, один из методов основан на взаимодействии фитопатогенов с бактериями и грибами, которые ингибируют развитие этих фитопатогенов.

Первым делом необходимо верно идентифицировать фитопатогенные микроорганизмы, как было сказано ранее. Далее следует провести исследования, показывающие взаимодействие фитопатогенов с микроорганизмами, в теории их ингибирующими. А после всего этого мы будем рассматривать взаимодействия между микроорганизмами, являющимися фитопатогенными, и их антагонистами на экссудатах растений. Экссудаты – это корневые выделения растений. Рассматривая взаимодействия микроорганизмов и их естественных врагов на экссудатах растений, мы сможем разработать новый метод идентификации фитопатогенов и защиты растений от них.

Разработка этого метода поможет нам оценивать взаимодействие фитопатогенных микроорганизмов с другими микроорганизмами в условиях, наиболее приближённых к естественным. Также этот метод в дальнейшем может использоваться для определения фитопатогенов, которые невозможно выделить на простых синтетических средах in vitro.

Целью нашей работы будет разработка этого метода. Чтобы разработать этот метод, мы поставили перед собой несколько задач: 1) Проверить, правда ли *Fusarium oxysporum* является фитопатогеном растений; 2) Выяснить, как взаимодействуют между собой

Fusarium oxysporum и грибы рода *Trichoderma* на экссудатах растений.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов, использованные в работе, предоставленные РХТУ им. Менделеева, кафедрой Биотехнологии:

Fusarium oxysporum - царство *Fungi*, отдел *Ascomycota*, класс *Sordariomycetes*, порядок *Hypocreales*, штамм F2106. Штамм был получен путём выделения из заражённого растения огурца тепличного комбината «Сейм-Агро» (Курск). Окраска мицелия белого цвета с дискретными светло-оранжевыми стромами.

Fusarium oxysporum поддерживали на скошенной, агаризованной среде Чапека в пробирках при температуре +4°С. Пересев на свежую питательную среду осуществлялся каждые три месяца. Все эксперименты по определению фитотоксичности проводили со спорами, перенесенными при помощи стерильной иглы или полученные смывом спор стерильной водопроводной водой.

Trichoderma viride – царство *Fungi*, отдел *Ascomycota*, класс *Sordariomycetes*, подкласс

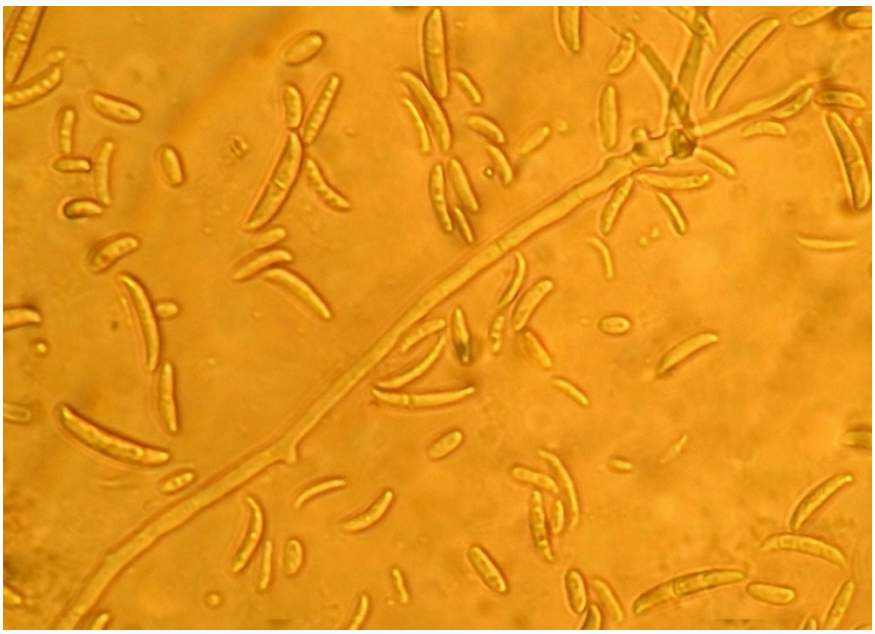


Рисунок 1. Мицелий *F.oxysporum* F2106

Hypocreomycetidae, порядок *Hypocreales*, штамм F2001. Колонии гриба с белой мицелиальной пленкой, с возрастом становятся волосистыми из-за образования воздушных гиф. Внешний вид колоний на ранних стадиях развития - белые, позднее образуется спороношение зелёного или жёлто-зелёного цвета. Мицелий образован гладкими, сильно ветвистыми, бесцветными гифами диаметром 1,5-12 мкм.

Trichoderma viride поддерживали на скошенной, агаризованной среде Чапека при +4◦ . Пересев на свежую питательную среду осуществлялся каждые три месяца. Все эксперименты проводили со спорами, перенесенными при помощи стерильной иглы или полученные смывом спор физиологическим раствором.

Семена огурца Атлет F1. Гибрид огурца среднего срока созревания, выведенный в 1999

году селекционерами агрофирмы Гавриш (г. Москва). Является одним из самых популярных гибридов в тепличных хозяйствах России и стран СНГ. Авторы гибрида: С.Ф. Гавриш, В.В. Шевелев, А.Е. Портянкин, А.В.Шамшина, Г.П.Додонов.

Среды, использованные для экспериментов:

- Среда Чапека (г/л водопроводной воды). Глюкоза - 30, дрожжевой экстракт (Difco) - 5, пептон (Bacto) - 5, KNO_3 - 2,5, KH_2PO_4 - 1, $MgSO_4*7H_2O$ - 0,5, NaCl - 10.
- Минеральная среда (г/л водопроводной воды). $Ca(NO_3)_2$ - 0.6963, KNO_3 - 0.5407, NH_4NO_3 - 0.0492, K_2SO_4 - 0.1269, KH_2PO_4 - 0.17, $Mg(NO_3)_2$ - 0.2223, $MnSO_4$ - 0.0017, $ZnSO_4$ - 0.0015, $CuSO_4$ - 0.0003, H_3BO_3 - 0.0028. Среда, используемая в работе, является составом минеральных веществ, используемых для приготовления раствора полива огурца на тепличном комбинате «Сейм-Агро»
- В качестве голодного агара применяли минеральную среду с добавлением (до стерилизации) в неё микробиологического агара (Бакто) в концентрации 17 г/л.
- Для затвердевания питательной среды в неё добавляется (до стерилизации) микробиологический агар (Бакто) в концентрации 17г/л.

Метод определения фитопатогенности

Суть метода заключалась в следующем: мы разлили по пластиковым чашкам Петри приготовленную питательную среду, в составе которой присутствовали только неорганические компоненты. Затем в застывшую питательную среду посадили семена огурца, так чтобы будущая корневая система развивалась в толщу среды. И поместили чашки в термостат на 120 часов при температуре 25-27^{o}C до образования корневой системы. После этого на поверхность питательной среды высеивались грибы путём нанесения штриха с помощью стерильной иглы.

Стерилизацию питательной среды проводили методом автоклавирования при температуре 120^{o}C в течение 30 минут.

Для того чтобы стерилизовать семена огурца мы выдерживали их в 95% этиловом спирте в течение 1-2 минут, а затем промывали стерильной водопроводной водой три раза по 2 минуты.

Для проверки вирулентности Fusarium oxysporum по отношению к огурцам сорта F1 Атлет в горшках вырастили 12 растений до фазы формирования ростка. Три растения в горшках обработали суспензией спор методом полива. Три другие подверглись внесению спор непосредственно в растения. Для этого в прикорневую зону растения была сделана инъекция суспензии спор. Остальные шесть растений мы посадили отдельно в незаражённую почву в качестве контроля. Каждую неделю мы осматривали растения и заносили в таблицу число листков, бутонов (в последствие цветков) и рост растений каждой группы.

Получение стерильных экссудатов огурца в лабораторных условиях

Для получения экссудатов, семена выращивали в стерильных условиях в пробирках на 60 мл. Для этого в пробирку помещали фильтровальную бумагу, сложенную в гармошку, вносили 30 мл (половина объема пробирки) рабочего раствора неорганических веществ (используемых на действующих тепличных комбинатах для полива рассады огурца), закрывали ватными пробками и автоклавировали при 120^{o}C в течение 30 минут. Семена огурца поверхностно стерилизовали, обрабатывая в течение 1-2 минут 95% этанолом, после чего 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой и вносили в подготовленные, охлажденные до комнатной температуры пробирки на сложенную гармошкой фильтровальную бумагу. Условия выращивания растений были наиболее приближены к реальным условиям роста растений в теплице. Для поддержания условий стерильные пробирки помещались в растительный бокс, в котором поддерживалась температура 25 ^{o}C и освещение 14 час/сутки с помощью светодиодной лампы с определённой длиной волны для обеспечений оптимального роста огурца. Время выращивания растений-14 суток. Именно на 14 сутки в теплицах рассаду из стерильных помещений переносят в основное помещение. К этому моменту корневая система растения достигает примерно 15 см, и оно имеет 3-4 листа.

Жидкость из всех пробирок сливали в стерильную колбу и делали рассев на твердые питательные среды для контроля стерильности. Независимо от результата, экссудаты дополнительно стерилизовали через мембранные фильтры (Millex GP 0.22 um) и вносили в стерильные колбы объемом 100 мл.

Метод выращивания огурца в чашках Петри

Для этого минеральную среду после стерилизации разливали в чашки Петри. Далее, после застывания среды, на край чашки Петри высаживается стерильное семечко огурца, после чего чашки ставят инкубироваться при температуре 28^{o}C на 7 суток до образования ростка и корневой системы.

Рисунок 2. Развитие растения огурца на агаризованной среде

Метод определения взаимодействия микроорганизмов на стандартных питательных средах, и на средах, содержащих экссудаты растений

В эксперименте используется метод встречных колоний. Берём две чашки Петри, одну заливаем минеральной средой, а другую средой, содержащей экссудаты огурца. По дну каждой чашки Петри проводим черту, разделяющую чашку на две равные части. Заливают агаризованную среду по 20 мл на чашку. В центр одной половины на расстоянии 2 см от черты засевают гриб-патоген рода *Fusarium*, на таком же расстоянии в центр другой – гриб рода *Trichoderma*. В контроле патоген *Fusarium* и грибы рода *Trichoderma* культивируются изолированно друг от друга. Учет результатов эксперимента проводят ежедневно, измеряя радиус колонии фитопатогена *Fusarium* и гриба рода *Trichoderma* в направлении, перпендикулярном черте, делящей чашку на две равные половины. Описывают морфологию колоний грибов. На 5-е и 10-е сутки рассматриваем степень ингибирования фитопатогена *Fusarium* грибом рода *Trichoderma* и степень ингибирования гриба рода *Trichoderma* фитопатогеном *Fusarium.*

Обзор литературы

Строение корневой системы растений

Корень состоит из корневого чехлика и основной массы. Все клетки откладываются в апикальной меристеме, в одном направлении клетки корневого чехлика, а в другом клетки, которые потом разовьются в центральный цилиндр, кору или эпидермис. Происхождение клеток корневого чехлика и эпидермиса неодинаково у различных растений [1], и это может отражаться на природе и протяженности слизистого слоя. За апикальной меристемой находится область удлиняющихся клеток, из которых дифференцируются центральный цилиндр и кора. Клетки коры обычно крупные и округлые в поперечном сечении с широкими межклеточными пространствами между ними. Согласно Скотту [2], стенки клеток коры выстланы липидным веществом там, где они граничат с межклеточным пространством. У злаковых и некоторых других видов эти пространства могут быть крупными. Этим может объясняться заселение бактериями части явно мертвых клеток коры в некоторых корнях [3]. Эндодерма часто служит некоторой защитой против внедрения патогенных организмов [4].

Продолжительность существования первичной коры неодинакова у разных видов. Корни большинства однодольных и некоторых травянистых двудольных полностью первичны. Там, где первичная кора сохраняется длительное время, может происходить некоторое опробковение или одревеснение. Из-за вторичного утолщения корни древесных двудольных сбрасывают первичную кору. В перицикле возникает пробковый камбий, первичная кора отслаивается, а наружный слой образуют пробковые клетки. Заселение первичной коры обычно усиливается с возрастом корней [5], но опробковение и особенно образование организованного коркового слоя сильно затрудняют корневые выделения и заселение микроорганизмами.

Боковые корни, проделывающие себе дорогу сквозь кору, производят некоторое перемещение и повреждение клеток, вызывающие усиление корневых выделений, которое может привлекать микроорганизмы. Например, *Fusarium solani* часто проникают в корни растений табака или фасоли в точках появления боковых корней [6].

Трещины и глубокие выемки в корне, открывающиеся в почву, могут обеспечивать защищенные ниши для микроорганизмов. Поверхность корней имеет также и продольные складки, соответствующие очертаниям подстилающих клеток. Бактерии и грибы часто распространяются вдоль таких борозд, в корнях эти места могут, кроме того, обеспечивать защиту против иссушения и царапин.

Болезни огурца в закрытом грунте

К главным неинфекционным заболеваниям огурца относятся краевой некроз листьев (факторы - неравномерные поливы, излишек либо нехватка компонентов минерального

питания), отмирание листьев и завязей (нехватка освещения), завершковывание побегов (одна из причин - деформация вредителями верхушечной меристемы), октябрьская болезнь (гибель корневой системы из-за нехватки освещённости) и т.д.
К инфекционным относят заболевания, способные передаваться с растения к растению. К возбудителям инфекционных заболеваний можно относить грибы, бактерии, вирусы, немотоды и др.

Грибные заболевания

Корневые и прикорневые гнили огурца виды рода *Fusarium (F. culmorum, F. solani, F. gibbosum, F. oxysporum)* и другие виды фитопатогенов – это распространенное заболевание огурца, приводящее к гибели молодых и плодоносящих растений. На рассаде признаки заболевания фиксируют редко, как правило, они проявляются уже после высадки огурцов в конечный субстрат. Наиболее стремительно болезнь распространяется в зимне-весенний период (при низкой температуре воздуха и почвы), а также летом при высокой температуре почвы. Благоприятные для патогенов значения температуры почвы - ниже 16^{o}C и выше 28°C.

Для сельского хозяйства большое значение имеют выведенные гибриды огурца, такие как, F1 Атлет и F1 Тайга, которые устойчивей к корневой гнили. Внесенные в субстрат в качестве подкормки некоторые соединения ($MnS0_4$ и $ZnS0_4$ по 0,25г на 10л воды) также усиливает устойчивость растений к корневой гнили и помогают росту урожая.

Фузариозное увядание

Чаще всего увядание листьев является результатом поражения растения грибом Fusarium oxysporum, который поселяется в сосудистой системе растения. При попадании в растение фитопатоген вызывает закупорку ксилемы и выделяет фитотоксины, которые, распространяясь по сосудам, приводят к системным нарушениям. Эти воздействия обуславливают появление некрозов на разных частях растения и увядание. Наиболее благоприятный период для развития болезни – начало плодоношения, хотя возможно поражение на всех стадиях развития [7]. Условия окружающей среды значительно влияют на патогенность грибов и продуцирование ими вторичных метаболитов. Оптимальная температура для роста гриба *F. sporotrichioides* колеблется от 22 до 25 °C, а для токсинообразования – от 2 до 10 °C [8]. Влияние на развитие заболевания и продукцию фузариотоксинов оказывают множество факторов: субстрат, его влажность, микрофлора, температура, применение пестицидов, внесение удобрений и другие факторы.

Субстраты, используемые для выращивания овощных культур в теплицах

Тепличные растения выращивают на нескольких субстратах, которые с точки зрения фитопатологии, можно разделить на 3 типа. Стерильный - искусственный субстрат,

состоящий в основном из минеральных компонентов, например, минеральная вата. В нем практически отсутствуют вредители и патогены. Условно-стерильный субстрат - органоминеральный комплекс, хорошо пропаренный. Такой грунт менее благоприятен, так как на труднодоступных для пара участках сохраняются возбудители микозов и бактериозов, поэтому у растений, выросших на этом грунте, могут проявляться болезни, но в гораздо меньшей степени. Нестерильный субстрат - это не пропаренный органоминеральный тепличный грунт или неоднократно используемый искусственный субстрат (перлит, вермикулит и пр.).

Классификация методов защиты растений

- Отбор и внедрение сортов, устойчивых к болезням – это одно из наиболее эффективных мероприятий защиты растений. Создание таких сортов занимает ведущее место в борьбе с фузариозом. Устойчивых к болезни сортов иных растений не существует, но некоторые могут быть толерантны.
- Термическая обработка и соляризация почвы. Одним из радикальных методов оздоровления почвы является ее термическая обработка, в результате которой уничтожается большое количество всевозможных вредителей. Основным минусом пропаривания почвы является то, что это невозможно сделать на больших площадях. Использование удобрений усиливает интенсивность и скорость развития растения, что препятствует его заражению и имеет положительный эффект в борьбе с фузариозом.
- Химический метод базируется на применении различных органических и неорганических соединений, токсичных для фитопатогенных организмов. Химические вещества, применяемые для борьбы с патогенами растений, называют пестицидами. Множество, применяемых для защиты растений препаратов принадлежит к пестицидам, проявляющим свои свойства при прямом контакте препарата с патогеном. Последнее время химический метод по объёму использования занимает одно из первых мест в системе защиты растений. Но у него имеется один огромный недостаток - это опасность загрязнения окружающей среды. Поэтому развитие системы защиты растений направленно на сокращение использования химических средств защиты растений [9].
- К биологическим методам борьбы с фузариозом относится обработка посевного материала или субстрата микроорганизмами, способными подавлять рост грибов. Были разработаны различные препараты, содержащие микроорганизмы – антогонисты, представители рода *Trichoderma, Penicillium* и *Sporidesmium*, бактерии из родов *Pseudomonas, Bacillus* и *Streptomyces*[10].

Биологические методы отличаются своей безопасностью и экологичностью, однако их эффективность всегда относительна.

Среди грибов-антогонистов особый интерес учёных привлекают грибы рода *Trichoderma* (порядок *Hyphomycetales*). К роду *Trichoderma* относятся следующие виды грибов*: T. lignorum, T. polysporu*, и др. Общеизвестно, что *Trichoderma* секретирует разные метаболиты, одни из которых (цитокинины), служащие для стимуляции физиологических процессов растений, проникают в вегетативное тело и приводят к наиболее активному его формированию [6]. Виды рода *Trichoderma* способны оберегать растения от воздействия патогенов с помощью подавления фитопатогенных микроорганизмов, таких как *Fusarium,* и стимуляции роста растений. Эффект от воздействия *Trichoderma* сохраняется дольше, чем эффект пестицидов, препарат дешевле пестицидов и улучшает состояние корневой системы растений [11].

Экссудаты растений

Корневые выделения — источник питания для микроорганизмов. Микроорганизмы, размножающиеся на корнях растений, питаются корневыми выделениями. Такая секреция веществ из корня является одной из нормальных физиологических функций растений. Это было доказано при изучении метаболизма аминокислот в стерильных опытах с изолированными корнями пшеницы [12]. Постоянно протекающий процесс обмена аминокислот между клетками корня и средой регулирует внутриклеточный обмен веществ, таким образом, стабилизируются процессы, протекающие в корне. Избыточное содержание аминокислот в корнях сопровождается подавлением процессов метаболизма. Количество и состав корневых выделений непостоянны и зависят от возраста растения, условий произрастания и особенно от условий питания.

Исходя из исследований многих авторов [12], корневые экссудаты огурца содержат органические кислоты (23%), в состав которых в основном входят яблочная кислота (38,4%) и янтарная (41,4%), сахара (7%). В настоящее время ведутся исследования по определению точного состава корневых экссудатов огурца, поэтому данные неполные.

Исследователи заинтересованы в создании закрытых систем для изучения взаимодействия микроорганизмов и растений. На сегодня существует две, выделенные Сэги в 1983 году [13], группы систем, называющихся гнобиотическими, - стерильная и полустерильная. В первом варианте растения выращивают с использованием сосудов, в которых время эксперимента поддерживаются стерильные условия. В полустерильных условиях корневая система растения находится в стерильных условиях, а его росток не изолирован. Выращивание растений проводят в определённых условиях освещённости и температуры. У этих подходов есть много недостатков, но основными недостатками, является невозможность довести растение до полного созревания.

Есть более технически-сложная установка по выращиванию растений в полустерильных

условиях, которая позволяет выращивать растение до полного созревания [14]. Основным недостатком данной установки, является сложное техническое исполнение.

Различные источники питания, оказывают разное воздействие на жизнедеятельность фитопатогенов и их антагонистов. Органические кислоты и сахара экссудатов растения являются одними из основных источников питания микроорганизмов, обитающих около корней растений, и исходя из состава сахаров и органических кислот, присутствующих в среде они могут синтезировать определённые вещества, способные влиять на растение. Состав экссудатов огурца очень беден, и значительно отличается от аминокислотного состава искусственных питательных сред, из чего можно сделать вывод о целесообразности исследований микроорганизмов на микробиологических средах, содержащих экссудаты растений.

Результаты и их обсуждение

В теплице можно часто наблюдать увядания растений огурца, вызвано оно может быть многими причинами, однако чаще болезнь является результатом поражения сосудистой системы растения грибами *Fusarium oxysporum* или их метаболитами. Основные симптомы заболеваний, вызываемых этим патогеном, являются: хлороз листьев, увядание отдельных листьев растения. В связи с этим для дальнейших исследований была поставлена задача: определить, является ли *F. oxysporum* F2106 вирулентным по отношению к гибриду огурца Атлет F1. Для этого была поставлена серия экспериментов, описанных ниже.

Определение вирулентности *F. oxysporum* по отношению к растениям огурца

Целью данного эксперимента является определить способность *F. oxysporum* проявлять фитопатогенные свойства по отношению к растениям огурца сорта Атлет гибрида F1. Для этого был проведён опыт по искусственному заражению растений. Стерильные семена огурца проращивали в горшках объёмом 1 л с стерильным торфом при температуре 24^{o}C и естественной освещённости в течении 14 суток до появления 1-го настоящего листа. Далее в субстрат опытных растений вносили суспензию спор F. oxysporum в количестве 100 мл и концентрацией 10^{7} КОЕ/мл путём полива (Вариант 1). Параллельно проводили заражение растений методом инъекции суспензией спор *F. oxysporum* в корневую шейку в количестве 0,5 мл с концентрацией спор 10^{9} КОЕ/мл (Вариант 2). Растения выдерживали в течении 45 суток при температуре 24^{o}C и при естественном освещении. Полив осуществляли 100 мл раствора минеральных веществ путём подтапливания 1 раз в 2-е суток. В течении 45 суток фиксировали параметры: средняя высота растений, среднее количество листьев, общее состояние растений, % погибших растений. Данные, полученные в результате эксперимента, были занесены в таблицу 1.

Таблица №1 Рост и развитие огурца после заражения *F.oxysporum*.

Время после заражения, сутки	Параметры	Контроль	Вариант 1	Вариант 2
1	Средняя высота растений (см)	12.75	12.5	12.70
	Среднее Количество	1	1	1

	настоящих листьев, шт.			
	Внешний вид растений	Без патологических изменений.	Без патологических изменений.	Без патологических изменений.
	Процент погибших растений	0	0	0
7	Средняя высота растений (см)	16	14.7	15
	Среднее Количество настоящих листьев, шт.	2.5	2	2
	Внешний вид растений	Без патологических изменений. Листья крупные, равномерно зелёные, у 100% растений появились усы.	Наблюдается пожелтение листьев по краю(хлороз), у 60% растений появились усы.	Листья по краям пожелтели, усы отсутствуют
	Процент погибших растений	0	0	0
14	Средняя высота растений (см)	23	18.3	17.1
	Среднее Количество настоящих	6	4	3

	листьев, шт.			
	Внешний вид растений	Без патологических изменений.	Листья жёлто-зелёные. Хлороз прогрессирует.	Наблюдается общее увядание растений, листья светло-жёлтые
	Процент погибших растений	0	0	10
21	Средняя высота растений (см)	30	24	20,5
	Среднее Количество настоящих листьев, шт.	8	6	4,5
	Внешний вид растений	Без патологических изменений. Появились бутоны цветов.	Листья хлоротичные. Наблюдается увядание растений.	Сильный хлороз и общее увядание. Высыхание нижнего яруса листьев.
	Процент погибших растений	0	10	50
28	Средняя высота растений (см)	36	30	22
	Среднее Количество настоящих листьев, шт.	11	8	5

	Внешний вид растений	Без патологических изменений. Цветы распустились.	Листья хлоротичные. Наблюдается общее увядание.	Хлороз и увядание. Высыхание среднего яруса листьев.
	Процент погибших растений	0	10	75
35	Средняя высота растений (см)	48	38	-
	Среднее Количество настоящих листьев, шт.	12	8	-
	Внешний вид растений	Без патологических изменений. На растениях образуются завязи плодов	Листья жёлтые. Появляются бутоны цветов.	Срез стебля показал наличие мицелия гриба, а также образовавшиеся зернистые и бурые новообразования в просвете сосудов.
	Процент погибших растений	0	10	100
42	Средняя высота растений (см)	52	39	-
	Среднее	12,5	8,5	-

	Количество настоящих листьев, шт.			
	Внешний вид растений	Без патологических изменений. 10% растений начали плодоносить.	Наблюдается сильный хлороз, также растения увядают. Высыхание нижнего яруса листьев.	-
	Процент погибших растений	0	50	-
45	Средняя высота растений (см)	54	39	-
	Среднее Количество настоящих листьев, шт.	12,5	5	-
	Внешний вид растений	Без патологических изменений. На 90% растений образуются плоды. Срез стебля чистый. Сосуды не повреждены.	Бутоны цветов отпали. Срез стебля показал наличие мицелия гриба, а также образовавшиеся зернистые и бурые новообразования в просвете сосудов.	-
	Процент погибших растений	0	50	-

По полученным данным были построены графики:

График №1 Изменение высоты растений во времени.

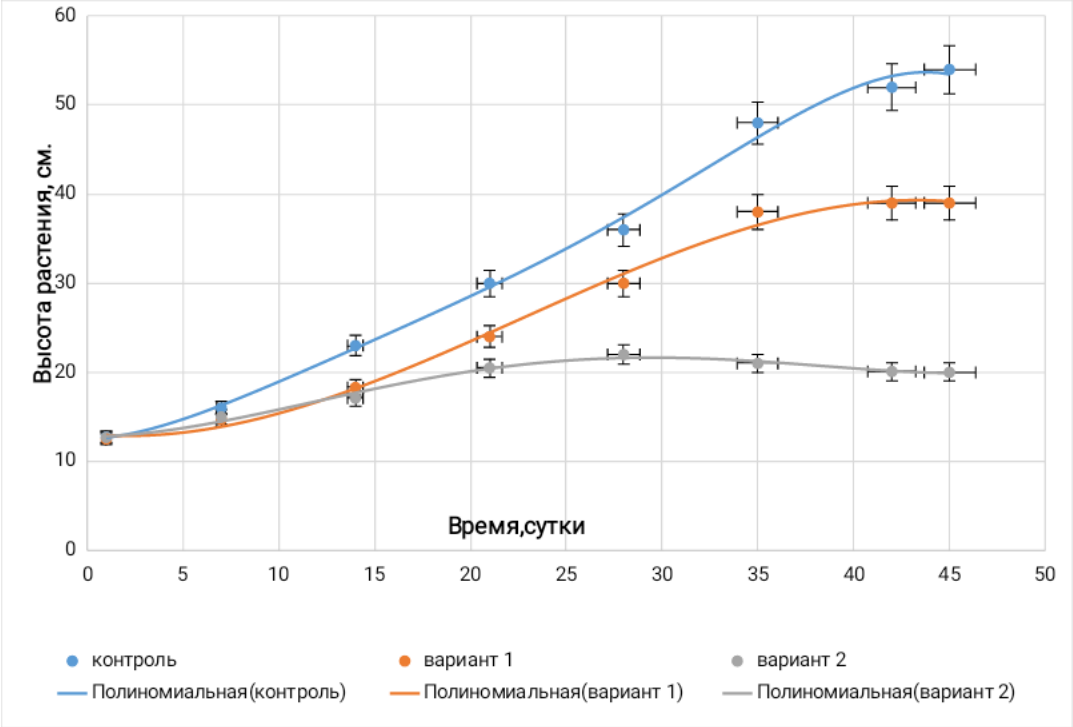
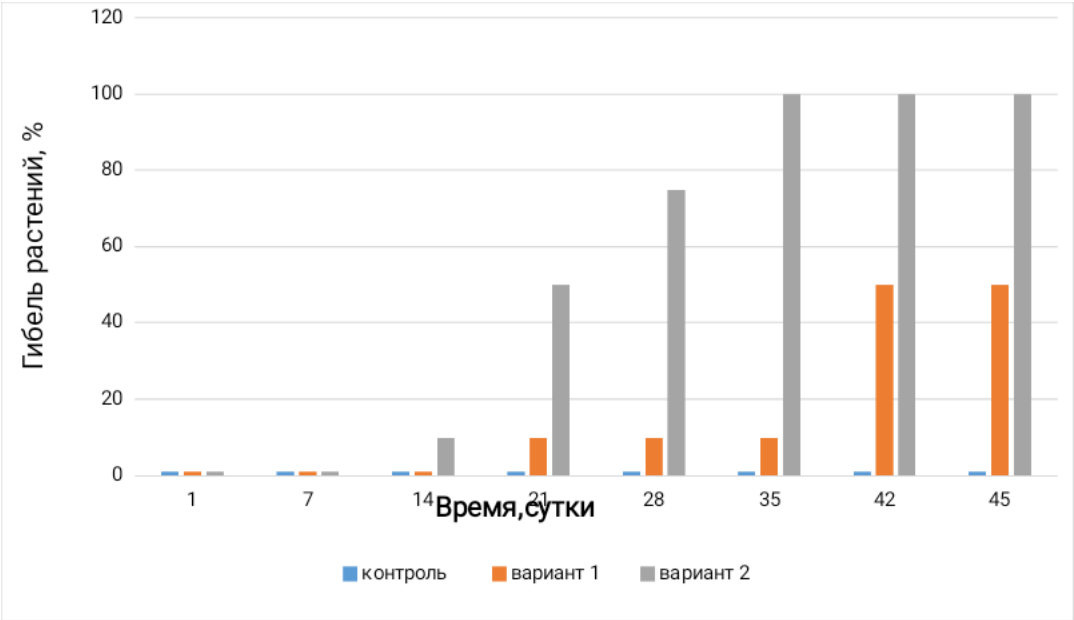


Диаграмма №1 Гибель растений во времени при воздействии *F.oxysporum* различными механизмами.



Из таблицы №1, графика №1 и диаграммы №1 видно, что на 7-е сутки после заражения у опытных растений наблюдается задержка роста. С 7 суток у растений, искусственно заражённых *F.oxysporum,* наблюдаются характерные для фузариозного увядания симптомы: хлороз листьев, просветление жилок растения. Количество образовавшихся листьев в вариантах с искусственным заражением меньше, чем в контрольном варианте. Также у варианта с внесением в субстрат *F.oxysporum* происходит задержка

образования цветов, причём на варианте с инъекцией цветы вообще отсутствуют. На 21 сутки высота растений в варианте 1 меньше, чем в контрольном варианте на 28%, а в варианте 2 на 64%. Количество листьев так же снижено в варианте 1 на 27%, а в варианте 2 на 55%. Срез растений варианта 1 и 2 на 45 сутки показал образование мицелия на срезе, закупорку сосудов, что полностью отсутствует в контроле. Было видно, что метаболиты, выделенные *F.oxysporum,* угнетающе действуют на растение.

В результате можно сделать вывод, что у растений, подвергнутых искусственному заражению, развиваются типичные признаки фузариозного увядания. Проявляются характерные симптомы: хлороз листьев, просветление жилок растения, деформация черешка листьев, увядание листьев растения, гибель. Таким образом, было доказано, что используемый в работе штамм *F. oxysporum* F2106 обладает ярко выраженными фитопатогенными свойствами в отношении огурца гибрида Атлет F1. Также показано, что вирулентность штамма после инъекции в корневую шейку, по сравнению с внесением в субстрат, значительно выше, что, очевидно, связанно с тем, что микроорганизму не требуется ресурсов на процесс внедрения в растение. Вирулентность штамма при внесении в субстрат свидетельствует о высокой агрессивности фитопатогена, способности проникать в растение через корневые покровы, активируя для этого соответствующие ферментные системы.

Исследование роста огурца и способности секретирования экссудатов на агаризированной среде

Целью данного эксперимента было стерильное выращивание растений огурца в агаризованной среде минеральных веществ для последующего изучения взаимодействия микроорганизмов. На первом этапе необходимо было выяснить, выделяют ли растения экссудаты, находясь в агаризованной среде, и не наблюдается ли отрицательного воздействия подобных условий эксперимента на рост и развитие растений. Так, в минеральную среду, содержащую микробиологический агар в концентрации 17г/л, после стерилизации вносили индикатор бромтимоловый синий (с переходом окраски при 7,6–6,0pH с синего в жёлтый) в концентрации 0.1%. Данный индикатор был выбран исходя из того факта, что по экспериментальным данным, экссудаты огурца имеют слабокислый pH, в то время как pH исходной среды близок к нейтральному. После перемешивания среду разливали в чашки Петри. Далее, после застывания среды, стерильным пинцетом в толщу высаживали простерилизованные семена огурца и ставили чашки инкубироваться при температуре 25^{o}C и освещенности 1000 люкс. Растения, выросшие на 7-е сутки представлены на рисунке 3.

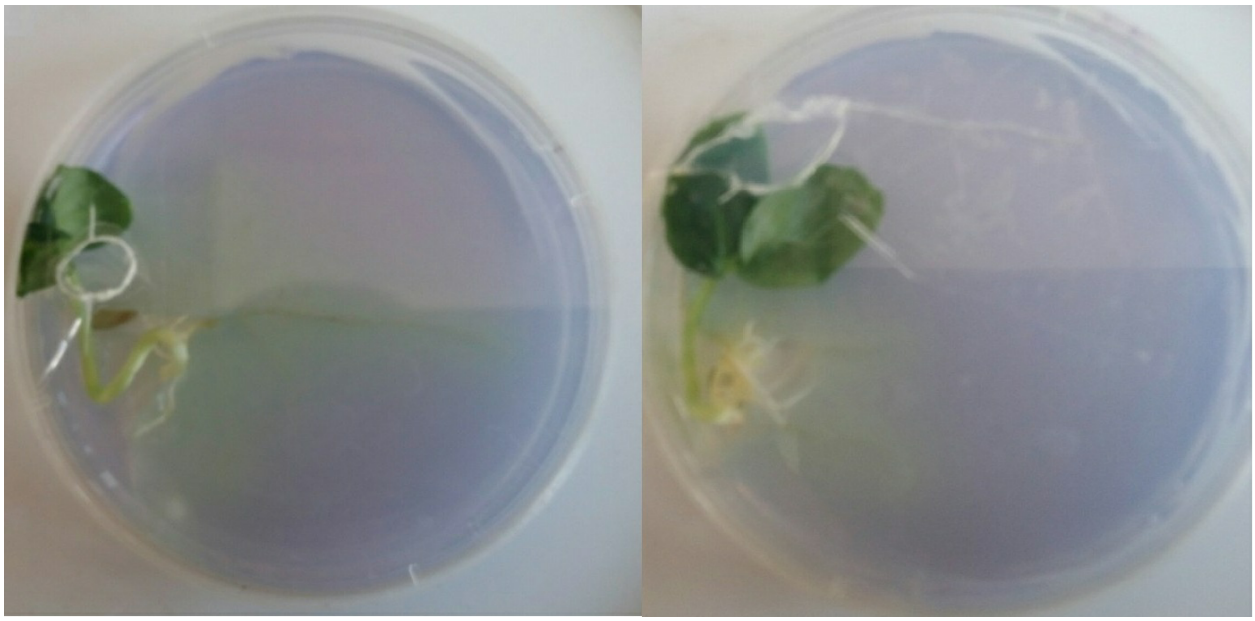


Рисунок 3. Выращивание огурца на агаризованной среде в присутствии индикатора.

По результатам эксперимента, на 7-е сутки инкубации ростовые характеристики семян были сопоставимы с вариантом выращивания в пробирках, при этом было отмечено, что корневая система развивается нормально, наблюдается образование боковых корней и корневых волосков, симптомы заболеваний отсутствуют. Начиная с 4 суток было зафиксировано изменение окраски питательной среды вокруг корней с синей на жёлтую, что говорит о снижении pH среды в прикорневой зоне и, следовательно, о выделении экссудатов. Исходя из этого можно сделать вывод, что метод выращивания растений огурца на агаризованной среде применим для дальнейших исследований.

Рост *Fusarium oxysporum* на агаризованной минеральной среде в присутствии живого растения

Задачей данного эксперимента является установление способности поверхностного культивирование *Fusarium oxysporum* на агаризованной минеральной среде в присутствии живого растения, а также определение влияния *Fusarium oxysporum* на растение огурца при таком культивировании.

Для этого на чашки с агаризованной минеральной средой, на которой в течении 7 суток развивались растения, был произведён посев микроорганизмов методом штриха перпендикулярно корню. Чашки с растением и микроорганизмами инкубировали при температуре 26^{o}C и естественном освещении в течении 7 суток, далее описывали их развитие (рисунок 4).

На 4 сутки появились первые признаки образования колоний *Fusarium oxysporum* по линии засева, причём плотность штриха *F.oxysporum* была больше у корня растения. Во время эксперимента *Fusarium oxysporum* развивался постоянно – колония всё больше разрасталась, при этом на средах, содержащих экссудаты растений в суммарной концентрации 2000 мг/л, рост приостанавливался на 7-8 сутки.. Совместное

культивирование фитопатогена с растением на 10 сутки привело к поражению корневой системы (рисунок 5), было отмечено побурение главного и боковых корней, из чего можно сделать вывод о том, что инфицирование растения произошло успешно.

В последствии начиная с 12 суток стал наблюдаться хлороз и увядание листьев, типичные симптомы фузариозного увядания. Рост и развитие растения прекращается на 22 сутки, можно предположить, что поражённое растение, погибло, при этом наблюдается появление мицелия и спороношения *F.oxysporum* на стебле и листьях растения (рисунок 6).

В результате эксперимента можно сделать вывод о том, что *F.oxysporum* F2106 способен развиваться на агаризованной среде в присутствии живого растения, а также поражать его. Данный метод позволяет добиться постоянного секретирования экссудатов в среду, вследствие чего *F.oxysporum* развивается в полной мере и проявляет свои паразитические способности. В то же время и само растение способно в этих условиях реагировать на заражение. Методика представляется перспективной для исследования взаимодействия фитопатогенных микроорганизмов и их антогонистов, главным образом благодаря простоте исполнения и наглядности, при этом несомненным преимуществом является возможность контролирования фитопатологического процесса с учётом иммунного ответа растения.

Рисунок 4. Развитие *F. oxysporum* на агаризованной среде в присутствии живого растения.

Рисунок 5. Поражение корневой системы огурца *F.oxysporum*

Рисунок 6. Поражение стебля растения *F.oxysporum*.

Проявление антагонистической активности *Trichoderma viride* по отношению к *Fusarium oxysporum*

Для биоконтроля фитопатогенов в растениеводстве успешно используют микроскопические грибы рода *Trichoderma* (особенно часто вид *T.viride),* который относится к группе микромицетов, способных продуцировать вещества, токсичные для фитопатогенов, такие как антигрибные и антибактериальные пептиды.

Для изучения антагонистических свойств *Trichoderma viride* по отношению к *Fusarium oxysporum* микроорганизмы исследовали путем их культивирования на твердых питательных средах.

Рост и взаимодействие *Trichoderma viride* и *Fusarium oxysporum* на стандартных питательных средах

Для анализа роста и взаимодействия *Trichoderma viride* и *Fusarium oxysporum* микроорганизмы выращивали на стандартной питательной среде Чапека методом встречных колоний. По дну чашки Петри проводили черту, разделяющую чашку на две равные части. Заливали агаризованную среду по 20 мл на чашку после застывания среды. В центр одной половины на расстоянии 2 см от черты засевают гриб-патоген рода *Fusarium*, на таком же расстоянии в центр другой – гриб рода *Trichoderma*. В контроле патоген *Fusarium* и грибы рода *Trichoderma* культивируются изолированно друг от друга.

Скорость роста *F.oxysporum* при совместном его культивировании с *Trichoderma viride* сокращается до минимума на 8 сутки, т.е. микроскопический гриб *Trichoderma viride* проявляет ярко выраженную ингибирующую активность в отношении *Fusarium oxysporum*. Но, однако, важным фактором, обуславливающим рост и развитие микроорганизмов, является питание. Исходя из этого, был сделан вывод о необходимости изучить рост микроорганизмов на средах содержащих, экссудаты растений в виде единственного источника питания.

Рост *Trichoderma viride* и *Fusarium oxysporum* на средах, содержащих экссудаты растений

Растения выделяют в ризосферу большое количество высоко- и низкомолекулярных веществ органической природы, состоящих из органических кислот, сахаров, аминокислот, полисахаридов, пептидов и ферментов. Многие продукты секреции (особенно органические кислоты, сахара и аминокислоты) являются легкодоступными источниками питания для микроорганизмов. Однако растения секретируют не только метаболизируемые микроорганизмами соединения, но и токсичные (фитонциды), концентрация которых падает по мере удаления от корня. Организмы, приспособленные к фитонцидам, получили возможность обитать по соседству с корневой системой растения. Таким образом, вокруг корней возникает специфическая микрофлора. Исходя

из этого, было принято решение исследовать метаболизм экссудатов корневой системы двумя микроорганизмами, способными по-разному воздействовать на растение. Один из них *Fusarium oxysporum* - фитопатоген, вызывающий фузариозное увядание, другой, *Trichoderma viride*, проявляющий антагонистические свойства по отношению к фитопатогенам, в том числе и к *Fusarium oxysporum*. Поскольку в реальных условиях микроорганизмы развиваются поверхностно, возникла потребность в изучении их роста на агаризованных средах, содержащих экссудаты в качестве единственного источника питания.

Для анализа взаимодействия *Trichoderma viride* и *Fusarium oxysporum* была приготовлена агаризованная минеральная среда, содержащая экссудаты растений в концентрации 2000 мгО/л. Для этого использовали метод встречных колоний.

Скорость роста *F.oxysporum* при совместном его культивировании с *Trichoderma viride* на питательных средах, содержащих экссудаты растений, снижается. *T.viride* проявляет антагонистическое действие на *F.oxysporum,* не только при культивировании на питательной среде Чапека, но и на среде, содержащей экссудаты в концентрации 2000мгО/л.

Показатель ингибирования (Р) фитопатогена грибом рода Trichoderma и показатель ингибирования гриба рода Trichoderma фитопатогеном:

$P = ((K–A) \times 100)/K$,

где Р – показатель ингибирования, %,

К – рост гриба в контроле, мм,

А – рост гриба в опыте, мм.

Таблица 2. Радиус колонии (мм) исследуемых грибов.

Вид, штамм гриба	Время измерения, сутки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T. viride (контроль)	5	9	16	23	30	36	45	47	47	47
F. oxysporum (контроль)	6	10	14	22	28	32	37	42	45	47
T. viride	6	9	15	21	26	32	38	45	47	47
F. oxysporum	5	7	12	16	20	22	13	4	-	-

Таблица 4. Показатель ингибирования (%) фитопатогена грибом

рода *Trichoderma*

Вид, штамм гриба	Время расчёта, сутки	
	5	10
F. oxysporum	29	100

Таблица 5. Показатель ингибирования (%) гриба рода *Trichoderma* фитопатогеном.

Вид, штамм гриба	Время расчёта, сутки	
	5	10
T. viride	13	0

Таблица 6. Антагонистическая активность грибов рода Trichoderma.

Штамм гриба рода Trichoderma	Внешний вид колонии патогена	Степень нарастания колонии гриба рода Trichoderma, балл
T. viride	A++	4

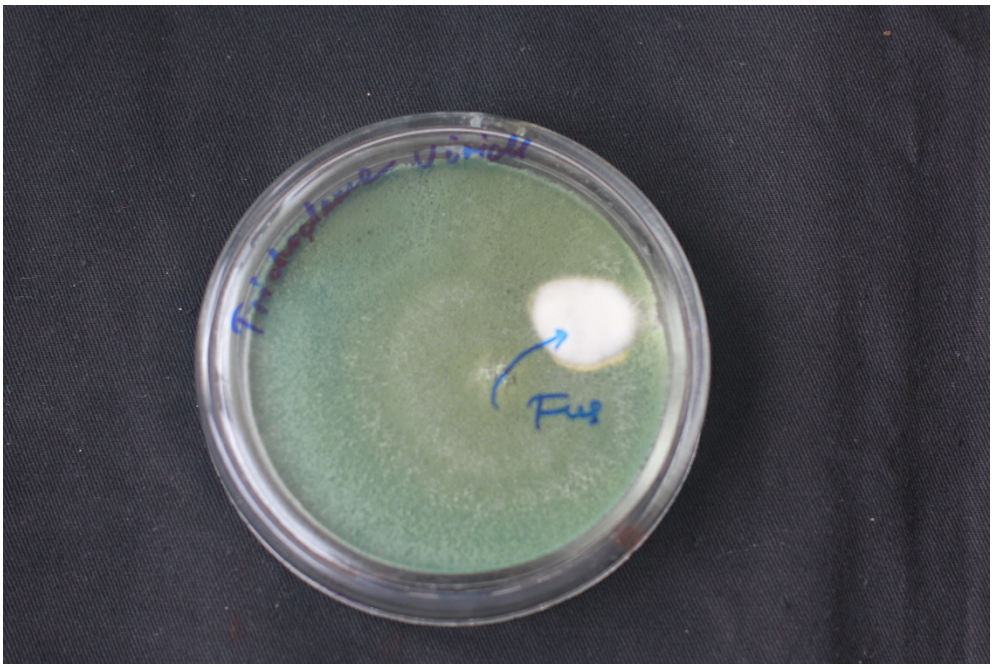


Рисунок 7. Рост исследуемых грибов на агаризованной среде Чапека

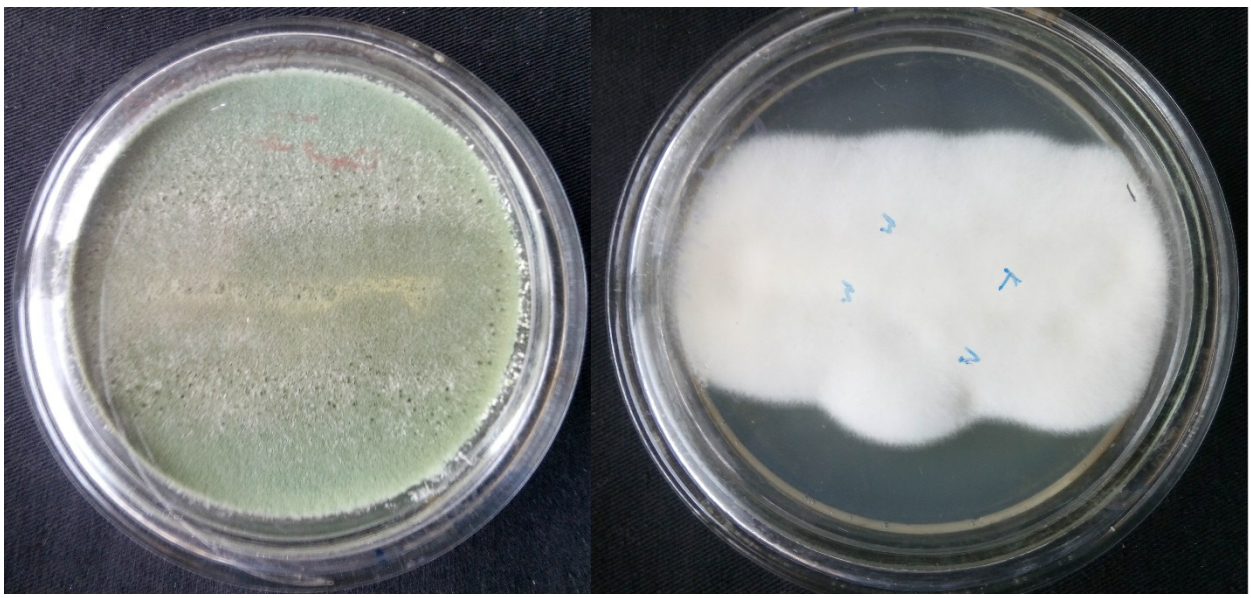


Рис.8.Рост *T.viride*(слева) и *F.oxysporum* (справа) на агаризованной среде Чапека (7 сутки)

Выводы

- Огурцы растут и развиваются при выращивании их на агаризованной среде.

- Данный метод позволяет добиться постоянного секретирования экссудатов в среду, *F.oxysporum* развивается в полной мере и проявляет свои паразитические способности.

- *Trichoderma* проявляет антагонистическое действие на *Fusarium,* не только при культивировании на питательной среде Чапека, но и на среде, содержащей экссудаты.

Список литературы

1. Кордюм Е. Л., Мартын Г. И., Овчаренко Ю. В. Рост и дифференцировка клеток колумеллы корневого чехлика и собственно корня в стационарных условиях и при клиностатировании. 2008 – 125с.
2. Scott F. M., Lewis M. Pits, intercellular spaces, and internal" suberization" in the apical meristems of Ricinus communis and other plants //Botanical Gazette. – 1953. – С. 253-264.
3. Hurek T. et al. Root colonization and systemic spreading of Azoarcus sp. strain BH72 in grasses //Journal of bacteriology. – 1994. – Т. 176. – №. 7. – С. 1913-1923.
4. Azcón-Aguilar C., Barea J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens–an overview of the mechanisms involved //Mycorrhiza. – 1997. – Т. 6. – №. 6. – С. 457-464.
5. Lloyd C. Toward a dynamic helical model for the influence of microtubules on wall patterns in plants //Int Rev Cytol. – 1984. – Т. 86. – С. l.
6. Павловская Н. Е., Яковлева И. В., Гнеушева И. А. Биологическая активность грибов рода Trichoderma и их промышленное применение //Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2010. – Т. 24. – №. 3.
7. Ахатов А. К., Ахатов Е. А. Болезни и вредители овощных культур и картофеля //М.: КМК, 2013 – 473с.
8. Билай В. Й. Ядовитые грибы на зерне хлебных злаков //К.: Изд-во АН УССР. –

1953.

9. Попкова К. В. Общая фитопатология //М.: Дрофа. 2005 – 445с.

10. Усенко А.С. Конспект лекций по дисциплине «Защита растений» // Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, кафедра микологии и фитоиммунологии. – 2012. С. 25-75

11. Коломбет Л. В. Грибы рода Trichoderma–продуценты биопрепаратов для растениеводства //Успехи медицинской микологии. М. – 2007. – Т. 1. – С. 323-371.

12. Кравченко Л. В. и др. Видовые особенности состава корневых выделений растений и его изменение в ризосфере под влиянием почвенной микрофлоры //Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №. 3. – С. 71-75.

13. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии //М.: Колос. – 1983. – Т. 296. – С. 4.

Ермаков Е. И., Степанова О. А. Изучение микроорганизмов ризосферы растений в ризотроне //Микробиология. – 1992. – Т. 1. – №. 5. – С. 916-923.