

Влияние грибов рода *Trichoderma* на ростовые процессы растений пшеницы

Голованова Т.И. (glvny@lan.krasu.ru), Долинская Е.В.,
Костицына Ю.Н.

Сибирский федеральный университет, Красноярск

Изучали влияние спор грибов рода *Trichoderma* на рост и развитие растений пшеницы. Отмечено, что данные грибы оказывают положительное влияние на морфологические параметры исследуемых растений. Грибы-антагонисты фитопатогенов увеличивали содержание хлорофилла в растениях. Обработанные грибом *Trichoderma* растения быстрее накапливают белки и углеводы. Выявлено влияние *Trichoderma* на параметры термоиндуцированных изменений флуоресценции хлорофилла у растений пшеницы. Фотосинтетический аппарат растений, обработанных спорами триходермы, более устойчив к нагреванию.

Одним из важных направлений современных исследований является повышение продуктивности растений. Этот показатель зависит от видовой принадлежности и от условий выращивания растений. Большое влияние на рост и развитие растений оказывают почвенные микроорганизмы. Следует отметить, что среди них встречаются как фитопатогены, оказывающие отрицательное воздействие, так и микроорганизмы – антагонисты, оказывающие положительное влияние на растительный организм [1].

Положительное влияние ассоциативных микроорганизмов на растения включает в себя как опосредованную стимуляцию роста растений за счет вытеснения и подавления развития почвенных фитопатогенов путем продуцирования соединений ингибирующих патогенную микрофлору, так и непосредственную - за счет синтеза микроорганизмами различных экзометаболитов, которые непосредственно проникают в растения и оказывают влияние на биохимические процессы [2, 3].

Механизмы антагонистических взаимодействий почвенных микроорганизмов и фитопатогенов различны, но наиболее хорошо изучены и важны с точки зрения практического использования это продукция сидерофоров и синтез антибиотиков. Антагонистический характер взаимоотношений с растениями наблюдается у микроорганизмов бактериального и грибного происхождения (*Azotobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Trichoderma* и другие) [4].

В настоящее время в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами широко используются грибы рода *Trichoderma* и биопрепараты, созданные на их основе [5, 3].

Trichoderma является продуцентом комплекса антибиотических веществ, обладающих высокой физиологической активностью и подавляющих рост целого ряда фитопатогенных грибов и бактерий, что и позволяет им достаточно быстро вытеснять из грунтов или субстратов патогенную микрофлору [6].

Продукты их жизнедеятельности способны усиливать обмен веществ, увеличивать всхожесть семян, ускорять развитие, повышать накопление запасных веществ и влиять на характер биохимических процессов, что объясняет успешное применение спор микроорганизмов-антагонистов и биопрепаратов, изготовленных на их основе в защите растений от болезней, в сохранении и повышении урожая, получении экологически чистой продукции высокого качества, отсутствии вредного влияния на животных и человека [7, 8, 9, 10].

Методика

В качестве объектов исследования использовали проростки *Triticum* сорта Тулунская-12 -среднеранний сорт, вегетационный период 75-92 дня, средний урожай на сортоучастках 34,4 -43,5 ц/га; и селекционной линии КС-15 - среднеранний, созревает одновременно с Тулунской-12, урожайность на 30 % ниже, чем у Тулунской-12.

Растения выращивали на керамзите в условиях светокультуры, освещенность составляла 13,5 Клк, температура - $23 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность - $75 \pm 3\%$.

Семена обрабатывали спорами гриба *Trichoderma asperellum* M 99/5 , титр 10^8 . Контролем служил вариант, где семена не были обработаны спорами исследуемого гриба.

Определяли энергию прорастания и всхожесть [2, 11]. Содержание зеленых пигментов определяли спектрофотометрическим методом по молярным коэффициентам экстинкции [12].

О влиянии триходермы на фотосинтетический аппарат судили по ТИНУФ (*Термоиндуцированные изменения нулевого уровня флуоресценции хлорофилла*) хлорофилла. Измерения проводили на индуктофлуориметре. Исследуемый объект помещали в кювету и заливали отстоянной водопроводной водой. Нагрев образцов проводили со скоростью 6 град/мин, в диапазоне 30-70°C. Все данные нормировали по величине F_0 (нулевой уровень флуоресценции) при 30°C. Флуоресценцию измеряли при 430 нм. Чтобы уменьшить влияние возрастной гетерогенности тканей на проводимые измерения, использовали высечки из средней части листа [16, 17].

Рассчитывали переменную флуоресценцию – R1, термоустойчивость и соотношение максимумов кривой - R2.

$$R1 = (M1 - \Phi_{Л30}) / M1;$$

$R2 = M1/M2$, где $M1$ - значение низкотемпературного максимума, $M2$ – значение флуоресценции при 65°C, $\Phi_{Л30}$ – значение флуоресценции при 30°C.

Термоустойчивость определяли путем построения биссектрисы из места пересечения касательных к термограмме, приложенных в участках минимального и максимального роста флуоресценции [16, 17].

Количество углеводов определяли в этанольных экстрактах методом Дюбуа [13]. Определение содержания белка проводили биуретовым методом [14].

Для определений образцы растительного материала брали через 10 суток.

Данные были обработаны статистически [15].

Результаты

Споры гриба *Trichoderma* увеличивали энергию прорастания семян на 16 % , а всхожесть на 8,8 % у селекционной линии КС-15, у сорта Тулунская-12 эти показатели составили 21 % и 3,6 %, соответственно, по сравнению с контрольным вариантом (рис. 1).

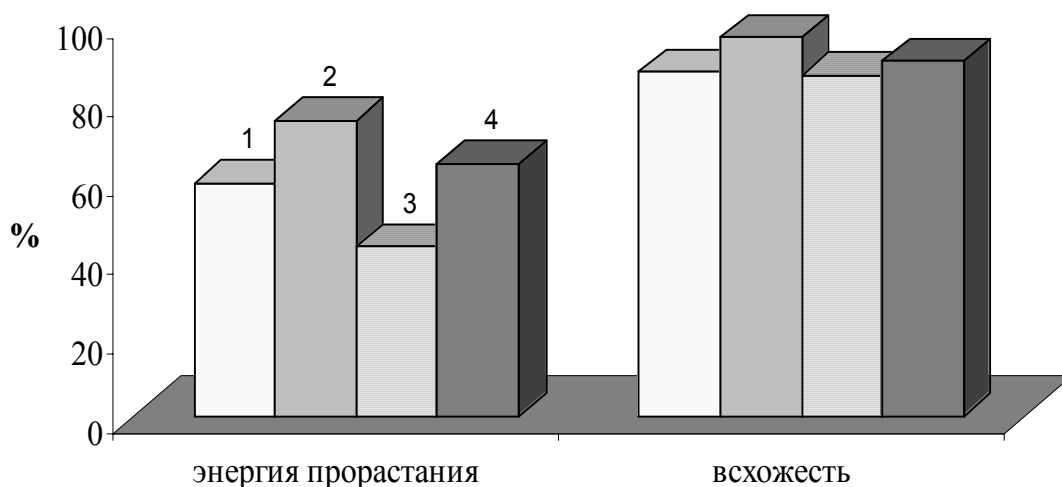


Рис. 1. Влияние спор гриба *Trichoderma* на энергии прорастания и всхожесть растений пшеницы

1 – селекционная линия КС-15, необработанная спорами гриба *Trichoderma*;

2 – селекционная линия КС-15, обработанная спорами гриба *Trichoderma* ;

3 – сорт Тулунская-12, необработанный спорами гриба *Trichoderma*;

4 – сорт Тулунская-12, обработанный спорами гриба *Trichoderma*.

Микробы-антагонисты фитопатогенов оказывали положительное влияние на морфологические параметры исследуемых растений, таких как количество листьев, длину

надземной части и корневой системы, сырую и сухую биомассу (табл. 1), наиболее выраженное действие проявлялось на таких показателях как сырая биомасса и длина надземной части.

Так, на 20 сутки сырая биомасса в опытном варианте у сорта Тулунская-12 превышала контроль на 14,5 %, а у селекционной линии КС-15 на 14,1 %. За десять дней в период с 10 по 20 сутки у сорта Тулунская-12 увеличение длины надземной части составило 4,6 см в контрольном варианте, тогда как у опытных растений этот показатель был равен 13,1 см. У КС-15 эти параметры были выше и составили 9,0 и 18,5 см, соответственно.

Таблица 1.

Влияние *Trichoderma* на морфологические параметры растений пшеницы.

Сутки	Сорта	Сырая биомасса, г	Сухая биомасса, г	Содержание воды, %	Длина надземной части, см	Длина корневой системы, см
10	контроль					
	Тулунская-12	0,28 ± 0,04	0,05 ± 0,00	82,14 %	29,52 ± 1,19	8,02 ± 0,45
	КС-15	0,28 ± 0,02	0,04 ± 0,00	85,7 %	27,88 ± 0,84	8,17 ± 0,48
	опыт					
	Тулунская-12	0,30 ± 0,02	0,05 ± 0,00	83,3 %	30,20 ± 1,43	8,52 ± 1,53
	КС-15	0,33 ± 0,03	0,06 ± 0,01	81,8 %	30,67 ± 0,86	8,22 ± 1,00
20	контроль					
	Тулунская-12	0,76 ± 0,03	0,12 ± 0,00	84,2 %	34,12 ± 1,14	7,72 ± 0,64
	КС-15	0,78 ± 0,07	0,15 ± 0,01	80,8 %	36,87 ± 1,11	8,28 ± 0,79
	опыт					
	Тулунская-12	0,87 ± 0,06	0,14 ± 0,01	83,9 %	43,27 ± 1,36	9,50 ± 0,52
	КС-15	0,89 ± 0,04	0,17 ± 0,00	80,9 %	49,18 ± 1,14	10,63 ± 0,58
30	контроль					
	Тулунская-12	1,63 ± 0,151	0,20 ± 0,053	87,7 %	52,4 ± 1,236	10,86 ± 0,616
	КС-15	1,68 ± 0,183	0,20 ± 0,016	88,1 %	52,55 ± 1,964	10,03 ± 1,195
	опыт					
	Тулунская-12	1,83 ± 0,632	0,21 ± 0,516	88,5 %	51,12 ± 2,314	13,6 ± 1,688
	КС-15	2,01 ± 0,237	0,23 ± 0,013	88,5 %	51,83 ± 1,558	10,23 ± 0,910

Представленные на рис. 2 данные свидетельствуют о том, что обработка семян спорами гриба-антагониста *Trichoderma* способствовала повышению содержания углеводов и белков у исследуемых растений. Так на 10 сутки содержание углеводов увеличивалось у сорта Тулунская-12 на 16,7 % и на 14,3 % у КС-15. В тоже время содержание углеводов в опытных вариантах у КС-15 превышало Тулунскую-12 на 14,3 %. В период с 10 по 20 сутки содержание сахаров в опытных вариантах у обоих сортов практически не изменялось, тогда как в период с 20 по 30 сутки содержание сахаров у КС-15 превосходило контроль на 35,4 % , а у Тулунской-12 на 61,2 %.

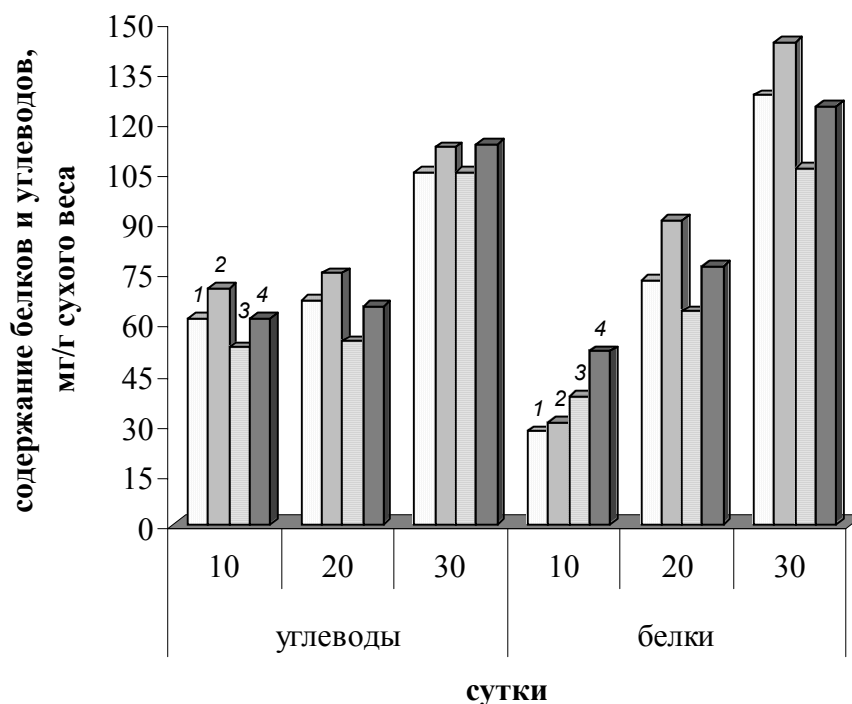


Рис. 2. Влияние спор гриба *Trichoderma* на содержание белков и углеводов в растениях пшеницы

- 1 – селекционная линия КС-15, необработанная спорами гриба *Trichoderma*;
- 2 – селекционная линия КС-15, обработанная спорами гриба *Trichoderma* ;
- 3 – сорт Тулунская-12, необработанный спорами гриба *Trichoderma*;
- 4 – сорт Тулунская-12, обработанный спорами гриба *Trichoderma*

Содержание белков на 10 сутки в опытных вариантах было больше на 9,1 % у КС-15 и на 34,6 % у Тулунской-12, при этом опытные варианты Тулунской-12 превышали КС-15 70,23 %. Наибольшие изменения в содержании белков в растении происходили в период с 10 по 20 сутки. На 20 сутки оно увеличивалось у КС-15 в 2,8 раза, у Тулунской-12 на 38,7 %. В период с 20 по 30 сутки эти показатели составили 15 % у КС-15 и 17,6 % у Тулунской-12.

Отмечено, что у опытных растений содержание общего хлорофилла больше, однако отношение хл а к хл b в опытных вариантах уменьшалось (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние спор гриба *Trichoderma* на содержание зеленых пигментов в растениях пшеницы.

Сутки	Сорта	Содержание хлорофилла а, %	Содержание хлорофилла b, %	Содержание общего хлорофилла, %	Отношение хлорофилла а к хлорофиллу b, %
15	контроль				
	Тулунская-12	0,032±0,002	0,014±0,001	0,05	2,29
	КС-15	0,029±0,001	0,011±0,002	0,04	2,64
	опыт				
	Тулунская-12	0,052±0,003	0,025±0,002	0,08	2,08
	КС-15	0,041±0,003	0,019±0,002	0,06	2,16
30	контроль				
	Тулунская-12	0,068±0,001	0,044±0,001	0,11	1,55
	КС-15	0,049±0,003	0,031±0,001	0,08	1,58
	опыт				
	Тулунская-12	0,078±0,003	0,065±0,003	0,14	1,15
	КС-15	0,071±0,001	0,054±0,02	0,13	1,31

Так на 15 сутки общее содержание хлорофилла в опытных вариантах превышало контроль в 1,5 раза у КС-15 и в 1,6 раз у Тулунской-12. В период с 15 по 30 сутки содержание общего хлорофилла увеличилось в 2,2 раза у КС-15 и в 1,75 раз у Тулунская-12.

Результаты термоиндуцированной флуоресценции хлорофилла (табл. 3) показали, что растения, обработанные спорами гриба *Trichoderma*, обладают более высокой вариабельной флуоресценцией, в них преобладает гранальная организация хлоропластов и они более термоустойчивы.

Таблица 3.

Термоиндуцированные изменения нулевого уровня флуоресценции хлорофилла у пшеницы.

Вариант опыта	Сроки вегетации, сутки	R1	R2	Термоустойчивость, °С
КС-15 контроль	15	0,615±0,008	3,270±0,002	40,25±0,35
КС-15 опыт		0,705±0,001	3,940±0,003	43,50±0,70
Тулунская-12 контроль		0,540±0,001	2,270±0,001	39,50±0,71
Тулунская-12 опыт		0,565±0,002	2,450±0,006	41,50±0,71
КС-15 контроль	30	0,520±0,003	3,450±0,003	43,25±0,72
КС-15 опыт		0,610±0,002	3,620±0,001	46,30±0,50
Тулунская-12 контроль		0,500±0,001	2,010±0,016	42,80±0,60
Тулунская-12 опыт		0,540±0,002	2,220±0,010	44,10±0,70

Обсуждение

Стимулирующий эффект обнаруживался уже на самых ранних стадиях развития растений, начиная с прорастания семян, это объясняет увеличение энергии прорастания и всхожесть семян. Споры гриба проникают в семена уже во время его прорастания и активные вещества, вырабатываемые ими, вероятно, и оказывают такое влияние на ростовые процессы растений, возможно, происходит активация и биохимических процессов в прорастающем семени [18]. Об этом свидетельствуют и наши исследования по накоплению белков и углеводов. Они показали, что содержание этих веществ больше у опытных растений, что вероятно, связано с тем, что грибы рода *Trichoderma* взаимодействуют с тканями зависимого растения, выделяя экзометаболиты, которые непосредственно включаются в метаболизм растительного организма [20]; внесение грибов этого рода в ризосферу значительно активизируют многие ферменты растений – инвертазу, каталазу, амилазу, уреазу, увеличивает интенсивность окислительно-восстановительных процессов, фотосинтез и поглощение питательных элементов корневой системой [19].

Микробы-антагонисты оказывали положительное влияние на продуктивность исследуемых растений: под их действием увеличивалась общая и продуктивная кустистость, конечная урожайность, масса зерна [20].

Результаты по влиянию спор гриба – антагониста *Trichoderma* на физиолого-морфологические параметры, показывают, что опытные растения растут и набирают биомассу быстрее, чем растения в контрольном варианте. *Trichoderma* оказывает влияние не только на ростовые процессы растений, но и на их развитие. Об этом свидетельствует тот факт, что у опытных растений процесс созревания начинается раньше [20].

Отмечено положительное действие *Trichoderma* на содержание хлорофиллов в растениях. Показано, что в опытных растениях соотношения хл а к хл b меньше контрольных. Это может свидетельствовать о том, что у данных растений эффективность использования световой энергии ФС II выше. Результаты термоиндуцированных изменений нулевого уровня флуоресценции хлорофилла растений показали высокие значения вариабельной флуоресценции в обработанных спорами гриба рода *Trichoderma* растениях, что косвенно подтверждает эффективность захвата световой энергии возбуждения открытыми реакционными центрами ФС II.

Деятельность грибов рода *Trichoderma* четко связано с внешними факторами, такими как температура, рН, влажность. Сравнивая результаты с данными, полученными в условиях естественного освещения, необходимо отметить, что стимулирующий эффект триходермы в условиях светокультуры выше. Их отклонение от нормы может спровоцировать переход микроорганизма к паразитизму.

Таким образом, гриб *Trichoderma* положительно действует на всхожесть и энергию прорастания семян различных сортов пшеницы. Предпосевная обработка семян спорами данного гриба положительно влияет на физиолого-морфологические параметры пшеницы, независимо от сортовой принадлежности, что согласуется с результатами исследований, полученных нами ранее [20, 21]. Гриб – антагонист оказывает стимулирующее действие на накопление хлорофилла растением, а также увеличивается содержание углеводов и белков. В обработанных спорами гриба растениях отмечен более интенсивный захват световой энергии фотосистемой II, а так же наблюдается изменение соотношения гранальных и агранальных структур хлоропластов в сторону увеличения доли относительного содержания хлорофилла в гранальных участках. Отмечено, что фотосинтетический аппарат растений пшеницы, обработанных *Trichoderma*, более устойчив к нагреванию.

Литература

1. Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Громовых В.С., Махова Е.Г. Эффективность действия *Trichoderma asperellum* (штамм МГ – 97) на развитие фузариоза на сеянцах *Larix sibirica* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. Вып. 4. С. 70–75.
2. Ермолаева Н.И., Иванова Н.И., Скворцова Н.П. и др. Применение биометода в открытом и защищенном грунте: Использование ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* для предпосевной обработки огурцов, капусты и картофеля // Защита растений. 1992. № 8. С. 24-25.
3. Nigam P. Process selection for protein enrichment: fermentation of the sugar industry by products molasses and sugar beet pulp // Process Biochemistry 29. 337342. 1994. P. 37-41.
4. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова; Ин-т биохимии и физиологии растений и микроорганизмов. – М.: Наука, 2005.– 262 с.
5. Хакимова Н.Т., Маннанов Р.Н. Микрофлора больных растений пшеницы. Влияние биопрепаратов на продуктивность картофеля // Защита и карантин растений. 2001. № 12. С. 35.
6. Александрова А.В., Великанов Л.Л. Влияние гриба *Trichoderma harzianum* на почвенные микромицеты // Микология и фитопатология. 2000. Т. 34. Вып. 3. С. 68-77.
7. Аспите А.Ф., Швинка Ю.Э., Стрикаускас С.В. Использование триходермина для защиты растений от фитопатогенных микромицетов // Вестник с.-х. науки. 1981. №9. С. 114-118.
8. Винокурова, Т. Г. Триходермин против болезней в защищенном грунте // Защита растений. 1991. С. 198-201.
9. Гринько Н. Н. Применение триходермина в овощеводстве защищенного грунта. Минск: Бел. НИИТИ, 1992. – С. 60.
10. Коваленко М.Н., Коваленко Т.Д. Триходермин: опыт исследования и применения // Защита растений. 1992. №9. С. 20-22.
11. Семена деревьев и кустарников. Правила отбора образцов и метода определения посевных качеств семян. М.: Стандарты СССР. 1988. С. 3-27.
12. Голованова Т.И., Бугакова А.Н. Физиология растений: малый практикум // Красноярск, 1983. 30 с.

13. Dibois M., Gilles K.A., Hamilton Y.K., Reber P.A., Smith F. Colometric method for determination of sugars and related substances // *Analit. Chem.* 1956. Vol. 28. P. 350-356.
14. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1976.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 351 с.
16. Гольд В.М., Гаевский Н.А., Григорьев Ю.С., Попельницкий В.П. Теоретические основы и методы изучения флуоресценции хлорофилла // Красноярск: Изд-во КГУ. 1984. С. 50-53.
17. Нестеренко Т.В., Шихов В.Н., Тихомиров А.А. Термоиндукция флуоресценции хлорофилла и возрастное состояние листьев высших растений // *Физиология растений.*-2001. Т. 48. С. 282-290.
18. Сейкетов Г.Ш. Грибы рода *Trichoderma* и их использование в практике. Алма-Ата: Наука, 1982. 248 с.
19. Коломбет Л.В. Грибы рода *Trichoderma* как продуценты биофунгицидов: прошлое, настоящее, будущее // Тез. докл. первого съезда микологов «Современная микология в России». Москва, 2002. С. 229.
20. Голованова Т.И., Аксентьева А.А. Физиолого-морфологические параметры растений под действием спор гриба *Trichoderma* // *Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки*, 2003'5. С.134-139.
21. Голованова Т.И., Громовых Т.И., Гукосян В. М. Триходерма - как регулятор ростовых процессов // *Деп. ВИНТИ. № 502. Вып. 96*, 1996. С. 14.