

DOI: 10.55505/sa.2023.2.06
UDC: 632.4:632.911.2



ГРИБЫ *TRICHODERMA* ДЛЯ ЗАЩИТЫ ТЕПЛИЧНЫХ КУЛЬТУР ОТ ООМИЦЕТА *PYTHIUM* SP.

Татьяна ЩЕРБАКОВА^{1*}, ORCID: 0000-0002-2632-325X,
Леонид ВОЛОЩУК¹, ORCID: 0000-0002-7475-4310

¹Государственный Университет Молдовы, Институт Генетики,
Физиологии и Защиты Растений, Республика Молдова

*Corresponding author: Татьяна ЩЕРБАКОВА - e-mail: tscerb@gmail.com

Abstract. Certain species of oomycetes, such as *Pythium* spp., exhibit high aggressiveness, posing a significant threat to young plant tissues of greenhouse crops like cucumbers, peppers, and tomatoes, leading to substantial yield losses. This research aims to identify highly virulent fungi of the genus *Trichoderma* Pers. ex Fr. for the protection of greenhouse crops against the pathogen *Pythium* sp. Pathogenicity testing of *Pythium* sp. was conducted using cucumber seedling infection assays. The antagonistic activity of nine *Trichoderma* cultures against *Pythium* sp. was assessed through dual culture experimntal method. After 10 days, four fungi — *Trichoderma lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, *T. asperellum*, *T. koningii*, and *Trichoderma* sp. 1K — completely colonized the pathogen, achieving a 100% inhibition rate. The remaining *Trichoderma* strains inhibited the pathogen with rates ranging from 83.5% to 94.1%. All *Trichoderma* strains tested in this study demonstrate potential for protecting greenhouse crops against the oomycete *Pythium* sp.

Keywords: Antagonistic activity; Double-culture; Pathogen; Strain; *Pythium*; *Trichoderma*.

Реферат. Некоторые виды оомицетов *Pythium* spp. весьма агрессивны, поражают молодые растительные ткани тепличных культур огурцов, перца и томатов, что приводит к значительным потерям урожая. Цель исследований – выявить высоковирулентный гриб *Trichoderma* Pers. ex Fr. для защиты тепличных культур от патогена *Pythium* sp. Патогенность *Pythium* sp. определяли методом инфицирования проростков огурца. Антагонистическую активность 9 культур *Trichoderma* по отношению к *Pythium* sp. изучали методом двойных культур. На 10-е сутки 4 гриба: *Trichoderma lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, *T. asperellum*, *T. koningii* и *Trichoderma* sp. 1K полностью колонизировали патоген с показателем ингибирования 100%. Остальные грибы *Trichoderma* ингибировали патоген на 83,5%-94,1%. Все штаммы *Trichoderma* из проведенного исследования могут быть использованы в качестве продуцента биопрепарата для защиты тепличных культур от оомицета *Pythium* sp.

Ключевые слова: Антагонистическая активность; Двойная культура; Патоген; Штамм; *Pythium*; *Trichoderma*.

ВВЕДЕНИЕ

При выращивании растений в современных теплицах, и особенно с использованием гидропонных технологий, большое значение приобретает здоровая корневая система. Повышенная влажность, колебания температурных показателей в

корневой зоне ниже-выше нормы, низкий уровень кислорода в питательном субстрате приводят к развитию корневых гнилей, возбудителями которых могут быть виды *Pythium* spp.

Род *Pythium* - это почвенные оомицеты от условно-патогенных до высоковирулентных возбудителей гнилей многих видов растений. Они представляют собой грибоподобные организмы, относящиеся к классу *Oomycetes*, порядку *Peronosporales*, сем. *Pythiaceae* J. Schrot. 1893, (Пыстина, 1998), распространяются зооспорами, которые образуются в спорангиях и их выход возможен только при наличии капель воды. Зооспоры, достигшие поверхности корня растения, превращаются в цисту, прорастают и образуют гифы, которые выделяют гидролитические ферменты, разлагающие корневую ткань. На разлагающихся корнях растений *Pythium* образует ооспоры и хламидоспоры, которые могут выдерживать длительные неблагоприятные условия, что способствует накоплению и распространению патогена в почве, воде и рециркулирующем питательном растворе (Чикин, 2001; Переведенцева, 2009).

Представители семейства *Pythiaceae* – факультативные паразиты, некоторые виды весьма агрессивны, поражают более чем 150 видов высших растений. Большинство видов *Pythium* возбудители заболеваний всходов, поражают молодые растительные ткани гороха, свеклы, салата, капусты, редиса, табака, тепличных культур огурцов, перца и томатов. Это вызывает довсходовое и послевсходовое увядание, снижение силы роста выживших сеянцев или их гибель. Кроме того, они поражают корни взрослых растений, вызывая корневую гниль, «корнеед», тяжелые некрозы и задержку роста. Нанесенный ущерб приводит к значительным потерям урожая (Сокирко и др., 2014). Сортов, устойчивых к *Pythium*, не существует.

Цель исследований – выявить высоковирулентный гриб *Trichoderma* Pers. ex Fr. для защиты тепличных культур от патогенного оомицета *Pythium* sp.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 2022 году в лабораторных условиях в Институте генетики, физиологии и защиты растений в составе Государственного университета Молдовы. Объектами исследований являлись штаммы грибов *Trichoderma*: *T. virens* CNMN-FD-13, *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14 и *T. harzianum* CNMN-FD-16 (Th-7F) – продуценты биопрепаратов *Gliocladină-SC*, *Trichodermină-SC*, *Trichodermină-BL* и *Trichodermină Th-7F-BL*, внесенные в Государственный регистр средств фитосанитарного назначения Молдовы (CSOP, 2023), а также перспективные изоляты из рабочей коллекции. Патоген *Pythium* sp. выделен из минеральной ваты, используемой в гидропонной теплице, оомицет выделялся из всех проб, взятых в разных частях теплицы площадью 3 га, поддерживается в лабораторных условиях на ростках огурца.

Патогенность *Pythium* sp. определяли методом инфицирования проростков огурца сорта Конкурент: 4-х дневные проростки помещали во влажную камеру в чашки Петри с агаровым диском диаметром 10 мм, заросшим 5-ти дневной культурой оомицета. Инкубировали при температуре 24°C, наблюдали ежедневно (Бехтер и др., 1987).

Для выявления наиболее активных штаммов (изолятов) *Trichoderma* по отношению к *Pythium* sp., изучали их антагонистическую активность методом встречных культур на агаровой питательной среде, содержащей картофельный отвар, посев блоками, повторность трехкратная (Егоров, 2004). Культивировали при температуре 28°C, оптимальной для исследуемых грибов. Радиус колоний измеряли

ежедневно линейным методом (мм), на 6-е и 10-е сутки вычисляли показатель ингибирования грибов друг другом (%), оценивали в баллах степень нарастания антагониста на колонию *Pythium*: 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 (Поликсенова и др., 2004). Проводили микроскопирование грибов в зонах нарастания.

Для определения антифунгальной активности грибов *Trichoderma* по отношению к *Pythium sp.* использовали фугат (нативную культуральную жидкость), изучали методом диффузии в агар с использованием металлических цилиндриков (Егоров, 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Принцип использования живых микроорганизмов в защите растений строится на явлениях антагонизма – это возможность угнетения, вытеснения и подавления одних видов микроорганизмов другими. Антагонизм возникает в результате непосредственного взаимодействия между двумя микроорганизмами, занимающими одну и ту же экологическую нишу. Широко распространенными в природе антагонистами фитопатогенов являются грибы *Trichoderma*, они располагают рядом механизмов, дающих возможность подавлять многих возбудителей болезней культурных растений. К этим механизмам относят: микопаразитизм, антибиоз, конкуренцию за питательные вещества и за пространство (быстрое размножение антагониста и вытеснение патогена), устойчивость к стрессам, инактивацию ферментов фитопатогенов (Guzmán-Guzmán et al., 2023; Tyskiewicz et al., 2022).

Грибы *Trichoderma* являются быстрорастущими, в чистой культуре через 4-6 дней после посева блоком заселяется вся агаровая пластинка чашки Петри (Рудаков, 1981; Алимова, 2006).

При определении патогенности изолята *Pythium sp.* по отношению к проросткам огурца было отмечено, что уже на 3-и сутки патоген проявил высокую вирулентность, стебельки ростков стали водянистыми, при касании ткань разлагалась, на 4-е сутки наступила 100%-я гибель всех ростков. При микроскопировании в растительных клетках отмечено большое количество ооспор (Рисунок 1.)



Рисунок 1. а) - чистая культура *Pythium sp.*, контроль; б) – погибшие ростки, инфицированные *Pythium sp.*, 1- контроль, 2 - опыт; в) – оидии *Pythium sp.* в клетках проростка, $\times 400$

При изучении антагонистических взаимоотношений грибов *Trichoderma* и *Pythium sp.* была отмечена стремительно высокая скорость роста оомицета. Через 24 часа радиус колонии *Pythium sp.* в контроле составил 45 мм, через 50 часов была

заселена вся агаровая пластинка. Однако в двойных культурах грибы *Trichoderma* сдерживали рост оомицета, радиус колонии *Pythium* sp. через 48 часов роста составил от 41 мм в культуре с *T. koningii* до 68 мм в культуре с *T. virens* CNMN-FD-13 (от 20% до 51%). На третьи сутки и в последующие дни во всех вариантах колонии грибов *Trichoderma* увеличивались и начался процесс колонизации патогена (Рисунок 2, Таблица 1).

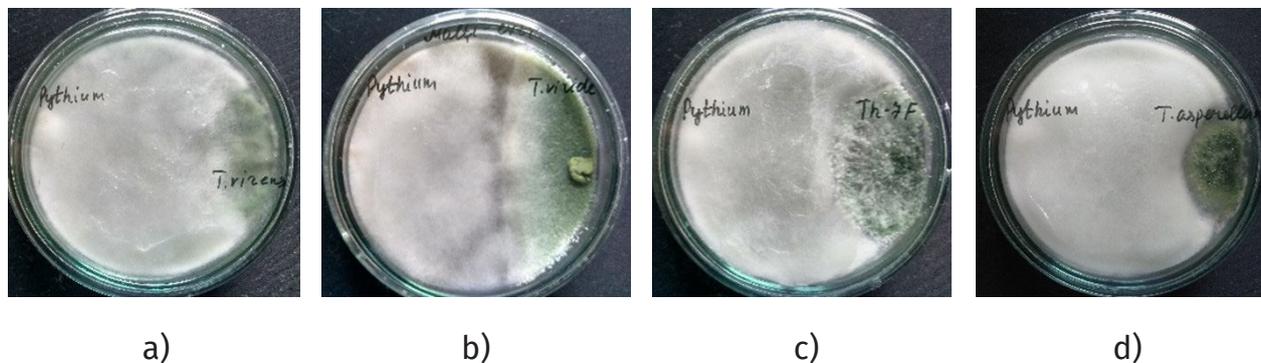
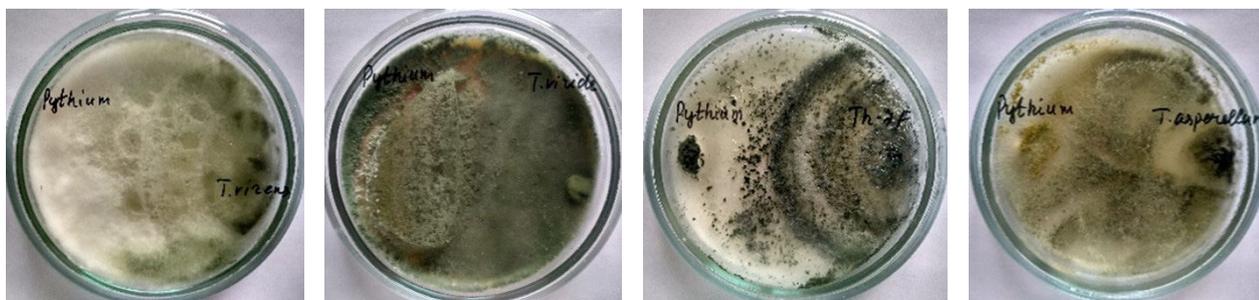


Рисунок 2. Двойная культура оомицета *Pythium* sp. и грибов *Trichoderma* на третьи сутки роста
 а)- *T. virens* CNMN-FD-13, б)- *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14,
 в)- *T. harzianum* CNMN-FD-16 (*Th-7F*), д)- *T. asperellum*

Таблица 1. Характеристика антагонистических взаимоотношений грибов *Trichoderma* и оомицета *Pythium* sp. в двойной культуре

№	Вариант Двойная культура Штамм (изолят)	Радиус колоний, мм Время измерения, сутки				% нгиби- рования на 6-е сутки	% нгиби- рования на 10-е сутки	Балл на- растания штамма на патоген
		2	3	6	10			
1	<i>Trichoderma virens</i> CNMN-FD-13 <i>Pythium</i> sp.	17±0,9 68±0,9	18±1,5 67±1,4	68±1,6 17±1,0	76±0,3 9±0,7	20,0 80,0	10,6 89,4	4
2	<i>T. lignorum</i> CNMN-FD-14 <i>Pythium</i> sp.	30±0,3 55±0,6	34±1,0 51±1,0	48±1,5 37±1,5	85±0 0	43,5 56,5	0 100	4
3	<i>T. harzianum</i> CNMN-FD-16 <i>Pythium</i> sp.	26±1,0 58±1,1	34±1,0 51±1,0	69±1,0 16±1,0	71±1,5 14±1,5	18,8 81,2	16,5 83,5	4
4	<i>T. asperellum</i> <i>Pythium</i> sp.	21±0,6 65±0,7	25±0,3 61±0,6	84±0 1±0	85±0 0	1,2 98,8	0 100	4
5	<i>T. koningii</i> <i>Pythium</i> sp.	44±0,3 41±0,5	45±0,3 40±0,6	67±1,7 18±0,9	85±0 0	21,2 78,8	0 100	4
6	<i>Trichoderma</i> sp. 2N <i>Pythium</i> sp.	24±0,6 61±0,7	25±0,3 60±0,3	66±0,6 19±0,6	75±0,6 10±0,5	22,4 77,6	11,8 88,2	4
7	<i>Trichoderma</i> sp. 14N <i>Pythium</i> sp.	24±1,0 61±1,0	26±1,0 59±1,2	68±0,6 17±1,5	80±0 5±0	20,0 80,0	5,9 94,1	4
8	<i>Trichoderma</i> sp. 13T <i>Pythium</i> sp.	20±0,6 68±0,3	25±0,3 66±1,5	57±1,5 25±1,7	74±1,5 11±1,7	32,9 70,6	12,9 87,1	4
9	<i>Trichoderma</i> sp. 1K <i>Pythium</i> sp.	20±0,6 65±0,7	25±0,3 60±0,3	82±0 3±0	85±0 0	3,5 96,5	0 1 00	4
10	<i>Pythium</i> sp. контроль	75±0	85±0	85±0	85±0	-	-	-

Высокую антагонистическую активность по отношению к *Pythium* sp. проявили штаммы *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, *T. asperellum*, *T. koningii* и изолят sp. 1K, к десятому дню роста они полностью колонизировали патоген с показателем ингибирования 100%. У штаммов *T. virens* CNMN-FD-13 и *T. harzianum* CNMN-FD-16 антагонизм к оомицету проявился несколько слабее, на 6-е сутки роста показатель ингибирования составил 80,0% и 81,2%, на 10-е сутки – 89,4% и 83,5%, соответственно, со степенью нарастания на патоген 4 балла. Изоляты *Trichoderma* sp. 13T, sp. 2N и sp. 14N на 10-е сутки ингибировали патоген на 87% - 94% (Таблица 1, Рисунок 3).



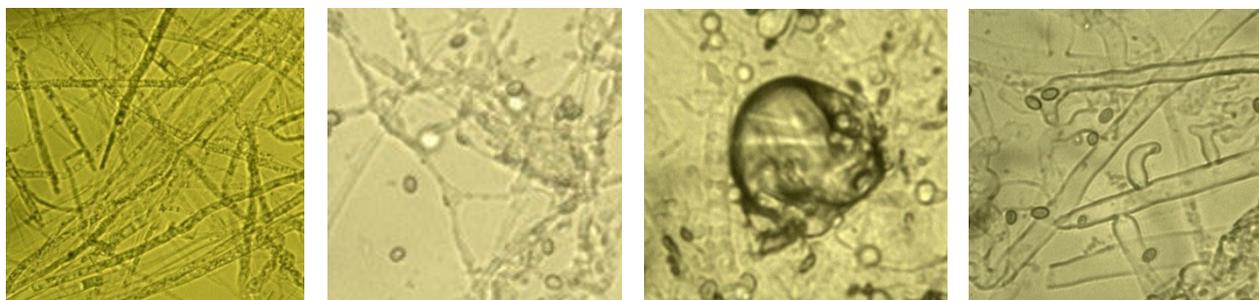
a) b) c) d)

Рисунок 3. Двойная культура оомицета *Pythium* sp. и грибов *Trichoderma* на десятые сутки роста

a)- *T. virens* CNMN-FD-13, b)- *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, c)- *T. harzianum* CNMN-FD-16 (*Th-7F*), d)- *T. asperellum*

По характеру роста грибы *Trichoderma* в двойной культуре проявляли фунгистатический алиментарный и территориальный антагонизм, при котором происходило нарастание колонии гриба *Trichoderma* на поверхность колонии фитопатогена, в результате его активный рост прекращался.

Микроскопирование двойных культур в зонах нарастания антагонистов на колонию *Pythium* sp. проводили на 10-е сутки. В результате было отмечено, что чаще всего грибы *Trichoderma* разрушали мицелий оомицета, это наблюдалось в культуре с *T. harzianum*, *T. virens*, *T. lignorum*, *Trichoderma* sp. 14N. Мощный ингибирующий эффект, деформация и лизис мицелия отмечены в культуре с *T. koningii*. В присутствии *T. asperellum* отмечена деформация и разрушение ооспор (в остальных культурах образования ооспор не замечено). В культуре с *T. lignorum* отмечено образование антеридиев, которые в чистой культуре *Pythium* sp. встречаются не часто (Рисунок 4).



a) b) c) d)

Рисунок 4. a) – чистая культура *Pythium* sp., контроль, ×400; b) – лизис, деформация мицелия *Pythium* sp. грибом *T. koningii*, ×400; c) – деформация ооспоры в присутствии *T. asperellum*, ×1000; d) – образование антеридиев в культуре с *T. lignorum*, ×1000

Фунгицидную активность фугата культуральной жидкости по отношению к патогену *Pythium* sp. определяли методом диффузии в агар с использованием металлических цилиндриков. По итогам эксперимента отмечено, что метаболиты, образующиеся в процессе культивирования грибов *Trichoderma* в жидкой культуре, не оказывают ингибирующего действия на оомицет. Вероятно, столь агрессивный патоген может подавлять, угнетать и вытеснять только живая культура антагониста.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований было установлено:

1. Оомицет *Pythium* sp., выделенный из тепличного субстрата, является агрессивным патогеном, при инфицировании проростков огурца их гибель отмечена на 4-е сутки.
2. Оомицет *Pythium* sp. обладает высокой скоростью роста на агаровых средах с картофельным отваром, однако в двойной культуре через 2-е суток грибы *Trichoderma* сдерживали рост патогена на 20-51%.
3. Высокую антагонистическую активность по отношению к *Pythium* sp. проявили штаммы *T. lignorum* (syn. *T. viride*) CNMN-FD-14, *T. asperellum*, *T. koningii* и изолят sp. 1К, к десятому дню роста они полностью колонизировали патоген с показателем ингибирования 100%.
4. Культуры *Trichoderma* проявили фунгистатический алиментарный и территориальный антагонизм, прямое паразитирование на патогене *Pythium* sp. и подавление развития мицелия.
5. Все грибы *Trichoderma* из проведенного исследования могут быть использованы в качестве продуцента биопрепарата для защиты тепличных культур от патогенного оомицета *Pythium* sp.

Благодарности

Исследования проведены в рамках проекта Государственной Программы 20.80009.7007.16 «Sinergismul dintre factorii naturali și mijloacele microbiologice, ecologic inofensive, de reglare a densității populațiilor de organisme dăunătoare pentru protecția culturilor agricole în agricultura convențională și ecologică», при финансовой поддержке Национального Агенства по Исследованиям и Развитию Республики Молдова (ancd.gov.md).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. АЛИМОВА, Ф.К. (2006). Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в сельском хозяйстве. В: Агро XXI, nr. 4-6, с. 18-21. ISSN 2073-2732.
2. БЁТТХЕР, И., ВЕТЦЕЛЬ, Т., ДРЕВС, Ф.В. и др. (1987). Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. Пер. с немецкого К.В. Попковой, И.А. Шмыгли. Москва: Агропромиздат, 224 с.
3. ЕГОРОВ, Н.С. (2004). Основы учения об антибиотиках. 6-е изд., перераб. и доп. Москва: Изд-во Моск. ун-та, Наука, 528 с. ISBN 5-02-033595-9.
4. ПЕРЕВЕДЕНЦЕВА, Л.Г. (2009). Микология: грибы и грибоподобные организмы: учебное пособие. Пермь, 199 с. ISBN 978-5-7944-1270-3.
5. ПОЛИКСЕНОВА, В.Д., ХРАМЦОВ, А.К., ПИСКУН, С.Г. (2004). Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов: методические указания к занятиям спецпрактикума. Минск: БГУ, 36 с.
6. ПЫСТИНА, К.А. (1998). Определитель грибов России. Класс Оомицеты. Род *Pythium* Pringsh. Изд-во: Наука, вып. 2, 118 с. ISBN 5-02-026072-X.

7. РУДАКОВ, О.Л. (1981). Микофильные грибы, их биология и практическое значение. Москва: Наука, 160 с.
8. СОКИРКО, В.П., ГОРЬКОВЕНКО, В.С., ЗАМИКО, М.И. (2014). Фитопатогенные грибы (морфология и систематика): учебное пособие. Краснодар: КубГАУ, 178 с.
9. ЧИКИН, Ю.А. (2001). Общая фитопатология (часть 1): учебное пособие. Томск, 170 с.
10. Centrul de Stat pentru Atestarea și Omologarea Produselor (CSOP) (2023). Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizantilor, permise pentru utilizare în RM. [online]. [accesat 25.03.23]. Disponibil: <http://www.pesticide.md/registrul-de-stat/>
11. GUZMÁN-GUZMÁN, P. et. al. (2023). Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases: A Review. In: Plants [online], vol. 12(3), pp.1-35. [accesat 25.03.23]. Available: <https://doi.org/10.3390/plants12030432>
12. TYSKIEWICZ, R. et. al. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. In: International Journal of Molecular Sciences [online], vol. 23 (4), pp. 1-28. [Дата обращения 25.03.23]. Доступ: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8875981/pdf/ijms-23-02329.pdf>

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Paper history

Received 31 May 2023 Accepted 23 July 2023

Copyright: © 2023 by the author(s). This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).