

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН  
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

УДК

*На правах рукописи*

**Матчанова Дурдона Шапуровна**

**Изучение влияния гриба рода *Trichoderma* на некоторые  
фитопатогены томата.**

**Специальность 5А320501- Биотехнологии (*производство пищевых,  
кормовых химических продуктов и биопрепаратов для сельского  
хозяйства*)**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание академической степени**

**магистра**

Научный руководитель:

к.б.н, доц. Р.М. Артикова

Научный консультант:

к.б.н. А.Г. Гузалова

## СОДЕРЖАНИЕ

	<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	2
<b>Глава I</b>	<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	5
1.1	Характеристика грибов рода <i>Trichoderma</i>	5
1.2	Механизм действия грибов рода <i>Trichoderma</i> на растения	7
1.3	Механизм действия на фитопатогенные грибы	12
1.4	Лигнолитическое действие грибов рода <i>Trichoderma</i>	15
1.5	Биопрепараты на основе грибов рода <i>Trichoderma</i>	17
1.6	Биологохимические особенности грибов рода триходерма	21
1.7	Роль грибов рода триходерма в природе	22
1.8	Биологические особенности томатов	25
<b>Глава II</b>	<b>ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	32
2.1.	Объект исследований	32
2.2	Схема опыта	32
2.3	Метод чистых культур и культивирование	32
2.4	Выделение фитопатогенных грибов	33
2.5	Выделение из корней	34
2.6	Выделение из клубней, луковиц, корнеплодов, плодов	34
2.7	Выделение из стеблей и листьев	34
2.8	Выделение из зерна хлебных злаков и семян	35
2.9	Методы исследования	39
<b>Глава III</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b>	45
3.1.	Изучение влияние местного штамма гриба <i>Trichoderma lignorum spp 3M</i> на прорастание семян	45
3.2.	Влияние штамма гриба <i>Trichoderma lignorum spp 3M</i> на поражаемость рассады черной ножкой	56
	Выводы	58
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	60
	ПРИЛОЖЕНИЕ	

## Введение

В условиях высокой специализации и концентрации сельскохозяйственного производства проведение защитных мероприятий - неотъемлемый фактор получения высоких и гарантированных урожаев сельскохозяйственных культур, сохранения их качества.

Высокая эффективность и универсальность химического метода защиты растений, быстрая окупаемость сделали его доминирующим в системе защитных мероприятий. Однако, широкое и повсеместное применение химических средств защиты растений приводит к появлению новых устойчивых форм вредных организмов, это в свою очередь, влечет за собой необходимость увеличения норм расхода препаратов и их ассортимента. Загрязняются почва, воздух, вода, возрастают остаточные количества химических препаратов и продуктов их распада в сельскохозяйственной продукции, наносится ущерб окружающей среде и здоровью человека.

Биологический метод борьбы основан на использовании естественных врагов вредителей, регулирующих численность последних в природе. При этом в очагах заражения вредителями создается искусственным путем высокая концентрация их врагов, что приводит к ликвидации этих очагов. В условиях загрязненной окружающей среды биологические методы борьбы с вредителями позволяют сократить или отказаться от применения химических средств - пестицидов и гербицидов.

В биометоды используются различные микроорганизмы, оказывающие положительное влияние на развитие растений, при этом угнетающие возбудителей фитозаболеваний. Огромный интерес ученых проявляется к почвенным грибам.

Большинство сортов сельскохозяйственных культур в среднем реализуют только 20-25% генетического потенциала продуктивности. При обеспечении защиты от возбудителей болезней, вредителей и сорняков они способны формировать значительно больший урожай.

Среднемировой уровень потерь вследствие поражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными микроорганизмами оценивается в 12%. Это определяет важность защиты растений как одного из факторов интенсивного растениеводства. Из всех известных ныне инфекционных болезней растений 83% вызываются грибами, 9 – вирусами и 7 – бактериями. Значительный ущерб посевам в ряде случаев причиняют простейшие (Protozoa).

Химическая защита растений от фитопатогенов пока занимает ведущее место в арсенале мер борьбы, особенно в системах интенсивных технологий возделывания сельскохозяйственных культур. Однако она не является экологически безопасной и должна сочетаться с биологическими средствами защиты. Последние следует рассматривать как важную, неотъемлемую компоненту интегрированной системы защиты в современном растениеводстве, а в ряде случаев и как единственное средство контроля фитопатогенов.

#### **Актуальность темы исследования.**

В последнее время усилилось внимание к разработке биологических средств борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных, технических, плодовых культур. Биологические препараты при своей специфичности и высокой эффективности позволяют избежать многих нежелательных изменений в биоценозах, устранить загрязнения окружающей среды, они безвредны для растений, животных и человека.

**Целью исследований** было выявить влияние штамм микромицета *Trichoderma lignorum* ЗМ, выделенный из почвы на физиолого-морфологические особенности томатов и на их урожайность.

**Научная новизна.** В результате исследований ненарушенных почв созданы виды *Trichoderma*, среди которых *T.lignorum* ЗМ. Показано, что возникающие у видов рода *Trichoderma* выполняют роль краевых популяций, осуществляющих освоение новых субстратов и экологи-

трофических ниш. Установлена высокая пластичность аэробного и анаэробного метаболизма, что обеспечивает специализацию к субстратам и поддержание численности видов рода *Trichoderma* в различных растений.

# Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Характеристика грибов рода *Trichoderma*

Важная роль в подавлении развития фитопатогенов отводится грибам-антагонистам. Среди их представителей внимание исследователей привлекают грибы рода *Trichoderma* (порядок *Hyphomycetales*). К роду *Trichoderma* относятся следующие виды грибов: *T. lignorum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. reesei*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. aureoviride*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* [1,45,54].

У грибов рода *Trichoderma* мицелий бесцветный или светлый, образующий белые, желтые, чаще зеленые или темно-зеленые колонии. Конидии одноклеточные, шаровидные или эллипсоидные, светлые или бесцветные, часто скученные в небольшие головки.

Эти грибы в большом количестве встречаются в почвах тайги, целинных, лесных и лесолуговой зоны, т.е. в почвах, богатых органическими остатками. Также, достаточно обильно они заселяют культурные почвы. В зоне подзолистых почв этих грибов больше, чем в других почвах. Особенно часто их обнаруживают в кислых почвах с низким значением pH (обычно 3,7-5,2) [2,47,48].

Наличие источников питания, а также абиотические факторы внешней среды: температура, влажность, pH среды оказывают существенное влияние на развитие грибов рода *Trichoderma* и активность их взаимодействия с патогенами. Так, споры прорастают только в условиях оптимальной влагообеспеченности субстрата - 70 - 100%, а при 20% они не прорастают. Оптимальной для развития *T. lignorum* является температура 24 - 28°C, *T. harzianum* - 24 - 25°C, а для *T. viride* - 35°C. Штаммы *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningii* проявляют гетерогенность по устойчивости к низким температурам. Холодоустойчивые штаммы при температуре 10°C на 81 - 97% заселяли склероции гриба *Botrytis cinerea* на 28-е сутки, а при температуре 5°C - до

50 - 71% на 60-е сутки. Реакция среды оказывает значительное влияние на рост грибов. Оптимальной для видов *Trichoderma* является кислотность почвы в пределах от 4 до 6.[46,47,50]

Триходерма зеленая (*Trichoderma viride*) и триходерма древесная (*T. lignorum*) появляются на агаре Чапека- и на сусловом агаре вначале в виде бесцветного мицелия, который быстро разрастается и с возрастом приобретает зеленый цвет. Колонии этих грибов бывают различных оттенков, от лимонно-желто-зеленого цвета до темно-зеленого. *koningii* образует колонии на картофельно-сахарозной среде. Вначале они белые, в виде ватообразных клубочков, впоследствии становятся светло-зелеными, но никогда не бывают темно-зелеными. Колонии на агаре Чапека распростерты, пушистые, вначале белые, с возрастом различных оттенков зеленого цвета, но не темно-зеленые [1, 3,51,55].

В последние годы в связи с бурным развитием биотехнологии возрастает интерес к микроскопическим грибам рода *Trichoderma*, которые привлекают внимание исследователей в связи с их практическим значением для получения биологически активных веществ, средств защиты растений и как активного деструктора растительных полисахаридов [3]. Разработка на их основе экологически чистых технологий является важным направлением в экологической биотехнологии [4,49].

Известно, что *Trichoderma* выделяет различные метаболиты: факторы роста (ауксины, цитокины и этилен), органические кислоты, внутриклеточные аминокислоты, витамины и свыше 100 антибиотиков. Фитогормоны *Trichoderma* (цитокинины), отвечающие за стимуляцию физиологических процессов растений, поступают в растительный организм и приводят к более активному его развитию [5,51, 6]. Из тканей гриба можно получить трихотецин - антибиотик и «Триходермин» - средство защиты растений от грибных болезней.

Микромицет рода *Trichoderma* является активным продуцентом фермента целлюлазы и способен к глубокой деструкции как клеточных стенок растений, так и отдельных трудно расщепляемых растительных полисахаридов: целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина до мономерных форм. В настоящее время активно исследуются фенолоксидазы микромицета в связи со значительной ролью этих ферментов в биодegradации лигнина [7,53, 8].

## **1.2. Механизм действия грибов рода *Trichoderma* на растения**

Многие виды грибов рода *Trichoderma* и другие полезные колонизирующие корни микроорганизмы улучшают рост растений и увеличивают урожайность культур, но долговременное улучшение могут вызывать только ризосферокомпетентные штаммы. В тепличном растениеводстве штамм T-22 *T. harzianum* широко используется для защиты от болезней растений вместо химических фунгицидов, поскольку он безопасен для работников. Эффект биоконтрольного агента сохраняется дольше, чем эффект пестицидов, препарат дешевле пестицидов, препарат, в отличие от пестицидов, улучшал состояние корневой системы растений [5,58]

Для отдельных видов *Trichoderma* показана способность к увеличению роста и массы корней, что приводит к повышению урожайности. Во многих случаях реакции растений являются результатом прямых воздействий на растения, снижения активности вредной корневой микрофлоры, инактивации токсических метаболитов в корневой зоне. Полезные грибы увеличивают потребление питательных элементов и эффективность усвоения азота, а также солубилизируют элементы из почвы. Генетическая и молекулярная основа этих эффектов неизвестна. У разных видов и сортов растений наблюдаются отличия в ответных реакциях на воздействие *Trichoderma*, по крайней мере, это показано для кукурузы. Недавно показано, что стимуляция роста растений под

воздействием бактерий, фенотипически напоминающая ситуацию с *Trichoderma* T-22, связана с тем, что бактерии выделяют летучие вещества, такие, как ацетон и 2,3-бутандиол. Колонизация корней также увеличивает скорость роста корней и всего растения, что приводит к повышению продуктивности культуры и урожая репродуктивных органов. Колонизация корней также помогает растению преодолеть абиотические стрессы и увеличивает усвоение питательных элементов [6,59].

Для выращивания в качестве стимуляторов роста гороха штамм перспективен, так как стимулирует рост корней и проростков, увеличивает пероксидазную активность, то есть не проявляет фитотоксичности [4,60].

Штаммы *Trichoderma* способствуют увеличению размера корневой системы, роста и жизнестойкости растений путем контроля ризосферной микрофлоры и влияя на обмен веществ растения. Ризосферный эффект может проявляться как долговременная колонизация ризосферы, что влияет на количественное улучшение отдельных показателей развития растения. Увеличение плотности корневой системы на глубине чрезвычайно выгодно для растений кукурузы и других культур, особенно в засушливые сезоны. В таких условиях колонизация корней штаммом *Trichoderma* снижает чувствительность растений к засухе.

Биопрепарат на основе видов *Trichoderma* перспективен для интегрированной защиты в полевых условиях. Грибы рода *Trichoderma* с ризосферным эффектом могут обеспечивать долговременную защиту даже при однократном применении в начале сезона, сохраняются на корнях, способны пролиферировать вместе с растущей корневой системой и оставаться жизнеспособными, по крайней мере, во время всей вегетации культуры. Таким образом, биологические препараты могут быть более эффективны, чем химические, в защите корней и ускорении роста растений.

Биопрепараты на основе *Trichoderma* способны подавлять возбудителей не только семенной, корневой и почвенной инфекции, но и

развитие болезней плодов и листьев при нанесении препарата на поверхность этих структур.

Препарат может быть эффективен против мучнистой росы (*B. cinerea*) в теплице, милдью, возбудителей болезней газонных трав, таких, как бурая пятнистость (*R. solani*), *Pythium* spp. и талерные бляшки (*S. homoeocarpa*). Для борьбы с такими фитопатогенами конидии *Trichoderma* следует вносить каждые 10 дней. При высокой заболеваемости *Trichoderma* может колонизировать новые здоровые листья, плоды и цветы, зрелые ягоды, прорасти на цветах, но не на листьях клубники. Однако существуют некоторые ограничения для использования биопрепаратов на основе *Trichoderma*: они являются превентивными, т.к. чаще всего не способны контролировать уже развившиеся заболевания.

Биопрепараты на основе *Trichoderma* менее эффективны против системных заболеваний, чем против местных (например, они эффективны против фузариозной корневой плесени, но не активны против фузариозного вилта), на фоне высокой инфекционной нагрузки. Биопрепараты на основе *Trichoderma* можно применять только как часть интегральной системы контроля (химико-биологической системы). Во всех случаях для получения максимального урожая требуется использовать как биологические, так и химические агенты. Например, протравливание семян одновременно фунгицидом и пестицидустойчивым биопрепаратом на основе *Trichoderma* приводит к колонизации корней растения и повышает эффективность биопрепарата. Создается общая картина положительного влияния *Trichoderma* на рост растений и урожайность, хотя это происходит не везде и не всегда. *Trichoderma* обеспечивает устойчивость к различным стрессам. В оптимальных условиях для роста растений визуальные эффекты от влияния изолятов *Trichoderma* не видны.

Одним из возможных механизмов, привлекающих особое внимание, является устойчивость биоконтрольного агента к стрессам благодаря улучшению корневой системы и повышению жизнеспособности растений.

Толерантность к высушиванию и повышенная усвояемость азота являются примерами этого механизма. Улучшение состояния корневой системы благодаря *Trichoderma*, возможно, приводит к появлению устойчивости к патогенам, которые непосредственно не контролируются.

В почве многие ионы постоянно переходят из нерастворимой в растворимую форму, что в значительной степени влияет на усвоение этих элементов корнями. Виды *Trichoderma* способны в значительной степени положительно влиять на переход многих ионов (фосфаты, цинк,  $Mn^{4+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) из нерастворимых в растворимую форму, и показано влияние этого процесса на развитие болезни растений.

Некоторые штаммы *Trichoderma* являются мощными индукторами системной резистентности растений (SAR). Штамм *T. harzianum*, инокулированный на корни или листья, защищает растения от *B. cinerea*, независимо от места введения. Анализ листьев, устойчивых к фитопатогенам, показывает, что на них нет *Trichoderma*. Установлено, что способность к контролю мучнистой росы связана с индукцией резистентности растений. В растениях огурца, выращенного с использованием биопрепаратов, отмечено увеличение размеров растения и урожайности. Мицелий гриба проникает в кортекс корней. В растениях, обработанных спорами *Trichoderma*, увеличена активность хитиназы и пероксидазы и обнаруживаются фитоалексины, что является показателем SAR.

Инфекционность и способность поражать растения у многих фитопатогенов зависит от продукции пектинолитических, хитинолитических и целлюлолитических ферментов, сериновых протеаз, деградирующих клеточные стенки растительных клеток. Механизм биоконтроля, который могут реализовать виды *Trichoderma* - разрушение ферментов фитопатогенов, что приводит к снижению их инфекционности [9,57]

В последнее время появилось множество новых разработок, касающихся использования *Trichoderma* в качестве агентов биоконтроля для болезнетворных микроорганизмов и растений, стимуляторов роста. Было предложено несколько механизмов для объяснения положительного воздействия этих микроорганизмов на растение-хозяин. Один из факторов, который способствует их полезной биологической деятельности, связан с широким разнообразием метаболитов, которые они производят. Эти метаболиты не только непосредственно подавляют рост и деятельность патогенных паразитов, но и повышают устойчивость к болезням, запуская систему обороны в растении-хозяина. Кроме того, эти метаболиты также способны к усилению роста растений. Вторичные метаболиты *Trichoderma*, которые влияют на метаболизм растений, могут играть важную роль в сложных взаимодействиях этого агента биоконтроля с растениями и микроорганизмами [10,56]

Недавняя смена тенденции сельскохозяйственной практики применения синтетических удобрений и пестицидов в сельском хозяйстве фокусируется на использовании микроорганизмов, которые выполняют аналогичную функцию. *Trichoderma* является одним из самых популярных видов грибов коммерчески доступных, способствующих росту грибов (PGPF) и как агент биологического контроля. Эксплуатация разнообразных вторичных метаболитов, производимых различными видами *Trichoderma*, расширяет свои программы в сельском хозяйстве и смежных отраслях. Как результат, *Trichoderma* добилась значительного успеха в качестве мощного агента биологического контроля на глобальном уровне. Одобрение *Trichoderma* в научном сообществе основано на понимании механизмов ее действия против большого набора грибковых, бактериальных и в некоторых случаях вирусных инфекций. Применение конкретных целевых вторичных метаболитов имеет потенциальные возможности использования *Trichoderma* как фитопатогенов в качестве замены имеющихся в продаже [11, 12].

Исследования по эффективности биоудобрений на основе *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas striata* и *Trichoderma viride* дали положительные результаты на примере роста рассады яблони. *Azotobacter chroococcum* и *Trichoderma viride* увеличили всхожесть семян до максимального уровня. При этом наблюдалось ускорение роста рассады за счет увеличения длины и диаметра растения. *Trichoderma viride* также оказалась эффективной против вредителей и болезней при условии достаточного количества влаги в сухой период. Самый высокий темп роста длины и диаметра рассады и хорошее развитие корневой системы наблюдалось при совместном использовании трех микроорганизмов: *Azotobacter chroococcum* + *Pseudomonas striata* + *Trichoderma viride*. Таким образом, «микробное трехстороннее действие» или комбинация из трех микроорганизмов дали лучшие результаты в производстве посадочного материала [13].

*Trichoderma hamatum* GD12 уникален тем, что он может способствовать росту растений, осуществлять биоконтроль над болезнетворными микроорганизмами, находящимися в почве, также может вызывать системное сопротивление прикорневым патогенным микроорганизмам [31].

Таким образом, *Trichoderma* представляет собой эффективный биоконтрольный агент, который улучшает рост растений.

### **1.3. Механизм действия на фитопатогенные грибы**

При исследовании биологии микромицета в первую очередь акцентируют внимание на его ингибирующую активность в отношении фитопатогенных грибов, таких как *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica* и др. Поэтому грибы рода *Trichoderma* используются в мировой практике для создания и разработки биологических препаратов, исходя из высокого антагонистического потенциала, скорости роста и возможности культивирования в производственных условиях [4].

Биологическое регулирование численности фитопатогенов с помощью *Trichoderma* может происходить косвенно: а) в результате конкуренции за питательные вещества и пространство; б) в результате способности агентов биоконтроля синтезировать или сопротивляться метаболитам, которые препятствуют прорастанию спор фитопатогена (фунгистазис); г) способности к уничтожению клетки фитопатогена (антибиоз); д) способности модифицировать ризосферу - закисляя почву так, что болезнетворные микроорганизмы не могут расти.

Механизм отрицательного типа взаимодействия *Trichoderma* с фитопатогенными микроорганизмами недостаточно изучен на генетическом уровне. В последнее время появилось много свидетельств в пользу того, что биоконтроль является результатом различных клеточных процессов, а не только ферментативного гидролиза, как предполагалось ранее. Исследования подтверждают, что, по крайней мере, один комплекс ферментов - хитиназ - играет одну из главных ролей в отрицательных взаимодействиях *Trichoderma* с фитопатогенами [6].

Виды рода *Trichoderma* способны защищать растения от действия патогенов с помощью подавления фитопатогенных микроорганизмов, а также путем индуцирования системной и локальной резистентности растений. Такие прямые эффекты *Trichoderma* на рост и развитие растений очень важны для применения в сельском хозяйстве и для понимания роли грибов *Trichoderma* в природных и искусственных экосистемах.

Грибы *Trichoderma* проявляют видо- и штаммоспецифичность к разным видам фитопатогенов. Все виды *Bipolaris* и *Alternaria* в той или иной степени чувствительны к антагонистически активным микромицетам рода *Trichoderma* [14].

При оценке перспективного продуцента биологического контроля большое значение играет паразитизм на других грибах. Паразитизм представителей рода *Trichoderma* в большинстве случаев охарактеризован

как некротрофный, а микофилия видов этого рода служит самостоятельным предметом изучения.

Активные в отношении фитопатогенов штаммы могут оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на растения, что необходимо учитывать при использовании их в практике сельского хозяйства. В случае рекомендации продуцента для создания биопрепарата возникает необходимость отбора штаммов и их оценки конкретно для каждого спектра фитопатогенов и классов растений.

Существует множество механизмов, посредством которых грибы *Trichoderma* осуществляют контроль фитопатогенов. Неудивительно, что разные штаммы обладают различными биоконтрольными способностями. Даже мутанты этих штаммов реализуют различные механизмы контроля фитопатогенов. Кроме того, что эти грибы вооружены самым разным «биологическим оружием», они относятся к высокоадаптивным к различным стрессовым факторам организмов и не специфичным по отношению к контролируемым ими фитопатогенам. Штаммы, лишенные одного механизма, быстро адаптируются и используют другой механизм.

Микопаразитизм считают самым важным механизмом действия биоконтрольных грибов рода *Trichoderma*. Показано, что регуляция микопаразитизма осуществляется многими генами и генными продуктами. Каждая функциональная ферментная группа представлена несколькими ферментами, различающимися по своим свойствам. Описано более 10 отдельных хитинолитических ферментов, установлена дивергентность и для  $\beta$ -1,3-глюканаз и протеаз. Регуляция каждой ферментной системы осуществляется по-разному, что делает регуляцию микопаразитизма чрезвычайно сложным процессом. Первый этап микопаразитизма обеспечивается более чем 20 генами и генными продуктами и регулируется сложными механизмами. Большинство генов синергичны друг другу. Сложный синергичный регуляторный механизм необходим только для осуществления атаки видов *Trichoderma* против других

фитопатогенов. Неудивительно, что этот род объединяет много грибов, способных контролировать фитопатогенные грибы.

Конкуренция за местообитание и питательные вещества с фитопатогенами - один из «классических» механизмов биоконтроля у видов рода *Trichoderma*. Во многих случаях, когда очевидный микопаразитизм или антибиоз отсутствует, предполагается механизм конкуренции [9].

Микопаразит *Trichoderma* коммерчески применяется в качестве агента биологического контроля в отношении ряда фитопатогенных грибов. Микопаразитизм *Trichoderma* обусловлен разрушением клеточной стенки фитопатогенного гриба, повлекший за собой его уничтожение и гибель. Из этого следует вывод, что ферменты клеточной стенки (вместе с антибиотиками) являются основными факторами биоконтроля *Trichoderma*. Среди них гидролазы и хитиназы играют важную роль. Кроме того, атака *Trichoderma* на хост грифы сопровождается значительными морфологическими изменениями [15] [32].

#### **1.4. Лигнолитическое действие грибов рода *Trichoderma***

При культивировании *Trichoderma viride* на жидкой питательной среде с добавлением твердого остатка соломы гречихи, культуральная жидкость исследуемого штамма проявляет высокую целлюлазную активность и не обладает фитотоксичностью. Данный субстрат рекомендован к использованию его для биоконверсии грибами рода *Trichoderma viride*.

Благоприятный состав твердого остатка соломы гречихи позволяет использовать его в качестве экологически чистого сырья для биоконверсии грибами рода *Trichoderma viride*, проявляющие высокую биологическую активность в отношении *Fusarium oxysporum*, а высокий титр спор в полученной культуральной жидкости (1108 спор/гр.) дают основание

рекомендовать этот субстрат для промышленного получения жидкого биопрепарата «Триходермин» [4].

Гидролиз ксиланаз и целлюлозы, это необходимый шаг в направлении эффективного использования лигноцеллюлозных материалов в природе. Лигноцеллюлозные отходы это большая часть твердых бытовых отходов в городах, тем самым представляя собой экологическую проблему. Исследования показали, что с помощью традиционных стратегий обращения с отходами не удалось снизить остроту этой проблемы. Использование микробных ферментов для переработки лигноцеллюлозных отходов, как было показано, может быть альтернативой, которая является эффективным и экономичным способом. Поэтому, учитывая промышленный потенциал ксиланаз и целлюлаз, и их потенциального использования в лигноцеллюлитическом обращении с отходами, становится перспективной для получения новых ферментов и микробных штаммов, продуцентов ферментов, которые смогут производить большое количество ксиланаз и целлюлаз по низкой стоимости. Химический гидролиз лигноцеллюлозы в настоящее время сопровождается образованием токсичных компонентов, которые оказывают токсическое воздействие на окружающую среду, следовательно, необходимо рассмотреть возможность использования микроорганизмов и их ферменты, которые обладают высокой специфичностью, незначительными потерями субстрата, и также чтобы побочные продукты являлись экологически чистыми [33].

Ксиланазы и целлюлазы находятся в широком изобилии в природе, они вырабатываются бактериями, грибами, простейшими, водорослями и т.д. Мицелиальные грибы, как сообщается, являются хорошими производителями лигнолитических ферментов с промышленной точки зрения из-за внеклеточного высвобождения ферментов, представляют высокую доходность в сравнении с дрожжами и бактериями, а также производство и несколько вспомогательных ферментов, необходимых для

замещенных полисахаридов. Применение ксиланаз и целлюлаз в основном рассматривается для биоконверсии лигноцеллюлозных материалов, особенно остатков и отходов сельского и лесного хозяйства по производству продукции с высокой добавленной стоимостью, таких, как этанол топливо и другие химикаты [16]. Screening of Fungi Isolated from Environmental Samples for Xylanase and Cellulase Production

Биоконверсия лигноцеллюлозной биомассы в топливо требует стадии гидролиза для получения брожения сахара, как правило, которое осуществляется с помощью грибковых ферментов. Масштабный скрининг различных штаммов микроорганизмов позволит получить оптимальные ферменты для любого целевой сырья. Различные штаммы *Trichoderma* исследовали для гидролизного потенциала на таком травянистом лигноцеллюлозном субстрате как просо. Штаммы культивировали на микропластинах для ксиланазной и целлюлазной деятельности. Таким образом, было выявлено, что рост на просо способствует выработке ксиланаз. Штамм К4 обладает самый высокий ксиланазной производительностью после роста на таком лигноцеллюлозном субстрате как просо [17].

### **1.5. Биопрепараты на основе грибов рода *Trichoderma***

Экологически безопасной альтернативой химическим пестицидам служат биологические препараты, созданные на основе природных микробных агентов регуляции численности фитофагов и фитопатогенов. Начало развитию биотехнологии микробных средств защиты растений было положено еще в XIX в. в работах известного российского ученого И.И. Мечникова, первого в мире создавшего биологический препарат на основе выделенного им из природы энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* [18].

Первым грибным препаратом, разработанным на основе *Trichoderma viride* (lignorum) стал «Триходермин». Позднее, включая современный

период, была разработана серия препаратов на основе *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, *T. asperellum* и др. В последнее время препараты, содержащие грибы рода *Trichoderma*, зарегистрированы под названиями «Глиокладин» и «Стернифаг» (ВИЗР и ЗАО «Агробιοтехнология, г. Москва). На мировом рынке представлено также несколько биопрепаратов, являющихся аналогами Триходермина, которые могут быть альтернативой химическим средствам: «ТопШилд» (на основе *T. harzianum* T-22) и «Триходекс» (*T. harzianum* T-39) [9].

Грибные препараты получают не только глубинным, но и поверхностным, а также глубинно-поверхностным культивированием. Это связано с тем, что споры грибов, получаемые в глубинной культуре, не столь жизнеспособны и активны, как конидии, образуемые грибами на поверхности питательной среды. В последние годы более популярным стал способ поверхностного культивирования грибов на сыпучих субстратах [17, 19].

Триходермины изготавливают на основе массового (производственного) размножения этого гриба, с использованием разных растительных отходов и других субстратов (хлебного мякиша, соломенной резки, отходов зерна и хлебных злаков, перегретого торфа). Эти препараты применяют для подавления в почве возбудителей болезни льна, корневых гнилей, вертициллезного увядания хлопчатника и других инфекционных болезней сельскохозяйственных растений. Данный гриб также подавляет развитие многоядного паразита - склеротинии *Sclerotinia sclerotiorum*, вызывающего заболевание склеротиниоз многих растений, в том числе кукурузы и подсолнечника. Гриб образует два известных антибиотика: глиотоксин и виридин, обладающих антибактериальными и антигрибными свойствами (против патогенных бактерий и грибов) [2, 18].

«Триходермин» выпускается в виде сухого порошка с титром не менее 6 млрд. жизнеспособных спор в 1 г. В борьбе с болезнями сельскохозяйственных культур препарат применяют

свежеприготовленным, если же такой необходимости нет, то его высушивают при 30-40°C и хранят в бумажных мешках в сухом помещении при 5-10°C. Срок хранения - 1 год. У препарата отсутствует вирулентность, токсичность и токсигенность по отношению к теплокровным животным и человеку [ 20].

В производстве препаратов важным завершающим этапом является приготовление препаративной формы (формуляция действующего начала). Препаративная форма тесно связана с технологией применения биопрепаратов и со сроком их хранения. От того, насколько она будет способствовать проявлению потенциала штамма-продуцента, зависит и эффективность микробного препарата. Современные разработчики биопрепаратов учитывают необходимость оптимизации препаративной формы, что недооценивалось на первых этапах развития биотехнологии. Кроме того, неотъемлемая часть технологического процесса получения биопрепаратов - их стандартизация и оценка качества. Без этого невозможно их рациональное использование в биологической защите растений [21].

Хотя главным преимуществом биопрепаратов является высокая степень экологической безопасности, их эффективность не всегда соизмерима с эффективностью химических пестицидов в связи с большей зависимостью от температуры, влажности, инсоляции. Для устранения этого необходимо дальнейшее изучение механизмов взаимодействия биоагентов с мишенью и с окружающей средой для усиления активности действующего начала [22]. Перспективны также исследования и разработка биопрепаратов полифункционального действия [23, 25]. Так, разработана технология получения комплексных препаратов серии «Хитозар Био», в которых клетки *T. viride* иммобилизуют на хитинхитозановых носителях [24].

В практике применения биопрепаратов для защиты растений до настоящего времени часто бытуют неверные представления по данному

вопросу. В частности, считается, что биопрепараты менее эффективны и доступны, чем химические пестициды, а биопрепарат, введенный в почву или ризосферу, не способен влиять на фитопатогены в течение длительного периода времени [26, 27]. Поэтому биопрепараты эффективны для защиты семян от болезней проростков, но бесполезны для защиты растений в период вегетации. Считается также, что один биоконтрольный агент не может быть эффективен в различных условиях, на различных культурах и против широкого спектра патогенов, поэтому лучше применять смешанные препараты, а механизм действия биоконтрольного агента очень прост и контролируется только одним или несколькими генами и генными продуктами. Некоторые специалисты уверены, что регистрация биопрепарата - процесс легкий, недорогой и простой [28].

Мнение о том, что биопрепараты менее эффективны и доступны, чем химические пестициды, ошибочно. Действительно, сторонники биологического земледелия стремятся внедрить биопрепараты в систему, в которой пестициды занимают прочное положение и были более экономичными. Другими словами, они старались внедрить биопрепараты по схеме внедрения химических средств защиты. Но на международном рынке уже существует множество эффективных пестицидов для защиты семян, часто более дешевых; пестициды сохраняются на семенах дольше, чем биопрепараты, а химические средства более эффективно защищают семена при разных погодных условиях [29, 30].

Однако в сельском хозяйстве существуют ситуации, в которых биопрепараты могут быть более привлекательными, чем химические пестициды. Например, биопрепаратами можно заменять фунгициды с низкой эффективностью, к которым у патогенов развилась резистентность и которые не могут заменить другие химические средства. Замена или частичная замена биопестицидами опасных для окружающей среды химических пестицидов, применение биопрепаратов там, где использование химических средств невозможно. Наконец, без

биологической защиты невозможно ведение биологического (органического) сельского хозяйства.

Следовательно, необходимо внедрять не только биопрепараты, но и новые концепции, которые бы заменили традиционные подходы [31].

### **1.6. Биологохимические особенности грибов рода триходерма**

Грибы рода триходерма относятся к классу несовершенных (Deuteromycetes), порядку гифомицентов (Hyphomycetales).

Вегетативное тело гриба состоит из хорошо развитого, ветвящегося, гаплоидного мицелия. Он может быть бесцветный или светлый, образующий белые, желтые, чаще зеленые или темно-зеленые колонии.

Размножается гриб бесполом путем при помощи конидий (спор). Конидии одноклеточные, шаровидные или эллипсоидные, светлые или бесцветные, часто скрученные в небольшие головки. Конидии одеты оболочкой, распространяются они воздушными течениями, насекомыми, человеком.

Конидии образуются на многоклеточных, реже одноклеточных конидиеносцах, представляющих ветви мицелия, обычно поднимающиеся над ним.

Кроме конидий триходерма образует хламидоспоры ( в результате распада гиф на отдельные короткие клетки). Они имеют более толстую оболочку, хорошо переносят неблагоприятные условия и прорастают мицелием. (приложение 1 ).

Штамм хорошо усваивает глюкозу( $C_6H_{12}O_6$ ), мальтозу- солодовый сахар ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), лактозу-молочный сахар ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), сахарозу( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), глицерин (нетоксичная, вязкая, бесцветная жидкость сладкого вкуса-  $(HOCH_2CH(OH)CH_2OH)$ ), органические кислоты, гидролизует крахмал. Не ассимилирует целлюлозу (клетчатку) ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, арабинозу. Медленно гидролизует азот нитратов, органический азот аминокислот, белки. Из источников азота утилизирует

гидролиазы казеина, рыбно – костной муки, дрожжей, мяса, соли аммония.

Ферментные системы грибов рода *Trichoderma* интенсивно изучаются. Установлено, что ими являются: бета-(1,3) глюконазы, хитиназы, целлюлазы, протеиназы и липазы.

Путем получения суперпродуцентов ферментов, мутантных клонов без ферментативной активности, а также клонирования генов ферментов доказана роль их в микопаразитизме грибов рода *Trichoderma*. Набор хитиназ и других ферментов, разлагающих клеточную стенку, различается у разных видов и штаммов, и ферменты по-разному экспрессируются в процессе микопаразитизма.

Считается, что продукты разложения клеточной стенки действуют как стимуляторы ферментов в системе хозяин-патоген.

Есть мнение, что рост стимулирующую активность обеспечивают некоторые вещества, например, гормоны, факторы роста. Считается также, что рост стимулирующими свойствами обладают и антибиотические вещества, однако, если вернуться к механизмам биологического действия грибов рода *Trichoderma*,

Это есть три механизма:

- конкуренция за питание и пространство;
- устойчивость к стрессам через увеличение корневой системы растений;
- улучшение питания растений посредством растворения и разложения неорганических растительных веществ; по-видимому и приводят к стимулированию роста растений.

### **1.7. Роль грибов рода триходерма в природе**

В природе триходерма зеленая встречается преимущественно в конидиальной стадии.

Высокая численность этих грибов обнаружена в почвах тайги, целинных, лесных и лесолуговой зоны, т.е. в почвах, богатых

органическими остатками. Также достаточно обильно они заселяют культурные почвы. В зоне подзолистых почв этих грибов больше, чем в других почвах. В северных почвах, в т.ч. почвах тундры, где минерализационные процессы протекают медленно, грибы рода триходерма встречаются редко (приложение 2).

Большая часть почвообразовательных процессов, протекающих в природе, в значительной степени обусловлена жизнедеятельностью микроорганизмов. Микроскопические грибы из рода триходерма выполняют в почве весьма разнообразные функции.

Гриб триходерма способен в процессе жизнедеятельности синтезировать весьма сложные органические соединения – антибиотики (глиотоксин и виридин), оказывающие губительное воздействие на бактерии и другие микроорганизмы. Антибиотическая активность представляет собой приспособление к условиям среды, обильно заселенной различными микроорганизмами, ведущими между собой и с другими грибами активную борьбу за существование.

Антибиотики убивают мицелий других грибов и используют его в качестве питательного субстрата. Первыми описали антибиотическую активность у грибов рода *Trichoderma* в связи с антагонистической функцией *Deninisan Webster*. Они показали, что грибы рода *Trichoderma* синтезируют стабильные и нестабильные компоненты, способные ингибировать мицелиальный рост различных грибов и продукция антигрибных метаболитов варьирует у разных изолятов, даже относящихся к одному и тому же виду. Антибиотические вещества были обнаружены и идентифицированы у различных видов грибов рода *Trichoderma* *T.harzianum*, *T. Koninqii*, *T.hamatum*, *T.longibrachiatum*, *T.reesi*, *T. viride* .

Антибиотики, которые синтезируются грибами рода триходерма:

-триходермин(трихотецены),

-неназыщенная одноосновная кислота - дермадин (активный против грам+грамбактерий)

циклический пептид трихотоксин А (токсичен для млекопитающих)

трихотоксин А 50 и трихотоксин А 40

-триховиридин

-антибактериальный пептид – сузукацилин

-пептиды аламетицины

- летучие и нелетучие низкомолекулярные антибиотики

Характерно, что наличие антибиотиков напрямую не связано с микопаразитизмом, что вполне понятно, т. к. в микопаразитизм включены другие процессы и ферментные системы.

Пептиды, выделяемые из грибов рода *Trichoderma* обладают не только фунгицидной и бактерицидной активностью, но также и обладают мембраномодифицирующими и гемолитическими свойствами, являются иммуномодуляторами.

Как уже было сказано выше, кроме антагонистической активности грибы рода *Trichoderma* обладают рост стимулирующим действием на растения. Впервые рост стимулирующая активность была показана в 1984 году Baker.

Дальнейшие исследования показали, что обработка почвы суспензией спор *Trichoderma* spp. стимулирует рост цветочных культур и увеличивает урожайность овощных культур.

Грибы рода триходерма непосредственно принимают участие в синтезе гумуса и гумусоподобных веществ в почве. Микроскопические грибы, образуя перегнойные соединения и обволакивая почвенные частицы мицелием, также принимают участие в оструктуривании почвы, что имеет исключительно большое значение в повышении плодородия почвы.

У гриба триходерма зеленая экспериментально установлена способность продуцировать целлюлозолитические ферменты. Это

позволяет использовать их в целлюлозно-бумажной промышленности для получения определенных сортов бумаги и картона из древесных остатков. Грибы данного рода способны паразитировать на других почвенных грибах. Они вызывают быструю гибель пораженных структур хозяина, сильно замедляют или полностью подавляют его развитие. Развиваясь на спорообразующих структурах грибов, они часто ограничивают их спороношение и снижают жизнеспособность или вызывают гибель образующихся спор. Представители этой группы обычно хорошо растут в лаборатории на питательных средах. Поэтому они представляют большой интерес с точки зрения разработки биологических методов борьбы с грибами-паразитами растений.

### **1.8. Биологические особенности томатов**

Томат — однолетнее растение семейства Пасленовые. В год посева формирует плоды и семена. Корневая система сильно разветвлена, за счет формирования боковых придаточных корней 1-го, 2-го и 3-го порядков, покрытых многочисленными корневыми волосками. Основная масса корней располагается в почве на глубине 30—50 см. Стебель томата прямостоячий (штамбовые сорта) или полегающий (обыкновенные сорта). В зависимости от характера ветвления главного побега растений различают два типа куста: детерминантный и индетерминантный.

Детерминантный тип куста обычно бывает у ранне- и среднеспелых сортов томата. У растений с кустом такого типа после образования 3—4 листьев на главном побеге закладывается соцветие — 1-я кисть. Вторая кисть образуется через 2—3 листа (в зависимости от сорта). Последующие соцветия могут закладываться через 1 лист, а последние 2—3 кисти формируются подряд и заканчивается рост главного стебля. Соцветие ограничивает (детерминирует) рост главного побега. В пазухе каждого листа развиваются почки, из которых впоследствии образуются пасынки. В зависимости от сорта главный побег у растений детерминантных сортов

низко- или среднерослый, достигает 30—65 см в высоту. На нем формируется от 2—3 до 4—5 соцветий. У растений индетерминантных сортов первое соцветие закладывается над 9—12-м листом; последующие — через каждые 3, иногда 4 листа.

В благоприятных условиях новые соцветия образуются непрерывно, стебель растений может достигать 1 —5 м в высоту. Такой тип куста характерен для позднеспелых сортов томата. У них огромная потенциальная возможность образования пасынков, так как в каждой пазухе листа быстро развивается и созревает вегетативная почка. Листья прерывисто-перисто-рассеченные, с очень коротким черешком, переходящим в главную жилку листа. Листовая пластинка расширенная и глубоко рассеченная на доли 1-го, 2-го и 3-го порядка. Края долей листа могут быть цельными или зазубренными.

Томат имеет сильноразвитую корневую систему стержневого типа. Корни разветвленные, растут и формируются быстро. Уходят в землю на большую глубину (при безрассадной культуре до 1 м и более), распространяясь в диаметре на 1,5-2,5 м. При наличии влаги и питания дополнительные корни могут образовываться на любой части стебля, поэтому томат можно размножать не только семенами, но также черенками и боковыми побегами (пасынками). Поставленные в воду, они через несколько суток образуют корни.

Стебель у томата прямостоячий или лежащий, ветвящийся, высотой от 30 см до 2 м и более. Листья непарноперистые, рассеченные на крупные доли, иногда картофельного типа. Цветки мелкие, невзрачные, желтые различных оттенков, собраны в кисть. Томат — факультативный самоопылитель: в одном цветке имеются мужские и женские органы.

Плоды — сочные многогнездные ягоды различной формы (от плоско-округлой до цилиндрической; могут быть мелкими (масса до 50 г), средними (51-100 г) и крупными (свыше 100 г, иногда до 800 г и более).

Окраска плодов от бледно-розовой до ярко-красной и малиновой, от белой, светло-зелёной, светло-жёлтой до золотисто-жёлтой.

Семена мелкие, плоские, заострённые у основания, светло- или тёмно-желтые, обычно опушённые, вследствие чего имеют серый оттенок. Физиологически зрелыми становятся уже в зелёных, сформированных плодах. Всхожесть сохраняют 6-8 лет.

При благоприятных температурных условиях и наличии влаги семена прорастают через 3-4 суток. Первый настоящий лист появляется обычно через 6-10 суток после всходов, последующие 3-4 листа — ещё через 5-6 суток, в дальнейшем каждый новый лист образуется через 3-5 суток. Начиная с молодого возраста в пазухах листьев отрастают боковые побеги (пасынки). Продолжительность периода от всходов до цветения растения 50-70 суток, от цветения до созревания плода 45-60 суток.

По строению куста, толщине стебля и характеру листьев различают 3 разновидности томатов: нештамбовый, штамбовый, картофельный.

Обычно площадь поверхности листьев у растений детерминантных сортов меньше, чем у растений инде-терминантных сортов. В пазухах листьев образуются боковые ветки (пасынки). Раньше появляются и наиболее сильно развиваются пасынки, расположенные непосредственно под соцветиями.

Цветки желтые, собраны в простые или более сложные (разветвленные) соцветия, обоеполые (гер-мафродитные). Плоды в зависимости от сорта сильно различаются по величине, форме и числу камер. Наибольшее значение имеют сорта, образующие гладкие красные плоды.

Семена мелкие (около 300—350 шт. в 1 г), беловато-кремоватые или сероватые, опушенные беловатыми волосками. В зависимости от сорта в одном плоде образуется от 25—30 до 300—350 семян. Плоды крупноплодных сортов обычно содержат меньше семян, чем плоды мелкоплодных сортов. Всхожесть семян сохраняется в течение 4—5 лет.

Влажность. Томат является средней по требовательности к влаге и относительно засухоустойчивой культурой. Однако для него необходима повышенная влажность почвы (примерно 70...80%), но при этом относительно пониженная влажность воздуха около 60 %. В период плодоношения влажность воздуха нужна в пределах 65...70 %. Перепады влажности почвы ухудшают рост корневой системы, поступление питательных веществ в растение, ведут к заболеванию. Неравномерное обеспечение влагой приводит к растрескиванию плодов и опадению цветков.

Особую заботу надо проявлять об обеспечении растений воздухом. При недостатке воздуха в почве семена медленно прорастают, корни приостанавливаются в росте, нарушается нормальный процесс питания. Такое требование обязывает овощевода использовать для выращивания томатов (особенно рассады) почву с хорошей комковатой структурой.

При недостаточном увлажнении наблюдается ускоренное созревание завязавшихся плодов при массовом опадении новых цветков и завязей. Растение, испытывая стресс, стремится воспроизвести семена при этом избавляется от репродуктивных частей, которые составляют конкуренцию в потреблении питательных веществ.

### Свет

Томат — требовательная культура к свету. Чем ярче и интенсивнее свет, тем быстрее формируется урожай. При недостатке освещения резко снижается процесс ассимиляции, рост растений ослабляется, развитие задерживается. Длительная пасмурная погода удлиняет период от цветения до созревания плодов на 10...15 дней, ухудшает их вкусовые и товарные качества. Большинство сортов южного происхождения являются короткодневными, а северного — нейтральными к длине дня или длиннодневными растениями.

### Почвенные микроэлементы

Однако наилучшие результаты дает культура томата на хорошо прогреваемых плодородных почвах, богатых органическим веществом черноземах и незатопляемых или рано освобождаемых от полой воды поймах рек с рН около 6,0 (5,5...6,5). Хорошие урожаи томата можно также получать на супесчаных и суглинистых почвах при внесении необходимых удобрений и поддержании почвы в рыхлом состоянии. Томат хорошо отзывается как на минеральные, так и на органические удобрения. На окультуренных почвах он может дать высокий урожай при внесении только минеральных туков, а на малопродуктивных, малогумусных почвах целесообразно сочетание минеральных и органических удобрений. Из органических удобрений под томат вносят перегной, навоз (лучше осенью), торфонавозные компосты, навозную жижу, птичий помет.

Из элементов минерального питания томат больше потребляет калия и азота. Однако он очень отзывчив на фосфорные удобрения, без которых трудно получить высокий урожай и хорошее качество плодов. Томаты выносят много питательных веществ из почвы. В начальный период формирования корневой системы особенно велика роль фосфора. Поэтому в молодом возрасте растения нуждаются больше всего в подкормке фосфорными удобрениями. В последующем, когда начинается процесс плодообразования, фосфор совместно с калием способствуют ускорению цветения, созревания плодов и повышению устойчивости растения к болезням. (37).

#### Характерные особенности томата сорта Авиценны

Раннеспелый. Созревание плодов наступает на 94-95 день после полных всходов. Растение детерминантное высотой 50 см. Лист обыкновенный.

Соцветие простое и промежуточное, первое соцветие закладывается над 6-7 м листом. Плод плоско-округлый, гладкий, красный. Число гнезд 4-5.

Масса плода 60-80 г. Вкусовые качества свежих плодов хорошие. В полевых условиях устойчив к фитофторозу и вершинной гнили плодов.

Рекомендуется для выращивания в закрытом и открытом грунте (36).

Болезни и вредители томата. Среди многочисленных проблем, которые возникают при выращивании томата, в комнатных условиях наибольшую опасность представляет заболевание черная ножка.

Черная ножка – грибное заболевание. Вызывается комплексом почвенных возбудителей, из которых наибольшее значение имеют: *Olpidium brassicae* Wor. (класс хитридиомицетов); *Pythium debariahum* Hess (класс оомицетов); *Rhizoctonia solani* Kuehn (класс несовершенных грибов), бактерии из рода *Erwinia*. (33).

Распространено заболевание повсеместно, особенно в защищенном грунте. Заболевание проявляется на рассаде раннего возраста в парниках и теплицах. Характерный признак болезни – почернение корневой шейки. Стебель пораженной рассады становится тонким и искривляется. Больные растения легко выдергиваются из почвы. При раннем поражении всходов растение полегает и гибнет. При более позднем заражении рассада несколько отстает в росте, но не погибает. Корни у нее развиты слабее, и после высадки в грунт растение хуже приживается, отстает в росте, снижает урожай.

Зимует возбудитель в почве и в растительных остатках в виде цист (род *Olpidium*), ооспор (род *Pythium*), толстого многоклеточного мицелия (псевдосклероции) (род *Rhizoctonia*). В течение вегетации заболевание распространяется зооспорами и мицелием. Развитию черной ножки благоприятствуют бессменное использование грунта, высокая влажность почвы и кислая реакция ее среды. Чаще всего страдают загущенные посевы. Развитию и распространению болезни способствует также обильный полив, слабое проветривание, резкие перепады температуры. Болезнь носит очаговый характер.

Меры борьбы [30,35,32]

1. Систематическое проветривание парников и рыхление почвы.
2. Уничтожение растительных остатков.
3. Редкие поливы.
4. Замена зараженного грунта в парниках и теплицах.
5. Обеззараживание почвы:

пропариванием; внесением корбатиона – 2% раствор (200 мл на 10 л воды на 1 м<sup>2</sup>) вносят осенью или весной за 30 суток до посева или пикировки рассады. После внесения препарата землю перекапывают и уплотняют; внесение тиазона – 85% с.п. (100-125 г/м<sup>2</sup>) вносят осенью или весной за 20 суток до посева: препарат смешанный с увлажненным песком (1:3), наносят на поверхность грунта, затем все перекапывают и укрывают пленкой; внесение в почву серы, коллоидной или с.п. (5 г/м<sup>2</sup>) за 3 суток до посева или пикировки рассады; внесение свежегашеной извести (1 кг/м<sup>2</sup>); внесение древесной золы (100 г/м<sup>3</sup>).

6. При появлении черной ножки очаги поражения обрабатывают 1% бордоской жидкостью (1 л/м<sup>2</sup>), затем подсыпают к корням песок (1-2 см).

7. Для оздоровления рассаду поливают марганцовокислым калием (3-5 г на 10 л воды).

## **II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

## 2.1. Объект исследований

Объектом нашего исследования являются выделенные штаммы А.Г. Гузаловой *Trichoderma lignorum spp 3М* и растение томата сорта Авиценна. Опыт по изучению влияния *Trichoderma lignorum spp 3М* на растений томата проводился в Ташкентском виляете Кибрайского района в частной фирме А.Г. Гузаловой “Агросервис”.

## 2.2. Схема опыта

Штаммами *Trichoderma lignorum spp 3М*. вносили следующими методами :

- опудривания семян штаммом *Trichoderma lignorum spp 3*;
- полив суспензий *Trichoderma lignorum 3М* одновременно с посевом;
- полив суспензий седьмые сутки после появления всходов.
- ростовые показатели: высоту растений, толщину стебля у основания, число листьев на растении. Измерения проводили линейкой, выкапывая по 5 растений.

## 2.3 Методы выделения чистой культуры и культивирование

Грибы выделяют в чистую культуру и наблюдают за ними *in vitro*. Наличие чистых культур дает возможность определить характер роста и спорообразования у грибов, особенности морфогенеза, выявить плодовые тела и виды спороношения, установить отношение грибов к факторам среды (температуре, влажности, источникам света, кислотности среды, радиации, компонентам субстрата); определить биосинтетическую активность продуктов метаболизма (ферментов, регуляторов роста, витаминов) грибов; выявить отношение грибов к фунгицидам, лекарственным препаратам; провести сравнительную характеристику изолятов видов грибов; провести популяционные исследования; выяснить взаимоотношения грибов друг с другом, охарактеризовать степень паразитизма, родство между грибами и т.д.

## **2.4. Выделение фитопатогенных грибов**

Прежде чем получить чистую культуру изучаемого гриба, необходимо иметь споры или мицелий, свободные от заражения сапротрофной микробиотой. Одним из наиболее простых методов получения мицелия или органов спороношения является стимулирование роста грибов и спороношения в условиях повышенной влажности – применение влажных камер. Для их изготовления обычно используют чашки Петри. Перед закладкой объекта во влажную камеру его промывают в проточной воде или в нескольких водах. Выбор концентрации дезинфектанта и времени экспозиции зависит от целей исследования и характера исследуемого материала. Стерилизуют объект, используя 3 %-ную перекись водорода, 2 %-ный раствор марганцево-кислого калия, 70 %-ный этиловый спирт. Объект выдерживают в растворе в течение 1-5 мин и многократно промывают стерильной водой. Для грубых частей растений используют обжиг в пламени. Необходимую для проведения микологического эксперимента посуду моют с моющими средствами, заворачивают в бумагу и стерилизуют в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 180-200 °С. Инструмент стерилизуют спиртом и прокалывают на огне. В стерильные чашки Петри кладут 2-3 фильтра, увлажненные стерильной или проточной водой (реже жидкой питательной средой). После поверхностной дезинфекции исследуемый материал помещают в чашку Петри и ставят в термостат при соответствующей температуре (обычно 20-25 °С). Фрагменты исследуемых пораженных объектов раскладывают так, чтобы они не соприкасались друг с другом. Выделение фитопатогенных микромицетов проводят из различных пораженных органов растений.

## **2.5. Выделение из корней**

Свежевыкопанные корни многократно промывают проточной, затем стерильной водой, отжимают в нескольких слоях стерильной фильтровальной бумаги, отрезками длиной 1-3 см или целиком (у проростков) укладывают на кружки стерильной фильтровальной бумаги в чашках Петри и помещают в термостат при температуре 26 °С. Толстые корни разрезают вдоль или нарезают небольшие поперечные отрезки. Наблюдение за ростом грибов и их выделение производят через 24-48 ч и в последующие дни роста.

### **2.6. Выделение из клубней, луковиц, корнеплодов, плодов**

Для выделения патогенных грибов из клубней, луковиц, корнеплодов и плодов необходимы предварительный отмыв исследуемого материала от частиц почвы и поверхностная стерилизация. Срезают стерильно небольшой кусочек на границе пораженной и здоровой ткани и помещают его во влажную камеру или на агаризованную среду.

### **2.7. Выделение из стеблей и листьев**

Грибы можно выделить не только из свежего материала, но и из гербарных образцов. Необходимо немедленно зафиксировать гербарный материал высушиванием, а также предохранять от заражения посторонней микобиотой. Листья, стебли или их части помещают в стерильный пакет из фильтровальной бумаги и высушивают в нем. После высушивания листьев пакет помещают во второй пакет, также стерильный, но из более плотной бумаги. В таком виде хранят до исследования. Перед выделением гриба материал помещают во влажную камеру. При поражении листьев или лепестков химической обработки не ведут, а промывают несколько раз водой и увеличивают число повторностей пораженного материала.

### **2.8. Выделение из зерна хлебных злаков и семян**

Семена дезинфицируют, если предполагают наличие внутреннего заражения. Если определяют внешнюю заспоренность, то дезинфекцию не проводят. Зерна или семена после поверхностной дезинфекции укладывают на фильтровальную бумагу через 0,5-1 см; из одной исследуемой партии зерна берут 100-1000 зерен.

### Выделение грибов из почвы

1. Метод «контактных стекол» (метод Росси-Холодного) – метод выделения микроорганизмов непосредственно из места их расположения в почве. Стерильные предметные стекла прижимают к почве. Через несколько дней стекла встряхивают для освобождения от крупных комочков почвы и помещают на поверхность агаровой среды, в которую добавлен антибиотик, стороной, соприкасавшейся с почвой. Выросшие грибы просматривают при малом увеличении микроскопа и после определенного периода инкубации колонии переносят на свежую среду.

2. Метод разведения почвенной суспензии. Чаще всего для этих целей применяют разведение 1:10 (10 г почвы на 100 мл воды), 1:100, 1:1000. Суспензии с большим разведением высевают на агар. После появления спороншения или признаков развития мицелия его пересевают на агаризованную питательную среду непосредственно в пробирку на скошенный агар или предварительно на агаризованную среду, разлитую в чашки Петри. Для освобождения от бактерий, посева исследуемых грибов и первичное выделение культур производят на средах с рН 4,0 с добавлением в среду для посева антибиотиков с широким спектром антибактериального действия (канамицин и др.) в концентрации 1-2 г/л питательной среды. Облигатных паразитов выращивают на живых растениях или специальных средах. Для дальнейшей работы очень важно провести расчистку культуры. Это осуществляется штриховой разводкой (1), разведением в стерильной воде (2) или среде (3).

1. Небольшое количество спороношения гриба снимают петлей и наносят штрихом на поверхность агар в чашки Петри. По мере продления штриха споры все более разделяются до тех пор, пока в итоге не получаются индивидуальные колонии, возникшие из нескольких или единичных спор.

2. Готовят разведения путем помещения инокулюма спор в пробирку со стерильной водой (10 мл), затем стерильной пипеткой переносят определенное количество суспензии (например, 1 мл) в пробирку с 9 мл стерильной воды. Свежая стерильная пипетка используется, чтобы смешать жидкость и перенести 1 мл ее в очередную пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды. Разведение продолжают по мере потребности. Из последнего разведения 1 мл суспензии спор добавляют к расплавленному агару, охлажденному до 45 °С.

3. Используют пять пробирок с соответствующей средой, расплавленной и охлажденной до 45 °С. Затем в одну из пробирок вносят небольшое количество спор; пробирку вращают между ладонями и содержимое выливают в чашку Петри. Опорожненную пробирку заполняют средой из другой пробирки, вращают между ладонями и выливают во вторую чашку. Процедуру повторяют с оставшимися тремя пробирками.

#### Получение моноспоровых культур

При проведении теоретических исследований или анализе популяции какой-либо географической формы, выявлении продуцентов и др. возникает необходимость получения культуры из одной споры – моноспоровую культуру. Моноспоровую культуру многих грибов получают следующими способами:

1. Готовят суспензию спор на стерильном предметном стекле в стерильной воде путем погружения обожженной петли в спорулирующую культуру. Эту суспензию спор наносят штрихом вдоль намеченной линии

в чашке Петри на очень тонкую пластинку агаризованной среды, приготовленной на кипяченой воде, и выдерживают при + 24 °С. Через 15-16 часов обычно наблюдают начало прорастания и готовность спор для выделения. При работе с биноклем чашку Петри перемещают вдоль линии отметки и выбирают подходящие одиночные проросшие споры. Затем вырезают агаризованную среду площадью около 2 мм<sup>2</sup> вокруг споры. Этот квадрат и зону непосредственно вокруг него проверяют при малом увеличении микроскопа, чтобы гарантировать наличие только одной споры. Агаровый блок с проросшей спорой затем переносят при помощи стерильной иглы под биноклем в чашку с агаром или пробирку.

2. Питательную среду разливают тонким слоем в стерильные чашки Петри, затем берут пробирку со стерильной водой, в нее вносят небольшое количество спор исследуемого гриба и тщательно взбалтывают в воде. После этого металлической петлей берут 4-5 капель споровой суспензии и переносят на предметное стекло. Под микроскопом подсчитывают количество спор в каждой капле. Если капля заключает  $n$  спор, то в пробирку добавляют стерильную воду, чтобы объем ее увеличился в  $n + 1$  раз. При этом можно полагать, что в одной капле будет в среднем по одной споре. После этого из пробирки с разбавленной суспензией спор берут 3-4 капли и переносят в чашки Петри на агаризованную среду. Капли должны располагаться друг от друга на сравнительно большом расстоянии. Под микроскопом проверяют количество спор, попавшее в каждую из этих капель. Просмотр проводят с нижней стороны чашки, которую для этого осторожно переворачивают. При этом выбирают те капли, в которых содержится по одной споре и отмечают их на стекле маркером. Полученные колонии отсевают в пробирки на скошенную агаризованную среду. Иногда каплю суспензии, содержащую одну спору, помещают на стерильное стекло в чашку Петри и добавляют в нее кусочек агаризованной среды; после обрастания его мицелием гриба культуру

переносят в пробирку или чашку Петри. Возможно использование и других методов получения моноспоровых культур, которые указаны в специальной литературе.

### Поддержание и хранение чистых культур

После выделения культур и своевременной их очистки от посторонних организмов следует поддерживать чистые культуры в жизнеспособном состоянии. Простейший способ поддержания – пересев их через определенное время в пробирки на косяки свежей агаризованной среды. Периодичность пересевов зависит от вида гриба и определяется временем его выживаемости. При пересевах переносят, главным образом, споры, а у неспорообразующих форм – мицелий из краевой зоны колонии. Следует учитывать, что длительное выращивание грибов на искусственных средах может привести к изменению свойств культуры, в частности, к потере патогенности, снижению агрессивности и вирулентности. Для хранения выбирают лучшие из имеющихся культур. Культуры сохраняют при комнатной температуре или в холодильнике при температуре 4 °С. Пересевы (если культура хранится в холодильнике) делают реже. При хранении в пробирках обжигают снаружи пробки и оборачивают пергаментной бумагой (фольгой, полиэтиленом и т.д.). Периодичность посева зависит от вида гриба. Грибы родов *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, пересевают через 3 месяца, рода *Phytophthora* – каждые 3 недели.

Все культуры должны быть подписаны с указанием даты посева. Хранить их нужно в разных местах в нескольких повторностях. Культуры необходимо периодически просматривать (во избежание попадания клещиков).

Для длительного хранения грибов лучше использовать бедные сахарами крахмальные и целлюлозные среды. Сохранять культуры грибов можно также под минеральным маслом, в лиофилизованном состоянии

(после удаления воды из замороженных суспензий под вакуумом) и в жидком азоте в ампулах. Все культуры должны быть пронумерованы и зарегистрированы в специальных журналах, карточках, в которых записывают номер и название культуры, где и откуда она выделена, дату выделения, способ выделения, название сред, примененных при пересевах, результаты наблюдений за ростом патогена в чистой культуре и отмеченные при этом особенности.

## **2.9. Методы исследования**

Образцы почвы отобраны в соответствии с правилами отбора проб для микробиологического анализа (Методы ..., 1991). Выделение изолятов грибов рода *Trichoderma* из образцов почв, ризосферы, ризопланы корней и филлопланы, растительных остатков, плодовых тел макромицетов проводили в период 1997 — 2008 гг методом посева на специализированные среды (Звягинцев, 1989). Идентификацию штаммов вели по культурально-морфологическим (Александрова с соавт., 2001; Chaverri et al., 2003; Samuels, 2003) и генетическим признакам (Druzhinina et al., 2005). Описание строения репродуктивных органов, очертания спор, размеров мицелия проводили методом сканирующей электронной микроскопии. Для подтверждения видовой принадлежности проводили генетическую идентификацию. Исследовали участки ядерной рДНК, содержащий ITS1 и 2 и ген *tefl*. Результаты секвенирования фрагмента гена *tef1* обрабатывали при помощи пакета программ Lasergene 5.03 (DNASTAR, Inc., США). Для анализа секвенсных хроматограмм использовали программу SeqMan и дальнейшим выравниванием последовательностей и экспорта их в формате GCG с использованием программы MegAlign. Молекулярную идентификацию нуклеотидных последовательностей - с программой TrichoMark — TrichoBLAST.

Моноспоровые культуры грибов получали методом разведения конидиальной суспензии на жидких питательных средах с добавлением

глицерина (Лихачев, 1994). О стабильности моноспоровых и исходных штаммов судили по их разделению на кулмурально-морфологические типы (КМТ), появлению секторов при росте на чашках Петри. Цвет колоний определяли по шкале А.С. Бондарцева (1953). Вегетативную совместимость моноспоровых клонов изучали парным сращиванием колоний на среде Чапека, с последующим<sup>TM</sup> микроскопированием пограничной зоны между колониями. Характер проявления реакций при визуальной оценке и микроскопировании определяли по методу Ю.Т. Дьякова и А.В. Долговой (1995).

Способность к анаэробному росту изучали в анаэростатах («BioMerieux Co», Франция). Анаэробноз создавали с помощью газовых анаэробных пакетов «GENbox anaer» и контролировали индикаторами на основе резазурина ("Oxoid Limited", Англия). Активность спиртового брожения определяли у штаммов, проявивших способность к росту в условиях анаэробноза на жидкой минеральной среде. Содержание спирта в культуральной жидкости определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе модели Chrom 3700 с пламенно-ионизационным детектором, колонка SOVPOL (1,5 м) и Parapac Q (0,5 м), газ носитель - аргон, температура колонки 160 °С и 130 °С, испарителя 240 °С, детектора 250 °С.

Интенсивность утилизации органических соединений определяли методом Biolog Phenotype MicroArray (PM) system (Кожевин и др., 2008; Druzhinina, 2006; Tanzer et al., 2003). Оптимум роста при различных температурах определяли путем культивирования на сусло-агаре. Режим культивирования задавали в пределах 4-х градаций: 15-20, 20-25, 25-30 и 30-35 °С. Влияние тяжелых металлов на рост штаммов *Trichoderma* изучали путем культивирования штаммов на твердых и жидких средах, с добавлением различных концентраций от 0,01 до 10 ммоль/л меди, цинка, кадмия, свинца. Определение количества тяжелых металлов в растворах и

мицелии проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе Agilent 7500 Series ICP-MS.

Антагонистические свойства штаммов рода *Trichoderma* оценивали по показателям гиперпаразитической и антибиотической активности, в отношении фитопато генных микромицетов (Великанов, 1992; Егоров, 2005). Антибактериальную активность культуральных фильтратов и экстрактов мицелия штаммов в отношении условно-патогенных бактерий и резистентных госпитальных стафилококков оценивали методом лунок (Бурмистрова, 2005). Противоопухолевую активность компонентов культуральной жидкости, и экстрактов спор штаммов изучали *in vitro* на 4-х линиях опухолевых клеток и *in vivo* на аутрбедной линии ICR лабораторных мышей. Фильтраты культуральной жидкости и экстракты из спор штаммов рода *Trichoderma* тестировали на линиях опухолевых клеток, предоставленных лабораторией клеточных взаимодействий ИБХ РАН и Международным научным центром СО РАН. Для выявления у исследуемых образцов противоопухолевой активности проводили оценку цитостатичности *in vitro* с помощью MIT теста и оценку проапоптотической активности. Фракционный состав активных компонентов культуральной жидкости изучали на жидкостном хроматографе «Shimadzu» (Япония) на колонке с обращенной фазой Perkin Elmer C18 (250x4,6 мм, 5мкм) в градиенте ацетонитрила 0-100% в 0,1% трифторуксусной кислоте при скорости потока 1,5 мл/мин. и длине волны 214 нм.

Оценку токсичности исследуемых штаммов в отношении простейших проводили по методу Е.Г. Черемных (2005), состоящему из трех последовательных этапов. На втором этапе проводили оценку токсичности на тест-объектах *Tetrahymena rugiformis*. На третьем этапе исследований подбирали нетоксичную концентрацию и увеличивали время экспозиции объекта с использованием обеих популяций простейших. Ростстимулирующее действие метаболитов штаммов рода *Trichoderma*

изучали по показателям энергии прорастания и всхожести семян с использованием метода влажных камер (ГОСТ 13056.5-76). Оценку стимуляции роста проводили на культурах злаков и хвойных растений путем их культивирования с добавлением метаболитов штаммов. Пролиферацию каллусных культур проводили на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 1 % и 3 % концентрации фильтратов культуральной жидкости штаммов *Trichoderma* в питательную среду. Содержание индолилуксусной кислоты в культуральной жидкости штаммов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе KNAUER на колонке Zorbax с диаметром 4,6 мм, длиной 250 мм, заполненной обращенным фазовым сорбентом SB-C18 зернением 5 цм. В качестве элюента использовали раствор ацетонитрила с 2 % уксусной кислотой в соотношении (1:4). Детектирование осуществляли при  $\lambda$  280 нм. ИУК определяли в диапазоне от 0 до 5 мг/л ( $r=0,9998$ ), со стандартным отклонением пика 3,5 % ( $n=6$ ).

Биохимический состав биомассы и метаболитов грибов рода *Trichoderma* исследовали по следующим показателям: общее количество белка - по методу Кьельдаля (Емельянова, 1976); аминокислотный состав - на автоматическом аминокислотном анализаторе A0326V2 (Knauer, Германия), общее содержание триптофана - спектрофотометрическим методом, разработанным в Институте биохимии им. АН. Баха РАН, содержание липидов с их последующим разделением на нейтральные, глико - и фосфолипиды - по методу Блайя и Дайера (Кейтс, 1975).

Концентрацию селена в мицелии грибов рода *Trichoderma* измеряли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (атомно-абсорбционный спектрометр «Квант-гЭТА»), Процедуру минерализации проб в аналитических автоклавах проводили в соответствии с МУК 4.1.985-00. Перевариваемость мицелия проводили на установке «Искусственный желудок», разработанной в МГУ Ив.

Твердофазное культивирование грибов рода *Trichoderma* проводили на растительных субстратах: коре пихты исходной и после различных химических обработок, коре лиственницы; гидролизном лигнине, вегетативной части топинамбура исходного и после водной экстракции. Определение химического состава сырья после биодеструкции проводили по общепринятым в химии растительного сырья методикам (Химия древесины, 1994).

Полевые испытания биопрепаратов на основе штамма *T. harzianum* М99/5 проводили на посевах *Pinns sibirica* L. в Мининском лесном питомнике, расположенном на территории Мининского опытного лесного хозяйства (56°10'с.ш., 92°42'в.д). Классификацию категорий сеянцев определяли по количеству всходов в опыте и контроле и степень проявления болезни сеянцев. Полевые испытания препарата на основе штамма *T. asperellum* МГ/6 проводили на посевах пшеницы линии «КС-1554» и ячменя сорта «Красноярский-80» в Мининском ОПХ (56°10' с.ш., 92°42; в.д.). Результаты действия биопрепаратов оценивали после сбора урожая по следующим параметрам: масса 1000 зерен, высота растений, продуктивная кустистость, количество зерен в колосе, количество растений к уборке, урожайность. Влияние внесения биопрепаратов на микробиоту почв оценивали традиционными методами (Звягинцев, 1991; Сэги, 1983).

Статистическую обработку результатов экспериментов и оценку достоверности различий проводили по критерию Стьюдента для уровня вероятности не менее 95 % с использованием Microsoft Excel 2007 и Statistica 8.0.

#### **Физико-химические показатели.**

*Trihoderma* диапазоне рН от 2 до 8. Оптимальное значение рН 5,5-6,5. Перед посевом семян определяли значение рН почвы индикаторной бумагой диапазоном 4,5-6,5.

Физико-химические свойства триходермина:

1. внешний вид- однородная суспензия;
2. содержание сухих веществ, %- 17-29;
3. массовая доля частиц размером более 100 мкм, % не более- 0,1;
4. общий титр спор, млрд. спор/см<sup>3</sup> не менее- 1.0;
5. диаметр зоны подавления роста тест культуры, мм не менее- 30.0.

#### 2.4 Приготовление питательной среды.

Для культивирования триходермы используют питательные среды следующего состава (г/дм<sup>3</sup>)

№ – 1	№ – 2
Глицерин – 3-20 см <sup>3</sup>	Кукурузный экстракт – 10
Зеленая патока – 5-30	Меласса – 30
Гидролизат белково-витамин-ного концентрата – 3-20	Двузамещенный фосфорнокислый калий – 2-6
Калий фосфорнокислый – 2-6	Азотнокислый аммоний – 3-6
Сернокислый магний – 3-5	Сернокислый магний – 2-5
Азотнокислый аммоний – 3-6	
Вода – 1 см <sup>3</sup>	Вода - 1

## Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1. Изучение влияния местного штамма *Trichoderma lignorum* spp 3М на прорастание семян

В теперешних условиях остро стоит проблема поиска новых перспективных направлений в сельском хозяйстве при использовании технологий, безопасных для здоровья человека, животных и биоты вообще.

В связи с этим происходит постепенный переход от интенсивного промышленного сельскохозяйственного производства к альтернативному (в частности биологическому или экологическому), которое предусматривает рациональные пути использования энергетических ресурсов и уменьшение загрязнения окружающей среды, получение высококачественной сельскохозяйственной продукции, сохранение и повышение плодородия грунта, безотходное использование сельскохозяйственной продукции.

Одной из составных частей экологического ведения сельского хозяйства является применение бактериальных микробиологических препаратов, направленных на улучшение питания растений, продукта биоконверсии отходов растительного происхождения — биогумата и биологических средств защиты растений. Поскольку овощи являются основным источником витаминов, ферментов, микроэлементов, минеральных солей, других биологически активных веществ и входят в незаменимые продукты рационального питания человека, которые потребляются преимущественно в свежем виде, требования относительно их качества довольно высокие. Для обеспечения высоких количественных и качественных показателей урожайности необходимо соблюдение технологий выращивания культуры.

Применение биопрепаратов при выращивании овощных культур стимулирует рост и развитие растений, улучшает азотное и фосфорное

питание, повышает их стойкость к фитопатогенам и, как результат, оказывает содействие повышению урожайности и качества продукции, дает возможность не только экономить значительное количество энергии, но и создает благоприятный фон для земледелия в целом, поскольку это оказывает содействие повышению плодородия грунтов при использовании значительно меньшего количества минеральных удобрений и, как следствие, снижению уровня загрязнения окружающей среды.

Сельскохозяйственные растения подвержены ряду заболеваний, вызываемых. Существуют методы интегрированной защиты растений, предусматривающие выбор таких средств подавления микроорганизмов, которые бы не только сохраняли, но и активировали действие полезных. Интегрированная борьба должна представлять идеальную комбинацию биологических, агротехнических, физических методов защиты растений против комплекса вредителей и болезней определенной культуре и направленно регулировать численность вредных видов до хозяйственно неощутимых количеств при сохранении деятельности полезных природных организмов [72, 75, 77, 78].

В последнее время усилилось внимание к разработке биологических средств борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных, технических, плодовых культур. Биологические препараты при своей специфичности и высокой эффективности позволяют избежать многих нежелательных изменений в биоценозах, устранить загрязнения окружающей среды, они безвредны для растений, животных и человека [74,].

Многочисленными исследованиями было показано, что некоторые микроорганизмы-антагонисты могут существенно стимулировать рост, развитие, обменные процессы растений и, при правильном применении биотехнологии, можно существенно повысить урожай и улучшить его качество; это объясняется тем, что микроорганизмы способны к продуцированию ростовых веществ и антибиотиков, иммунизации

растений, увеличению поглотительной активности корней. В настоящее время усиление роста растений при помощи микроорганизмов осуществляется как непосредственным применением микробов-активаторов, так и использованием микробных метаболитов разной степени очистки [81, 8570].

Целью исследований было выявить влияние местного штамма *Trichoderma lignorum spp 3 M* на рост и развитие томата в условиях защищенного грунта. Для анализа использовали семена томата Авиценна.

Штаммами *Trichoderma lignorum spp 3M*. вносили следующими методами :

- опудривания семян штаммом *Trichoderma lignorum spp 3*;
- полив суспензий *Trichoderma lignorum 3M* одновременно с посевом;

По данным таблицы видно (таб. 3.1), что самая высокая всхожесть семян наблюдалась в третьем варианте - 98,3%, всходы томата появились на неделю раньше, чем была проведена обработка почвы *Trichoderma lignorum 3M*. Самая низкая всхожесть была во 2 варианте – 88,3% , что на 10% ниже, чем в опыте 2.

Таблица 3.1

Влияние сроков внесения *Trichoderma lignorum 3M*. на всхожесть семян томата

Варианты	Посеяно семян в ящик (штук)	Взошло семян			
		По повторности		В среднем по повторностям	В % от числа посеянных семян
		I	II		
1 вариант контроль	30	30	28	29	96,7
2 вариант Опыт 1	30	25	28	26,5	88,3
3 вариант Опыт 2	30	30	29	29,5	98,3



Рис 3.1..Показатели диаграммы Влияние сроков внесения *Trichoderma lignorum* 3М. на всхожесть семян томата

Нами также было изучено влияние штамма *Trichoderma lignorum* spp 3 на физиолого-морфологические особенности томатов и на их урожайность в условиях защищенного грунта.

Для анализа использовали 14-, 21-, 28-, 35-дневные растения томатов сорта Авиценна, условиях защищенного грунта. Температура в условиях защищенного грунта колебалась в пределах 28°-31°С, влажность воздуха была 70-75%.

Фенологические наблюдения проводили ежедневно. Энергию прорастания определяли на 10-е сутки после посева, а всхожесть на 21-е сутки [82, 83].

Находили длину надземной части и корневой системы, количество листьев, сырую и сухую биомассу, общее количество хлорофилла [69, 71]. Для определения объема корневой системы, общей и адсорбирующей поверхности корневой системы использовали методы [84], рН определяли по методике [68].

В первой серии исследований изучали влияние *Trichoderma lignorum* 3М на ростовые процессы томатов сорта Авиценна , выращенных в течение 42 суток .

Штаммами *Trichoderma lignorum spp* 3М. вносили следующими методами :

- опудривания семян штаммом *Trichoderma lignorum spp* 3;
- полив суспензий *Trichoderma lignorum* 3М одновременно с посевом;
- полив суспензий седьмые сутки после появления всходов.

Контролем служил вариант, где семена не были обработаны исследуемого гриба. Результаты экспериментов приведены в табл. 3.2.

Таблица 3.2.

Влияние штамма *Trichoderma lignorum spp* 3М на некоторые физиолого-морфологические показатели томатов

Варианты опыта	Длина надземной части, см	Длина корневой системы, см	Количество листьев, шт.	Объем корневой системы, см <sup>3</sup>	Сырая биомасса, г	Сухая биомасса, г
Контроль, 14-е сутки	12,58±0,98	2,43±0,58	4,0±0,55	1,105±0,035	1,61±0,01	0,26±0,16
Обработка семян триходермой, 14-е сутки	18,08±0,74	3,40±1,96	5,0±0,3	3 0,200±0,028	3,58±0,78	0,50±0,06
Полив триходермой, 14-е сутки	15,85±1,27	2,83±0,46	4,0±0,29	0,125±0,041	2,35±0,83	0,36±0,11
Полив триходермой с	17,43±0,77	3,83±0,43	4,0±0,0	0,200±0,014	2,74±0,4	6 0,17±0,03

посевом, 14-е сутки						
Контроль 31-е сутки	35,05± 0,57	13,43± 0,94	11,00± 0,55	1,750± 0,780	44,77± 13,53	4,13±1,83
Обработка се-мян триходер- мой, 31-е сутки	41,10± 1,47	11,89± 0,53	11,00± 0,87	1,550± 0,350	38,37± 13,63	3,52±0,85
Полив триходер- мой, 31-е сутки	41,15± 2,34	12,55± 1,66	11,00± 0,75	2,500± 0,710	46,17± 6,41	3,78±0,45
Полив триходер- мой с посевом, 31-е сутки	35,50± 2,71	14,75± 1,80	11,00± 0,55	3,000± 0,280	37,58± 3,07	3,96±0,18



Рис.3.2. Диаграмма влияния штамма *Trichoderma lignorum spp 3M* на некоторые физиолого-морфологические показатели томатов на 14-е сутки

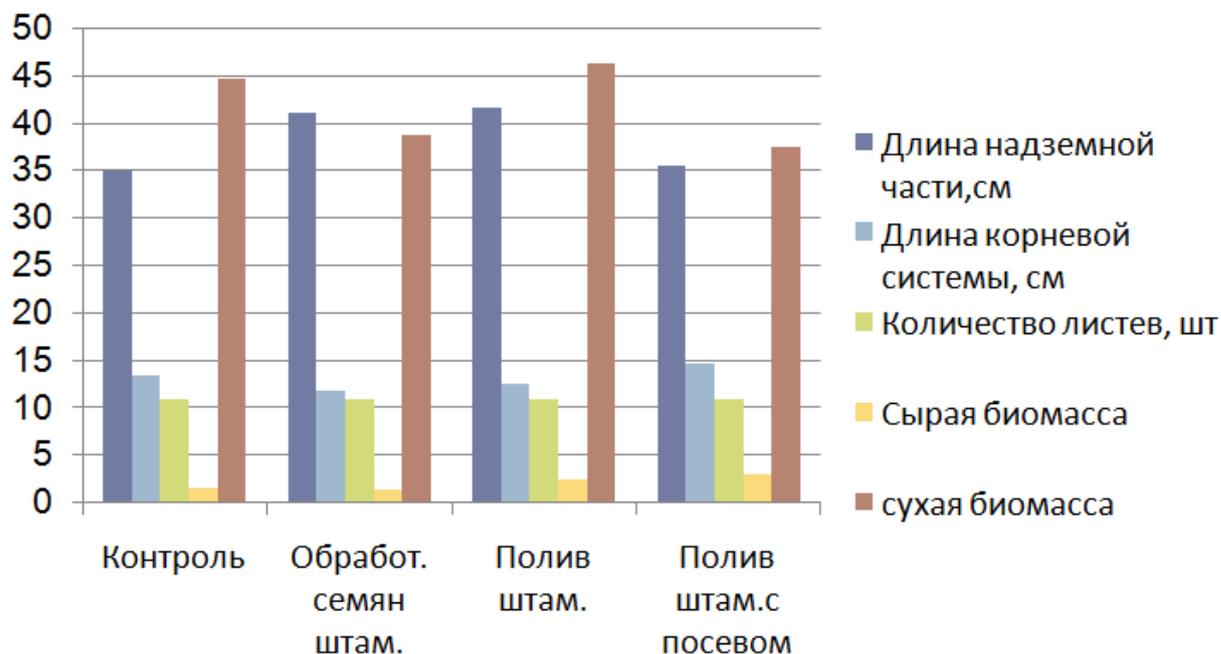


Рис.3.3. Диаграмма влияния штамма *Trichoderma lignorum spp 3M* на некоторые физиолого-морфологические показатели томатов на 31-е сутки

В ходе исследований было установлено, что при обработке семян томатов методом опудривания *Trichoderma lignorum spp 3M* получали наибольший эффект. Все исследуемые показатели были выше по сравнению с контрольным. Например, на 14-е сутки на длину надземной части увеличилась на 44%, длина корневой системы на 16%, количество листьев на 25%, сырая биомасса более чем в 2 раза, сухая на 92%, объем и поверхность корневой системы на 90-92%. В других вариантах исследуемые параметры были более низкие, исключение составляли варианты полив триходермой и полив с посевом для поверхности корневой системы. Было отмечено, что при обработке семян триходермой появление всходов, цветение происходило на 5-7 суток раньше по

сравнению с другими вариантами. Всходы были более однородными, проростки становились толще, тургосцентнее, зеленее.

Было замечено, что стимулирующий эффект обнаруживался уже на самых ранних стадиях развития растений, начиная с прорастания семян. Опудривание семян грибом *Trichoderma lignorum spp 3M* увеличивало энергию прорастания семян на 10-12%, а всхожесть на 6% растений по сравнению с контрольным вариантом. Это, вероятно, связано с тем, что обмен веществ у семян растений с внешней средой весьма ограничен, особенно в период покоя, а интенсивный обмен веществ и биохимические превращения начинаются у них с момента подготовки к прорастанию и в процессе его, поэтому влияние биогенных веществ на само растение, на его состояние, на его ростовые процессы связано непосредственно с проникновением их в семена уже во время прорастания последних. Активные вещества, вырабатываемые *Trichoderma*, вероятно, и оказывают столь существенное влияние на всхожесть семян, одновременно активируются и биохимические процессы в прорастающем семени, поэтому при опудривании семян штаммом *Trichoderma lignorum spp 3M* увеличивается и сырая, и сухая биомассы растений по сравнению с контролем (табл.3.3.). Например, на 36-е сутки у томатов сырая биомасса достоверно увеличилась на 55%, а сухая на 79%, чем в контроле.

Таблица 3.3.

Влияние штамма *Trichoderma lignorum 3M* на некоторые параметры томатов сорта Авиценны

Вариант опыта	Длина надземной части, см	Сырая биомасса, г	Сухая биомасса, г	Содержание общего хлорофилла, % к сырой массе
Контроль: семена не обработаны триходермой	13,04±0,60	1,28±0,21	0,15±0,01	0,07±0,01

Опыт: семена обработаны триходермой	23,92±1,82	1,98±0,26	0,27±0,01	0,08±0,01
---	------------	-----------	-----------	-----------



Рис.3.3. Диаграмма влияния штамма *Trichoderma lignorum* 3M на некоторые параметры томатов сорта Авиценны

В ходе экспериментов было установлено, что на начальных этапах роста растений большее содержание хлорофилла в листьях характерно для контрольных растений; это, вероятно, связано с тем, что при интенсивном росте исследуемых растений хлорофилл не успевает накапливаться в достаточном количестве. В дальнейшем, когда происходит постепенная стабилизация роста, при которой опытные и контрольные растения выравниваются, наблюдается большее содержание хлорофилла в опытных вариантах. Необходимо отметить, что особенно существенную разницу наблюдали на 26-36-е сутки; при дальнейшем выращивании эта разница несколько сглаживалась, однако процесс накопления биомассы продолжался довольно интенсивно на протяжении всего вегетационного периода, как и в опытах с томатами в условиях защищенного грунта .

Следует заметить, что томаты, выращенные из семян, обработанных штаммом *Trichoderma lignorum spp 3M*, зацветали, давали завязь и начинали плодоносить на 7-8 дней раньше контрольных растений. Кроме того, у опытных растений количество кистей на 27% больше чем у контрольных, а количество генеративных органов на одном растении в 3 раза превышало соответствующее значение в контроле.

Отмечено более раннее созревание плодов в опытном варианте, масса плода в среднем на 18% больше по сравнению с контролем (табл. 3.4.). Все это дает дополнительную прибавку к урожаю. Так, с каждого опытного растения томата собрано в среднем на 1-2 плода больше чем в контроле, что обеспечивало увеличение урожайности на 3,3 кг/м<sup>2</sup>

Таблица 3.4.

Влияние *Trichoderma lignorum spp 3M* на урожайность томатов сорта  
Авиценны, выращенных в условиях защищенного грунта

Возраст, сут	Варианты опыта	Длина надземной части, см	Количество листьев, шт	Количество кистей, шт.	Количество плодов, шт.	Масса плода, г
90	Контроль: семена, не обработанные триходермой	25,57±5,43	6,07±0,91	нет	нет	нет
	Опыт: семена, обработанные триходермой	37,63±6,61	9,73±0,66	1,57±0,36	1,50±0,33	25,37±3,39
130	Контроль: семена, не обработанные триходермой	65,20±6,43	15,20±0,70	2,53±0,50	13,80±0,60	41,92±3,99
	Опыт: семена, обработанные триходермой	89,01±7,29	16,60±0,75	3,21±0,67	14,60±0,68	49,63±4,03

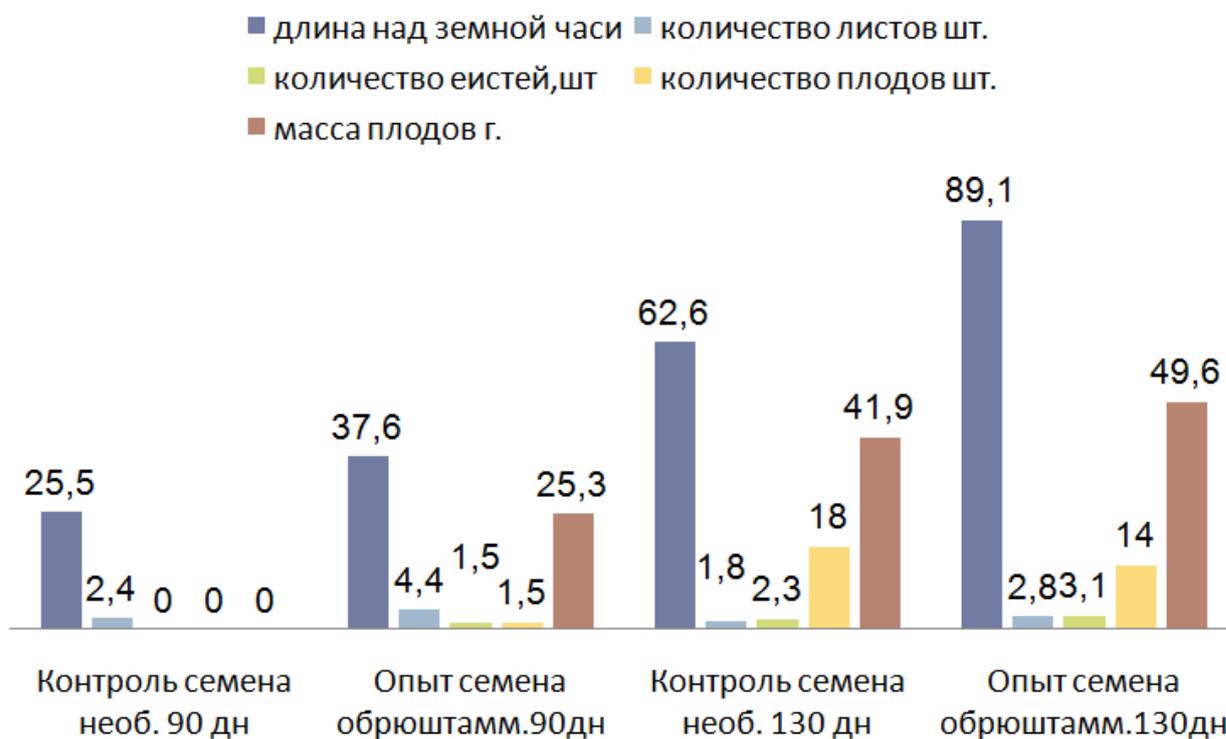


Рис. 3.5. Показание влияния *Trichoderma lignorum spp 3M* на урожайность томатов сорта Авиценны, выращенных в условиях защищенного грунта

Грибы рода *Trichoderma* оказывают существенное влияние на ростовые процессы исследуемых растений. Наиболее четко стимулирующее действие грибного препарата проявляется на ранних сроках вегетации. При дальнейшем выращивании разница между контрольными и опытными вариантами по ряду параметров постепенно сглаживается, однако накопление биомассы у томатов, обработанных споровым материалом гриба, продолжалось интенсивно на протяжении всего вегетационного периода.

При использовании микробов-антагонистов, вероятно, важно не столько сохранение их до конца вегетационного периода, сколько проявление присущей им бурной жизнедеятельности в прикорневой зоне растений в момент появления всходов и роста проростков и корешков, то есть в тот период, когда растение больше всего нуждается в защите от нападения возбудителей инфекционных заболеваний и дополнительных,

стимулирующих рост веществах.

На основании проведенных исследований можно предположить, что на исследуемые растения штамма *Trichoderma lignorum spp 3M* способен оказывать влияние не по гиббереллиновому эффекту, а скорее по ауксиновому, при котором происходит не только вытягивание растений, но и накопление сырой и сухой биомассы. Во время дальнейшего развития растений удлинение стебля тормозится из-за изменения направления роста стеблей с продольного на поперечное, что приводит к его утолщению, наблюдается более раннее появление плодов и их созревание.

### **3.2. Влияние *Trichoderma lignorum 3M* на поражаемость рассады черной ножкой.**

Среди многочисленных проблем, которые возникают при выращивании томата, в комнатных условиях наибольшую опасность представляет заболевание черная ножка. Учет числа пораженных растений проводился дважды: 1-й раз – в фазу всходов, 2-й – через 2 недели после первого. Полученные данные представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Количество здоровых растений в зависимости от сроков внесения *Trichoderma lignorum 3M*.

Варианты	Количество Пораженных растений		
	В фазе всходов (шт)	Через две недели после первого (шт)	В % от количества всходов
1 вариант контроль	29	26,5	91,4
2 вариант опыт 1	26,5	24	90,6
3 вариант опыт 2	29,5	13,5	45,8

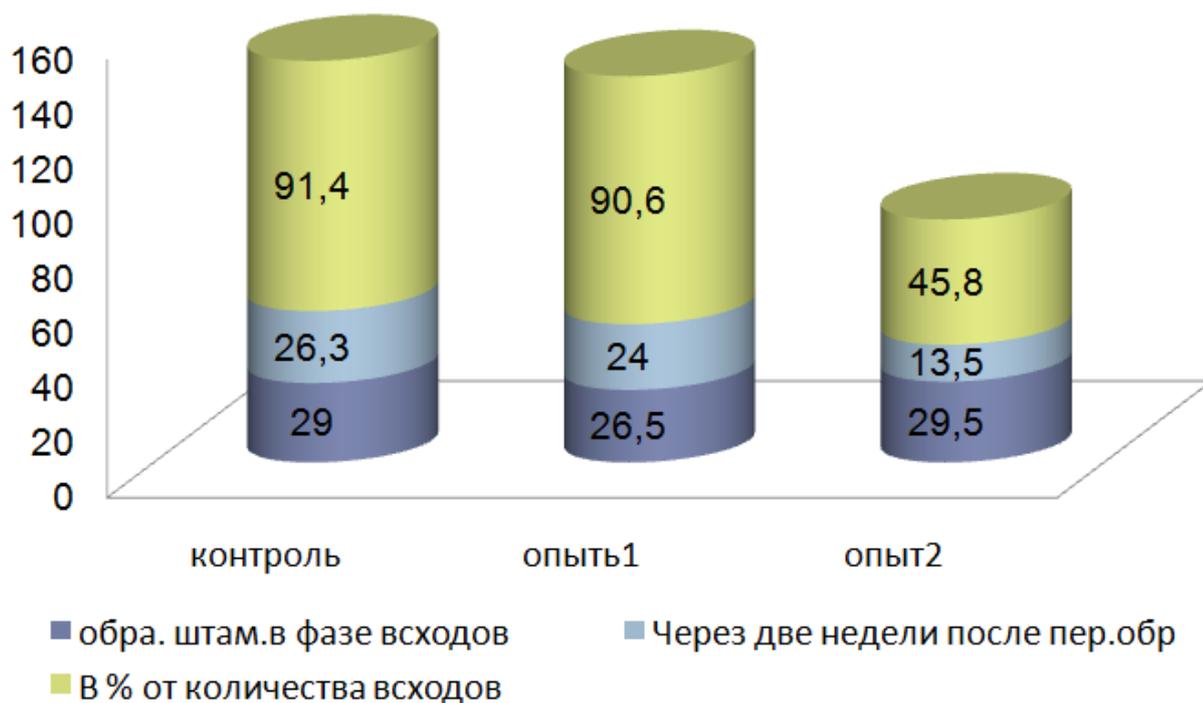


Рис. 3.6. Количество здоровых растений в зависимости от сроков внесения *Trichoderma lignorum* ЗМ.

Учёт проведенный после 7 дней после посадки семян показал, что больше всего зараженных растений в контрольном варианте – 91,4%, в опудренном варианте зараженные растения составляли 90,6%, а больше в обработанном суспензии *Trichoderma lignorum spp* ЗМ

Пораженные растения составляли – 54,2 %.

## ВЫВОДЫ

1. При изучении влияния *Trichoderma lignorum* spp 3М на всхожесть семян полученные результаты свидетельствуют что самая высокая всхожесть семян наблюдалась в третьем варианте - 98,3%, всходы томата появились на неделю раньше. Самая низкая всхожесть была во 2 варианте – 88,3% , что на 10% ниже, чем в опыте 2.

2. Было изучено влияние штамма *Trichoderma lignorum* spp 3 на физиолого-морфологические особенности томатов и на их урожайность в условиях защищенного грунта. В ходе исследований было установлено, что при обработке семян томатов методом опудривания *Trichoderma lignorum* spp 3М получали наибольший эффект. Все исследуемые показатели были выше по сравнению с контрольным.

3. При исследовании было замечено, стимулирующий эффект обнаруживался уже на самых ранних стадиях развития растений, начиная с прорастания семян. Опудривание семян грибом *Trichoderma lignorum* spp 3М увеличивало энергию прорастания семян на 10-12%, а всхожесть на 6% растений по сравнению с контрольным вариантом.

4. Активные вещества, вырабатываемые *Trichoderma*, вероятно, и оказывают столь существенное влияние на всхожесть семян, одновременно активируются и биохимические процессы в прорастающем семени, поэтому при опудривании семян штаммом *Trichoderma lignorum* spp 3М увеличивается и сырая, и сухая биомассы растений по сравнению с контролем. На 36-е сутки у томатов сырая биомасса достоверно увеличилась на 55%, а сухая на 79%, чем в контроле.

5. В ходе экспериментов было установлено, что на начальных этапах роста растений большее содержание хлорофилла в листьях характерно для контрольных растений; это, вероятно, связано с тем, что при интенсивном росте исследуемых растений хлорофилл не успевает накапливаться в достаточном количестве. В дальнейшем, когда происходит постепенная

стабилизация роста, при которой опытные и контрольные растения выравниваются, наблюдается большее содержание хлорофилла в опытных вариантах. Необходимо отметить, что особенно существенную разницу наблюдали на 26-36-е сутки;

6. Показано, что томаты, выращенные из семян, обработанных штаммом *Trichoderma lignorum* spp 3M, зацветали, давали завязь и начинали плодоносить на 7-8 дней раньше контрольных растений. Кроме того, у опытных растений количество кистей на 27% больше чем у контрольных, а количество генеративных органов на одном растении в 3 раза превышало соответствующее значение в контроле.

7. Отмечено более раннее созревание плодов в опытном варианте, масса плода в среднем на 18% больше по сравнению с контролем. Все это дает дополнительную прибавку к урожаю. Так, с каждого опытного растения томата собрано в среднем на 1-2 плода больше чем в контроле, что обеспечивало увеличение урожайности на 3,3 кг/м<sup>2</sup>

8. Учёт проведенный после 7 дней после посадки семян показал, что больше всего зараженных растений в контрольном варианте – 91,4%, в втором варианте зараженные растения составляли 90,6%, а больше в третьем варианте пораженные растения составляли – 54,2 %.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Штерншис М.В. Биологическая защита растений: учебник / М.В. Штерншис, С.У. Джалилов, И. В. Андреева, О. Г. Томилова; под ред. М.В. Штерншис. - М.: КолоС, 2007. - 264с.

2. Алимова Ф. К. Trichoderma/ Нурореа (Fungi, Ascomycetes, Нурореаles): таксономия и распространение: учеб. / Ф.К. Алимова. - Казань: УНИПРЕСС ДАС, 2006. - 260 с.

3. Гнеушева И.А. Биологическая активность грибов рода Trichoderma и их промышленное применение / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, И.В. Яковлева // Вестник Орловского государственного аграрного университета - 2010. - № 3. - С. 36-38.

4. Benitez T.V. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains / T.V. Benitez, A.M. Rincon, M.C. Limon, A.C. Codon // International Microbiology. - 2004. - Vol. 7, №4. - P. 60-63.

5. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода Trichoderma: учеб. пособие / Ф.К. Алимова, Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова. - Казань: УНИПРЕСС ДАС, 2007. - 234 с.

6. Бабицкая В.Г. Грибы - эффективные деструкторы лигноцеллюлозных субстратов: их морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика / В.Г. Бабицкая. - М.: Новая Волна, 2003. - 38 с.

7. Claus H.M. Laccases: structure, reactions, distribution / H.M. Claus // Micron. - 2008. - Vol. 35, №2. - P. 6-10.

8. Алимова Ф. К. Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода Trichoderma в сельском хозяйстве. - Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2006. - 4 с.

9. Vinale F Trichoderma secondary metabolites that affect plant metabolism/ F. Vinale. K. Sivasithamparam E.L. Ghisalberti, S. Wood , M. Lorito // Nat Prod Commun. - 2012. - Vol. 11, №7. - P. 50-52.

10.Keswani C Keswani. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various Trichoderma spp. / C. Keswani, S. Mishra, B.K. Sarma,

11.S.P. Singh // Appl Microbiol Biotechnol. - 2013. - Vol. 2, №98. - P. 44-47.

12.Triveni S. Optimization of conditions for in vitro development of Trichoderma viride - based biofilms as potential inoculants / S. Triveni, R. Prasanna A.K. Saxena // Folia Microbiologica - 2012. - Vol. 57, № 5

13.Raman J. Response of Azotobacter, Pseudomonas and Trichoderma on Growth of Apple Seedling / J. Raman // Department of Botany and Microbiology. - 2012. - Vol. 40, №3. - P. 83-90.

14.Коломбет Л.В. Грибы рода Trichoderma - продуценты биопрепаратов для растениеводства / Успехи медицинской микологии. - М., 2007. - С. 323-371.

15.Zeilinger S. Signal transduction in host sensing and mycoparasitic response of Trichoderma atroviride / S. Zeilinger , K. Brunner, B. Reithner , I. Peissl// Molecular Biotechnology . - 2012. - Vol. 8, №1. - P. 34-38.

16.Inuwa M. Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production / M. Inuwa Microbiol. - 2013. - Vol. 12, №6. - P. 23-28.

17.Cianchetta S Hydrolytic potential of Trichoderma spp. strains evaluated by microplate - based screening followed by switchgrass saccharification /

18.S. Cianchetta , S. Galletti, P.L. Burzi true&cauthoruid, C. Cerato // Enzyme Microb Technol. - 2012. - Vol. 50, №6. - P. 10-16.

19.Штерншис М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России / М.В. Штерншис // Вестник Томского государственного университета tomskogo-gosudarstvennogo-universiteta-biologiya. -2012. - № 2. - С. 92-100.

20. Садыкова В.С. Перспективы использования грибов рода *Trichoderma* в защите злаков от корневых гнилей в Сибири / В.С. Садыкова, П.Н. Бондарь // Вестник Крас ГАУ. - 2010. - № 2. - 34 с.

21. Садыкова В.С. Биологическая активность сибирских штаммов *Trichoderma* как фактор отбора для создания биопрепаратов защиты растений нового поколения / В.С. Садыкова, Т.И. Громовых, А.Н. Лихачев [и др.] // Биотехнология, 2007. - №6. - 12 с.

22. Громовых Т.И. Новые аборигенные штаммы грибов рода *Trichoderma*, распространенные на территории Средней Сибири / Т.И. Громовых, С.В. Прудникова, В.С. Громовых // Микология и фитопатология. - 2010. - Т. 35. - 56-61 с.

23. Сидоров А.А. Эколого-биологические основы патогенеза злаковых культур при поражении возбудителями корневых гнилей. - М.: Общество фитопатологов, 2001. - 182 с.

24. Горьковенко В.С. Фитопатогенный комплекс возбудителей корневых гнилей ярового ячменя / В.С. Горьковенко // Защита и карантин растений. - 2005. - № 8. - С. 32-33.

25. Громовых Т.И. Фитопатогенные микромицеты семян хвойных в Средней Сибири: видовой состав, экология, биологический контроль: автореф. дис. д-ра биол. наук / Т.И. Громовых; М-во образования РФ, Красноярск. гос. ун-т. - Красноярск, 2002. - 37 с.

26. Lord J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control / J.C. Lord // J. Invertebrate Pathology. - 2005. - Vol. 89, №1. - P. 19-29.

27. Берестецкий А.О. Проблемы и достижения в области биологической борьбы с сорными растениями при помощи фитопатогенных грибов / А.О. Берестецкий // Микология и фитопатология. - 2004. - 14 с.

28. Глупов В.В. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты/ под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2006. - 736 с.
29. Орловская Е.В. Биологические аспекты использования энтомопатогенов для регуляции численности насекомых - вредителей леса / Е.В. Орловская // Информационный бюллетень ВПС МОББ, 2002. - № 33. - С. 141-146
30. Белик В.Ф. Ваш огород. Маленькая энциклопедия, М.: Большая Российская энциклопедия. 1999.-480 с.
31. Ганичкина О.А., Ганичкин А.В. Ваш огород. Справочник огородника. М.: ООО «Гамма -С.А.» 1999 –352с.
32. Ганичкина О.А., Ганичкин А.В., Фатьянов В.И. Настольная книга огородника и садовода. М.: ИД «Прибой» 1998-464 с.
33. Гулий В.В., Памужак Н.Г. Справочник по защите растений для фермеров. К.: Universitas, М.: Росагросервис, 1992 –464 с.
34. Каратаев Е.С, Русанов Б.Г., Бешанов А.В. и др.: Настольная книга овощевода: Справочник. М.: Агропромиздат, 1990.-288с.
35. Корчагин В.Н. Защита растений от вредителей и болезней на садово-огородном участке: Справочник. М.: Агропромиздат, 1987-317с.
36. Мамонов Е.В. Сортовой каталог. Овощные культуры. М.: ЭКСМО-Пресс. 2001.-496 с.
37. Пивоваров В.Ф, Овощи России. М.: АО «Российские семена» 1994.-256с.
38. Слесарев В.И. Химия: Основы химии живого: Учебник для вузов. -2-е изд., испр. и доп. – СПб: Химиздат, 2001. 784 с.:ил.
39. Тарасенко О.И. Ваш огород. Смоленск: Русич, 1999-576 с.
40. Трайтак Д.И. Основы сельского хозяйства. Сельскохозяйственный труд. Учебник для 5-7 классов сельской школы. М.: Мнемозина. 1998-285 с.

41. Тимофеева С.Ф. Энциклопедия огородника. М.: АСТ-Пресс.1999-720с.
42. Федоров А.А. Жизнь растений. М.: Просвещение.1976-479 с.
43. Хессайон Д.Г. Все об овощах М: Кладезь-Букс.1999-143с.
44. Щадрина О.В. Новые методы - в защиту льна от болезней. Газета «Земля Вологодская» 2002,март.с.-4.
45. Садыкова, В.С. Изменчивость вида *Trichoderma asperellum* и отбор штаммов для создания биопрепаратов на гидролизном лигнине/ В.С. Садыкова: Дис. канд. биол. наук. -М. 2003.-198 с.
46. Садыкова, В.С. Перспективы использования грибов рода *Trichoderma* в защите злаков от корневых гнилей в Сибири / В.С. Садыкова, Бондарь П.Н. // Вестник КрасГАУ. 2010. - №2 (41). - С. 34-39.
47. Н.Н. Слинкина: Автореф. канд. биол наук. Владивосток. 2009.- 19 с.340159. Стаканов, В.Д. Характеристика лесного покрова / В.Д. Стаканов // Лесные экосистемы Енисейского меридиана. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2002. С. 19-24.
48. Тюльпанова, В.А. Биотехнология новых форм грибных фунгицидов для защиты растений / В.А. Тюльпанова, Т.И. Громовых, А.Л. Малиновский,341
49. Т.Ю. Нечитайло, П.Н. Голышин, А.В.Кураков, Б.А. Вызов, Д.Г.Звягинцев // Микробиология. -2007. Т. 76. - № 1. - С. 55-65.
50. Abdel-Azim, M. Novel sorbicillinoid derivatives from the marine fungus *Trichoderma viride* associated with the Caribbean sponge *Agelas dispar*/ M.Abdel-Azim, Bonn Abdel-LateffZ/J. Nat Prod. 2007. -63. -P. 225 - 232.
51. Adams, P. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 Mediates Growth Promotion of Crack Willow (*Salix fragilis*) Saplings in Both Clean and Metal-Contaminated Soil / P.Adams, F. A. A. M.De-Leij, J. M. Lynch // Microby Ecology.-2007.-Vol. 54.-P. 306-313.

52. Alguacil, F.J. Biotratamiento de contaminantes de origen inorganic/ F.J. Alguacil, Y. Merino // Rev. Metal. Madrid. 1998. - 34.-P. 428-436.
53. Andrade, R. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. III. Two new tetronic acids: 5-hydroxyvertinolide and bislongiquinolide / R. Andrade, W.A. Ayer, L.S. Trifonov // Aust J Chem. -1997. Vol. 50. - P. 255-257
54. Aydogdu, H. Airborne fungi in child day care centers in Edirne City, Turkey / H. Aydogdu, A. Asan // Environ Monit Assess. 2008 -. Vol.-147.- P. 423444.
55. Bakker, P.A.H.M. Understanding the involvement of rhizobacteria mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases /
56. Carsolio, C. Characterization of ech42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism / C. Carsolio, A. Gutierrez,
57. C. Cortes-Penagos, J. Lopez-Bucio // Plant Physiol. 2009. - Vol.149. - P. 15791592.
58. Delgado-Jarana, J. Overproduction of  $\beta$ -1,6-glucanase in *T. harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH / J. Delgado-Jarana, J.A. Pintor-Toro, T. Benitez // Biochim. Biophys. Acta. 2000. - Vol. 1481. - P.289-296.
59. Druzhinina, I. Global carbon utilization profiles of wild type, mutant and transformant strains of *Hypocrea jecorina* / I. Druzhinina, M. Schmoll, B. Seiboth, C. P. Kubicek // Appl Environ Microbiol. -2006. Vol. 72. - P. 2126-2133.
60. Farr, D.F. Fungi on Plant Products in United States / D.F. Farr, G.F. Bills, G.P. Chamuris, A.Y. Rossman // St. Paul. Minnesota: APS Press. 1989. - 999 p.
61. Hanada, R.E. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao / R.E. Hanada, W.V. Pomella, W. Soberanis, L. L. Loguercio, J. O. Pereira // Biological Control. 2009. - Vol. 50-P. 143-149.

62. Huang, Z. Metabolic biodiversity of *Trichoderma* / Z. Huang, W.J. Zheng, B.J. Guo // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2002. -Vol.18. - N 3.-P. 373-376.
63. Liu, R. Trichodermamide A and aspergillazine A, two cytotoxic modified dipeptides from a marine-derived fungus *Spicaria elegans* / R. Liu, Q.Q. Gu, W.M. Zhu, C.B. Cui, G.T. Fan // *Arch Pharmacol Res*. 2005a. - - Vol. 28. - P. 1042-1046.
64. Martin, P. Site and seasonal influences on the fungal community on leaves and stems of *Pinus* and *Quercus* seedlings in forest nurseries / P. Martin, J.A. Pajares, N. Nanos, J.J. Direz // *Sydowia*. 2004. - 450 p.
65. Shoresh, M. Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required for *Trichoderma*-conferred plant resistance / M. Shoresh, A. Gal-On, D. Leibman, I. Chet // *Plant Physiol*. 2006. - Vol. 142. - P. 1169-1179.
66. Якушин, С.С. Влияние селенсодержащей добавки к пище на обеспеченность селеном больных ишемической болезнью сердца / С.С. Якушин, В.К. Мазо, Н.С. Сазонова и др. // *Вестн. новых мед технологий*. 2003. - Т. 10. -№ 3. - С. 84.
67. Garcia-Toledo, A. Training of *Rhizopus stolonifer* and *Cunninghamella blakesleeana* to copper: cotolerance to cadmium, cobalt, nickel and lead /A.Garcia-Toledo,Н. Babich,G. Stotzky// *Can. J. Microbiol.*-1985. - Vol. 31. -P. 485-492.
68. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв/ Е.В.Аринушкина. М.: Изд-во МГУ, 1990. 487с.
69. Бугакова А.Н. Физиология растений: Малый практикум/ А.Н.Бугакова, Т.И.Голованова. Красноярск: Изд- во КГУ, 1983. 30 с.
70. Возняковская Ю.М. Значение продуктов микробного синтеза для повышения качества урожая/ Ю.М.Возняковская// *Микроорганизмы в сельском хозяйстве*. М.: Изд-во МГУ, 1970. С. 295-300.

71. Викторов Д.П. Малый практикум по физиологии растений/ Д.П.Викторов. М.: Высш. шк., 1983. 135 с.
72. Воронин Г.Н. Наш ориентир биометод/ Г.Н.Воронин// Защита растений. М.: Агропромиздат, 1994. №1. С.6 - 7.
73. Гавриш С.Ф. Томаты/ С.Ф. Гавриш. М.: Россельхозиздат, 1987. 71 с.
74. Еремеев А.П. Биологический метод в защищенном грунте/ А.П. Еремеев// Защита растений. М.: Агропромиздат, 1994. №11. С.18-19.
75. Когут М.М. Ризоплан против корневых гнилей/ М.М. Когут, Ю.А.Калус, Я.К.Назаренко, В.Г.Бурячковский// Защита растений. М.: Агропромиздат, 1986. №8. С. 14-15.
76. Лакин Г.Ф. Биометрия/ Г.Ф.Лакин. М.: Высш. шк., 1990. 351 с.
77. Лисина Т.О. Влияние интродуцируемых в почву микроорганизмов деструкторов пестицидов на рост и развитие растений/ Т.О. Лисина, Н.Г. Гаранькина, Ю.В. Круглов// Прикладная биохимия и микробиология. М., 2001. Т.37. №3 С. 374-378. Вестник КрасГУ 53
78. Никонов П.В. Экология. Проблемы остаются/ П.В.Никонов, А.П. Твердюков// Защита растений. М.: Агропромиздат, 1992. №5. 16 с.
79. Новиков И.И. Влияние новых биопрепаратов на основе штаммов микроорганизмов-антагонистов на комплекс возбудителей корневой гнили огурца/ И.И.Новиков, А.И.Литвиненко, Г.В.Калько// Микология и фитопатология. 1995. Т. 29, вып. 5-6. С. 42-53.
80. Плохинский И.А. Математические методы в биологии/ И.А. Плохинский. М.: Изд-во МГУ, 1978. 263 с.
81. Попова Н.Я. Опыт применения стимуляторов роста в лесном хозяйстве/ Н.Я.Попова. М., 1984. 43 с.
82. Практикум по растениеводству/Под ред. А.Г.Ведрова. - Красноярск: Изд-во Краснояр. ун-та, 1992. С.53-62.

83. Семена деревьев и кустарников. Правила отбора образцов и методы определения посевных качеств семян. М.: ГОС. стандарты СССР, 1988. С. 3-27.

84. Сборник лабораторных работ по физиологии растений/Под ред. В.М.Гольда. Красноярск: КГУ, 1971. 178 с.

85. Тулемисова К.А. Значение микроорганизмов и их метаболитов в повышении урожайности сельскохозяйственных растений/ К.А.Тулемисова// Микробиологические основы повышения урожайности сельскохозяйственных растений. Алма-Ата: Наука,1986. Т.30. С. 3-14.