



На правах рукописи

Шагаев Антон Александрович

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ХАРАКТЕРИСТИК И
СВОЙСТВ ГРИБОВ *FUSARIUM OXYSPORUM* И *TRICHODERMA
VIRIDE* ПРИ МЕТАБОЛИЗМЕ ЭКССУДАТОВ КОРНЕВОЙ
СИСТЕМЫ ОГУРЦА ГИБРИДА F1 АТЛЕТ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ризосфера, возможно, является одной из самых сложных микробных сред обитания на Земле, состоящей из интегрированной сети корней растений, почвы и разнообразного микробного консорциума бактерий, архей, вирусов и грибов (Martens R. *et al.*, 1990; Иванов В.П. *и др.*, 1973). Поэтому актуальными являются вопросы, связанные с пониманием процессов, которые протекают в ризосфере растения, особенно вопросы взаимодействия микроорганизмов и корневой системы растения, а также разных групп микроорганизмов между собой, в том числе фитопатогенных, способных вызывать различные заболевания. Все процессы взаимодействия между микроорганизмами, их рост и развитие в ризосфере протекают при секреции растением органических веществ через корневую систему - экссудатов корневой системы (далее экссудаты), которые метаболизируются микроорганизмами (Смирнов А.М. *и др.*, 1970; Vais Н.Р. *et al.*, 2006). На сегодня недостаточно экспериментальных данных, позволяющих оценить качественный и количественный состав экссудатов. Согласно литературным данным, состав экссудатов и скорость экссудации зависят от вида растения, его возраста и абиотических факторов, влияющих на растение (Vancura V. *et al.*, 1972; Rovira A.D. *et al.*, 1969). Данные утверждения подтверждают актуальность исследований по изучению роста микроорганизмов и их взаимодействию при метаболизме экссудатов, учитывая, что растение является основным фактором формирования сообщества микроорганизмов в ризосфере (Broeckling C. *et al.*, 2008; Bowen G.D. *et al.*, 1980).

Степень разработанности темы.

Согласно современным представлениям, растения выделяют различные экссудаты, при этом экссудаты совместно с разнообразными неорганическими и органическими веществами переходят в ризосферу в процессе роста растения (Vancura V. *et al.*, 1972). Состав, количество и концентрация этих соединений в прикорневой зоне растения непосредственно влияют на размножение доминирующих в составе ризосферы видов микроорганизмов (Broeckling C. *et al.*, 2008). Микроорганизмы в составе ризосферы способны использовать экссудаты, такие как сахара, аминокислоты и другие органические кислоты, в качестве источника углерода, что является основным фактором, способствующим колонизации ризосферы (Lynch J.M. *et al.*, 1990).

Несмотря на большое количество исследований, направленных на понимание взаимодействий между микроорганизмами и микроорганизмами и растением в ризосфере, многие аспекты остаются невыясненными. Некоторые результаты не могут быть однозначно интерпретированы в связи со значительными физиологическими различиями, зависящими от рода, вида и штамма микроорганизма, а также от самого растения. Имеются лишь отрывочные сведения об экссудации огурца, а также о составе этих экссудатов в прикорневой зоне.

Таким образом, направление по развитию биологизации защиты растений определяет необходимость исследований, направленных на понимание влияния экссудатов на взаимодействия «микроорганизм-микроорганизм» и «микроорганизм-растение»

Цель и задачи работы

Целью работы является разработка методов оценки характеристик и свойств грибов *Fusarium oxysporum* и *Trichoderma viride* при метаболизме экссудатов, а также изучение особенностей

взаимодействия грибов с растениями огурца гибрида F₁ Атлет и грибов между собой при метаболизме ими экссудатов растений огурца.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучение особенностей экссудации корневой системы огурца, определение качественного и количественного состава органических компонентов, входящих в состав экссудатов. Оценка влияния концентрации экссудатов в прикорневой зоне на развитие растений.

2. Исследование способности и особенности развития грибов *F. oxysporum* и *T. viride* и их взаимодействия при метаболизме экссудатов растений в концентрациях, сравнимых с концентрациями в ризосфере при поверхностном культивировании.

3. Разработка метода (системы) для культивирования грибов, моделирующего развитие грибов на поверхности корневой системы при постоянном подводе компонентов питания (экссудатов) через мембрану. Изучение развития грибов на поверхности мембранного биореактора при постоянном подводе экссудатов (модели экссудатов) огурца, а также исследование взаимодействия грибов при совместном развитии в разработанной системе.

4. Оценка влияния внесения экссудатов (модели экссудатов) растений на фитопатогенные свойства грибов *F. oxysporum* при развитии в прикорневой зоне растений на фоне других микроорганизмов.

Методология и методы исследования. В работе использованы различные микробиологические методы, такие как поверхностное культивирование на агаризованных питательных средах, глубинное культивирование, культивирование грибов при непрерывном подводе компонентов питания, оценка концентрации микроорганизмов с помощью метода измерения абсолютно сухого веса биомассы (АСБ); методы изучения действия микроорганизмов на растения (фитотоксичность), а также физико-химические методы анализа, в том числе спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы «Microsoft Excel», «Prism» и «Statistica 6.0».

Научная новизна. Впервые проанализирован состав органических компонентов экссудатов корневой системы растений огурца гибрида F₁ Атлет при выращивании растений в стерильных условиях, при этом основными компонентами экссудатов были органические кислоты (янтарная, яблочная, лимонная). Исследован процесс секреции экссудатов, и на основе полученных данных составлен модельный раствор экссудатов, в состав которого входят органические кислоты и моносахара. Разработан метод, позволяющий исследовать развитие и взаимодействие микроорганизмов на фоне экссудации. Получены новые экспериментальные данные по влиянию экссудации растения на взаимодействие микроорганизмов, при этом показано, что дополнительное внесение экссудатов влияет на синтез ряда гидролитических ферментов – протеолитических, целлюлолитических. Доказана эффективность внесения модельного раствора экссудатов в поливной раствор для снижения уровня фитопатогенности *F. oxysporum*, а также повышения уровня антагонистической активности *T. viride* по отношению к *F. oxysporum*.

Теоретическая и практическая значимость. Предложенные в данном исследовании методы изучения характеристик и свойств грибов при метаболизме экссудатов растений могут быть

рекомендованы для оптимизации мероприятий по биологической защите растений. Полученные результаты вносят вклад в понимание физиологических особенностей грибов при метаболизме экссудатов, а также показывают пути повышения метаболической устойчивости растений к различным биотическим возмущениям, возникающим в процессе их развития.

В работе установлено негативное влияние экссудатов корневой системы на секрецию ферментов литического ряда *F. oxysporum* и *T. viride*.

Знания в этой области позволят сформировать системный подход при проведении мероприятий по биологической защите растений от болезней.

Результаты исследования использованы при создании органического удобрения «ВитАмин» (№ государственной регистрации 008(101)-20-3373-1).

Личный вклад автора. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов, написание диссертационной работы.

Положения, выносимые на защиту:

1. На основе определения качественного и количественного состава экссудатов корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет показано, что основными компонентами экссудатов являются янтарная, лимонная и яблочная кислоты. Взаимосвязь экссудации с накоплением вегетативной массы растений огурца свидетельствует о том, что при превышении концентрации экссудатов в прикорневой зоне растения огурца происходит снижение скорости накопления абсолютно сухой массы растения.

2. Наличие экссудатов в прикорневой зоне снижает активность целлюлолитических и протеолитических ферментов у *T. viride* F2001 и *F. oxysporum* F2106.

3. Разработанный и описанный метод оценки взаимодействия грибов при непрерывном подводе компонентов питания включает разработку мембранного реактора и условия проведения культивирования.

4. Целесообразность изучения взаимодействия фитопатогенных культур и перспективных агентов биологического контроля на средах, приближенным к реальным условиям, должна учитывать состав и количество органических веществ (экссудатов) в прикорневой зоне.

5. Внесение в поливной раствор модельного раствора экссудатов влияет на способность *F. oxysporum* проникать внутрь растения за счет репрессии литических ферментов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6. Биотехнология – по п. 13 (в части агробиотехнологий), по п. 17 (в части Биотехнологии для повышения продуктивности сельского хозяйства), по п. 21 (в части моделирования биологических процессов)

Степень достоверности и апробация результатов. Математическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программ «Microsoft Word 2016», «Microsoft Excel 2016». Массив экспериментальных данных получен с использованием современных методов и оборудования в трех-пятикратной повторности; результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке. Исследования подтверждаются их воспроизводимостью и корреляцией экспериментальных данных, полученных с применением

независимых взаимодополняющих методов, а также их согласованностью с известными литературными данными

Основные результаты диссертационной работы представлены на Всероссийской конференции «Болезни и вредители овощных культур в защищенном грунте. Комплексная система защиты растений» (г. Санкт-Петербург, 2021), Всероссийской конференции «Технология биологической защиты, новинки и проверенные методики» (г. Светлогорск, 2019), XIX Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ "БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА" (г. Казань, 2019), XV Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии "МКХТ-2019"(г. Москва, 2019), XVI Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии "МКХТ-2020"(г. Москва, 2020).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 14 печатных работах, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в реферативную базу РИНЦ, международные реферативные базы по научным публикациям WoS и Scopus. Результаты научного исследования подтверждены участием на научных мероприятиях всероссийского и международного уровня: опубликовано 5 работ в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов.

Благодарности Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность научному руководителю к.т.н., доценту Марквичеву Николаю Семеновичу за внимание и помощь в работе, заведующему кафедрой биотехнологии д.т.н., проф. Панфилову В.И., а также коллективу кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева за практическую помощь и поддержку при написании диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка работ, опубликованных автором. Общий объем работы 139 страниц, включая 37 рисунков, 4 таблицы, библиографию из 207 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы основные направления исследования.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Представлен обзор литературных данных по теме исследований, обобщены современные представления об экссудации растений и её влиянии на микробиологический состав ризосферы корневой системы, рассмотрены принципы влияния компонентов экссудатов на различные ризосферные сообщества микроорганизмов, описаны взаимосвязи экссудатов растений и фитопатогенеза различных микроорганизмов в составе ризосферы, рассмотрены механизмы действия агентов биологического контроля при взаимодействии с представителями ризосферной микрофлоры на фоне экссудации растений. На основе анализа литературы сформирована цель и задача работы.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Объектами исследования являлись штаммы грибов-аскомицетов: *F. oxysporum* F2106 (штамм был выделен с поверхности корней растения огурца с характерными признаками фузариозного увядания, выращенного в условиях защищённого грунта тепличного комбината «Сейм-Агро» (г. Курск)). Видовая принадлежность культуры была определена на основании секвенирования ITS региона (18s рДНК) в ООО «Евроген»; *T. viride* F2001 (ВКПМ F-1532), который является одним из микроорганизмов -

агентов биологического контроля и используется в современных схемах биологической защиты растений. Штаммы были взяты из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева. Кроме того, в работе были использованы семена огурца гибрида F₁ Атлет компании Гавриш.

Анализы растворов экссудатов корневой системы растения проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с определением содержания органических кислот и сахаров, на жидкостном хроматографе Agilent 1220 Infinity LC с рефрактометрическим детектированием с использованием колонки Hi-Plex H (250×4,6 мм) и Zorbax Eclipse Plus C18.

Для подготовки проб осуществляли центрифугирование 2 мл полученного раствора экссудатов при 6000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость дополнительно пропускали через фильтр 0,2 мкм и помещали в микропробирки типа Эппендорф. Перед проведением анализа раствор экссудатов смешивали с подвижной фазой для хроматографии в соотношении 3:2.

Разделение органических кислот проводилось при температуре 50°C в термостате колонки и на рефрактометрическом детекторе в изократическом режиме элюирования. Подвижная фаза – серная кислота 0,02 М. Объем вводимой пробы составлял 3 мкл, расход элюента 0,3 мл/мин.

Для построения калибровочного графика использовали стандартные растворы определяемых органических кислот и сахаров, последовательно разведенные подвижной фазой. Подвижную фазу готовили путем разбавления точного объема (фиксанал) серной кислоты 0,1 н. деионизированной водой.

Для **определения суммарной концентрации** экссудатов применяли метод титриметрического определения химического потребления кислорода (ХПК).

Фитотоксичность растворов определяли методом оценки энергии прорастания и всхожести семян огурца по методике, описанной в ГОСТ 12038-84.

Концентрацию грибов оценивали методом определения сухого веса биомассы микроорганизмов, состоящим из трех последовательных операций: доведения веса центрифужных пробирок (бюксов) или фильтров до постоянного значения, отделения клеток микроорганизмов от культуральной жидкости и определения веса полученной высушенной биомассы (АСБ).

Для оценки **абсолютно сухого веса растений** (АСВ растений) высушивали их в сушильном шкафу при температуре 80°C до прекращения изменения веса.

Определение **целлюлитической активности** оценивали по образованию редуцирующих веществ под действием раствора при ферментативном гидролизе целлюлозы за 1 ч, согласно стандартной методике.

Определение **протеолитической активности** оценивали по образованию тирозина в продуктах расщепления казеина под действием исследуемого раствора, согласно стандартной методике.

Оценку взаимодействия грибов проводили методом встречных колоний. Для описания внешнего вида колонии грибов на 10-е сутки использовали следующую шкалу: А – гриб угнетен в сильной степени, мицелий редкий, прижатый к субстрату; Б – гриб угнетен слабо; В – патоген-гриб не угнетен. Знаком «+» рядом с буквой указывали нарастание гриба на колонию другого гриба, а знаком «++» – отмечали появление на колонии гриба очагов спороношения другого гриба. На 10-е сутки определяли тип взаимоотношений фитопатогена и гриба рода *Trichoderma*, а также оценивали

в баллах степень нарастания гриба рода *Trichoderma* на колонии фитопатогена: 0 – нет нарастания колонии гриба рода *Trichoderma* на колонию патогена; 1 – гриб рода *Trichoderma* занимает до 25 % площади колонии патогена; 2 – гриб рода *Trichoderma* занимает 25-50 % площади колонии патогена; 3 – гриб рода *Trichoderma* занимает 51-75 % площади колонии патогена; 4 – гриб рода *Trichoderma* занимает 76-100 % площади колонии патогена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3. Исследование экссудации корневой системы огурца

Для того, чтобы сформировать понимание, как и какое количество экссудатов выделяется при развитии растений, была поставлена серия экспериментов по определению концентрации органических веществ в образцах поливного раствора и дренажного раствора на действующем тепличном комбинате. По используемой технологии - растения огурца гибрида F₁ Атлет выращивают в минераловатном субстрате с применением капельного полива. В качестве поливного раствора используют минеральный раствор Хогланда. Для экономии воды в поливной раствор добавляют до 50 %об дренажного раствора, очищенного фильтрацией. Для проведения исследования отбирали пробы поливного и дренажного растворов на протяжении 30 суток после высадки растений. Далее в образцах оценивали такой показатель, как ХПК (химическое потребление кислорода). Показатель использовали для отображения количества органических веществ, содержащихся в образцах поливного и дренажного раствора. Мера измерения показателя – миллиграммы кислорода, потраченные на окисление вещества в одном литре воды – мгО/л. Данный показатель определяли титриметрическим способом. Показатель ХПК для поливного и дренажного раствора представлен в таблице 1.

Таблица - 1. Средняя концентрация органических веществ (ХПК) в поливном и дренажном растворе при выращивании огурца гибрида F₁ Атлет по используемой технологии ТК «Сейм-Агро»

	Время после высадки растений, сутки		
	5	15	30
Значение показателя ХПК в поливном растворе, мгО/л	20±10	65±10	65±10
Значение показателя ХПК в дренажном растворе, мгО/л	84±10	560±10	584±10

Было показано, что с увеличением времени после высадки растений в субстрат показатель ХПК в поливном и дренажном растворе увеличивался. Однако помимо выделения корневой системой растений экссудатов в данной системе присутствуют различные микроорганизмы, которые развиваются, метаболизируя экссудаты. В такой динамической системе, когда растение по мере своего развития секретирует экссудаты, а микроорганизмы метаболизируют их, достаточно сложно оценить каким образом идёт накопление органических веществ в прикорневой зоне.

В дальнейшем для понимания влияния экссудатов на развитие растения и анализа механизмов развития и взаимодействия грибов *F. oxysporum* и *T. viride* при метаболизме экссудатов перед нами возникла задача получения экссудатов в стерильных условиях.

Для получения экссудатов огурца выращивали огурцы гибрида F1 Атлет в стерильных условиях на минеральной среде Хогланда, следующего состава $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 0.6963, KNO_3 - 0.5407, NH_4NO_3 - 0.0492, K_2SO_4 - 0.1269, KH_2PO_4 - 0.17, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ - 0.2223, MnSO_4 - 0.0017, ZnSO_4 - 0.0015, CuSO_4 - 0.0003, H_3BO_3 - 0.0028 (г/л водопроводной воды), в ходе выращивания растений в пробах оценивали концентрацию органических веществ в растворе, одновременно оценивали накопление АСВ растений. Также в ходе исследования ввели коэффициент экссудации, описывающий соотношение количества секретируемых органических веществ растением к накоплению АСВ растений. Коэффициент рассчитывали по формуле: K (коэффициент экссудации) = ((средний АСВ растения/концентрация органических веществ (ХПК))/время выращивания) * 100000.

На рисунке 1 и 2 представлены результаты исследования.

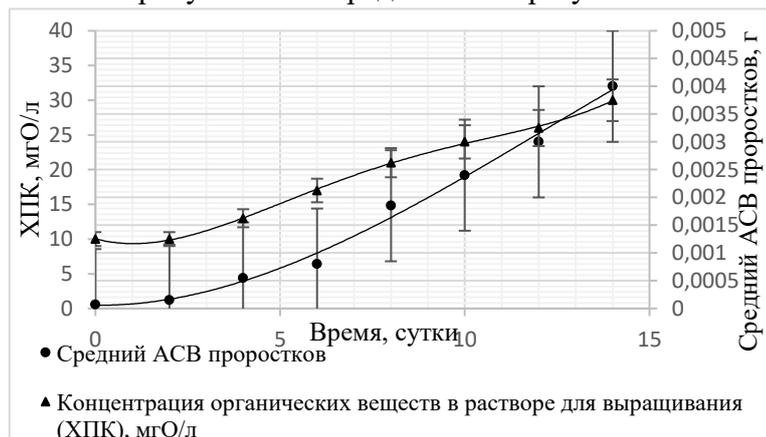


Рисунок 1 – Концентрация органических веществ (ХПК) в растворе на начальном этапе развития огурца в зависимости от времени вегетации при стерильном выращивании

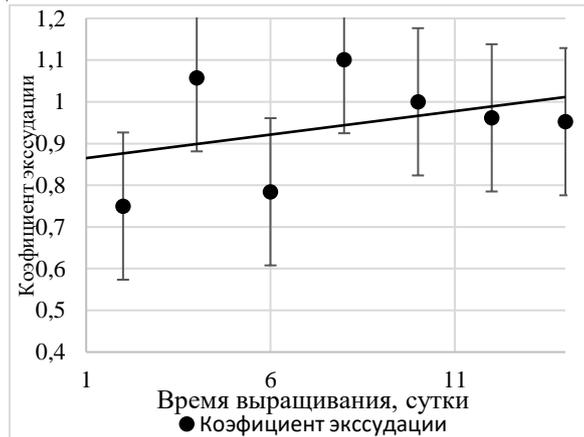


Рисунок 2 – Коэффициент экссудации огурца гибрида F1 Атлет при выращивании в стерильных условиях

Как видно из рисунков 1 и 2, увеличение концентрации органических веществ в растворе для выращивания происходит пропорционально приросту АСВ растения.

Для оценки влияния экссудатов огурца на ростовые характеристики растений вносили раствор экссудатов, полученный в ходе стерильного выращивания огурцов в течении 14 суток, в чашки Петри со стерильной фильтровальной бумагой (влажные камеры), далее помещали семена во влажную камеру, после чего выращивали огурцы в термостатируемых условиях при 25°C. На 7 сутки выращивания определяли АСВ растений огурца, выращенных на различных концентрациях экссудатов. Результаты представлены на рисунке 3.

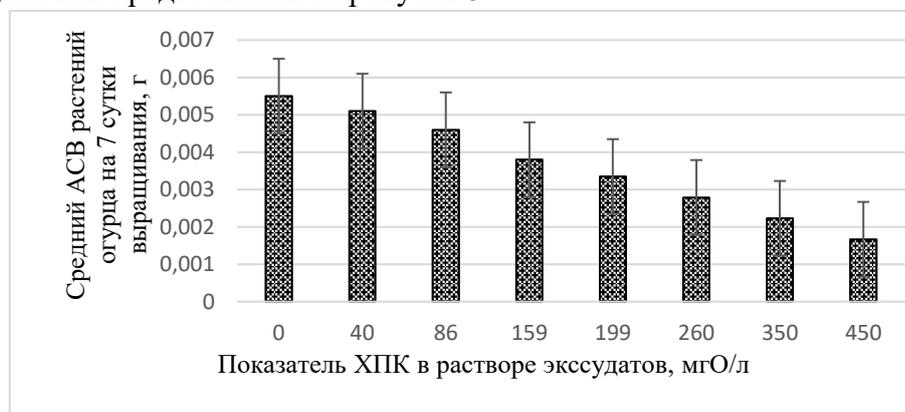


Рисунок 3 – Влияние раствора экссудатов огурца гибрида F1 Атлет на накопление АСВ растения при выращивании на влажных камерах

Как видно из рисунка 3, увеличение концентрации экссудатов приводит к торможению накопления массы проростков огурца.

В результате исследования было определено, что концентрация экссудатов растений пропорциональна накоплению зеленой массы растений, при этом повышение концентрации экссудатов в прикорневой зоне при отсутствии микроорганизмов негативно влияет на ростовые характеристики растений.

Анализ состава и количества экссудатов. Накопление экссудатов огурца оценивали в пробах образцов, отобранных при выращивании огурца на 7 и 14 сутки в стерильных условиях. Образцы проб концентрировали на роторно-пленочном испарителе при температуре 46°C и далее анализировали с помощью ВЭЖХ. В пробах были проанализированы сахара и органические кислоты. Статистическая обработка полученных хроматограмм представлена на рисунке 4.

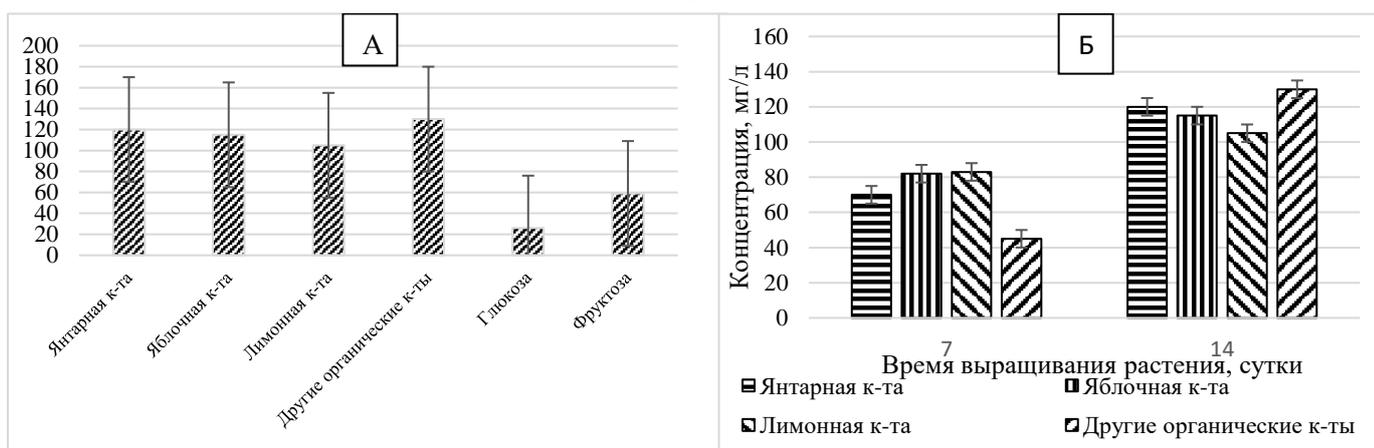


Рисунок 4 - Оценка состава экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет, где А - основные компоненты экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет, выращенного в течении 14 суток в стерильных и не стерильных условиях, и Б - соотношение основных компонентов экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет

Таким образом показано, что основную часть органических кислот, входящих в экссудаты огурца, составляют янтарная, яблочная и лимонные кислоты, при этом их концентрации соизмеримы между собой. В ходе исследования также определено, что в состав экссудатов входят моносахара, такие как фруктоза и глюкоза, при этом их концентрация меньше концентрации органических кислот. Как видно из рисунка 4Б соотношение компонентов экссудатов не меняется в ходе выращивания.

Также для оценки общей концентрации органических веществ в растворе определяли ХПК, которое составило в среднем 500 мгО/л (ХПК) на 14-е сутки выращивания огурца гибрида F₁ Атлет.

Также в ходе анализа установлено, что существует зависимость между накоплением АСВ растений и количеством секретируемых экссудатов, при этом количество секретируемых экссудатов составляет 20-30% от АСВ растения.

Получение экссудатов в стерильных условиях довольно трудоемкий и малоэффективный процесс. Для дальнейших исследований на основе результатов ВЭЖХ был предложен модельный раствор экссудатов, включающий в себя следующие вещества: лимонная кислота- 0,1 г/л; янтарная кислота-0,1 г/л; яблочная кислота-0,1г/л; дрожжевой экстракт-0,1 г/л; фруктоза-0,1 г/л, при растворении в минеральном растворе, что приближено к естественному составу и количеству экссудатов в прикорневой зоне растений огурца при выращивании в минераловатном субстрате. При приготовлении сред рН устанавливали в диапазоне 5,8-6,0.

Изучение особенностей развития и взаимодействия колоний грибов в условиях поверхностного культивирования при метаболизме модельного раствора экссудатов огурца. В реальных условиях ризосферные микроорганизмы развиваются и взаимодействуют между собой и растением на границе раздела фаз при метаболизме экссудатов растений. В связи с этим было проведено исследование по изучению взаимодействия грибов *T. viride* и *F. oxysporum* при метаболизме экссудатов (модели экссудатов) растения. Для проведения исследования использовали метод встречных колоний. Грибы (споро-мицелиальную массу) высевали «уколом» на поверхность агаризованной питательной среды Чапека и на среду, в состав которой входил минеральный раствор (раствор Хогланда) и составленный модельный раствор экссудатов огурца в концентрации 500 мг/л (ХПК), в качестве контроля микроорганизмы сеяли на голодный агар. Культивирование проводили в термостате при температуре 28°C. В течении эксперимента оценивали ростовые характеристики грибов, такие как плотность колонии, скорость радиального роста. Для оценки взаимодействия грибов использовали вышеописанную шкалу (раздел 2), результаты представлены в таблице 2. На рисунках 5-7 представлены результаты культивирования на средах, в состав которых входит модельный раствор экссудатов огурца.



Рисунок 5 - Развитие грибов *T. viride* F2001 и *F. oxysporum* F2106 при совместном развитии на среде Чапека



Рисунок 6 - Развитие грибов *T. viride* F2001 и *F. oxysporum* F2106 при совместном развитии на голодном агаре



Рисунок 7 - Развитие грибов *T. viride* F2001 и *F. oxysporum* F2106 при совместном развитии на среде, моделирующей экссудаты

Таблица-2. Ростовые характеристики *T. viride* F2001 и *F. oxysporum* F2106 при развитии на различных питательных средах, при культивировании методом встречных колоний

	питательная среда	<i>T. viride</i> F2001	<i>F. oxysporum</i> F2106
Радиальная скорость роста, мм/ч	среда Чапека	1,2	0,26
	голодный агар	0,62	0,68
	среда, моделирующая экссудаты огурца	1,13	0,46
Плотность колонии	среда Чапека	высокая	высокая
	голодный агар	низкая	низкая
	среда, моделирующая экссудаты корневой системы	средняя	низкая
Антагонистическая активность грибов рода <i>Trichoderma</i> по отношению к грибу рода <i>Fusarium</i>	среда Чапека	Внешний вид колонии патогена	Степень нарастания колонии гриба рода <i>Trichoderma</i> , балл
		A+	0
	голодный агар	Внешний вид колонии патогена	Степень нарастания колонии гриба рода <i>Trichoderma</i> , балл
		B	0
	среда, моделирующая экссудаты огурца	Внешний вид колонии патогена	Степень нарастания колонии гриба рода <i>Trichoderma</i> , балл
		A++	2

В результате исследования можно отметить, что скорость роста *F. oxysporum* F2106 при его совместном культивировании с *T. viride* F2001 на питательных средах, содержащих модельный раствор экссудатов растений, повышается по сравнению со скоростью роста на стандартной питательной среде. Анализ антагонистической активности показал, что при развитии грибов на среде, моделирующей экссудаты, *T. viride* проявляет более яркую антагонистическую активность нежели на стандартной питательной среде или голодном агаре. Это может быть связано с тем, что предположительно на 10-е сутки концентрация питательных компонентов в среде, моделирующей экссудаты, была очень мала, вследствие чего *T. viride* начинал проявлять антагонистические свойства по отношению к *F. oxysporum*. Данные демонстрируют, что *T. viride* проявляет антагонистическое действие на *F. oxysporum* не только при культивировании на питательной среде Чапека, но и на среде, содержащей модельный раствор экссудатов, однако не проявляет их при культивировании на голодном агаре.

Показано, что исследуемые микроорганизмы способны расти на средах, содержащих модельный раствор экссудатов огурца, однако макроморфологические характеристики колоний микроорганизмов отличались от характеристик, проявляемых ими на стандартной питательной среде Чапека. Например, более низкая плотность колонии, скорость радиального роста отличалась на 15-25%, слабая способность к спорообразованию, наличие хламидоспор.

Изучение динамики роста и секреции токсинов *F. oxysporum* и *T. viride*. Для изучения первоначальной реакции грибов на компоненты питательных сред, а также синтеза токсичных для растения веществ, была поставлена задача исследовать рост грибов на среде Чапека и оценить фитотоксичность фильтрата полученной культуральной жидкости. Так как использование в качестве субстрата стандартной питательной среды для изучения секреции токсинов и изучения аспектов фитопатогенеза не может быть сравнимо с естественными условиями в ризосфере, то была поставлена задача исследовать процессы роста и развития *F. oxysporum* F2106 и *T. viride* F2001, а также возможное выделение токсичных веществ на питательной среде, содержащей экссудаты. В качестве экссудатов использовали модельный раствор экссудатов, описанный ранее, в концентрации 500 мгО/л, данная концентрация была выбрана исходя из анализа органических веществ (ХПК) в дренажных растворах при выращивании в минераловатном субстрате растений огурца.

Для проведения исследования микромицеты культивировали в 100 мл стерильной питательной среды Чапека и среде, в состав которой входил модельный раствор экссудатов. Засев культуры проводили методом смыва споро-мицелиальной массы со скошенной агаризованной среды. Глубинное культивирование проводили на ротационной качалке при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и при перемешивании 130 об./мин на протяжении 168 ч. Концентрацию микроорганизмов определяли весовым методом. Для оценки токсичности штаммов использовали бесклеточную культуральную жидкость. Для этого культуральную жидкость пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и полученный фильтрат исследовали методом определения фитотоксичности растворов, описанным в разделе «Материалы и методы». Кроме энергии прорастания измеряли всхожесть семян (количество проросших на седьмые сутки). Контролем являлась стерильная водопроводная вода.

Кривые роста грибов на стандартной среде и среде, содержащей модельный раствор экссудатов, а также динамика образования фитотоксичных веществ представлена на рисунке 8.

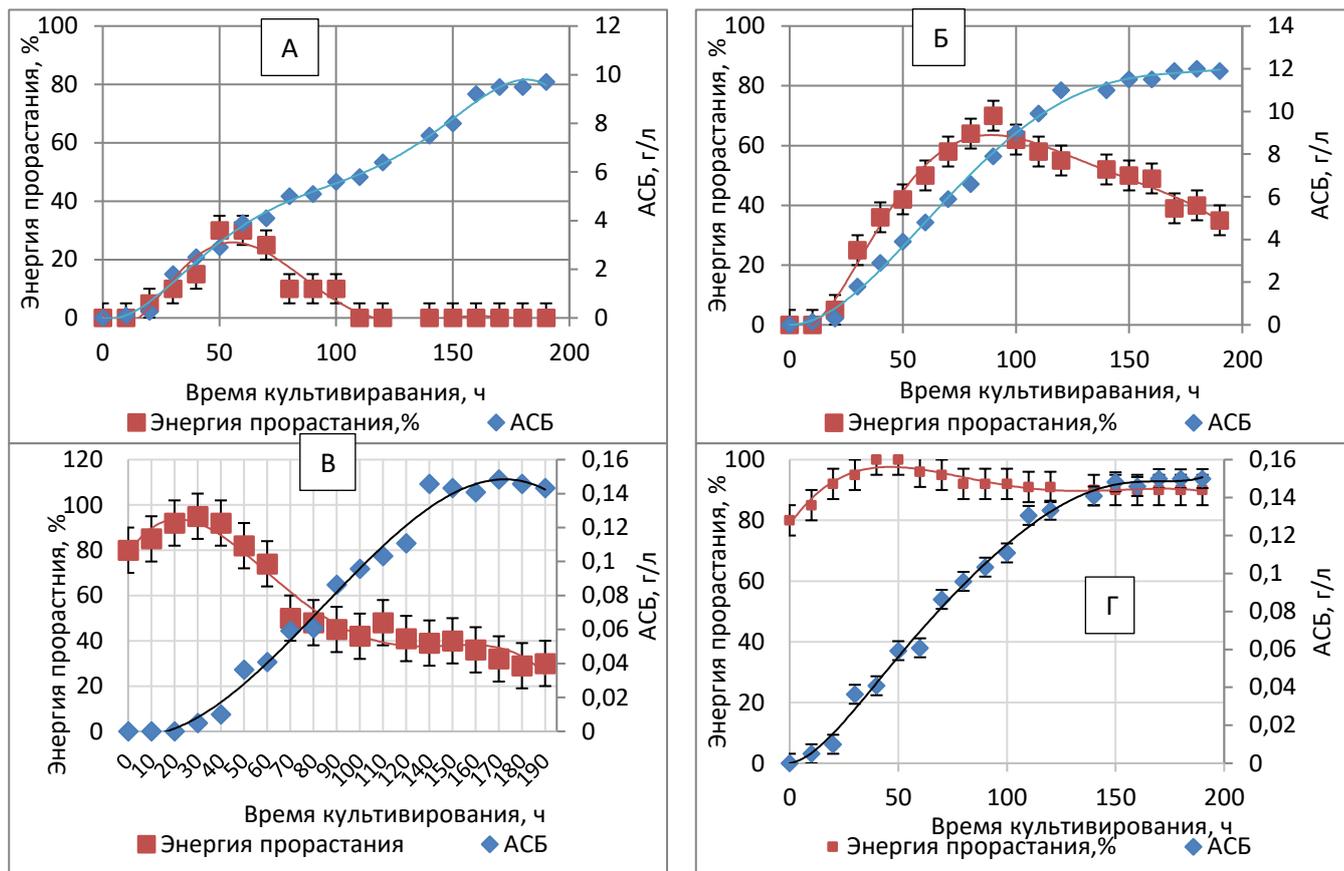


Рисунок 8 - Динамика изменения энергии прорастания семян, обработанных бесклеточной культуральной жидкостью *F. oxysporum* F2106 и *T. viride* F2001, полученной на разных этапах культивирования на среде Чапека (А-*F. oxysporum* и Б-*T. viride*) и среде, содержащей модельный раствор экссудатов растения (В-*F. oxysporum* и Г-*T. viride*).

Исходя из полученных результатов, можно сделать выводы о том, что штамм *F. oxysporum* F2106 выделяет токсичные соединения даже в условиях доступа источника углерода, причём при культивировании на стандартной питательной среде токсичность среды по отношению к растениям огурца гибрида F₁ Атлет возрастает. Но если соотнести концентрацию и биодоступность среды и, в частности, источника углерода с количеством образовавшейся биомассы, то можно предположить, что более высокий показатель фитотоксичности культуральной жидкости на среде Чапека обусловлен, во-первых, ингибирующим эффектом самой питательной среды, во-вторых, значительно большим количеством образовавшегося мицелия, который секретирует токсины. С другой стороны, штамм *T. viride* также выделяет метаболиты, влияющие на энергию прорастания, однако данные метаболиты обладают значительно меньшим фитотоксичным эффектом.

Было показано, что при развитии микроорганизмов в стационарных условиях есть различия в их способности секретировать фитотоксичные метаболиты при культивировании на стандартных питательных средах и средах на основе модельного раствора экссудатов огурца. В реальных условиях микроорганизмы прикорневой зоны развиваются и взаимодействуют при непрерывной секреции экссудатов. Следовательно, дальнейшие исследования развития и взаимодействия микроорганизмов необходимо проводить при непрерывном подводе компонентов питания.

Моделирование взаимодействий грибов и растений в ризосфере. Для всестороннего понимания механизмов развития и взаимодействия микроорганизмов прикорневой зоны следует

проводить исследования при непрерывном подводе компонентов питания. Была разработана и создана установка для культивирования микроорганизмов с непрерывной подачей модельного раствора экссудатов, моделирующая секрецию через корневую систему растения экссудатов. В качестве углеродсодержащего субстрата для культивирования был использован раствор, моделирующий экссудаты огурца. Объем питательной среды рассчитывали на 10-15 дней непрерывного культивирования, расход питательного раствора задавали перистальтическим насосом (2.7 мл/ч). Данный расход соответствовал $0,4 \text{ мл/см}^2/\text{ч}$ поверхности мембраны. В основе установки находился керамический модуль, покрытый целлюлозной мембраной (фильтровальная бумага *Whatman* тип 1, толщина 0,16 мм), через который с заданной скоростью подавался стерильный питательный раствор (модельный раствор экссудатов). Питательный раствор, проходя через керамический блок и целлюлозный носитель, попадал в емкость для отбора проб, емкость менялась по мере накопления в ней раствора каждые 4 часа. Данная система (рисунок 9) имитирует корневую систему живого растения.

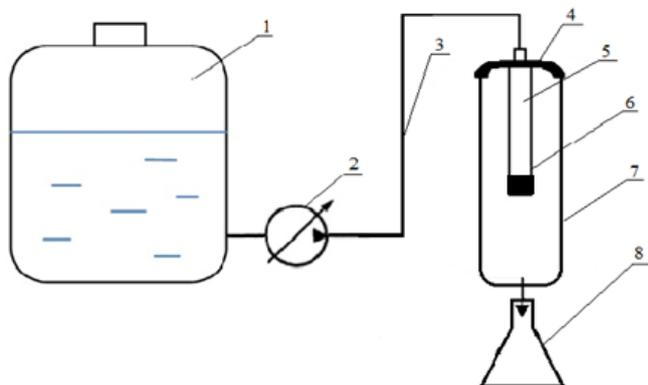
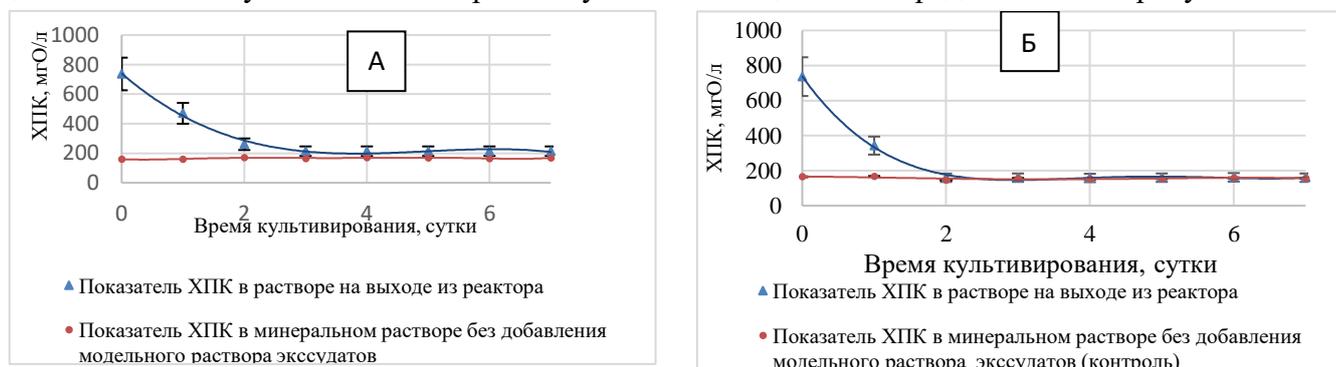


Рисунок 9. Установка для непрерывного поверхностного культивирования микроорганизмов: 1-емкость с питательным раствором, 2-перистальтический насос, 3-силиконовый шланг, 4 - ватно-марлевая пробка, 5-керамическая трубка, покрытая целлюлозным носителем, 6- поверхность для культивирования м/о (целлюлозная мембрана), 7-корпус реактора, 8- емкость для отбора проб.

Грибы в виде суспензии спор с концентрацией 10^9 КОЕ/мл. вносили на поверхность целлюлозного носителя в объеме 500 мкл. Установку помещали в термостат. Опыты проводили при 28°C . Каждые сутки из приемной емкости отбирали пробы раствора, в которых определяли количество остаточных органических веществ (ХПК), оценивали протеолитическую и целлюлолитическую активности проб. Результаты исследований представлены на рисунке 10.



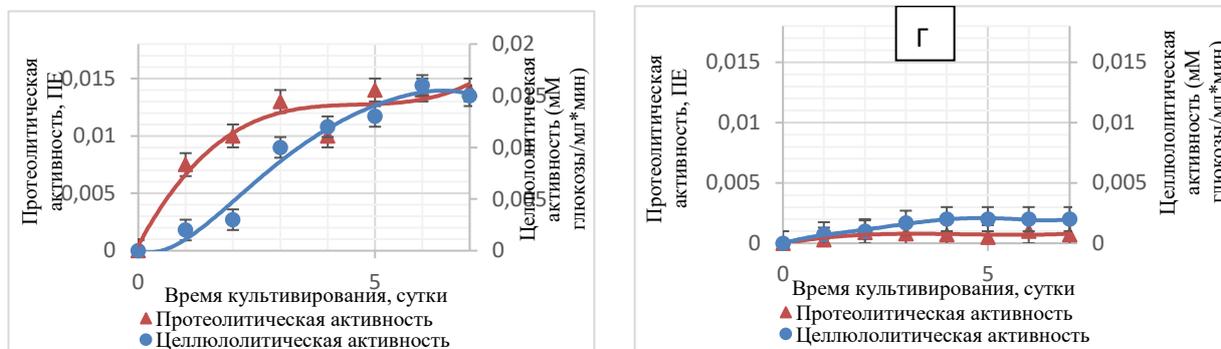


Рисунок 10 - Изменение концентрации органических веществ (ХПК) в растворе на выходе из реактора при поверхностном культивировании *F. oxysporum* (А) и *T. viride* (Б) с непрерывной подачей компонентов питания; Изменение целлюлолитической активности и протеолитической активности при поверхностном культивировании *F. oxysporum* (В) и *T. viride* (Г) с непрерывной подачей компонентов питания.

В результате проведенного исследования было установлено, что *T. viride* и *F. oxysporum* способны расти на поверхности с непрерывной подачей питательных веществ в условиях, создаваемых в модельной установке. При достижении минимальной концентрации органических веществ в образцах была обнаружена целлюлолитическая и протеолитическая активность, что может свидетельствовать об одновременном метаболизме как легко метаболизируемых компонентов, так и целлюлозы.

В результате исследования был разработан метод культивирования, а также изготовлена система культивирования и исследованы процессы роста микроорганизмов на поверхности полых мембран из фильтрующего целлюлозного материала при непрерывном подводе компонентов питания (моделирующих экссудаты огурца) внутрь мембраны, моделирующей условия, возникающие на поверхности корневой системы растения. Показано, что при снижении концентрации экссудатов ниже определенного уровня при постоянном их подводе в области лимитированного роста клетки *F. oxysporum* F2106 синтезируют, предположительно, низкомолекулярные водорастворимые фитотоксины и одновременно синтезируют и секретируют ферменты литического ряда (на примере целлюлазы и протеазы).

Исследование роста *T. viride* с подсевом *F. oxysporum* при поверхностном культивировании с непрерывной подачей компонентов питания. Далее было изучено взаимодействие штаммов *T. viride* и *F. oxysporum* при культивировании на поверхности с непрерывным подводом питательной среды, где была смоделирована ситуация, при которой в прикорневой зоне изначально присутствовал гриб *T. viride* и в прикорневую зону попал гриб *F. oxysporum*. Такие условия возникают в прикорневой зоне растения *in situ* при профилактическом применении *T. viride*, когда микромицет вносят в субстрат для выращивания растений заранее. Опыты проводили аналогичным образом в условиях разработанной нами установки. После запуска установки и отбора нулевой пробы на мембрану вносили суспензию спор *T. viride*, равномерно распределяя ее по поверхности целлюлозной мембраны. На вторые сутки культивирования, после прорастания спор *T. viride* и образования на поверхности целлюлозной мембраны видимого мицелия, на носитель наносили суспензию спор штамма *F. oxysporum*. Далее оценивали развитие микромицетов на поверхности целлюлозного носителя. В пробах анализировали остаточное содержание органических веществ, а также определяли целлюлолитическую и протеолитическую активность. Результаты анализов представлены на рисунке 11. Также по окончании культивирования анализировали наличие микромицетов на поверхности целлюлозного носителя, для этого споро-мицелиальную массу

отделяли иглой от целлюлозного носителя и помещали на поверхность агаризованной питательной среды, и выращивали микроорганизмы в термостатируемых условиях.

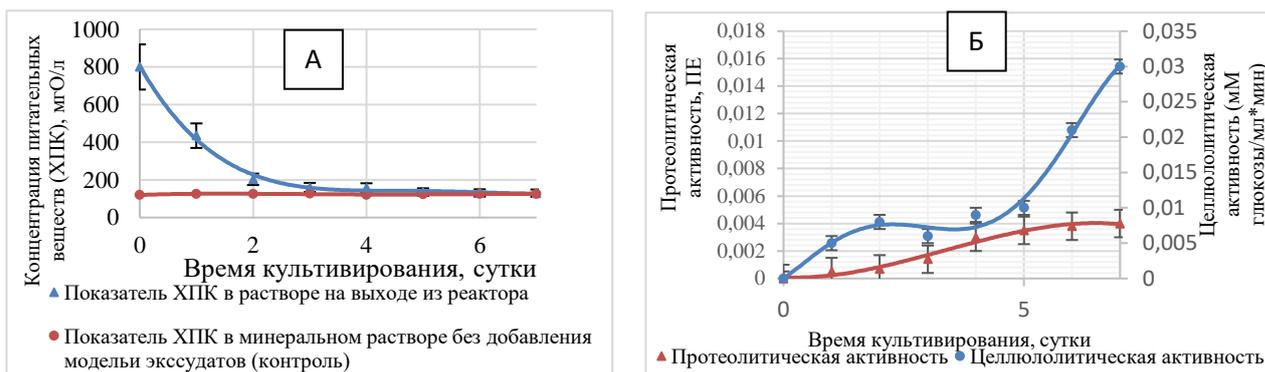


Рисунок 11 – Изменение показателей при культивировании *T. viride* с подсевом *F. oxysporum* при непрерывной подаче компонентов питания на целлюлозной мембране в, разработанной установке, где А – изменение ХПК, и Б – изменение целлюлолитической и протеолитической активности

При высеве микроорганизмов с поверхности целлюлозного носителя на агаризованные среды колоний *F. oxysporum* обнаружено не было, что может свидетельствовать о том, что при совместном культивировании выбранных штаммов на поверхности с непрерывным подводом питательной среды *T. viride* полностью подавляет рост *F. oxysporum*. Усиление ферментативной активности по сравнению с исследованием развития микроорганизмов отдельно может свидетельствовать о том, что клетки и споры фитопатогенного гриба были разрушены под действием ферментативных систем *T. viride*, что косвенно подтверждает механизм ферментативного разрушения одних клеток другими при условии лимитированного роста при недостатке компонентов питания, так как возрастание ферментативной активности при снижении концентрации органических веществ в прикорневой зоне может быть фактором, влияющим на фитопатогенность грибов за счет разрушения клеточных стенок растения и проникновения гриба внутрь сосудистой системы.

Таким образом, установка, разработанная в ходе работы, даёт возможность исследовать взаимодействие микроорганизмов в приближенных к реальным условиям при непрерывной секреции эксудатов растения. Так как нарастание уровня ферментативной активности при снижении концентрации органических веществ в прикорневой зоне может быть фактором, влияющим на фитопатогенность грибов, было проведено исследование по влиянию дополнительного внесения эксудатов (модели эксудатов) на фитопатогенность грибов.

Исследование снижения биотических стрессовых воздействий с помощью внесения модели эксудатов при выращивании *Cucumis sativus*. Для проведения исследования были предварительно в нестерильных условиях выращены огурцы до появления 2 настоящих листьев. Таким образом были смоделированы естественный рост растения в почве и формирование ризосферы. Растения поливали капельно в зону корневой системы. Полив проводили с заданной скоростью минеральным раствором Хогланда. Расход минерального раствора задавали перистальтическим насосом (2,7 мл/ч). Одновременно в системах осуществляли 4 варианта, описанных на графике опытов (рисунок 13). В начале эксперимента в варианты 3 и 4 вносили суспензию спор *F. oxysporum* в физиологическом растворе, полученную смывом с культуры, выращенной на поверхности агаризованной среды. Модельный раствор эксудатов в концентрации

органических веществ (ХПК) 500 мгО/л подавали в прикорневую зону в составе раствора Хогланда двух из четырех вариантов (варианты 2 и 3). Часть растений поливали раствором Хогланда без дополнительного внесения спор *F. oxysporum* и модельного раствора экссудатов (вариант 1). За развитием растений после внесения *F. oxysporum* наблюдали в течение 20 суток. Каждые 2-е суток производилось измерение стебля растений каждого из образцов (рисунок 13). После окончания эксперимента на 20 сутки культивирования было осуществлено микробиологическое исследование наличия *F. oxysporum* внутри растения. Для этого стебли стерилизовали этиловым спиртом, после чего стебли делили на сегменты и внутренней частью выкладывали на агаризованную среду Чапека, после чего выдерживали в термостате при температуре 28°C в течение 3 суток до образования видимых колоний. Результаты исследования представлены на рисунке 12 и 13.

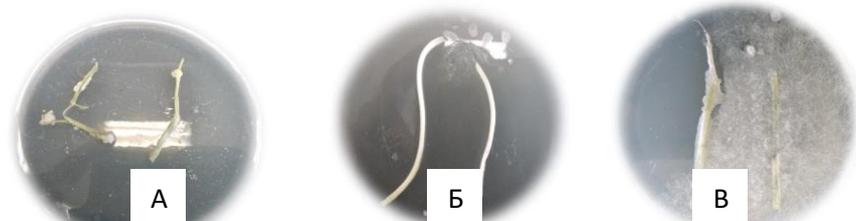


Рисунок 12 – А и Б – высев части стебля огурца на агаризованную питательную среду (вариант с внесением в прикорневую зону раствора модели экссудатов); В – высев части стебля огурца на агаризованную питательную среду (вариант без внесения в прикорневую зону раствора модели экссудатов)

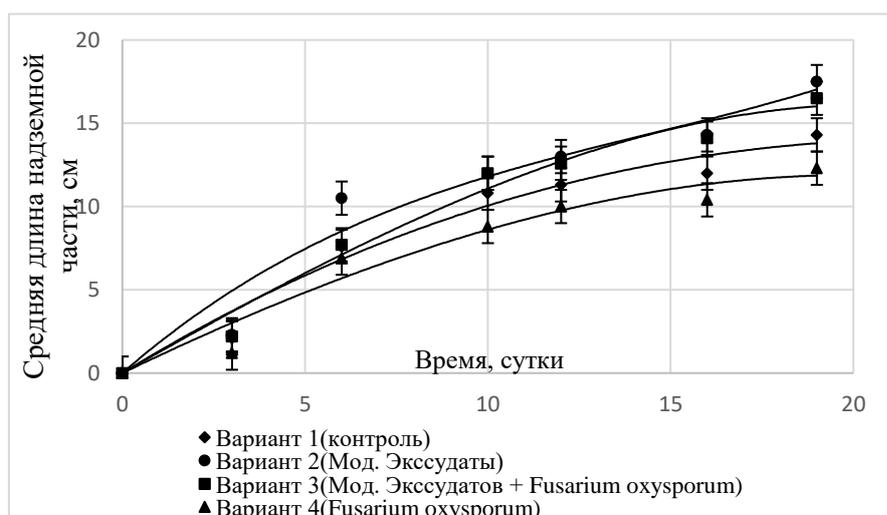


Рисунок 13 - Ростовые характеристики огурца гибрида F₁ Атлет в присутствии *F. oxysporum* (вариант 3, 4) и дополнительном внесении модели экссудатов (вариант 2,3)

В результате исследования можно отметить, что при наличии в поливном растворе модельного раствора экссудатов внутри корневой системы *F. oxysporum* не был обнаружен, однако в варианте 4, без внесения модели экссудатов, внутри корневой системы *F. oxysporum* проник внутрь растения и колонизировал его. После подсева в прикорневую зону *F. oxysporum* (вариант 4) наблюдали спад развития растения (рисунок 13).

Колонии гриба разрастались от центра чашки, где были размещены стебли. Кроме того, колонии были распределены равномерно по всей длине стебля огурца. Таким образом, можно говорить о том, что при прорастании гриба клетки *F. oxysporum*, внесенные в прикорневую зону, достигли корневой системы, вероятно, колонизируя ее и пробираясь внутрь стебля. Мицелий гриба

F. oxysporum частично закупорил и существенно разросся в растительных тканях. Вторым не менее интересным результатом является то, что колоний *F. oxysporum* внутри проростка образца варианта 3 не было обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было установлено, что проникновение *F. oxysporum* внутрь растения происходит только при недостатке экссудации, при этом грибы, находящиеся на корневой системе, способны на ней развиваться. Известно, что, если экссудация по каким-либо причинам снова начинается, то в соответствии с теорией регулирования ферментативной активности (теория катаболитной репрессии) синтез литических ферментов прекращается. Клетки фитопатогенного микроорганизма как минимум продолжают метаболизировать экссудаты, и «атака» на растение прекращается.

На основании результатов исследования можно сделать вывод о том, что, согласно теории о катаболитной репрессии, микроорганизм сначала потребляет более доступный субстрат, которым в данном случае являются экссудаты. Атака растения фитопатогеном начнётся только в случае недостачи или вовсе прекращения экссудации в результате переживаемого растением стресса. Разработанный метод исследования взаимодействия растений при учете непрерывной экссудации корневой системы позволил подтвердить эту гипотезу.

Результаты исследования использованы при создании органического удобрения «ВитАмин» (№ государственной регистрации 008(101)-20-3373-1).

ВЫВОДЫ

1. При изучении процесса экссудации корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет, выращиваемого в стерильных условиях, установлена динамика накопления органических компонентов и увеличения их концентрации в прикорневой зоне растения пропорционально приросту его зеленой массы. Определены основные компоненты экссудатов корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет, в составе которых преобладали органические кислоты – яблочная, лимонная и янтарная (до 60%). Показано, что при превышении концентрации экссудатов (до 450 мг/л ХПК) в прикорневой зоне растения огурца происходит снижение скорости накопления абсолютно сухой массы растения до 60 %. На основе полученных результатов предложен состав раствора, моделирующий основные компоненты экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет.

2. Изучены рост и развитие грибов *F. oxysporum* F2106 и *T. viride* F2001 (ВКПМ F1532) при метаболизме экссудатов (модельного раствора экссудатов) огурца при поверхностном и глубинном культивировании. Показано, что существуют различия в свойствах, таких как толщина гиф, скорость образования спор, разветвлённость мицелия, скорость радиального роста; в характеристиках – плотность колонии; секреции фитотоксичных метаболитов, а также их взаимодействии и проявлении антагонистической активности при поверхностном и глубинном культивировании и метаболизме экссудатов (модели раствора экссудатов) огурца по сравнению с ростом на стандартных питательных средах.

3. Разработан метод культивирования, включающий систему культивирования, состоящую из мембранного реактора для развития микроорганизмов на поверхности раздела фаз, моделирующего корневую систему и экссудацию. В данной системе исследованы процессы роста на поверхности полых мембран из фильтрующего целлюлозного материала при непрерывном подводе компонентов питания, моделирующих экссудаты огурца.

4. Исследован рост мицелия *F. oxysporum* F2106 и *T. viride* F2001 (ВКПМ F1532), а также мицелия *T. viride* F2001 (ВКПМ F1532) с внесением спор *F. oxysporum* F2106 в фазе лимитированного роста в разработанной системе половолоконного реактора с тупиковой подачей субстрата. Установлено, что после внесения спор *F. oxysporum* F2106 наблюдается их полный лизис, о чём свидетельствует увеличение активности протеолитических ферментов, предположительно секретируемых и выделяемых клетками *T. viride* F2001 (ВКПМ F1532), что косвенно подтверждает механизм ферментативного разрушения одних клеток другими при условии лимитированного роста на поверхности при недостатке питательных компонентов.

5. Проведена оценка влияния раствора модели экссудатов огурца на взаимодействие корневой системы растения огурца гибрида F₁ Атлет и клеток *F. oxysporum* F2106 на начальных этапах развития. Показано, что при внесении раствора модели экссудатов в прикорневую зону опытных растений *F. oxysporum* F2106 не проникал внутрь растений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

В изданиях, рекомендованных ВАК при МОиН РФ:

1) **А. А. Шагаев**, Н. А. Зеленова, Е. Н. Дмитриева, А. А. Белов, Н. С. Марквичев. Поверхностное культивирование грибов рода *Fusarium* и *Trichoderma* при непрерывном подводе компонентов питания // Бутлеровские сообщения. 2017. Т. 50. № 5. С. 65–72.

2) **A. Shagaev**, N. Behbudzada, A. Zhuravleva, O. Goryunova, and N. Markvichev. Cultivation of fungi crops on hollow cellulose tubes as a model of the root system of a plant. 20th International multidisciplinary scientific GeoConference SGEM 2020, NANO, Bio and green – Technologies for a sustainable future. — Vol. 6 of Advances in Biotechnology. Sofia, Bulgaria. 2020. P. 87–96. (Scopus) <https://doi.org/10.5593/sgem2020V/6.2/s08.12>

3) В. А. Писаревская, А. С. Журавлева, М. В. Минич, Бехбудзада Н.Б., **Шагаев А.А.**, Марквичев Н.С. Рост и взаимодействие штаммов *Trichoderma spp.* при различных температурах // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12, № 3. С. 417–423. (WoS, CAS)

4) **А. А. Шагаев**, А. С. Журавлева, Н. Б.-о. Бехбудзада, Марквичев Н.С. и др. Повышение продуктивности растительных экосистем регулированием уровня фитопатогенеза *Fusarium oxysporum* экссудатами корневой системы растений // Химическая промышленность сегодня. 2023. № 2. С. 7–12. (CAS)

В других изданиях:

5) **А. А. Шагаев**, В. В. Соколова, А. А. Самородова, Т. В. Балабанова, Е. Н. Дмитриева, Н. С. Марквичев. Исследование роста *Trichoderma viride* и *Fusarium oxysporum* на твёрдых

микробиологических средах, содержащих экссудаты растений огурца // Успехи в химии и химической технологии. 2016. Т. 30, № 9. С. 39–41.

6) **А. А. Шагаев**, Н. А. Зеленова, Е. Н. Дмитриева, Н. С. Марквичев, А. А. Белов Поверхностное культивирование грибов рода *Fusarium* и *Trichoderma* на целлюлозном носителе в непрерывных условиях // Успехи в химии и химической технологии. 2017. Т. 31, № 9. С. 17–19.

7) А. Г. Буланов, **А. А. Шагаев**, А. А. Белов, Н. С. Марквичев. Физиологические свойства резистентного штамма *Fusarium oxysporum* // Бутлеровские сообщения. 2019. Т. 57. № 2. С. 144–150.

8) А. С. Журавлева, **А. А. Шагаев**, О. Б. Горюнова, Н. С. Марквичев. Исследование особенностей развития *Fusarium oxysporum* на легко- и труднодоступном субстратах// Успехи в химии и химической технологии. 2020. Т. 34, № 11. С. 31–33.

9) **А. А. Шагаев**, Н. Б-о Бехбудзада, А. С. Журавлева, О. Б. Горюнова, Н. С. Марквичев. Почему именно ВитАмин? Препарат, который необходим всем // Гавриш. 2020. № 6. С. 52–55.

10) В. А. Писаревская, А. С. Журавлева, Н. Б. Бехбудзада, **А. А. Шагаев**, Н. С. Марквичев. Поверхностное культивирование грибов рода *Trichoderma* на средах, моделирующих экссудаты *Cucumis sativus* // Успехи в химии и химической технологии. 2021. Т. 35, № 12. С. 164–167.

11) **А. А. Шагаев**, Е. И. Беликова, О. Б. Горюнова, Н. С. Марквичев Поливной раствор - как важный фактор успешной работы салатной линии // Теплицы России. 2021. № 4. С. 20–23.

12) **А. А. Шагаев**, Е. И. Беликова, О. Б. Горюнова, Н. С. Марквичев. Управляй стрессом. ВитАмин // Гавриш. 2021. № 2. С. 63–67.

13) А. С. Журавлева, В. А. Писаревская, Н. Б.-О Бехбудзада, **А. А. Шагаев**, Н. С. Марквичев Оценка амилалитической и целлюлолитической активностей *Fusarium oxysporum* при поверхностном культивировании // Успехи в химии и химической технологии. 2021. Т. 35. № 12. С. 57–59.

14) А. С. Журавлева, В. А. Писаревская, М. В. Минич, Н. Б.-О Бехбудзада, **А. А. Шагаев**, Н. С. Марквичев. Исследование влияния метаболитов *Fusarium oxysporum* на прорастание семян огурца //Биохимическая физика: труды XXI ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-вузы. ИБХФ РАН Москва, 2022. С. 70–73.